

## 혈액세포의 텔로미어 함량을 이용한 소의 연령예측

최나은<sup>1</sup> 김현섭<sup>2</sup> 최창용<sup>2</sup> 전광주<sup>3</sup> 손시환<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>진주산업대학교 동물생명과학과, <sup>2</sup>농촌진흥청 축산과학원, <sup>3</sup>한경대학교 생명공학과

## Cattle Age Prediction by Leukocytes Telomere Quantification

Na Eun Choi<sup>1</sup>, Hyun Sub Kim<sup>2</sup>, Chang Yong Choe<sup>2</sup>, Gwang Joo Jeon<sup>3</sup> and Sea Hwan Sohn<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science and Biotechnology, Jinju National University, <sup>2</sup>National Institute of Animal Science, RDA,

<sup>3</sup>Department of Biotechnology, Hankyong National University

### ABSTRACT

Telomeres at the end of chromosomes consist of tandem repeats of (TTAGGG)<sub>n</sub> DNA sequence and associated proteins. Telomeres have the essential functions in chromosome stability and genome integrity and are hence related to cell senescence and cancer. This study was carried out to quantify the amount of telomeric DNA and establish age prediction equations by using the quantity of telomeric DNA for cattle. Analysis of the telomere quantity of the lymphocytes was performed at different age, across breeds and between different sexes of cattle. We quantified the amount of telomeric DNA by the Q-FISH technique using the telomeric DNA probe in 460 cattle at age of 1~166 months in Korean Cattle and Holstein breeds. In results, we found that the amount of telomeric DNA decreased gradually with age. The amount of telomeric DNA of Korean Cattle was significantly higher than that of Holstein breed ( $P < 0.01$ ). In addition, the amount of telomeric DNA in male was significantly higher than that in female ( $P < 0.01$ ). Using the relationship between age and the amount of telomeric DNA in cattle, age predicting equations were established as a result of regression analysis. Because sex and breeds influenced telomeric DNA quantity, the age prediction equations were estimated separately in Korean Cattle females and Holstein females. The regression equations were  $\hat{Y} = 38.102X^2 - 20.103X + 318.309$  ( $P < 0.0001$ ,  $R^2 = 0.8019$ ) in Korean Cattle females and  $\hat{Y} = 42.799X^2 - 99.682X + 242.106$  ( $P < 0.0001$ ,  $R^2 = 0.8379$ ) in Holstein females, where the X was quantity of telomeric DNA and Y was predicted age in months. These equations predicted the age of cattle with high significance and accuracy and have high R square values. Thus, it could be possible to scientifically predict the age using the above equations for Korean Cattle and Holstein females.

(Key words : Telomere, Age prediction, Q-FISH, Leukocyte, Cattle)

### 서 론

국내 한우의 사육두수 증가와 더불어 FTA 협정 발효에 따른 한우 산업의 위기감이 고조되고 있는 실정이다. 특히 FTA 협정에 있어 소고기의 수입 개방은 한우 산업에 지대한 영향을 미칠 것으로 예견하고 있으며, 이에 대한 다각적 대응이 요구된다. 다행히 국내 한우의 생산이력표시제의 도입과 축산물 원산지 표시제가 정착됨에 따라 한우 산업의 위기감이 다소 완화되기는 하였으나, 경쟁력 있는 지속적 산업으로 육성하기 위해서는 보다 과학적인 사육 체계가 필요하다. 최근 한미 FTA 협정에 있어 수입되는 도축 개체에 대한 연령 식별이 사회적 문제가 된 바 있는데 아직까지 소에 있어 사육 개체 및 도축 개체에 대한 실험실적 연령 측정 방법이 거의 없는 실정이다. 따라서 유전자원의 확보, 보존 측면이나 국내 무적 소들의 확인 및 도축우에 대한 과학적 연령 예측 기술이 시급히 개발되어야 할 과제로 사료된다.

