

바이오장기 연구를 위한 이동식 아이솔레이터 내 복제 미니 돼지의 생리 활성 평가

김해성, 전유별, 광성성, 정승아, 정의만, 현상환*, 정의배

충북대학교 수의과대학

Physiological Evaluation of Cloned Mini-pigs in a Transportable Isolator for the Study of Xenotransplantation

Hae-Sung Kim, Yu-Byeol Jeon, Seong-Sung Kwak, Seung-A Jeong, Eui-Man Jung, Sang-Hwan Hyun* and Eui-Bae Jeung

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

ABSTRACT

The present study investigated the physiological evaluation of cloned mini-pigs in a transportable isolator. Transportable isolator was designed and manufactured by our research team for transporting gnotobiotic pig. Until now, no previous reports are available regarding the physiological activities and harmful effects when pigs were transported in this isolator. Five cloned mini-pigs of 1~2 year (s) old female with a body weight between 80~90 kg were used. The effects of transportable isolator on stress-related hormone, adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisol levels, and heart rate were evaluated. In addition, it was also examined the effects of transportable isolator on blood chemistry factors (alanine aminotransferase: ALT, aspartate aminotransferase: AST, blood urea nitrogen: BUN, glucose, and creatinine). Blood was sampled just before the beginning of transport (T0), at the end of transport (30min after the transport; T1), and 30 min after the end of transport (T2). At the same time, heart rate was also evaluated. As a result, heart rate had no significant ($p>0.05$) differences at the various-time points of study (T0, T1, T2). However, heart rate was slightly higher than normal range in T1 and T2. The ACTH level was higher than normal range. Whereas, the cortisol level was lower than normal range. There were no statistical significant differences both ACTH and cortisol level between different time groups. Also, there were no significant differences in blood chemistry factors. Therefore, our present study shows that transportable isolator has no harmful effect on stress and physiological condition in cloned mini-pigs.

(Key words : transportable isolator, cloned pigs, stress hormone, physiological evaluation)

서 론

생명공학 연구 분야는 급속도로 눈부신 발전을 이루었으며, 이에 부합하는 무균 동물의 생산이 요구되었다. 1960년대 파스퇴르 연구소, Notre Dame 대학 및 Lund 대학에서 초기 무균 동물 연구가 시작되었고, 이에 따른 무균 동물 생산 사육할 수 있는 아이솔레이터의 필요성이 대두되었다(Pollard, 1964). 초창기 무균 동물인 mouse나 rat을 위한 아이솔레이터가 최초로 제작되었다(Pilgrim와 Thompson, 1963; Pilgrim, 1969). 그 이후 germfree guinea pig, chicken, rabbit, monkey 등을 위한 아이솔레이터도 제작되었다(Beal 등, 1967; Cooper와 Timms, 1972; Boot와 Walvoort, 1984; Betts 등, 1985; Trexler와 Orcutt, 1999).

초기에는 stainless steel로 만들어진 아이솔레이터가 사용되었으나, 비싼 가격과 유연하지 못한 재질의 특성으로 많은 불편함이 있었다. 이후 이러한 단점을 개선하여 plastic 아이솔레이터, flexible film 아이솔레이터가 차례로 개발되었다(Trexler와 Reynolds, 1957). 다수의 무균 동물을 동시에 사육, 연구할 수 있는 아이솔레이터도 개발되었다. 현재 이러한 무균 기술은 사람을 치료하기 위한 목적으로 이용될 정도로 많은 발전을 이루었다(Trexler, 1971).

최근 생명공학 분야에서는 복제 돼지를 이용한 바이오장기 연구가 활발히 진행되고 있다(Vodicka 등, 2005; Dehoux와 Gianello, 2007; Prather 등, 2008; Matsunari와 Nagashima, 2009). 또한, 기존의 mouse 중심의 중개 의학 연구(translatio-

* 본 논문(특허)은 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호:20070401034011)의 지원에 의해 이루어진 것임.

