

복분자 추출물을 돼지의 비장 면역세포에 처리시 cDNA Microarray를 이용한 유전자 발현분석

정정수* · 최영숙* · 임희경** · 오윤길** · Prabhat Kumar Mandal*** · 최강덕***

충북대학교 축산학과*, 한경대학교 생물환경, 정보통신전문대학원**, 한경대학교 생명공학부***

cDNA Microarray Analysis of Gene Expression in Pig Spleen Lymphocytes in Response to Extract of Raspberry

Chung Soo Chung*, Youngsook Choi*, Heekyong Lim**, Baatartsogt Oyungerel**, Prabhat Kumar Mandal*** and Kangduk Choi***

Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763*, Graduate School of Biotechnology & Information Technology, Hankyong National University, Gyeonggi 456-749**, School of Biotechnology, Hankyong National University, Ansung-city, Korea, 456-749***

ABSTRACT

The present study was undertaken to investigate specific immune response of *Rubus coreanus* Miquel (raspberry) in pig spleen lymphocytes and gene expression induced by the extracts of raspberry using gene chip technology. The 70% ethyl alcohol extracts of raspberry were treated to pig spleen lymphocytes. The extracts of raspberry stimulated the proliferation of splenocytes and increased the population of CD3 & CD4 T-cells and B-cells in pig spleen lymphocytes. The extracts of raspberry improved immune response by increasing the viability of splenocytes. In microarray study we found eight genes were significantly up-regulated by the extracts of raspberry in pig splenocytes, including genes known to be involved in cell structure and immune response, particularly microtubule-associated protein 4, cytoplasmic dynein heavy chain, tumor necrosis factor alpha, lymphotoxin-beta receptor precursor. However, ten genes were down-regulated by the extracts of raspberry treatment.

(Key words : Raspberry, Pig, Lymphocyte, Microarray, Gene expression)

I. 서 론

최근 국민소득의 증가와 함께 육류 등 축산물 소비가 크게 증가하였다. 한편, 항생제 잔류문제 등 축산식품의 안전성 및 동물성 지방의 과다 섭취에 의한 성인병 발생에 대한 우려가 커지게 되었다. 이에 대해 소비자의 안전하면서도 지방이 적은 축산물 및 기능성 축산 제

품에 대한 요구가 증가하고 있다. 이러한 사회적 기대에 따라 천연물질로부터 다양한 생리활성 효과를 갖는 물질을 탐색하고 이를 기능성 사료로 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다.

복분자(raspberry)의 학명은 *Rubus coreanus* Miquel이고 장미과에 속하고 산딸기로 알려져 있다. 복분자는 덜 익은 산딸기를 일컬으며 빨

Corresponding author : Kangduk Choi, School of Biotechnology, Hankyong National University, Ansung-city, Korea, 456-749, Korea.
Tel: 82-31-670-5422, Fax : 82-31-675-5331, E-mail : kchoi04@hknu.ac.kr

강게 익은 것은 약효가 적다고 한다. 흔히 민간요법에서는 신장의 기능을 보강하고 정력을 돕는 것으로 알려져 있으며 간 손상을 보호하고 눈을 밝게 하며 이뇨제의 효능이 있다 (Kim과 Lee, 1991), 복분자의 위의 기능 이외에 광범위한 작용이 보고되었으며 (Shin 등, 2003), 특히 최근에 와서는 사람의 면역 활성화에 영향을 미친다고 보고된 바 있으나 (김 등, 2006), 이 같은 작용이 돼지에게 나타나는지는 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 복분자가 돼지의 면역 활성화에 미치는 영향을 구명하고자, 복분자 추출물을 돼지 비장 백혈구에 처리 하였을 때 일어나는 유전자 발현 변화를 microarray 기법을 사용해서 관찰하였다. 본 연구의 결과는 복분자가 돼지 사료 첨가제로 활용될 가능성을 제시해 줄 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 비장의 면역세포 배양

어린 새끼돼지 (3 kg)의 비장을 PBS (Sigma-Aldrich, USA) 용액과 함께 으깨어 적정량을 15 ml centrifuge tube에 넣은 후 3 ml Histopaque (Sigma-Aldrich, USA) 용액을 넣어 층이 생기게 하였다. 2,500 rpm에서 30분간 원심분리 한 후 중간의 백혈구 층을 따내어 PBS (Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 2회 세정 한 뒤 RPMI (Gibco, USA)로 적정 수의 세포를 희석한 후 37°C의 5% CO₂ incubator에서 배양 하였다.

