

## Mouse에서 CLA의 투여가 면역성 증진에 미치는 영향

박종국 · 김진영<sup>1</sup> · 이병한 · 임좌진 · 정병현

건국대학교 수의과대학

### CLA Treatment Effect on Immunosuppressive Effect of Corticosteroid in Mouse

Jong-Kook Park, Jin-Young Kim<sup>1</sup>, Byung-Han Lee, Jae-Jin Lim and Byung-Hyun Chung

College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul, 143-701, Korea

**Abstract :** Dietary conjugated linoleic acid(CLA) has been shown to affect immune function. Thus, the objective of this study was to investigate the effects of CLA on the mice that treated prednisone. Mice were randomized into 6 groups and fed diet containing either 0(control, P), 0.5%(CLA1, CP1) or 1.5%(CLA2, CP2) CLA for 5weeks. Before 1 week of finishing diet supplement CP1, CP2, and P group treated the prednisone by subcutaneous injection. The levels of serum immunoglobulin A, G, E, gut lumen s-IgA, MLN immunoglobulin A, body weight, mucosal protein was compared. The level of serum IgA in CLA1, CLA2, CP1, and CP2 group increased, while which of P group was decreased. The level of serum IgG in CLA1 group increased, while which of the other group no differences. Serum IgE level showed no difference and the immunoglobulin production in MLN lymphocyte in CLA1 group increased. The level of gut lumen s-IgA in P group showed decreased, while which of the other group showed no differences. These results support the view that CLA supplement partially enhance the cell-mediated immunity and overcome the immunosuppressive effect of prednisone.

**Key words :** Conjugated linoleic acid, prednisone, immunoglobulin, mucosal protein

## 서 론

CLA(Conjugated Linoleic Acid)는 linoleic acid의 이성체 중 이중결합을 가지고 있는 지방산의 통칭으로 이중결합의 위치는 9와 11, 10과 12 또는 11과 13번 그리고, 기하학적 이성체로는 cis-cis, cis-trans, trans-cis 또는 trans-trans 형태가 존재하며 이들 이성체 중 cis-9, trans-11 octadecadienoic acid(cis-9, trans 11-CLA)가 생리활성이 강하고 CLA의 효과를 발휘하는 주 이성체로 알려진 물질로<sup>1,2</sup> 1978년 미국의 Wisconsin 대학의 Dr. Pariza의 연구팀이 햄버거 내에 존재하는 발암물질을 연구하는 과정에서 햄버거 추출물에서 항암효과가 있는 물질이 포함되어 있다는 것을 우연히 알게 되었고 1987년 이 물질이 CLA임을 확인하였다<sup>3</sup>.

자연에서 존재하는 CLA는 반추동물의 제1위에서 서식하는 혐기성 세균인 butyrivibrio fibrisolvens가 linoleic acid로부터 CLA를 합성하는 유일한 미생물이다. 따라서, 반추위를 갖는 동물에서 유래한 식품인 쇠고기나 우유를 비롯한 식품에 CLA가 소량 함유되어 있다. 최근에는 CLA를 가축에게 투여하여 CLA가 함유된 계란이나 고기를 생산하는 방법으로 산업적 연구가 많은 연구자들에 의해 연구가 진행되고 있다<sup>4,6</sup>.

CLA는 항암효과에 있어서 dimethylbenz(a)anthracene으로 유도된 mammary tumors에 대한 항암효과를 나타내는 것으

로 알려져 있으며, 피부암, 전위종양, 결장암, 폐암 및 간암에 대한 발암억제 효과가 있음이 보고되었다<sup>7,8</sup>. 동물실험과 더불어 human cancer cell을 이용하여 CLA의 항암효과를 구명하는 연구도 진행되고 있다<sup>9</sup>.

Corticosteroids는 생체에 대한 여러 가지 작용으로 인하여 현재 인의와 수의임상에서 치료 및 증상완화 목적으로 이용되고 있으나 심각한 면역저하반응을 나타내는 것으로 알려져 있다. 장관내 분비형 면역글로블린 A(secretory IgA)의 감소로 인한 박테리아 변위의 증가로 신체복합감염의 기회를 가져오며 심할 경우 패혈증으로 인한 패혈성 쇼크를 나타낸다<sup>10</sup>. Mouse에서 glucocorticoids를 생리학적 용량으로 사용해도 항체의 합성이 억제된다고 하였고<sup>11</sup>, corticoid를 3~5일 간의 고용량의 methylprednisolone의 투여시에 혈청면역글로블린 G 함량이 감소한다고 보고되었으며<sup>12</sup>, 또한 12주간 methylprednisolone을 5 mg/kg/day씩 복강내로 투여한 mouse에서 혈청면역글로블린 G 함량이 감소하였음이 보고되었다<sup>13</sup>.