* Correspondence : E-mail : shhyun@cbu.ac.kr

nal biomedical research) 분야에서도 형질전환기법을 이용한 무균 돼지의 필요성이 증대되고 있다(Aigner 등, 2010). 이에 따라 기존의 무균 돼지를 사육할 수 있는 아이솔레이터뿐만 아니라 전입상 실험을 위해 필요한 장소로 돼지들을 무균적으로 이동시킬 수 있는 이동식 아이솔레이터의 개발의 필요성도 대두되었다. 그러나, 무균을 유지하기 위한 압력 조절 및 밀폐된 공간에서의 사양 환경이 동물에 미칠 수 있는 생리 활성 및 생체유해성 분석에 관한 보고는 제한적이다. 따라서, 본 연구에서는 본 연구진에서 자체 개발한 이동식 무균 아이솔레이터 내 복제 미니 돼지의 생리 활성을 평가하기 위하여, 아이솔레이터 무균조건 하 이동 시간에 따른 복제 미니 돼지의 심박수, 스트레스호르몬 및 혈액 화학치를 분석하고자 한다.

재료 및 방법

1. 공시 동물

총 5마리의 복제 미니 돼지로 실험을 진행하였다. 모두 암컷이며, 연령은 1~2세, 체중은 80~90 kg으로 경기도 축산위생연구소 실험돈사에서 사육되었다(Fig. 1A).

2. 무균 이동식 아이솔레이터

아이솔레이터의 크기는 1000(가로)×600(세로)×1000(높이) mm이며, 내부체적은 0.6 m³이다. Frame은 stainless steel frame을 사용하였으며, 상부 마감판은 아크릴을 사용하였다. 측면 판넬 마감은 stainless steel sheet metal을 사용하였다. 배기 filter로 래미 재질 필터를 적용하였다. 환기를 위해 전동 공기 여과기를 설치하였다(장착 수량; main blower 1ea, spare blower 1ea). 여과기는 lithium polymer battery를 전원으로 사용하며, 8시간 가동 가능하다. 여과기의 유량은 240 liter/minute이며, 산술적 환기 횟수는 24회/hour이다(Fig. 1B).

3. 스트레스 호르몬 및 혈액화학치 분석

공시동물은 실험이 진행되는 장소로 옮긴 뒤 약 30분 동안 안정을 취하는 시간을 가졌다. 동일 건물 내 실험을 위해 공시동물을 이동시키는 시간이 평균적으로 30분 정도가 소요되기 때문에 30분간 이동식 아이솔레이터에 태운 후 이동과 최대한 비슷한 환경에 노출시켰다. 채혈은 총 3번 실시하였다. 아이솔레이터에 공시동물을 태우기 전(T0), 탑승 30분 뒤 아이솔레이터에서 내린 직후(T1), 아이솔레이터에서 내린 후 30분 뒤(T2) 각각 채혈하였다. 아이솔레이터의 환기 모터는 작동시킨 채로 실험을 진행하였다.

혈액 화학 분석은 이동식 아이솔레이터에 의해 받는 스트레스 관련 호르몬을 평가하기 위해 ACTH(adrenocorticotrophic hormone)와 cortisol 농도를 측정하였고, 체내 대사에 미치는

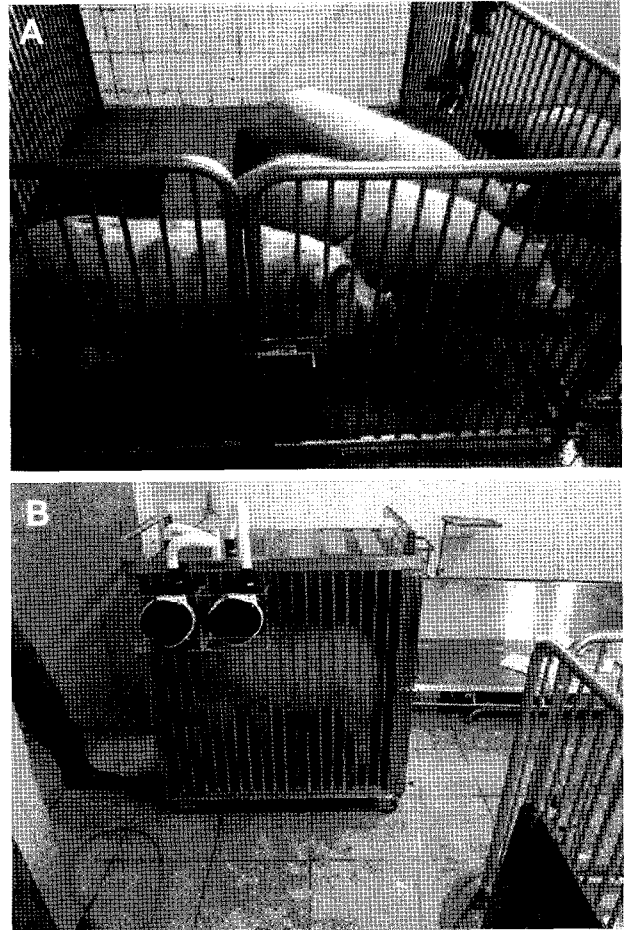


Fig. 1. Cloned mini-pigs (A) and a transportable isolator (B).