2. 복분자 추출액

본 실험에 사용한 복분자 (*Rubus coreanus* Miquel)는 2003년 6월에서 7월 사이 고창군에서 개화 후 18일 경과된 미숙과를 이용하였다. 시료 70 g을 70% ethanol 200 ml로 50°C에서 환류추출하였다. 추출액은 감압여과한 후 유기용

매가 완전히 휘발될 때까지 감압농축하고 14,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 100 ml로 정용한 후 1 ml씩 마이크로튜브에 나누어 냉동보관했다.

3. 면역세포의 MTT assay

돼지의 비장으로부터 분리한 면역세포에 복분자는 50 ug/ml, ConA는 10 ug/ml로 처리 한 후 37°C의 5% CO₂ incubator 48시간 동안 배양 하였다. 배양 한 후에는 MTT (Sigma-Aldrich, U.S.A)를 0.01 g/ml의 농도로 배지에 녹인 후 배지 1 ml당 100 ul를 처리 하였다. 다시 37°C 5% CO₂ incubator에서 3시간 동안 반응을 시켜 MTT formazan 환원을 유도한 뒤 MTT를 처리한 배지를 모두 제거했다. Acid isopropanol을 배지 1 ml당 500 ul를 처리하여 MTT formazan을 용해 시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Schat와 Shek, 1984).

4. FACS를 이용한 면역세포 분석

돼지의 혈액을 채취 한 뒤 RBC lysis buffer를 이용해 적혈구를 제거하였다. 적혈구가 제거 된 혈액은 PBS로 3회 세정 한 뒤 원심분리를 하여 세포만을 모은 후 다시 PBS 100 ul를 넣어 희석하여 주었다. 각 처리군마다 항체는 대조군으로 IgG1을 사용하였고 실험군으로 CD4a-RPE (CD4 T cell marker), CD8a-FITC (CD8 T cell marker)를 사용하였다. Antibody를 충분히 반응시킨 후 PBS로 1회 세정하여 주고 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)를 이용하여 분석하였다.

5. cDNA microarray 실험 방법

(1) RNA 분리

Lymphocytes를 분리한 후 복분자를 50 ug/ml로 처리하여 4시간 후 세포를 모은 후 total

RNA는 TRIzol™ (Life Technologies Ltd., MD)과 RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 분리 및 정제하였다. 추출한 RNA를 Spectrophotometry 방법으로 260 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. Total RNA는 실험 전까지 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

(2) cDNA 합성 및 cDNA 혼성화와 세척

각각의 Total RNA 1 µg에 대조군에는 Cy3 Primer를, 실험군에는 Cy 5 primer를 각각 1 µl씩 넣고 80℃에서 5분간 반응 시킨 후 ice에 둔다. 5× SuperScript II First Strand Buffer 2 µl, dNTP mix 0.5 µl, Superase-In RNase Inhibitor 0.5 µl 및 reverse transcriptase 0.5 µl를 넣고 42℃에서 2시간동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 반응을 중단시키기 위해 1M NaOH/100 mM EDTA를 넣고 65℃에서 10분간 반응시켜 RNA를 분해시켰다. 그 후 2M Tris HCl (pH 7.5)를 넣어 중화 시킨 후 cDNA Hybridization에 이용하였다. 합성된 대조군 cDNA 12.7 µl와 실험군 cDNA 12.7 µl를 새 tube에 넣고 2× Enhanced cDNA Hybridization buffer 27.4 µl, LNA dT Blocker 2 µl를 넣어 cDNA Hybridization Mix를 만든 후 75℃에서 10분간 반응시켰다. 14,688개 유전자를 함유한 Porcine DNACHIP을 미국 아이오와 대학의 Dr. Rothschild로부터 구입하여 실험을 수행하였다. 이 칩은 7,000여 개의 미지 유전자가 포함되어 있으며 70mer oligonucleotide spotted arrays여서 60℃에서 16시간 반응시켰다.