이에 본 연구에서는 다기능 지질신소재인 conjugated linoleic acid의 여러 가지 기능 중 면역성증강 기능을 임상에 응용하여 corticoid 투여에 의한 면역억제기능에 대해 CLA의 면역저하 방어효과 여부를 살펴보고자 한다. 특히 CLA가 미치는 혈액내 면역글로블린의 상승효과를 확인하고, 장관내 분비형 면역글로블린 A(secretory IgA)를 측정함으로써 장관점막면역(intestinal mucosal immunity)에 미치는 영향을 확인하여 CLA가 장관면역의 저하를 가져올 수 있는

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : kjunk@hanmail.net

스트레스, 외상, 화상 등의 임상적 측면에서의 이차감염의 기회를 가질 수 있는 질환들에 대한 질병치료의 보조제로서의 이용과 면역성을 억제하는 약물의 결합을 보완하는 보좌약 물로써의 효능을 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 공시동물

실험 동물은 6주령의 수컷 Balb/c Mice 50마리를 (주)대한실험동물센터(Seoul, Korea)에서 분양 받아 2주일간의 적응사육 후 실험에 사용하였다. 사육환경은  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 를 유지하고, 12시간의 명암주기를 유지하였다. 실험동물은 적응사육기간부터 단독사육 하였으며, 분말(powder type)형의 사료에 적응기간을 가졌다.

### CLA 첨가사료의 준비

순도 70%의 CLA(c9,t11:35%, t10,c12:35%)를 사용하였으며, 실험에 필요한 사료첨가 농도인 0.5%와 1.5%를 만들기 위하여 w/w 퍼센트의 비율로써 분말형 사료 100 g을 기준으로 CLA 0.71 g, 2.14 g을 혼합하였다. CLA사료의 준비는 산화를 최대한 예방하기 위하여 사료공급 2시간 전에 만들었으며, 질소가스의 공급을 유지시켜 주었다.

사료는 48시간 간격으로 교체시켜 주었으며, 물과 사료는 사료를 채취하기 이전의 절식시간(12시간)을 제외하고는 자유급식 시켰다.

### 시 약

실험에는 파우더형 prednisone(17 $\alpha$ ,21-Dihydroxy-1,4-pregnadiene-3,11,20-trione. powder. SIGMA. U.S.A.)을 phosphate buffered saline(PBS) 용액(pH7.4)에 용해하여 최종농도가 0.2 mg/ml가 되도록 하였으며, 투약 전까지 4°C에 보관하였다.

면역글로블린의 정량분석을 위한 Sandwich ELISA에는 PBS(NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.135 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g in DW 1 l, pH7.4), carbonate-bicarbonate coating buffer (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.795 g, NaHCO<sub>3</sub> 1.46 g, Thimerosal 0.05 g in DW 500 ml, pH9.6), blocking buffer (bovine serum albumin(BSA;fractionV, SIGMA) 30 g in PBS 1 l), 혈청희석완충액(0.5% BSA, PBS with 0.02% thimerosal), 반응완충액(400 mg o-phenylenediamine dihydrochloride/L and 3.5 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/L in 50mmol phosphate-citrate buffer, pH5.0), 반응정지완충액(3M-HCl)을 이용하였고, 일차항체(capture antibody)에 monoclonal affinity isolated goat antimouse IgA( $\alpha$ -chain specific), polyclonal affinity isolated goat anti-mouse IgG( $\gamma$ -chain specific), monoclonal rat anti-mouse IgE(heavy chain), 이차항체(detector antibody)에 goat anti-mouse IgA( $\alpha$ -chain specific, peroxidase conjugate), goat anti-mouse IgG( $\gamma$ -chain specific, peroxidase conjugate), rat anti-mouse IgE(epsilon heavy chain specific, peroxidase

conjugate), reference standard로써 mouse IgA (kappa, TEPC 15, purified immunoglobulin), mouse IgG (reagent grade)를 이용하였다.

점막과 장관내 세정액(gut lumen washing fluid)의 검체 전처리에는 leupeptin(acetyl-leu-leu-arg-al), phenylmethylsulfonylfluoride( $\alpha$ -toluenesulfonyl fluoride), trypsin inhibitor (Type I-S: from soybean)를 사용하였다.

장간막림프절(mesenteric lymph node, MLN) 림프구의 처리에는 RPMI medium 1640(with L-glutamine without sodium bicarbonate, GIBCOBRL. U.S.A. penicillin 100 U/ml, streptomycin 100  $\mu\text{g/ml}$ ), Histopaque-1077 (polysucrose, 5.7 g/dL, and sodium diatrizoate, 9.0 g/dL. aseptically filtered), Bactolipopolysaccharide B(Escherichia coli O26:B6; Difco Laboratories)를 이용하였다.

### 실험방법

**군의 분류 및 처치.** 본 실험에서는 먼저 실험동물을 대조군(C 군)과 처치군으로 나누고 처치군은 제1군으로써 CLA 사료첨가 혼합비율인 0.5%와 1.5%를 섭취하는 군(CLA 1군, CLA 2군), 제2군은 제1군과 같이 사료섭취는 동등하게 유지하며 실험종료일 4일부터 시료채취 12시간 전까지 1일 1회의 prednisone(8 mg/kg)의 투여를 하는 군(CP 1군, CP 2군), 제3군은 prednisone(8 mg/kg)의 투여군(P군)으로 나누어 각 군 당 7두씩 배치하였다.

모든 군에게 파우더형의 사료를 급여하였으며, CLA 사료는 5주 동안 급여하였다. CP 1군, CP 2군, P군은 실험종료 4일부터 0일까지 prednisone의 투여를 피하주사로 하였으며, C군, CLA 1군과 CLA 2군에는 동일한 방법으로 생리식염수를 투여하였다.

실험기간경과 2주후부터 CLA 1군의 2두, CLA 2군의 1두의 사료섭취 양이 극히 저조하여 데이터에서 제외하였다.