생체 노화의 지표로 가장 큰 관심의 연구 대상중 하나가 텔로미어(telomere)이다. 텔로미어는 진핵생물의 양 염색체 말단을 지칭하는 것으로 TTAGGG의 임의반복염기서열(tandem repeated DNA sequence)과 특정 단백질로 구성되어 있고, 이의 역할은 염색체의 보호와 DNA 복제에 필수적 기능을 가진다(Blackburn, 1991; Zakian, 1995; Shay, 1999). 진핵세포의 경우 세포 분열이 거듭됨에 따라 점진적으로 염색체 길이가 감소하게 되는데 동물 세포의 경우 통상 세포 분열 1주기당 약 50 bp~200 bp 정도의 telomeric DNA가 소실된다. 텔로미어가 일정 길이 이하(senescence point)로 짧아지게 되면 염색체를 보호하는 기능을 잃게 되어 세포사멸(apoptosis)이 일어나 전반적 세포 노화가 진행된다(Greider와 Blackburn, 1985; Wright 등, 1997; Faragher와 Kipling, 1998). 그러므로 텔로미어는 세포분열시계(mitotic clock)로서 세포의 분열능력을 제한하는 조절자의 기능을 수행한다 하겠다(Harley, 1991). 텔로미어 길이는 동일 개체 내 세포 간변

\* Corresponding author : Sea Hwan Sohn, Dept. of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea.  
Tel: +82-55-751-3264, E-mail: shsohn@jinju.ac.kr

만 아니라(Londono-Vallejo, 2001), 종(種) 간(Roux 등, 2009), 성(性) 간(Benetos 등, 2001; Cherif 등, 2003)에도 이질적(heterogeneous) 양상을 보이며, 여러 환경적 요인들 특히 식이 조건이나 스트레스와 같은 요인들이 이들 길이에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(von Zglinicki, 2000; Epel 등, 2004; Zannoli 등, 2008). 그러나 사람을 포함한 여러 동물들에 있어 연령과 텔로미어 길이의 관계는 유전적, 환경적 요인에 따른 변이에도 불구하고 연령이 증가함에 따라 일정한 텔로미어 길이의 감축 패턴을 나타내고 있다(Frenck 등, 1998; Monaghan과 Haussmann, 2006; 정 등, 2006; 최 등, 2008; 손 등, 2008). 이러한 이론적 바탕을 근거로 텔로미어의 길이를 이용한 연령 예측이 시도되고 있는데 Hewakapuge 등(2008)은 사람의 백혈구세포의 텔로미어 함량을 real-time quantitative PCR (Q-PCR) 방법으로 분석하여 연령을 예측한 결과 인종별, 환경적인 변이뿐만 아니라 개인 간 편차가 커서 연령의 예측이 불가능함을 보고한 바 있으나, Ren 등(2009)은 티벳인을 대상으로 telomeric restriction fragment (TRF) 방법으로 텔로미어 함량을 분석하여 연령과 높은 상관도를 가진 회귀식을 추정함으로써 연령 예측의 가능성을 제시하였다. 소의 경우도 모든 개체가 연령이 증가함에 따라 점진적이고 일정 함량의 텔로미어 감축이 나타난다고(최 등, 2008) 보고함으로써 telomeric DNA 함량을 이용한 개체의 연령 예측이 가능할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 양적형광보인법(Quantitative Fluorescence *in situ* Hybridization; Q-FISH)을 이용하여 소 혈액중 백혈구 세포의 telomeric DNA 함량을 분석하여 연령에 따른 텔로미어의 감축 양상 및 이에 영향을 미치는 요인들을 구명하고, 텔로미어 함량을 이용한 연령추정함수를 개발하여 혈액세포를 이용한 소의 개체 연령을 예측하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물 및 공시재료

소의 연령별 텔로미어 함량 분석을 위하여 경남지역 농가 및 가축유전자원시험장(남원)에서 사육중인 1~166개월령의 한우 암수 312두와 진주산업대학교 종합농장 및 국립축산과학원(성환)에서 사육중인 1~126개월령의 홀스타인종 암컷 148두를 대상으로 각 개체별 경정맥에서 10 ml의 혈액을 채혈 후 분석에 공시하였다.

