

## 생후 5개월된 형질전환 암송아지에서의 인공 비유

김영훈 · 이창우\* · 한용만\*\* · 이경광\*\*\* · 조종기 · 신상태<sup>1</sup>

충남대학교 수의과대학, \*서울대학교 수의과대학,  
\*\*한국과학기술원 생명과학과, \*\*\*한국생명공학연구원 동물발생공학연구소

(게재승인: 2007년 6월 14)

### Artificial Induction of Lactation in 5 Month Old Transgenic Female Calf

Young-hun Kim, Chang-woo Lee\*, Yong-mahn Han\*\*, Kyung-kwang Lee\*\*\*, Jong-ki Cho and Sang-tae Shin<sup>1</sup>

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea, \*College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea, \*\*Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon 305-701, Korea, \*\*\*Center of Development and Differentiation, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea.

**Abstract :** The purpose of this study was premature induction of lactation in the transgenic calf to confirm the expression of human lactoferrin gene in the milk as early as possible. We performed the induction of lactation in 6 normal 1-month old calves and 3 normal and 1 transgenic 5-month old calves. In order to induction of lactation, 1-month old calf was injected with estradiol benzoate (0.2 mg/kg), 17-β estradiol cypionate (0.1 mg/kg) and progesterone (0.25-0.5 mg/kg) in every other day by 21 days. After 10 days cessation of administration, dexamethasone (0.028 mg/kg) was injected intramuscularly, however, lactation was failed. In the 5-month old calves, estradiol benzoate (0.2 mg/kg) and progesterone (0.5 mg/kg) were injected individually every other day during 21 days. After 10 days cessation of administration, dexamethasone (0.1 mg/kg) was injected intramuscularly and milk was lactated in the next day. Lactation was successfully induced in the 5-month old normal and transgenic calves and we confirmed the lactoferrin gene in the milk of transgenic calf. In conclusion, confirmation of human lactoferrin gene expressed in the milk of the transgenic calf was possible in 20 months earlier than in normal condition.

**Key words :** human lactoferrin, induction, lactation, transgenic calf.

## 서 론

최근 유전공학 및 동물발생공학 기술의 발달에 따라 형질전환동물(transgenic animal) 생산이 가능하게 되었다(21). 또한 이렇게 생산된 형질전환동물로부터 각종 인체 생리 활성 물질을 대량 생산하기 위한 연구가 급속히 발전하고 있다(11,12, 17). 특히, 유즙 분비에 관련된 유전자를 조작하여 유즙 성분을 변화시키거나 새로운 물질을 유선에서 분비하게 하는 연구가 진행되고 있다.

인체 생리 활성 물질을 대량 생산하기 위해서는 형질전환된 동물의 대량 번식이 필요하며, 번식된 후대 동물로부터 유전자 및 생리활성물질의 발현여부를 확인하는 것이 선행되어야 할 것이다. 동물마다 차이는 있겠지만 일반적으로 생체조직, 혈액, 유즙 등의 검사를 통해서 발현 여부를 확인할 수 있다. 그런데 대부분의 생체조직, 혈액 등은 동물이 생산

된 즉시, 검사가 이루어질 수 있지만, 유즙 검사는 유즙이 분비될 때까지 기다려야 한다. 유즙이 분비되려면 성숙이 되어 임신과 분만의 과정을 거쳐야만 되므로, 많은 시간과 노력이 요구된다. 또한 각 동물마다 성숙과 임신기간이 모두 달라 어떤 동물을 실험모델로 선택하는가에 따라 연구기간이 결정된다. 예를 들어, 암송아지가 성장하여 유즙이 분비되려면 성숙기를 거쳐 임신하고, 분만하기까지 최소한 24개월이 소요된다. 그러므로 소를 실험동물로 선택할 경우, 다른 동물에 비해 오랜 연구기간이 필요하다.

젖소의 인공비유에 관한 연구는 1970년에 많이 보고되었다. Collier 등(2), Fleming 등(7), Croom 등(3) 및 Fulkerson 등(8)은 미임신 Holstein 젖소에서 estradiol-17β, progesterone 및 dexamethasone을 이용한 비유유기를, Dabas 등(4)은 135~142개월 된 5마리의 불임우에 progesterone, estradiol 및 reserpine을 이용한 비유유기를 보고하였다. Nchare 등(14)은 10마리의 6~7개월된 송아지에 CIDR(Controlled Intravaginal Drug Release), progesterone과 estradiol-17β, hydrocortisone,

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : stshin@cnu.ac.kr

dexamethasone 등의 약물을 사용하여 하루 35-974 ml의 우유를 얻었다고 보고한 바 있다.