**시료채취 및 처리.** 실험기간 경과 후 mouse를 12시간 절식시켜 ether 마취를 하여 보정한 후 흉곽과 복부에 걸쳐 알코올로 소독한 다음 개복하여 복대동맥에서 채혈을 하였다. 혈액은 면역글로블린 A, G, E의 측정을 위하여 4°C, 12,000 g, 10분간 원심분리 후 혈청을 20  $\mu\text{l}$ 씩 분주하여 -80°C에 보관하였다.

장간막림프절은 적출하여 페트리디쉬에 분주해 놓은 RPMI 1640 배지에 담아두었다가 전처리하여 분석에 이용하였다.

점막단백질의 측정을 위한 시료는 회장의 하단을 중심으로 공장부분으로 올라오는 방향으로 슬라이드 글래스를 이용하여 점막을 긁어내어 채취하였다. 이렇게 채취한 시료는 종이로 물기를 제거한 후 무게를 측정된 뒤 PBS(containing 100m-mol/L PMSF, 100  $\mu\text{mol}$  leupeptin) 1 ml에 넣어 이것을 Teflon pestles를 이용하여 균질화시켰다. 균질화된 시료를 4°C에서 10분간 12,000 g로 원심분리하고 상층액만을 얻어 분석 전까지 -80°C에 보관하였다<sup>14</sup>.

장관내 함유물은 소장의 양단을 절찰한 후 즉시 Ice Bath에 이동을 하여 2 ml의 Cold PBS(4°C, containing soybean

trypsin inhibitor 0.1 mg/ml)를 장관내에 투여하고 10분간 정 체시켜 충분한 세척이 되도록 한 후 tube에 옮겨 4°C 650 g 에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 얻어 새로운 tube에 옮긴 후 PBS(containing 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl-fluoride, 100 μmol leupeptin)와 1:10의 비율로 혼합하여 4°C에서 12,000 g로 20분간 원심분리하여 상층액을 얻어내 고 면역글로블린 A 분석전까지 -80°C에 보관하였다<sup>15</sup>.

**장점막단백질의 측정.** 점막에서의 단백질측정은 Bradford method에 의한 microassay에 의해 측정하였다. Standard curve는 Bovine serum albumin(BSA, fractionV, SIGMA)을 이용하였다.

**장간막림프절 (mesenteric lymph node, MLN)의 처리.** 적출하여 낸 장간막림프절을 RPMI 1640 배지에 즉시 담구어 조직분리(teasing)하고, RPMI 1640 배지로 3회 세척(rinsing)을 한 후 tissue scum을 제거하기 위해 100 μm mesh에 여과하였다. 섬유아세포를 제거하기 위해 세포부유물(cell suspension)을 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 10 mL의 세포부유물을 10 mL의 Histopaque-1077에 부유하여 1,500 g로 30분간 원심분리 하였다. 림프구층(lymphocyte band)을 조심스럽게 얻어내어 세포들을 다시 세척하고 1.5×10<sup>6</sup> cel.s/mL의 밀도(density)로 계산하여, 96-well에서 RPMI 1640배지(containing 10% fetal bovine serum)에 세포배양 하였다. 12시간동안의 회복기를 거친후 1.0 μg/mL의 lipopolysaccharide를 첨가하였다. 48시간의 반응시간 후 면역글로블린 A의 측정을 위하여 시료는 50 μl씩 분주하여 분석 전까지 -80°C에 보관하였다.

**Sandwich ELISA.**

(1) 시료의 전처리

96-well flat bottom immuno plate(Maxisorp, NUNC)에 goat anti-mouse IgA (1 μg/well in 100 μl PBS), goat anti-mouse IgG(diluted 1/1000 in carbonate buffer), rat anti-mouse IgE(1 μg/well in 100 μl carbonate buffer)를 100 μl씩 분주하여 4°C에서 overnight incubation 하였다.

Plate를 다시 3회 세척(0.5 g Tween20/L PBS)하고 blocking solution을 150 μl씩 분주하여 실온(humid atmosphere)에서 4시간동안 incubation 하였다. 3회 세척을 하고 10진으로 희석한 검체들을 100 μl씩 분주하여 37°C에서 1시간동안 incubation을 한 후 4회 세척을 하였다. 일차항체(detector antibody)는 1:1500으로 희석(PBS containing 10 g BSA/L)하여 100 μl씩 분주하고 37°C에서 1시간동안 incubation 하였다.

마지막으로 4회동안 세척을 한 후 plate에 반응완충액(developing solution)을 100 μl씩 분주하여 30분 동안 반응을 일으킨 후 반응정지완충액으로 발색을 정지시켜 즉시 분석하였다.

면역글로블린 A, E의 분석에는 490 nm, 면역글로블린 G의 분석에는 570 nm filter를 이용하였다.

(2) 분석

ELISA reader(Microplate autoreader. BIO-TEK INSTRUMENT. EL311 SL)로 OD가를 측정하였다.

**통계처리**

실험결과는 SAS package의 general linear model (GLM) procedure (SAS version 6.12, SAS Institute, 1996)을 이용하여 Duncan's multiple range test에 의하여 검정하였으며, P<0.05의 유의성만을 인정하였다.

**결 과**

**혈청면역글로블린 A**

본 실험에서 대조군의 혈청 중 면역글로블린 A의 함량은 Fig 1에서 보는 바와 같이 48.88±5.67(μg/ml)로 나타났다.