반응이 끝난 microarray를 prewarmed 2× SSC, 0.2% SDS wash buffer에 5 min 정도 둔 후 coverslip을 제거하고 42℃로 데워진 2× SSC, 0.2% SDS wash buffer로 20분간 세척한 후 2× SSC wash buffer로 20분간 세척하였다. 마지막으로 0.2× SSC Wash buffer로 20분간 세척하였다.

(3) 3DNA Hybridization and Wash

3DNA Array 900 Capture reagent Cy3 2.5 µl,

Cy5 2.5 µl와 2× SDS-Based Hybridization buffer 27.5 µl, Anti-Fade reagent를 0.275 µl 혼합하여 3DNA Hybridization mix를 만들었다. 3DNA Hybridization mix를 75℃에서 10분간 반응시킨 후 prewarmed microarray에 올리고 microarray를 dark humidified chamber에 넣고 60℃에서 5시간 반응시켰다. 반응이 끝난 microarray를 prewarmed 2× SSC, 0.2% SDS wash buffer에 5 min 정도 둔 후 coverslip을 제거하고 42℃로 데워진 2× SSC, 0.2% SDS wash buffer로 20분간 세척한 후 2× SSC wash buffer로 20분간 세척하였다. 마지막으로 0.2× SSC Wash buffer로 20분간 세척하였다. 3DNA Hybridization는 암실에서 실험하였다. microarray에 부착된 fluorescent dyes의 산화를 막기 위해 microarray 표면에 DyeSaver2를 뿌려주어 coating하였다.

(4) Signal detection 및 cDNA microarray data의 분석

ScanArray 4000 (GSI Lumonics, U.S.A)을 이용하여 Cy3는 550 nm의 파장에서 scan하였고 Cy5는 650 nm의 파장에서 scan하여 fluorescent images를 얻었다. 결과 분석은 GenePix 6.0 software를 이용하여 일자별 이미지를 얻었고 각 spot의 intensity는 background intensity를 제거한 median 값으로 취하였다. Vector Xpression 3.0을 이용하여 M-A로 보정 후 다시 Lowess normalization을 통하여 각 단계별 M 값이 1 이상 또는 -1 이하의 유전자들이 어떠한 양상을 보이는지 살펴보았다.

M-A normalization

$$M_i = \log_2 \left(\frac{cy5i}{cy3i} \right) \text{ (where } 1 \leq i \leq 14688 \text{)}$$

$$A_i = \sqrt{\log_2(cy5i \times cy3i)} \text{ (where } \leq i \leq 14688 \text{)}$$

Lowess (Locally Weighted Linear Regression) normalization

$$\log_2(Ti)' = \log_2(Ti) - y(\xi)$$

$$= \log_2(Ti) - \log_2(2^{y(\xi)})$$

$$= \log_2 \left(\frac{Ti}{2^{y(\xi)}} \right) \quad \text{where } \begin{cases} Ti = \frac{cy5i}{cy3i} \\ y(x_i) \text{ is function of ratio on intensity} \end{cases}$$

6. 통계분석

처리 간 차이를 비교 분석하기 위하여 SAS package program (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)을 이용하여 ANOVA 검정분석법으로 처리 평균간 유의성 검증을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

160여종의 식물 추출물 중에 MTT assay를 통하여 면역세포활성이 뛰어난 것을 골랐다. 복분자는 복강 macrophage로부터 nitric oxide의 생성 및 phagocytic activity를 억제하고, TNF- α 의 생성을 증가시켜 비특이적 면역반응을 조절하는 기능을 갖고 있으며, 미숙과가 완숙과에 비해 효과가 더 강하다 (Won 등, 2003) 본 실험에서 면역활성 효과를 보기 위해 돼지 비장으로부터 면역세포를 분리한 후에 복분자 추출액을 첨가하였을 때 좋은 결과를 보여 주었다 (Fig. 1). 대조구에 비해 4.5배 정도 ConA 보다 1.5배 정도의 세포분열활성 효과를 보여주었다 ($p < 0.05$). 면역세포의 어떤 종류에 영향을 주는 지 알아보기 위하여 이 추출물을 돼지의 면역세포에 50 ug/ml 농도로 처리한 후 24시간 후 세포 구성의 변화를 flowcytometry를 이용하여 측정하였다. 복분자를 처리한 샘플에서 CD3 T