### 2. Telomeric DNA probe 제작

세포내 텔로미어의 양적분석을 위하여 형광보인법(fluorescence *in situ* hybridization; FISH)을 시행하였는데 이를 위한 telomeric DNA probe의 제작은 Dig-PCR probe synthesis kit(Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. Primer는 CCCTAA 42mers 단일 oligomers를 제작하여 이

용하였고, primer를 첨가 후 변성(denaturation), 접합(annealing), 신장(extension) 과정을 반복하여 대상염기서열을 증폭하면서 dig-labeled nucleotide를 결합시켰다. PCR의 반응 조건은 94°C 서 5분 동안 최초 변성을 시키고, 94°C 서 30초, 56°C 서 30초, 72°C 서 30초의 과정을 35번 반복시킨 후 72°C 서 5분간 마지막 신장을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel로 전기영동하여 band의 위치와 크기로서 농도를 확인하였다.

### 3. 형광보인분석을 위한 표본 제작

텔로미어의 함량분석을 위하여 채혈한 혈액을 원심분리한 후 백혈구만 분리하여 세포 표본을 제작하였다. 분리된 세포는 0.06M KCl (Sigma, St Louis, MO, USA)을 이용하여 37°C 배양기에서 15분간 저장 처리하고 이후 고정액을 10방울 정도 첨가하여 원심 분리 시켰다. 고정처리하는 methanol과 acetic acid를 3:1비율로 혼합하여 사용 하였으며 이를 3회 반복 처리한 후 세포액을 3~5 방울 정도 슬라이드에 떨어뜨려 표본을 제작하였다.

### 4. 양적형광보인분석

백혈구의 텔로미어 함량 분석을 위하여 양적형광보인법(Q-FISH)을 이용한 본 분석 방법은 손 등(2004)이 제시한 방법을 일부 수정하여 실시하였다.

Q-FISH를 위한 전처리로 준비된 슬라이드 표본을 10 $\mu$ l RNase A (Roche)가 함유된 50 ml의 2 $\times$  SSC 용액에 담귀 37°C 황온수조에서 30분간 처리하여 RNA를 제거하였다. 이후 초저수에 2~3회 수세하고 80%, 90%, 100% ethanol로 수세하여 탈수 시키고 슬라이드를 실온에서 건조 시켰다. 접합 용액(hybridization solution)은 13 $\mu$ l 4 $\times$  hybridization solution(8 $\times$  SSC, dextran sulphate 40%, DNA MB grade 4mg/ml Roche) 및 telomeric DNA probe 2 $\mu$ l(100ng/ $\mu$ l)를 제조하였다. 접합 용액을 표본 슬라이드의 중앙에 떨어뜨리고 커버그라스로 덮은 후 종이접착제로 밀봉하였다. 이를 72°C 서 10분간 처리하여 probe와 표본의 DNA를 변성시키고 38.5°C 서 12시간 이상 접합시켰다. 이 후 표본을 PN buffer(0.1% sodium phosphate, 0.1% Nonidet P-40; Roche)로 세척하고 접합 탐지를 위하여 20 $\mu$ l anti-digoxigenin-fluorescein (FITC; Roche)으로 38.5°C 서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 표본은 PN buffer로 3회 세척 후 암소에서 건조시킨 다음 propidium iodide solution (PI; Sigma)으로 배경염색 하였다. 처리가 끝난 표본은 적녹 파장대의 검출필터를 부착한 형광현미경(model AX-70 with WIB filter, Olympus, Tokyo, Japan)으로 probe의 접합 양상을 관찰하고 관찰한 각각의 상은 디지털 카메라(Model DP-70, Olympus)로 촬영하여 컴퓨터에 저장한 다음 이미지 분석 프로그램(MetaMorph, UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 telomeric DNA의 상대적 함량을 분석하였다. 분석 방법은 적색(PI)의 핵내

genomic DNA 발현량 대비 녹색(FITC)의 telomeric DNA 발현량을 산출함으로써 텔로미어의 상대적 함량을 계산하였다.

5. 통계분석

소의 성별 간, 품종 간 및 연령 간 텔로미어 함량을 비교 분석하기 위하여 SAS 통계프로그램(SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)을 이용하여 t-test 및 ANOVA/Tukey 다중 검정 분석법으로 유의성 검증을 하였고, 텔로미어 함유율로서 연령에 대한 회귀식의 추정 및 회귀계수의 유의성 검증은 동일 프로그램을 이용하여 회귀분석법(regression analysis)으로 분석 하였다.