CLA1군, CLA2군, CP1군, CP2군은 각각 61.21±5.24, 60.25±3.55, 61.30±2.36, 59.52±1.41(μg/ml)로 대조군에 비하여 유의성 있는(P<0.05) 증가를 나타내었다.

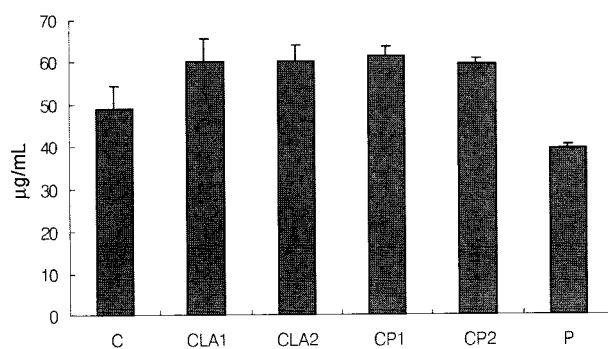
P군은 39.38±1.07(μg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(P<0.05) 감소를 보였다.

**혈청면역글로블린 G**

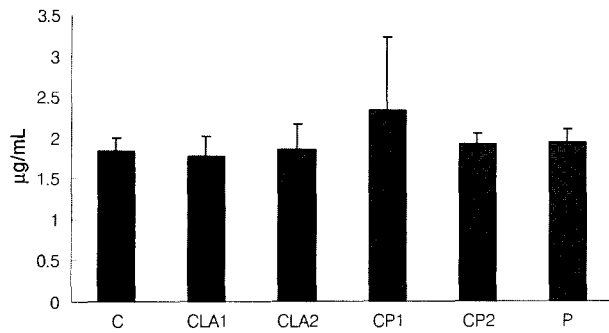
대조군에서의 면역글로블린 G함량은 25.61±15.36(μg/ml)로 나타났다.

Fig 2에서 보는 바와 같이 CLA1군은 29.76±14.5(μg/ml)로 대조군에 비하여 유의성 있는(P<0.05) 증가를 나타내었다. CLA2군은 19.86±9.2로 감소하는 것으로 나타났으나 유의성은 인정되지 않았다.

CP1군은 24.46±12.85(μg/ml)로 대조군에 비하여 약간 감소하였는데 유의성은 인정되지 않았다. CP2군은 19.86±13.3

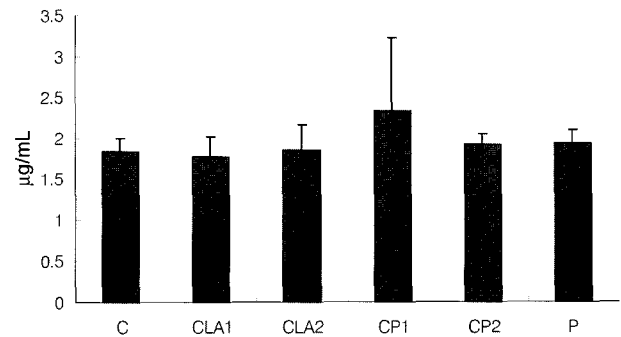


**Fig 1.** Serum immunoglobulin A concentration  
 C : groups fed control diet and administered with saline.  
 CLA1 : groups fed diet supplemented with 0.5% CLA and administered with saline.  
 CLA2 : groups fed diet supplemented with 1.5% CLA and administered with saline.  
 CP1 : groups fed diet supplemented with 0.5% CLA and administered with 8 mg/kg/day Prednisone.  
 CP2 : groups fed diet supplemented with 1.5% CLA and administered with 8 mg/kg/day Prednisone.  
 P : groups fed control diet and administered with 8 mg/kg/day Prednisone.  
 Each bar represents the concentration of immunoglobulin and error bar is expressed as mean±standard deviation (n=5).



**Fig 2.** Serum immunoglobulin G concentration

C : groups fed control diet and administered with saline.  
 CLA1 : groups fed diet supplemented with 0.5% CLA and administered with saline.  
 CLA2 : groups fed diet supplemented with 1.5% CLA and administered with saline.  
 CP1 : groups fed diet supplemented with 0.5% CLA and administered with 8 mg/kg/day Prednisone.  
 CP2 : groups fed diet supplemented with 1.5% CLA and administered with 8 mg/kg/day Prednisone.  
 P : groups fed control diet and administered with 8 mg/kg/day Prednisone.  
 Each bar represents the concentration of immunoglobulin and error bar is expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n = 5).



**Fig 3.** Serum immunoglobulin E concentration

C : groups fed control diet and administered with saline.  
 CLA1 : groups fed diet supplemented with 0.5% CLA and administered with saline.  
 CLA2 : groups fed diet supplemented with 1.5% CLA and administered with saline.  
 CP1 : groups fed diet supplemented with 0.5% CLA and administered with 8 mg/kg/day Prednisone.  
 CP2 : groups fed diet supplemented with 1.5% CLA and administered with 8 mg/kg/day Prednisone.  
 P : groups fed control diet and administered with 8 mg/kg/day Prednisone.  
 Each bar represents the concentration of immunoglobulin and error bar is expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=5).

으로 유의성 있는( $P < 0.05$ ) 감소를 나타내었다.