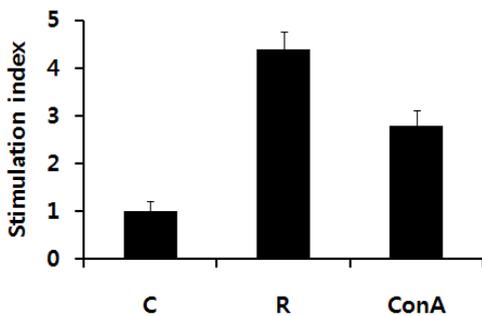


Fig. 1. Demonstration of the nature of Raspberry stimulation of spleen lymphoblasts. C; control, R; Raspberry, ConA; Concanavalin A ($p < 0.05$).

세포가 36에서 38%로 증가하였으며 CD4 T 세포는 8에서 9%로, B세포는 8에서 10%로 각각 증가함을 볼 수 있었다 (Fig. 2). 복분자는 다양한 생리활성을 갖고 있다는 것이 잘 알려져 있다 (정, 2001). 복분자의 기능을 DNA microarray 방법을 이용하여 유전자와의 관계를 탐색하여 기능을 탐색하고 작용 기작을 알아보았다.

cDNA microarray를 분석한 결과를 M-A plot으로 표시하였을 때 데이터의 분포가 상당히 정상적인 분포를 보여 주었고 (Fig. 3), Lowess 방법으로 data를 보정하여 이후에 선별된 유전자를 표로 정리하였다. 복분자추출물을 면역세포에 처리시 2배 이상 발현이 증가하는 유전자는 8개의 유전자가 있었으며 다음과 같다 (Table 1).

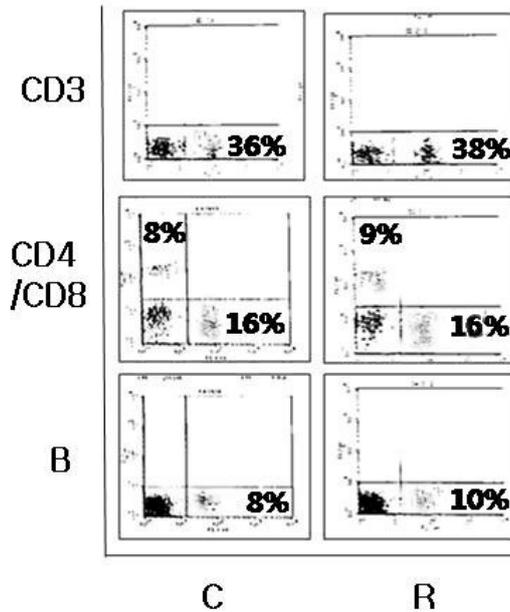


Fig. 2. Representative dot plot profiles of pig leukocytes labeled with anti-B-FITC (B cell marker), anti-CD4a-RPE (CD4 T cell marker) and anti-CD8a-FITC (CD8 T cell marker). Each percentage indicates leukocyte subpopulation in pig spleen lymphocyte after treatment of 50 ug/ml Raspberry. C; control, R; Raspberry.