영향을 평가하기 위해 혈액화학치인 ALT(alanine aminotransferase), AST(aspartate aminotransferase), BUN(blood urea nitrogen), glucose, creatinine 농도를 측정하였다.

혈액 화학치와 cortisol 농도 측정 시 필요한 serum은 vacutainer에서 혈액을 응고시킨 뒤, 원심분리(3,500 rpm, 10 min)하여 샘플링하였으며, 분석 전까지 얼음에 보관하였다. ACTH 농도 측정 시 필요한 plasma는 EDTA-tube에 혈액을 담은 뒤 원심분리(3,500 rpm, 10 min)하여 샘플링하였으며, 분석 전까지 얼음에 보관하였다.

Cortisol과 ACTH는 chemiluminescent법(immulite 1000, Siemens AG, Munich, Germany)으로 농도를 측정하였다. 혈액화학치는 spectrophotometer법(Hitachi 7020, Hitachi, Ltd., Japan)을 이용하여 농도를 측정하였다.

4. 심박수 측정

채혈과 동일한 시간에 심박수 측정을 실시하였다(HESKA Vet/Ox plus 4800, HESKA Corp., Rocky Mountain Ave. Loveland, Colorado, USA).

5. 통계분석방법

본 실험 결과의 통계학적 분석은 SPSS 17.0(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)의 ANOVA를 이용하여 통계학적 유의성($p < 0.05$)을 검정하였다. 결과는 $mean \pm SEM$ 으로 나타내었다.

결 과

심박수는 각 측정시점에 따라 증가하는 양상을 보였으나, 통계적으로 유의적 차이($p > 0.05$)는 보이지는 않았다. 하지만 T1, T2에서의 심박수는 돼지의 정상 범위에 비해 다소 높게 나타난 것으로 보인다(Table 1).

ACTH 농도는 T0에서 가장 높게 나타내었으며, T1에서 가장 낮았다. 정상 범위와 비교해 볼 때, 모든 시점에서 정상범위보다 매우 높은 농도를 보였다. 반면에 cortisol 농도는 T1에서만 다소 증가한 듯한 양상을 보였다. 정상 범위와 비교해 볼 때, 모든 시점에서 정상 범위보다 낮은 양상을 보였다. 그러나 ACTH, cortisol 농도 모두 통계적인 유의적 차이는 나타내지 않았다(Table 1).

이번 실험에서 확인한 5가지의 혈액화학치(ASL, ASL, BUN,

Table 1. Heart rate and stress-related hormone levels at the various time-points

	T0	T1	T2
HR (beat/min)	97.5 ± 16.2	125.3 ± 12.8	131.9 ± 23.2
ACTH (pg/ml)	209.8 ± 68.8	120.5 ± 32.6	178.0 ± 91.7
Cortisol (ng/ml)	17.4 ± 2.3	24.9 ± 4.4	19.8 ± 1.7

HR, Heart rate; ACTH, Adrenocorticotrophic hormone; T0, just before transporting pigs into the transportable isolator; T1, at the end of transport (30 min. after the transport); T2, 30 min after the end of transport

Table 2. Blood chemistry factors at the various time-points

	T0	T1	T2	Normal range in cloned pig*	Normal range in normal pig**
ALT (U/L)	50.0 ± 5.8	48.4 ± 4.9	63.3 ± 16.4	42.5~63.1	32~84
AST (U/L)	67.8 ± 17.9	68.5 ± 18.2	54.3 ± 13.5	36.7~106.7	9~113
Glucose (mg/dl)	72.8 ± 4.5	83.4 ± 6.3	85.3 ± 6.8	67~86	65~95
BUN (mg/dl)	14.4 ± 0.8	15.0 ± 0.9	15.5 ± 1.0	10.4~12.3	8~24
Creatinine (mg/dl)	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.75~1.18	0.7~2.7