P군은  $24.58 \pm 14.95$  ( $\mu\text{g/ml}$ )로 대조군에 비하여 약간 감소하는 것으로 나타났으나 유의성은 인정되지 않았다.

#### 혈청면역글로불린 E

대조군에서는 Fig 3에서 보는 바와 같이 면역글로불린 E의 농도가  $1.83 \pm 0.16$  ( $\mu\text{g/ml}$ )로 나타났다.

CLA1군, CLA2군, CP2군, P군의 면역글로불린 E 농도는 각각  $1.77 \pm 0.24$ ,  $1.85 \pm 0.31$ ,  $1.92 \pm 0.13$ ,  $1.93 \pm 0.17$  ( $\mu\text{g/ml}$ )로 나타나 대조군과 유사한 수준으로 나타났다.

CP1군은  $2.33 \pm 0.89$  ( $\mu\text{g/ml}$ )로 대조군에 비하여 증가하는 경향으로 나타났는데 유의성은 인정되지 않았다.

#### 장간막임파절(MLN)의 면역글로불린 A

대조군에서 면역글로불린 A의 농도는 Fig 4에서 보는 바와 같이  $0.254 \pm 0.03$  ( $\text{ng/ml}$ )로 나타났다.

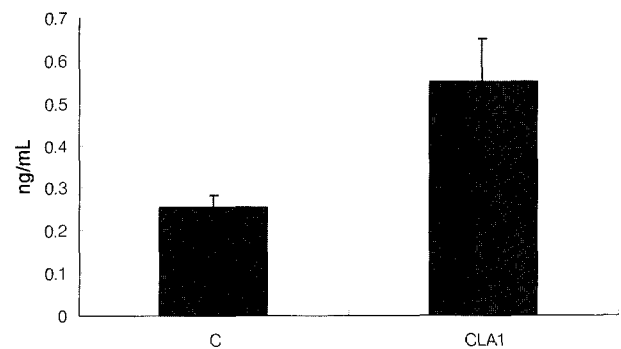
CLA1군은  $0.55 \pm 0.1$  ( $\text{ng/ml}$ )로 나타나 유의성 있는( $P < 0.01$ ) 증가를 나타내었다.

#### 장관내 분비형 면역글로불린 A

대조군에서는 Fig 5에서 보는 바와 같이  $260.95 \pm 63.06$  ( $\mu\text{g/cm}$ )로 나타났다.

CLA1군에서는  $300.2 \pm 26.73$  ( $\mu\text{g/cm}$ )로 대조군 보다 증가하는 것으로 나타났으나 유의성은 인정되지 않았다.

CP1군과 CP2군은 각각  $228.1 \pm 70.3$ ,  $188.8 \pm 52.38$  ( $\mu\text{g/cm}$ )로 나타나 대조군에 비하여 감소하는 경향으로 나타났으



**Fig 4.** Effect of CLA on the immunoglobulin production in MLN lymphocyte

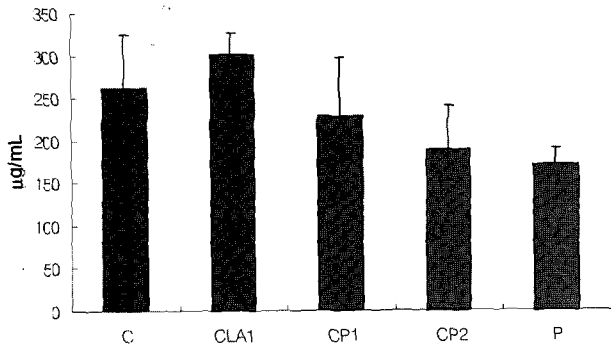
C : groups fed control diet and administered with saline.  
 CLA1 : groups fed diet supplemented with 0.5% CLA and administered with saline.  
 The lymphocytes were incubated with lipopolysaccharide for 48 h.  
 Each bar represents the concentration of immunoglobulin and error bar is expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=5).

나 유의성은 인정되지 않았다. P군은  $171.1 \pm 18.9$  ( $\mu\text{g/cm}$ )로 대조군에 비하여 유의성 있는( $P < 0.05$ ) 감소를 나타내었다.

CP1군과 P군은 유의성 있는( $P < 0.05$ ) 차이점을 나타내었다.

#### 장점막 단백질

대조군의 mucosal protein 농도는 Fig 6에서 보는 바와 같



**Fig 5.** Gut lumen total immunoglobulin A concentration  
 C : groups fed control diet and administered with saline.  
 CLA1 : groups fed diet supplemented with 0.5% CLA and administered with saline.  
 CP1 : groups fed diet supplemented with 0.5% CLA and administered with 8 mg/kg/day Prednisone.  
 CP2 : groups fed diet supplemented with 1.5% CLA and administered with 8 mg/kg/day Prednisone.  
 P : groups fed control diet and administered with 8 mg/kg/day Prednisone.  
 Each bar represents the concentration of immunoglobulin and error bar is expressed as mean±standard deviation (n=5).

이  $0.03 \pm 0.00245$  (mg/mucosa wet weight, mg)으로 나타났다.  
 CLA1군은  $0.036 \pm 0.004$  (mg/mucosa wet weight, mg)로 나타나 유의성 있게 ( $P < 0.05$ ) 증가하는 것으로 나타났다.  
 CLA2군은 대조군과 유사한 수준으로 나타났다 ( $0.03 \pm 0.001$ ).