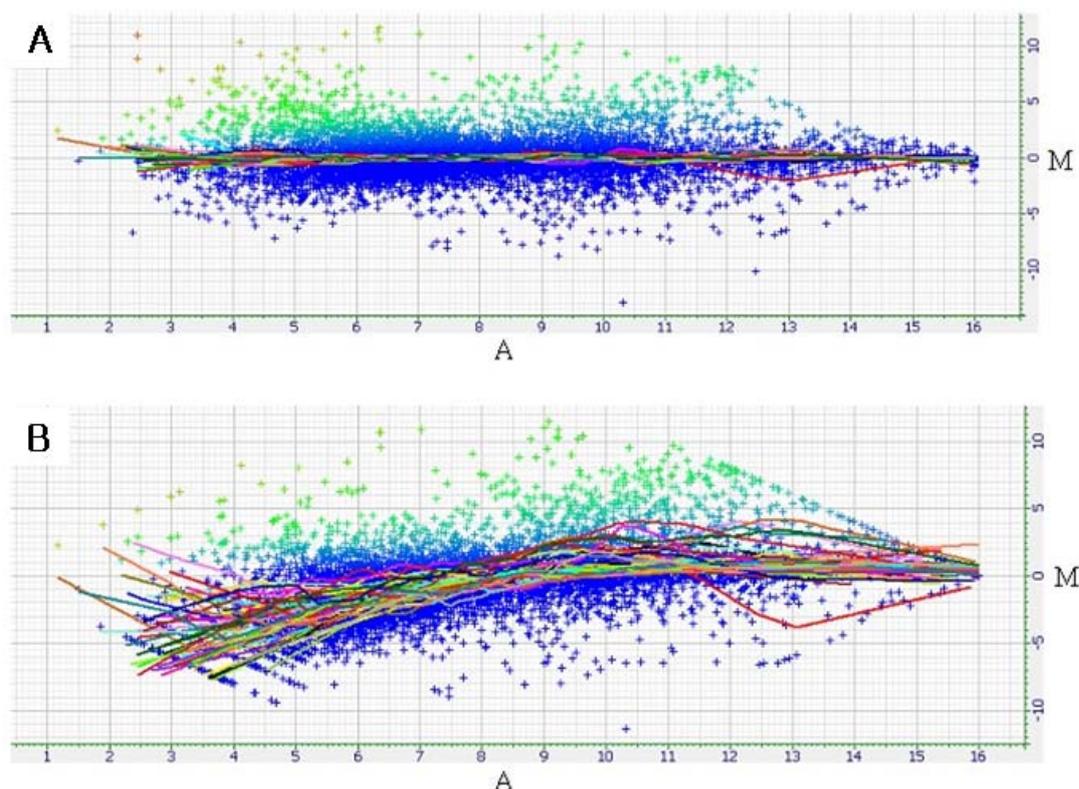


Fig. 3. Scattered plot of the normalization results by Lowess method (a) M-A plot, (b) Lowess M-A plot.

Table 1. Changes in up-regulated gene expression by treatment of raspberry extract to pig spleen lymphocytes

Gene	Protein DB	Function	Ratio
Microtubule-associated protein 4 (MAP 4)	P36225	Stimulation of polymerization and stabilization of microtubule	16.11
Cytoplasmic dynein heavy chain	BAA97048.1	Intracellular motility, including retrograde axonal transport, protein sorting, organelle movement, and spindle dynamics	4.32
Metallothionein isoform	BAA19178	Detoxification of heavy metals	2.75
Vascular cell adhesion molecule	NP_999056	Mediation of the adhesion of monocytes and lymphocytes	2.53
Tumour necrosis factor alpha	CAA38693	Production of the endogenous second messenger, sphingosine. Induction of cardiac cell death	2.42
Transcription factor jun-B.	P17275	Regulation of output signal	2.35
Myxovirus resistance protein 1	NP_999226	Antiviral activity against influenza virus infection	2.06
Lymphotoxin-beta receptor precursor.	P50284	Immunologic reactions by cell-cell contact	2.03
Kruppel-like factor	AAF13295.1	Transcriptional activator that directs high-level expression of the adult beta-globin promoter	2.00

Table 2. Changes in down-regulated gene expression by treatment of raspberry extract to pig spleen lymphocytes