ALT, Alanine aminotransferase; AST, Aspartate aminotransferase; BUN, Blood urea nitrogen; T0, just before transporting pigs into the transportable isolator; T1, at the end of transport (30min. after the transport); T2, 30 min after the end of transport; *Hyun, 2003; **Meyer et al., 1992

glucose 및 creatinine)에서도 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 다만, ALT는 T2에서 다소 증가하는 양상을, AST는 T2에서 다소 감소하는 양상을 보였다. Glucose는 다른 화학치들에 비해 변화폭이 다소 컸는데, T0에 비해 T1, T2에서 다소 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다. 그리고 본 연구에서 측정된 모든 혈액화학치가 일반 돼지와 복제 돼지의 혈액화학치중 복제 돼지의 정상 범위와 더 유사한 것을 확인할 수 있었다(Table 2).

고 찰

본 실험을 통해 복제 미니 돼지를 이용한 이동식 아이솔레이터 내에서의 생체 유해성 평가 결과, 심박수, 스트레스 호르몬, 그리고 혈액화학치에서 모두 수술 전후 점진적인 변화만 관찰될 뿐 통계적인 유의적 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.

심박수의 경우, T0에 비해 T1, T2에서 점진적인 증가 양상만 보일 뿐 유의적 차이가 관찰되지 않았다. 결과에 인용된 정상 범위는(Perez-Torres 등, 2011) 밤중에 돼지가 돈사에서 안정을 취하고 있을 때 측정된 것인데, 이에 비해서는 전체적으로 증가한 양상을 보였다. Perez-Torres 등(2011)의 보고에서는 돼지를 보정할 때나 보정하지 않을 때 심박수의 유의적 차이가 없다고 하였다. 따라서 이는 돼지를 평소에 늘 지내던 환경이 아닌 실험을 위한 새로운 장소로 옮긴 것에 따른 영향으로 보인다. Perremans 등(1998)의 보고에서는 돼지를 수술 시와 비슷한 환경에 두고 진동을 주면 심박수가 유의적으로 증가한다고 하였다. 이를 통해 볼 때, 본 연구에서처럼 돼지를 이동식 아이솔레이터에 태운 후 단순히 평지에서 운송만 하는 것으로는 심박수에 큰 영향을 주지 못하지만, 진동이 느껴질 정도의 운송 시에는 심박수에 영향을 미칠 것이라 생각된다.

ACTH는 정상 범위에 비해 모든 시점에서 매우 높은 농도로 관찰되었다. 결과에 인용한 ACTH의 정상 범위(Jankord 등, 2008)

는 자동채혈기를 사용하여, 보정 없이 밤중에 잠을 자고 있을 때 측정된 basal ACTH 농도이다. 하지만 본 연구에서는 실험 장소로 돼지를 옮기고 30분 정도의 안정 시간만을 취한 뒤 보정을 한 채 채혈을 실시하였다. Perez-Torres 등(2011)은 보정이 돼지의 스트레스를 유발하는 주요한 원인이라고 보고하였다. 따라서 실험 결과에서 전체적으로 ACTH의 농도가 높게 나온 것은 돼지를 실험 장소로 옮기는 과정에서 받은 스트레스와 보정에 의한 스트레스 때문인 것으로 보인다. 반면에 cortisol 농도는 모든 측정 시점에서 정상 범위보다 낮은 수치를 기록하였다. 단, 이동식 아이솔레이터에서 내린 직후 인 T1에서의 농도가 다소 증가한 듯한 양상을 나타내었다. 이를 ACTH 농도와 비교해 보면 T1에서 두 호르몬의 농도가 서로 상반된 양상을 띄는 것을 확인할 수 있다. 이는 ACTH와 cortisol 사이의 negative feedback 작용에 의한 것이라 생각된다(Perremans 등, 2001). 즉, ACTH에 의해 cortisol 농도도 정상 범위보다 높게 나오는 것이 정상이다. 하지만, 결과에서는 cortisol 농도가 정상 범위보다 오히려 낮게 나왔다. 본 연구에서는 정상 범위를 인용한 논문과 달리 복제 미니 돼지를 이용하여 실험을 수행하였다. 따라서 이러한 결과가 단순히 미니 돼지 사용에 의한 차이인지, 아니면 복제 돼지 사용에 의한 차이인지는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. 복제소의 경우에는 일반소와 복제소에서 각종 혈액검사치 및 생리적 요인들의 유의적 차이가 관찰되지 않는다는 보고가 있으며(Lanza 등, 2001), 복제 돼지에서도 혈액화학치에서 정상 돼지와 유의적인 차이가 없다는 보고가 있다(Hyun, 2003). Perez-Torres 등 (2011)의 논문에서는 본 실험에서 사용한 미니 돼지와 체중이 비슷한 90 kg의 돼지를 이용해 cortisol 농도를 측정하였는데, 정상치가 15.1 ± 4.4 ng/ml 범위 내에 속했다. 이를 통해 볼 때 미니 돼지를 사용한 것에 의한 차이일 가능성이 좀 더 높다고 생각된다.