### 고찰

Conjugated linoleic acid (conjugated derivatives of linoleic acid, CLA)는 다양한 생리적 효과를 가지고 있으며 항암 및 다이어트 효과 등의 생리적 효능이 입증되어 최근 주목을 받고 있는 생리활성 물질로서 자연에 존재하는 지방에 함유되어 있는 linoleic acid는 이중결합이 9번과 12번 탄소에 존재하지만 고열이나 반추동물의 rumen에 존재하는 linoleic acid isomerase에 의하여 여러 가지 형태의 공액화된 형태 즉 CLA가 만들어진다. 현재 이론적으로 만들어질 수 있는 CLA의 종류는 8종으로 알려져 있으나 이들 중 임상적으로 또는 동물실험을 통하여 항암 및 다이어트 효과를 나타내는 것은 cis-9, trans-11 CLA인 것으로 알려져 있다. CLA는 마우스, 랫 및 닭에서 림프구와 대식세포의 기능을 조절하는 효과를 보였다<sup>16,17</sup>.

면역글로불린은 면역에 관련하는 globulin을 말하며, 특별한 항원에 붙어 그들의 작용을 봉쇄하거나 중화시키고 파괴, 제거를 조정하는 항체들이며 이들은 Functional Component (Fc) portion에 따라 구별되고, 이에 따라 면역에서 수행하는 기능이 다르다.

본 연구에서 CLA투여 마우스 혈청 면역글로불린 A와 G, 장간막임파절의 면역글로불린 A의 증가하였다 이것은

Michihiro 등<sup>18</sup>의 연구에서 3주동안의 CLA(순도80.7%) 0.5%사료첨가 투여로 인하여 비장과 장간막임파절(mesenteric lymph node)에서의 면역글로불린 A, 면역글로불린 G의 양적인 증가의 경향을 나타내었다는 보고도 유사한 경향을 보이는 것이다. 그러나 사료첨가 농도의 증가로 인한 CLA2군 (CLA 1.5%)에서의 면역글로불린 G의 유의성 없는 변화로 미루어 볼 때 0.5%의 CLA첨가가 면역글로불린의 생성에 더욱 효과적인 것으로 생각된다. 이것은 CLA의 면역계에 미치는 영향이 직선적 용량의존성이 아니라는 것을 의미한다고 생각된다.

Michihiro 등<sup>18</sup>의 연구에서는 면역글로불린 E의 양은 감소하는 경향을 나타내었다고 보고 되었으나 본 연구에서는 면역글로불린 E의 농도는 군간 비슷한 경향을 나타내었다. 이것은 CLA의투여가 생체의 알러지 감각에는 크게 영향을 주지 않는 것을 의미한다.

Prednisone의 투여 (putative immunosuppressive doses)로 인한 혈청 면역글로불린(SIg), 적혈구, 림프구의 감소를 나타내는 것으로 나타났으며<sup>19,20</sup>, 또한 prednisone(16.8 mg/kg)으로 15일 동안의 처치를 통하여 SIg의 감소가 나타나는 것이 보고되었다<sup>21</sup>.

CLA함유 사료급여 개체에 prednisone을 처치한 군에서 면역글로불린 G는 대조군과 CP1군, P군이 비슷한 농도를 보이며, 반면 CP2군에서의 대조군과 비교시 유의성 있는 감소를 보이고 있다. 면역글로불린 A는 CP1군, CP2군에서 대조군보다 유의성 있는 증가를 나타내며 이상의 결과는 CLA의 사료첨가 투여 시 면역글로불린 A에 대한 prednisone의 면역저하 현상은 영향을 받지 않는 것으로 생각이 되며, 반면 면역글로불린 G에 대한 영향은 없으며, 오히려 사료농도의 증가에 따른 저하현상이 나타났다.

장관은 영양분의 소화와 흡수를 주요기능으로 하는 복합 기관이며, 이의 기능과 아울러 중요한 기능의 하나로서 장관 내 박테리아와 내독소의 신체장기나 조직으로의 변위를 예방하는 방어막 역할을 한다. 이는 분비형 면역글로불린 A와 비면역성(mucus, epithelial surfactant, defensin, etc.) 인자의 점막보호에 의한다.

분비형 면역글로불린 A (s-IgA)는 장점막표면에 가장 많은 비율로 존재하는 면역글로불린이며, 점막면역성에 중요한 역할을 담당하는 성분이다. s-IgA의 합성과 장관내로의 분비는 박테리아와 바이러스의 점막상피세포로의 부착을 예방하는 역할을 하며, 이로써 그들의 병원성을 방해하여 더 이상의 활동성을 가지지 못하도록 하여 신체를 보호하는 역할을 하게 된다<sup>22</sup>. 면역글로불린 A는 장관고유층에 있는 형질세포에서 생성되며, secretory component와 J chain과 상호관련되어 장관 내로의 분비가 이루어지게 된다.

Corticosteroid therapy는 임상에서 광범위하게 사용되고 있으며, 심각한 면역저하 효과를 나타내는 것으로 알려져 왔다. 비단 외적인 glucocorticoids의 투여 뿐만 아니라, 이러한 스트레스 호르몬의 증가를 유발하는 환경(burns, shock, sepsis, trauma)으로 인한 corticosterone의 분비는 고대사성, 이화반

응을 유발하게 된다.