인간 lactoferrin은 여성의 유선조직에 분포하고 있으며, 철분이 결합된 단백질로서 철분을 화합하고 유리하는 중요한 기능을 하여 유즙 내 주요 항균성분으로 감염성 질병으로부터 방어 기능을 갖는다고 보고되고 있다(11).

본 연구는 우유에서 인간 lactoferrin을 대량 생산하는 형질전환 젖소(21) 정액으로 생산된 형질전환 암송아지에서 인공비유(induction of lactation)를 시도함으로써 유즙 내 인간 lactoferrin 발현 여부를 조기에 분석하고자 수행되었다.

**재료 및 방법**

**실험동물 및 사양관리**

실험에 사용된 총 10마리의 Holstein 암송아지는 생후 1개월령이 6마리 그리고 형질전환 송아지 1마리가 포함된 5개월령이 4마리였으며(Table1), 실험 전에 측정 한 이들의 체온, 호흡수, 맥박수, PCV, 혈액 도발 검사, 혈액 화학치 등은 모두 정상이었다. 생후 1개월령 송아지는 개체관리를 위해 hutch에서 사육하면서 생유 2kg을 하루에 2번 급여하고, 물과 건초는 자유 급식하였다. 생후 5개월령 송아지는 군(herd)으로 관리하면서 중 송아지 용 펠렛형 사료 1.5 kg씩 하루 2번 급여하고 역시, 물과 건초는 자유 급식하였다.

**약물**

인공비유를 위해 estradiol benzonate(에스론®, (주)삼양화학,

한국), 17-β estradiol cypionate(E8004, Sigma, 미국), progesterone (오바론®, (주)삼양화학, 한국; P0130, Sigma), dexamethasone(덱사손®, (주)이글벳, 한국) 등을 사용하였다. 호르몬제를 주사하기 위해 9-gauge needle과 3ml 일회용주사기를 사용하였고, 채유 시 20 ml 무균 tube를 사용하였다.

**생후 1개월 송아지에서 비유유기**

Fulkerson 등(8)의 방법에 따라 생후 1개월 된 암송아지 3두에 kg당 0.2 mg의 estradiol benzoate와 kg 당 0.5 mg의 progesterone을 격일로 양쪽 목부위에 11회 반복 주사하고, 10일간 휴약 기간을 가진 뒤 dexametason을 kg당 0.028 mg씩 4일간 매일 근육주사 하고, 그 다음날 채유를 시도하였다. 시도 후 비유 유기 반응이 좋지 않을 경우 Fleming 등(7)의 방법에 따라 생후 1개월된 암송아지 3두에 1차 시도에 사용했던 약물보다 약리작용이 더 강하다고 알려진 17-β estradiol cypionate를 kg당 0.1 mg 그리고 progesterone을 kg 당 0.25 mg씩 하루에 2번 피하주사하고, dexametason을 kg당 0.028 mg씩 4일간 매일 근육 주사한 뒤, 그 다음날 채유를 시도하였다.

**생후 5개월 송아지에서 비유유기**

Fulkerson 등(8)의 방법에 따라 5개월령의 정상 송아지 3두 및 혈액과 귀조직에서 인간 lactoferrin 유전자가 확인된 형질전환 송아지 1두에 estradiol benzoate를 kg당 0.2 mg과 progesterone kg당 0.5 mg을 격일로 양쪽 목 부위에 11회 반복 주사하고, 10일간 휴약 기간을 가진 뒤 dexametason kg당 0.028 mg씩 4일간 매일 근육주사 하고, 그 다음날 채유를 시도하였다.