Gene	Protein DB	Function	Ratio
MCM10 homolog	BAB18723	Cell division	0.48
Protegrin	2013229A	Antimicrobial peptide	0.48
Period circadian protein 1	O35973	Neurodegenerative spongiform encephalopathies	0.45
GTP-binding protein RhoD	O00212	Muscle differentiation	0.45
Ceramide glucosyltransferase	AAK29448.1	First glycosylation step in glycosphingolipid biosynthesis	0.44
L-serine dehydratase	P20132	Deamination of L-serine and L-threonine to yield pyruvate or 2-oxobutyrate	0.41
C-X-C chemokine receptor type 4	P56498	Acts with the CD4 protein to support HIV entry into cells and is also highly expressed in breast cancer cells	0.39
Faciogenital dysplasia protein 2	AAC35430.1	Aarskog-Scott syndrome	0.38
Leukocyte surface antigen CD53	P19397	Regulation of cell development, activation, growth and motility	0.30
Osteopontin precursor	AAA41762	Important factor in bone remodeling	0.03

복분자는 세포분열 또는 세포의 운동성에 관련된 microtubule-associated protein 4, cytoplasmic dynein heavy chain 유전자의 발현을 증가시켜 세포활성을 증가시키며 (Chapin과 Bulinski, 1993; Vaisberg 등, 1996), 급성면역반응에 대해 cytokine 분비 유도하는 tumor necrosis factor alpha (Old, 1985)와 influenza 바이러스 감염 시 항바이러스 기능과 관련된 myxovirus resistance protein 1 (Muller 등, 1992) 유전자의 발현을 증가시켜 질병 저항성을 증가시키는 기능을 가질 것으로 사료된다. 스트레스단백질, 중금속, 항암제 등에 의해 유도하는 metallothionein-isoform 유전자를 증폭시켜 폐지가 외부 자극에 잘 극복하고 건강하게 자랄 수 있게 도와준다 (Kumari 등, 1998) 또한 내피세포가 염증성 cytokine에

의해 활성화되었을 때 발현이 증가되는 세포부착단백질 (vascular cell adhesion molecule) 유전자를 증가시켜 항염증 기능을 가질 것으로 생각된다 (Pepinsky 등, 1992). 2배 이하로 감소되는 유전자는 10개의 유전자가 선별되었으며 다음과 같은 기능을 가질 것으로 생각된다 (Table 2). 포유류 유래 항미생물 펩타이드인 protegrin의 발현을 감소시키고 (Khandeliad와 Kaznessis 등, 2007) glycosphingolipids 합성시 glycosylation 단계에 필요한 ceramide glucosyltransferase 유전자의 발현을 감소 시켰다 (Paul 등, 1996). osteopontin precursor의 발현을 감소시킴으로써, 석회화작용을 감소시키며 이는 요로결석을 줄이는 결과를 줄 수 있으며 (Kleinman 등, 1995) 또한 조골세포와 활골 세포에서 hydroxyapatite

의 생성 억제를 저해하여 석회화를 억제하며 신결석의 형성에 대해 방어적인 역할을 할 것으로 생각된다. 호중구를 염증 부위에 끌어들이는 기능이 있는 C-X-C chemokine receptor type 4의 발현을 감소시켜 염증을 완화시키는 역할을 할 것으로 생각된다(Eddleston 등, 2002). Microarray 실험을 통해 선별된 유전자들은 RT-PCR 방법을 통해 재차 확인이 필요하다. 본 실험을 통해 복분자가 면역세포에 가해졌을 때, 그 발현수준이 변화되는 유전자들이 분석되었으며 이는 잠재적으로 복분자에 대한 생체 작용기전을 규명하는데 유전학적 자료를 제공하며, 복분자를 여러 가지 질병 현상에 대한 치료 효과를 잠재적으로 연구 개발하는데 활용될 수 있다.