Mice, rat에서는 glucocorticoids의 생리학적 용량 및 고용량의 투여로 인한 점막표면에서의 면역글로불린 A의 뚜렷한 감소로 인한 민감음성 미생물총의 부착증가와 장간막임프절 등으로의 변위증가 등이 나타나는 것으로 보고되었다<sup>23-25</sup>.

본 연구에서 장관내 분비형 면역글로불린 A(s-IgA)는 P군에서 대조군보다 유의성 있는 감소를 나타낸 것으로 나타나 기존 연구결과와 유사한 경향을 나타내고 있으며, CLA1군은 대조군과 비교시 유의성은 인정되지 않으나 약간의 증가 경향을 보이는 것으로 나타났다. CLA함유 사료급여 개체에 prednisone을 처치한 군에서 CP1군은 P군과 비교하여 유의성 있는 차이점과 대조군과 비교시 감소경향이 낮게 나타났으며, CP2군은 P군보다 분비형 면역글로불린 A의 감소경향이 낮게 나타난 것으로 나타났다. 이의 결과에서 CLA 0.5%의 사료첨가 투여는 prednisone의 장점막면역 저하에 완화작용을 지니고 있는 것으로 생각되며, 1.5%의 사료첨가 농도보다 더욱 효과적인 것으로 생각된다.

Dietary CLA는 mice, rat 그리고 pig<sup>26,27</sup>에서 4주동안의 투여결과로써 체내지방의 감소와 fat-free mass(단백질, 수분 등)의 증가를 나타내는 효과를 보이는 것으로 보고되었다. 이는 hormone sensitive lipase와 carnitine palmitoyl transferase의 활성을 증가시켜 체지방을 감소시키고 lean body mass(근육질)를 증가시키는 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 또한 CLA는 인간의 체지방을 감소시키는 효과도 있음이 밝혀졌다<sup>29</sup>.

본 실험에서 모든 군에서 실험 2주와 3주동안의 체중이 유의성있는 증가를 보이나, 이 후 CLA사료첨가 투여군에서의 지속적인 유의적 체중 증가는 단백질, 수분등의 fat-free mass의 증가로 인한 상대적 증가를 나타내는 것으로 보인다. P군에서의 prednisone 투여 후의 유의적 체중감소는 corticosteroids처치가 신체의 대사 방향을 이화작용과 생리적 활성, 열량소모의 방향으로 바꾸어 체중을 감소시킬 수 있기 때문이며, CP1, CP2군에서의 prednisone 투여 후 체중의 유지는 CLA의 catabolic suppressive효과와 복잡한 작용으로 prostaglandin의 합성이나 signal transduction등에 관여함으로써 prednisone에 대한 체중감소 경향을 완화시키는 것으로 생각된다.

이상의 실험결과로 미루어 볼 때 CLA는 이의 다양한 생리활성과 더불어 세포면역체계와 장관면역체계의 스트레스, 외상, 화상 등의 임상적 측면에서의 이차감염 기회를 가질 수 있는 질환들에 대한 보호작용을 담당할 수 있을 것으로 기대되며, 이를 바탕으로 임상에 응용할 수 있는 연구의 체계화를 통해 정확한 기전과 더불어 CLA의 사료첨가제나 기능성물질로의 이용을 수행해야 할 것으로 본다.

## 결 론

본 연구는 다기능 지질신소재인 conjugated linoleic acid (CLA)의 사료첨가물질로서의 투여를 통한 마우스에서의 혈

청면역글로불린 상승효과여부와 장관내분비형 면역글로불린 등의 측정을 통한 면역성증강여부와, prednisone의 투여로 인한 면역력 저하에 대해 CLA의 면역저하 방어효과 여부를 확인하기 위하여 수행하였다.

CLA 사료첨가 농도 0.5%에서의 혈청면역글로불린 A, G와 장간막림프절 면역글로불린 A 농도는 유의성 있는 증가를 나타내었으며 혈청면역글로불린 E의 농도는 변화를 나타내지 않았다. 그러나 CLA 사료첨가 농도 1.5%에서의 혈청면역글로불린 A 농도는 유의성있는 증가( $p < 0.05$ )를 나타내었으나 혈청면역글로불린 G, E의 농도는 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다.

Prednisone의 투여 후 혈청면역글로불린 A, 장관내 분비형 면역글로불린 A의 농도는 유의성 있는 감소( $p < 0.05$ )를 나타내었으나, 혈청면역글로불린 G, E의 농도의 변화는 유의성이 인정되지 않았다. 그러나 CLA의 첨가사료 투여 후 prednisone의 투약시 혈청면역글로불린 A는 증가경향을 나타내었으나, 혈청면역글로불린 G, E 및 장관내 분비형 면역글로불린 A의 농도는 변화를 보이지 않았다.