**유기 비유된 우유의 분석**

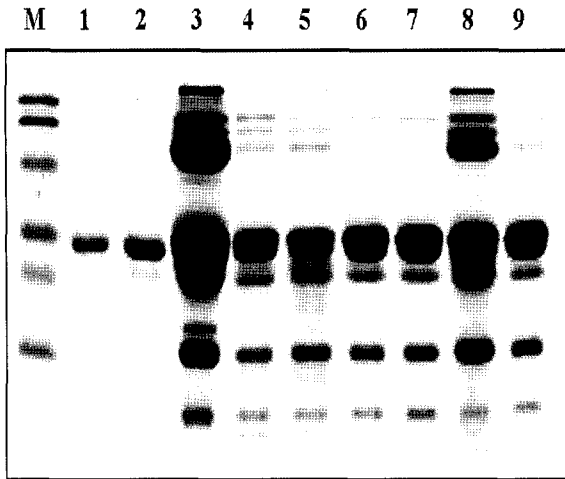
유기 비유된 우유와 정상 분만한 성우의 초유를 비교하기 위하여 육안검사와 Colostrometer™ (Biogenics Co., USA)을 이용하여 비중을 측정하였다. 채취된 우유는 냉동상태에서 원심분리를 실시하여 유청을 분리하고 우유 중 인간 lactoferrin의 존재 유무는 SDS-PAGE 방법(21)으로 확인하였



**Fig 1.** Udders and teats of 5-months of transgenic calf before (left) and after (right) artificial induction of lactation.

**Table 1.** Age and weight of calves

Heifers	Age(days)	Weight(kg)	Remark
A	21	48	
B	21	50	1st trial
C	22	50	
D	23	51	
E	30	55	2nd trial
F	31	55	
G	123	120	
H	128	125	Preliminary trial
I*	134	130	
J	143	140	Final trial



**Fig 2.** SDS-PAGE analysis of proteins in the milk. Lane M; size marker, Lane1-2; bovine  $\alpha$ -casein, Lane3; colostrum, Lane4; adult milk at 5<sup>th</sup> day after parturition, Lane 5-7; milk from transgenic calf at 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> day after induction of lactation, Lane8-9; milk from normal calf at 1<sup>st</sup> and 16<sup>th</sup> day after induction of lactation.

다. 유기 비유된 우유의 단백질을 알아보기 위해 유기 비유된 우유와 정상 분만한 성우 우유를 16일 동안 매일 채유하여 SDS-PAGE 방법으로 우유농도를 측정 비교하였다.

### 결 과

#### 생후 1개월 송아지에서 비유유기

생후 1개월령의 송아지에서 estrogen(estradiol benzoate 또는 17- $\beta$  estradiol cypionate), progesterone 및 dexamethasone 을 투여한 3마리의 송아지는 호르몬 투여 전에 비해 유두는 다소 커졌으나, 유방은 거의 발달되지 않았으며 3두 모두 채유를 시도하였지만 유기비유가 이루어지지 않았다.

#### 생후 5개월된 송아지에서 비유유기

생후 5개월 된 2마리의 정상 암송아지에서 비유유기를 시도한 결과 약물처치 전에 비해 유방이 현저히 발달되었으며 이 2마리의 송아지에서 dexamethasone 투여 다음날부터 성공적으로 채유가 가능하였다. 생후 5개월 된 형질전환 송아지 1마리와 대조군용 송아지 1마리에서 투약한 결과, Fig. 1에서와 같이 유선조직이 양호하게 발달되었고 우유를 채취할 수 있었다. 생산된 우유에서의 인간 lactoferrin 유전자 발현 여부 및 정상 우유와 단백질 농도를 비교하기 위해 하루에 10 ml씩 계속 채유하였다.

#### 유기 비유된 우유의 분석

유기 비유된 우유를 성우의 정상 초유와 육안적으로 비교해 본 결과, 정상적으로 분만한 성우의 초유는 황갈색으로 나타났고, 유기 비유된 우유는 흰색으로 나타났다. 또한 Colostrometer™ 로 우유의 비중을 측정해 본 결과, 정상적으

로 분만한 성우의 초유는 90.0이었고, 유기 비유된 우유는 10.0이었다. 일반적으로 정상 분만한 초유는 황갈색을 나타내고 점도가 아주 높아 끈적거리는데 비해 유기 비유된 우유는 일반 우유 수준 정도의 색깔과 점도를 가지고 있었다.

#### 인간 lactoferrin 유전자 확인 및 단백질 농도

SDS-PAGE 분석을 통해 유기 비유된 우유에서 유전자 확인 및 단백질 농도를 확인한 결과 Fig. 2에서와 같이 우유 내에서도 인간 lactoferrin 유전자가 발현됨을 확인하였다. 우유에서 단백질 농도를 비교한 결과 유기 비유된 우유의 단백질 농도가 성우의 초유와 비교하면 매우 낮으나, 5일 이후의 우유와는 비슷한 단백질 농도를 보였다.