IV. 요약

본 연구에서는 복분자(라즈베리)의 돼지 비장 임파구에 대한 면역 반응을 조사하였다. 복분자의 70% 에틸 알코올 추출물을 돼지 비장 임파구에 처리하였다. 복분자의 추출물은 비장 면역세포의 증식을 촉진하였으며, 복분자(라즈베리)의 추출물은 돼지 비장 임파구에 대해 CD3-T 세포, CD4-T 세포와 B 세포의 구성분을 증가시켰다. 복분자 추출물은 비장 임파구 세포의 활력을 증가시킴으로써 면역반응을 향상시켰다. 본 연구에서 우리는 돼지 비장세포에 복분자 추출물을 처리한 결과 8개의 유전자 발현이 증가되었음을 확인했는데, 이들 중에는 세포구조와 면역반응에 관여하는 유전자가 포함되었다. 특히 microtubule-associated protein 4, cytoplasmic dynein heavy chain, tumor necrosis factor alpha, 및 lymphotoxin-beta receptor precursor 유전자 발현이 증가되었다. 한편 10개의 유전자는 복분자 추출물에 의해 그 발현이 감소되었다.

V. 사 사

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발 사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

VI. 인용 문헌

1. Chapin, S. J. and Bulinski, J. C. 1993. Microtubule stabilization by assembly-promoting microtubule-associated proteins: a repeat performance. *Cell Motil. Cytoskeleton* 23(4):236-243.
2. Eddleston, J., Christiansen, S. C. and Zuraw, B. L. 2002. Functional expression of the C-X-C chemokine receptor CXCR4 by human bronchial epithelial cells: regulation by proinflammatory mediators. *J Immunol.* 169(11):6445-6451.
3. Khandelia, H. and Kaznessis, Y. N. 2007. Structure of the antimicrobial beta-hairpin peptide protegrin-1 in a DLPC lipid bilayer investigated by molecular dynamics simulation. *Biochim Biophys Acta.* 1768(3):509-520.
4. Kim, H. C. and Lee, S. I. 1991. A comparative study on the health effect of *Rubus coreanum*, *J. Herabal.* 6:3-11.
5. Kleinman, JG., Beshensky, A., Worcester, EM. and Brown, D. 1995. Expression of osteopontin, a urinary inhibitor of stone mineral crystal growth, in rat kidney. *Kidney Int.* 47:1585-1596.
6. Kumari, M. V., Hiramatsu, M. and Ebadi, M. 1998. Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radical Research* 29(2):93-101.
7. Muller, M., Winnacker, E. L. and Brem, G. 1992. Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: new members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins. *J Interferon Res.* 12(2):119-129.
8. Old, L. J. 1985. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230(4726):630-632.
9. Paul, P., Kamisaka, Y., Marks, DL. and Pagano, RE. 1996. Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes

- the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis. Proc Natl Acad Sci. U S A. 93(10): 4638-4643.
10. Pepinsky, B., Hession, C., Chen, L. L., Moy, P., Burkly, L., Jakubowski, A., Chow, E. P., Benjamin, C., Chi-Rosso, G. and Luhowskyj, S. 1992. Structure/function studies on vascular cell adhesion molecule-1. J Biol Chem. 5:267(25): 17820-17826.
11. Schat, K. A. and Shek, W. R. 1984 Separation of cytotoxic lymphocytes against marek's disease lymphoblastoid cell line on percoll gradients. Avian Path. 13:439-478.
12. Shin, K. S., Park, P. J., Boo, H. O. and Ko, J. Y. 2003. Chemical components and comparison of biological activities on the fruit of natural bogbunja. Korean J Plant Res 16:109-117.
13. Vaisberg, E. A., Grissom, P. M. and McIntosh, J. R. 1996. Mammalian cells express three distinct dynein heavy chains that are localized to different cytoplasmic organelles. J. Cell Biol. 133(4):831-842.
14. Won, K. S., Lee, T. W., Eun, T. S. and Song, J. M. 2003. Effect of Rubus coreanus Miquel on the specific immune response in mice, Korean J. Oriental Physiol. Pathol. 17:656-661.
15. 김정화, 김철희, 김효성, 권민철, 조성연, 송영규, 이현용. 2006. 복분자, 당귀, 마황 분획물의 면역 활성 및 항스트레스 활성 증진 공정. 한국작물학회. 학술대회지 524-525.
16. 정영란. 2001. 일부 한약재가 면역반응 조절에 미치는 영향. 순천대학교 생물학과 석사학위논문.
(접수일자 : 2008. 10. 6. / 수정일자 : 2008. 12. 5. / 채택일자 : 2008. 12. 19.)