CLA의 첨가사료 투여 후 prednisone의 투약시의 체중의 변화는 정상사료투여 후 prednisone의 투약시 일어나는 체중의 감소경향과 유의성 있는 차이점( $p < 0.05$ )을 나타내어 prednisone의 투여로 인한 체중감소경향을 차단하는 것으로 나타났다

이상으로 볼 때 CLA의 투여는 생체의 면역성을 증가시키고 면역저하상태를 개선시키는 질병치료 보조제로써의 이용 가능성이 있다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Ha YL, Storkson J, Pariza MW. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Research* 1990; 50: 1097-1101.
2. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1881-1887.
3. Ip C, Chin SF, Scimeca JA, and Pariza MW. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Research* 1991; 51: 6118-6124.
4. Kelly, ML and Bauman DE. Conjugate linoleic acid: a potent anticarcinogen found in milk fat. In *proc Coenell Nutr Conf Feed Manuf* 1996; 68, cornell University, Ithaca, NY
5. Klusmeyer and Clark. Effect of dietary fat and protein on fatty and flow to the duodenum and in milk produced by dairy cows. *J Biohydrogenation of unsaturated fatty acids J Dairy Science* 1991; 74: 3055.
6. Staples CR, Burke JM, Thatcher WW. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J Dairy Science* 1986; 81: 865.
7. Belury MA, Kempa-Steczko A. Conjugated Linoleic Acid Modulates Hepatic Lipid Composition in Mice. *Lipids* 1997; 32:199-204.
8. Liew C, Schut HA, Chin SF, Pariza MW, Dashwood RH.

- Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 1995; 16: 3037-3043.
9. Roberto Gennari, J Wesley Alexander. Arginine Gutamine, and dehydroepiandrosterone reverse the immunosuppressive effect of prednisone during gut-derived sepsis. *Crit Care Med* 1997; 25(7): 1207.
  10. Dannenberg AM Jr. The antiinflammatory effects of glucocorticoids: a brief review of literature. *Inflammation* 1979; 3: 329.
  11. Butler WT, Rossen RD. Effects of corticosteroids on immunity in man. I. Decreases serum IgG concentration caused by 3 or 5 days of high doses of methylprednisolone. *J Clin Invest* 1973; 52: 2629.
  12. Belury MA, Nickel KO, Bird CE, Wu Y. Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutritional and Cancer* 1996; 26: 149.
  13. Tito C, Kerry G, Norman AG. Murine Lupus Nephritis Effects of glucocorticoid on circulating and tissue bound immunoreactants. *Laboratory Investigation* 1983; 49(4): 476.
  14. Georg Spaeth MD, Thomas Gottwald MD, Robert D Specian PhD, Mark R Mainsous MD, Rodney D Berg PhD, Edwin A Deitch MD. Secretory immunoglobulin A, intestinal Mucin and mucosal permeability in nutritionally induced bacterial translocation in rats. *Annals of Surgery* 1994; 220(6): 798.
  15. Kjerulf M, Grdic D, Kopf M, Lycke N. Induction of gut mucosal immune response: Importance of genetic background and Th1/Th2 cross-regulation. *Scand J Immunol* 1998; 47: 401.
  16. Cook ME, Miler CC, Pariza M. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poultry science* 1993; 72: 1301-1305.
  17. Miller CC, Park Y, Pariza MW, Cook ME. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biophys Res Commun* 1994; 198: 1107.
  18. Michihiro Sugano, Akira Tsujita, Masao Yamasaki, Miwa Noguchi, Koji Yamada. Conjugated Linoleic Acids Modulates Tissue Levels of Chemical Mediators and Immunoglobulins in Rats. *Lipids* 1994; 198: 1107.
  19. Rinkardt NE, Kruth SA, Kaushik A. The effects of prednisone and azathioprine on circulating immunoglobulin levels and lymphocyte subpopulations in normal dogs. *Can J Vet Res* 1997; 25(7): 1207.
  20. DeVries AC, Gerber JM, Richardson HN, Moffatt CA, Demas GE, Tayman SE, Nelson RJ. Stress effects corticosteroid and immunoglobulin concentrations in male house mice (*Mus musculus*) and prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1997; 118(3): 655.
  21. Settigan GA, Pudupakkam RK, McGowan JH. The inhibitory effect on immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 1978; 62(3): 162.
  22. Alverdy JC, Ayois E and Moss GS. Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery* 1988; 104: 185.
  23. Charles R Wira, Carola P Sandoe, Michel G Stelle. Glucocorticoid regulation of the humoral immune system: In vivo effects of dexamethasone on IgA and IgG in serum and at mucosal surfaces. *The journal of immunology* 1990; 144: 142.
  24. Jamaes spitz, Gail Hecht, Mildred Taveras, Eric Ayois and John Alverdy. The effect of dexamethasone administration on rat intestinal permeability : The role of bacterial adherence. *Gastroenterology* 1994; 106: 35.
  25. Luca Gianotti, J Wesley Alexander, Ryoji Fukushima, Tonya Pyles. Steroid therapy can modulate gut barrier function, host defense and survival in thermally injured mice. *Journal of surgical research* 1996; 62: 53.
  26. Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. Effect of Conjugated Linoleic Acid on Body Composition Changes in Mice. *Lipids* 1997; 32: 853-858.
  27. Dugan ME, Aalhus JL, Schaefer AL, Kramer JKG. The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. *Canadian Journal of Animal Science* 1997; 77: 723-725.
  28. Sisk M, Azain MJ, Hausmann DB and Jewell DE. Effect of conjugated linoleic acid on fat pad weights and cellularity in Sprague-dawley and Zucker rats. *FASEB J* 1998; 12: A536.
  29. Thom E. A pilot study with the aim of studying the efficiency and tolerability of Tonalin CLA on body composition in humans. *Medstat Res Ltd* 1997; Oslo Norway.