혈액화학치는 모든 측정 요소에서 특별한 변화가 관찰되지 않았다. 정상 범위를 벗어나는 항목도 관찰되지 않으며, 모든 측정 시점에서 유의적 차이 없이 거의 일정한 양상을 띄는 것을 확인할 수 있다. 다만 glucose만 유의적인 차이가 보일 정도는 아니지만 다른 화학치들의 변화 정도에 비해 T1, T2에서 좀 더 큰 폭으로 증가한 것을 확인할 수 있다. 이는 아마도 절식시간이 길어짐에 따라, 간이나 신장에서의 glycogenolysis가 일어나 혈당량이 다소 증가한 것이라 생각된다. 앞서 언급하였듯이 복제 소의 혈액화학치는 일반 소와 유의적 차이가 나지 않는다는 보고가 있다(Lanza 등, 2001). 본 실험의 결과도 일반 돼지의 혈액화학치의 정상 범위에 모두 포함된다. 그러나 일반 돼지와 복제 돼지의 정상 범위를 각각 결과와 비교해 보면, 전체적으로 복제 돼지의 혈액화학치와 좀 더 유사한 양상을 보이는 것을 확인할 수 있다.

본 실험에 사용된 이동식 아이솔레이터는 바이오장기 연구를 위한 무균 돼지 연구에 사용될 목적으로 제작된 것이다. 따라

서 일반 돼지를 이용하지 않고 복제 돼지를 이용해 얻은 실험 결과는 그 의미가 더 크다고 할 수 있겠다. 본 실험에 사용된 이동식 아이솔레이터의 문제점은 공기동물인 돼지는 앞이 막힌 곳으로는 가지 않으려는 습성이 있기 때문에 이동식 아이솔레이터 입구의 맞은편 벽면이 stainless steel로 되어 있어 아이솔레이터에 올라타지 않으려고 하는 것이었다. 추후에 이러한 이동식 아이솔레이터의 개선되어야 할 점은 벽면을 아크릴과 같이 앞이 훤히 보이는 재질로 제작하는 것이 돼지를 이동식 아이솔레이터에 입실시키는데 좀 더 용이하리라 생각된다. 참고사항으로 돼지들은 이동식 아이솔레이터에 타고 있는 동안 소리를 내거나 발버둥 치지 않았고, 앉았거나 심지어 잠을 자는 경우도 있었다. 그리고, 아이솔레이터에서 밖으로 나오지 않으려고 하는 돼지도 있었다. 보정은 가장 마지막 측정 시기인 T2에서 가장 힘이 들었는데, 돼지들이 아이솔레이터보다는 보정과 채혈에 좀 더 민감한 반응을 보였다.

결론

본 연구는 이동식 무균 돼지 아이솔레이터가 돼지에게 미치는 생체 유해성을 조사한 바, 심박수와 ACTH 농도는 안정 상태에서의 정상 범위보다 상승하였을 뿐 수술 전후의 유의적인 차이가 없었다. Cortisol은 정상 범위보다 오히려 낮은 농도를 나타내었으며, 수술 전후의 통계적 유의적인 차이가 없었다. 혈액화학치에서도 수술 전후의 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 따라서, 단순히 돼지를 낫선 장소로 이동시키고 보정함에 의한 스트레스가 주요한 유해요소일 뿐, 이동식 무균 돼지 아이솔레이터에 의한 생체 유해성은 없는 것으로 나타났다. 단, 복제 미니 돼지에서 ACTH와 cortisol 농도에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 사료된다.