### 고 찰

유선은 포유동물만이 가지고 있는 기관으로서 유방의 실질조직인 유선포계(alveolar system)와 유선관계(duct system)으로 나눌 수 있다(13). 유선포계는 유즙의 생성과 방출에 관여하고 유선관계는 유즙의 이동 통로의 역할을 한다. 그러므로 유즙이 분비되려면 무엇보다 유선조직의 발달이 필요하다(13). 소의 경우에는 약 8개월령에 도달했을 때, 뇌하수체의 LH함량이 감소하는 시기를 전후해서 성주기가 시작되는데, 성주기는 상피세포의 형태, 분비물 등 유선관계의 실질조직에 영향을 미친다(1,5,6). 성주기가 시작되어 뇌하수체 호르몬의 자극을 받아 난소에서 분비된 estrogen이 유선관의 발달을 촉진시키며 progesterone은 유선포계의 소엽(lobule)과 선포(alveolar)의 형성을 촉진한다(1,5,6).

형질전환 송아지에서 정상적으로 비유되기 전 estradiol과 progesterone을 처치하여 인위적으로 유선조직을 발달시켜, 조기에 인공비유를 유도하여 우유 내 lactoferrin 유전자 발현을 확인하기 위해 시도된 본 실험에서, 1개월 된 송아지에서 6마리는 인공비유가 성공되지 못했다. 호르몬 처치 후 이들의 유두는 다소 커졌지만, 유방은 거의 발달되지 않았다. 그러나 5개월 된 정상 및 형질전환 송아지에 시도된 실험에서는 모두 성공적으로 비유유기 되었으며, 유선조직이 잘 발달되어 지속적으로 채유 할 수 있었다.

소에서 인공비유에 관한 기존의 연구결과는 불임우(2,4,7,9,16,17,19,20), 성숙한 미경산우(8,10,19,20) 또는 6~7개월된 처녀소(14) 등에서 성공한 사례들만 있을 뿐이며 어린 송아지에 대한 보고는 찾을 수가 없었다. 따라서 본 실험에서 생후 1개월 및 5개월 령에서 비유유기를 시도한 결과 생후 5개월령의 어린 송아지에서도 비유유기가 가능함을 확인시켜 주었다. 즉 태어난 지 5개월 정도면 estradiol과 progesterone에 의해 유선조직이 충분히 발육될 수 있음을 알 수 있었다. 그러나 1개월령 송아지는 이들 호르몬이 유방의 발육을 유도하지 못하였다. Nchare 등(14) 6~7개월 된 처녀소에서 인공비유를 성공시켰으며 이 결과는 차후 어린 동물에서 인공비유를 통해 우유 내 유전자 발현 여부를 확인함으로써 형질전환 동물 여부를 조기에 확인하는데 이용될

수 있을 것이라고 하였다.

본 연구 결과 5개월령의 어린 형질전환 젖소로부터 인공 비유를 성공하였으며, 채취된 우유로부터 인간 lactoferrin 유전자가 삽입되었는지를 확인하였다. 이는 우유에서 인간에게 유용한 물질을 생산할 수 있는 bioreactor로서의 형질전환 젖소의 성공 여부를 조기에 판정할 수 있어 향후 형질전환 동물 연구의 생산 효율성을 높일 수 있으리라 사료된다.