감사의 글

이 실험을 도와주신 경기도 축산위생연구소 김동민 선생님 과 충북대학교 김은혜, David Yoon에게 감사드립니다.

참고문헌

- Aigner B, Renner S, Kessler B, Klymiuk N, Kurome M, Wunsch A and Wolf E. 2010. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J. Mol. Med.* 88:653-664.
- Beal CB, Espinosa H, Stites DP and Watson MJ. 1967. A surgical wound isolator. *Lancet.* 1:97-101.
- Betts TE, Firmin R and Guerreiro D. 1985. The use of a flexible film isolator to maintain specified concentrations of oxygen. *Lab. Anim.* 19:109-110.

- Boot R and Walvoort HC. 1984. Vertical transmission of *Bacillus piliformis* infection (Tyzzer's disease) in a guinea pig: case report. *Lab. Anim.* 18:195-199.
- Cooper DM and Timms JR. 1972. The rearing and maintenance of breeding chickens in isolators: 2. Plastic tent isolators. *Avian Pathol.* 1:59-64.
- Dehoux JP and Gianello P. 2007. The importance of large animal models in transplantation. *Front. Biosci.* 12:4864-4880.
- Hyun SH. 2003. Production and characterization of cloned pigs by somatic cell nuclear transfer. Graduate School Seoul National University, Seoul, pp. 155.
- Jankord R, Ganjam VK, Turk JR, Hamilton MT and Laughlin MH. 2008. Exercise training alters effect of high-fat feeding on the ACTH stress response in pigs. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 33:461-469.
- Lanza RP, Cibelli JB, Faber D, Sweeney RW, Henderson B, Nevala W, West MD and Wettstein PJ. 2001. Cloned cattle can be healthy and normal. *Science* 294:1893-1894.
- Matsunari H and Nagashima H. 2009. Application of genetically modified and cloned pigs in translational research. *J. Reprod. Dev.* 55:225-230.
- Meyer DJ, Coles EH and Rich LJ. 1992. *Veterinary Laboratory Medicine; Interpretation and Diagnosis.* W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 328-331.
- Perez-Torres S, Flores-Perez FI, Orihuela A, Aguirre V, Bernal G, Nieto A, Vazquez R and Solano JJ. 2011. Influence of tongue inspection during cysticercosis diagnosis on some behavioral and physiological stress measures in pigs (*Sus scrofa domestica*). *Trop. Anim. Health Prod.* Epub ahead of print.
- Perremans S, Randall J, Rombouts G, Decuyper E and Geers R. 2001. Effect of whole-body vibration in the vertical axis on cortisol and adrenocorticotrophic hormone levels in piglets. *J. Anim. Sci.* 79:975-981.
- Perremans S, Randall J, Allegaert L, Stiles M, Rombouts G and Geers R. 1998. Influence of vertical vibration on heart rate of pigs. *J. Anim. Sci.* 76:416-420.
- Pilgrim HI. 1969. A lightweight autoclavable free-flow germ-free mouse isolator. *Lab. Anim. Care.* 19:117-120.
- Pilgrim HI and Thompson DB. 1963. An inexpensive, autoclavable germfree mouse isolator. *Lab. Anim. Care.* 13:suppl. 602-608.
- Pollard M. 1964. Germfree animals and biological research. *Science* 145:247-251.
- Prather RS, Shen M and Dai Y. 2008. Genetically modified pigs for medicine and agriculture. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 25:245-265.
- Trexler PC. 1971. Microbiological isolation of large animals. *Vet. Rec.* 88:15-20.
- Trexler PC and Reynolds LI. 1957. Flexible film apparatus for the rearing and use of germfree animals. *Appl. Microbiol.* 5:406-412.
- Trexler PC and Orcutt RP. 1999. Development of gnotobiotics and contamination control in laboratory animal science. *50 Years of Laboratory Animal Science.* AALAS, Memphis, pp. 121-128.
- Vodicka P, Smetana K Jr, Dvoránková B, Emerick T, Xu YZ, Ourednik J, Ourednik V and Motlík J. 2005. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1049:161-171.

(접수: 2011. 8. 2. / 심사: 2011. 8. 3. / 채택: 2011. 8. 19.)