## 결 론

우유로부터 인간 lactoferrin을 대량 분비할 수 있는 형질전환 중모우의 정액으로 생산한 5개월 된 1세대 형질전환 암송아지에서 인공비유를 시도하여 우유 내 인간 lactoferrin 유전자 발현 여부를 조기에 확인 할 목적으로 본 실험을 수행하였다. 생후 1개월 된 송아지에 2차에 걸친 인공비유 시도에서는 비유유기 되지 않았으나 생후 5개월 된 송아지에 시도한 예비실험에서는 성공적으로 비유유기 되어 채유가 가능하였다. 우유를 채유하여 먼저, 인간 lactoferrin 유전자 발현을 확인하였고, 우유 내 단백질 농도를 측정하여 성우의 정상 우유와 비교해 본 결과, 성우의 정상 초유보다는 농도가 아주 낮았으나, 분만 5일째 우유부터는 거의 같은 수준이 유지되므로 정상우유와 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 결론적으로, 5개월 된 형질전환 송아지에서 호르몬을 처치하여 인공비유를 성공시켜 분만 등의 과정을 거친 정상적인 상태에서 보다 20개월 이상 더 빨리 인간 lactoferrin 유전자를 확인할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- Akers RM, Bauman DE, Capuco AV, Goodman GT, Tucker HA. Prolactin regulation of milk secretion and biochemical differentiation of mammary epithelial cells in periparturient cows. *Endocrinology* 1981; 109: 23-31.
- Collier RJ, Croom WJ, Bauman DE, Hays RL, Nelson DR. Cellular studies of mammary tissue from cows hormonally induced into lactation: lactose and fatty acid synthesis. *J Dairy Sci* 1976; 59: 1226-1231.
- Croom WJ, Collier RJ, Bauman DE, Hays RL, Nelson DR. Cellular studies of mammary tissue from cows hormonally induced into lactation: histology and ultrastructure. *J Dairy Sci* 1976; 59: 1232-1246.
- Dabas YP, Sud SC. Induction of lactation in cattle with estradiol 17-beta and progesterone primed progesterone. *Indian J Exp Biol* 1989; 27: 774-776.
- Delouis G, Djiane J, houdebine LM, Terqui M. Relation between hormones and mammary gland function *J Dairy Sci* 1980; 63: 1492.
- Erb RE. Hormonal control of mammogenesis and onset of lactation in cows-a review. *J Dairy Sci* 1977; 60: 155.
- Fleming JR, Head HH, Bachman KC, Becker HN, Wilcox CJ. Induction of lactation: histological and biochemical development of mammary tissue and milk yields of cows injected with estradiol-17 beta and progesterone for 21days. *J Dairy Sci* 1986; 69: 3008-3021.
- Fulkerson WJ. Artificial induction of lactation in maiden heifers. *Theriogenology* 1997; 8: 136.
- Gupta N. Induction of lactation in a cross bred cow-a case report. *The Indian veterinary journal* 2003; 80: 447-448.
- Hooda OK, Kaker ML, Dhanda OP, Galhotra MM, Razdan M N. Induction of lactation and retroductive response in non-producing buffalo heifers folloing steroid hormone treatment. *Asian Austrian journal of animal science* 1997; 10: 519-522.
- Kim SJ, Lee KW, Yu DY, Han YM, Lee CS, Nam MS, Moon HB, Lee KK. Expression analysis of a bovine  $\alpha$ -casein/human lactoferrin hybrid gene in transgenic mice. *J Reproduction and Development* 1997; 43: 143-149.
- Lee CS, Kim KJ, Yu DY, Lee KK. An efficient production of human growth hormone in the milk of transgenic mice using rat  $\beta$ -casein/hGH fusion genes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1996; 56: 211-222.
- Munford JE. A review of anatomical and biochemical changes in the mammary gland with particular reference to quantitative methods of accessing mammary development. *J Dairy Sci Abstr.* 1964; 26: 293
- Nchare A, Salaheddine M, Desbuleux H, Sulon J, Beckers JF. Artificial induction of lactation in heifers aged 6 to 7 months. *Annals de medicine veterinaire* 2001; 145: 365-372.
- Sinh M, Kumar P. Natural induction of lactation. *Indian veterinary journal* 1994; 7: 405.
- Sharma A, Kishtwaria RS, Gupta N. Artificial induction of lactation in a crossbred cow-a case report. *Indian journal of veterinary medicine* 2001; 21: 53.
- Smith KL, Redman DR, Schanbacher FL. Efficiency of 17  $\alpha$ -estradiol and progesterone treatment to initiate lactation in infertile cows. *J Dairy science* 1973; 56: 657.
- Sohn BH, Kim SJ, Park HG, Park SK, Lee CS, Hong HJ, Park YS, Lee KK. Expression and characterization of bioactive Human Thrombopoietin in the milk of transgenic mice. *DNA and Cell Biology* 1999; 18: 845-882.
- Verma HK, Takkar OP, Pangaonkar GR, Sidhu SS. Artificial induction of lactation in crossbred cattle. *Indian journal fo dairy science* 1994; 47: 912-914.
- Willett LB, Smith KL, Schanbacher FL. Hormone induced lactation in the bovine III. Dynamics of injected endogenous hormones. *Purdue agricultural experiment station journal* 1975; 22: 53-75.
- 한용만, 김선정, 유대열, 박정선, 이철상, 정상균, 박인영, 손보화, 최영희, 남명수, 이훈택, 정병현, 정길생, 고대환, 김영훈, 양철성, 유옥준, 이경광. 락토페린을 우유에서 생산하는 형질전환 젖소의 개발에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 1996; 20: 371-378.