결과 및 고찰

1. 소의 연령별 텔로미어 양적 변화

소의 성장, 발달, 노화단계 별 텔로미어의 양적변화 양상을 분석하기 위하여 한우 및 홀스타인종을 대상으로 연령별 각 개체의 백혈구 세포 표본을 제작하고 telomeric DNA probe로서 FISH를 수행한 후 각 개체별 100개 이상의 세포를 획득하고 이미지 분석 프로그램(image analyzer program; MetaMorph®)을 이용하여 텔로미어의 상대적 함량을 분석하였다.

Fig. 1은 소의 백혈구 간기 세포의 텔로미어 분포양상을 나타낸 것으로 각 그림의 텔로미어의 상대적 함량은 상기 분석법으로 분석한 값이다. Table 1과 Fig. 2는 1개월령부터 166개월령의 한우 및 홀스타인종 암수 총 460두에 대한 개체별 백혈구 세포의 텔로미어

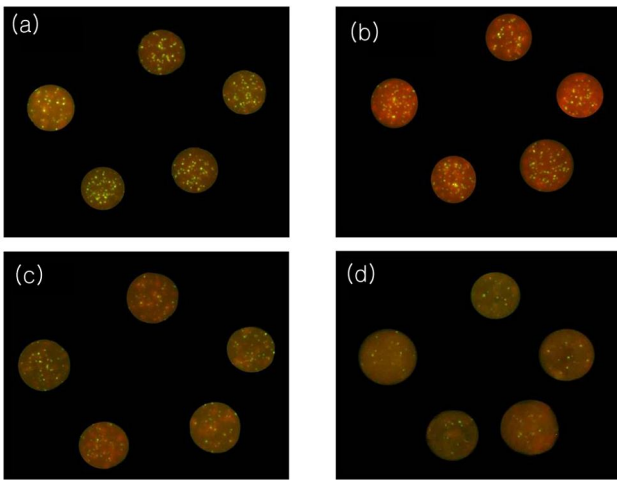


Fig. 1. Distribution of telomeric DNA on interphase nuclei of cattle leukocytes by FISH using telomeric DNA probe. The relative amount of telomeric DNA calculated using the image analyzer program Metamorph®; (a) amount of telomeric DNA (ATD) 2.53%, (b) ATD 2.00%, (c) ATD 1.51%, and (d) ATD 1.07%.

Table 1. The relative amount of telomeric DNA on cattle leukocytes at different ages

Age	Number of cattle	Amount of telomeric DNA (%)	Telomere shortening rate (%)
1 yr (1-12 mo.)	59	2.355±0.013 <sup>a</sup>	
2 yr	84	2.057±0.011 <sup>b</sup>	0.298
3 yr	89	1.810±0.009 <sup>c</sup>	0.247
4 yr	79	1.710±0.008 <sup>cd</sup>	0.100
5 yr	35	1.596±0.009 <sup>de</sup>	0.114
6 yr	34	1.425±0.012 <sup>ef</sup>	0.171
7 yr	21	1.433±0.013 <sup>ef</sup>	— 008
8 yr	21	1.330±0.011 <sup>fg</sup>	0.103
9 yr	12	1.269±0.013 <sup>fg</sup>	0.061
above 10 yr	26	1.176±0.008 <sup>g</sup>	0.093
Mean		1.616±0.118	0.134

The values are means ± SEM. Means with different superscripts in same column significantly differ at p<0.0001.

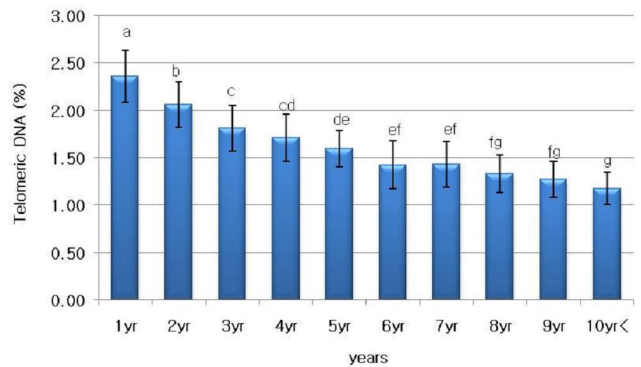


Fig. 2. The trend of telomere quantity of cattle leukocytes along with age.

의 상대적 함유율이다. 분석 결과 소의 백혈구 세포의 평균 telomeric DNA 함유율은 1.62%이었고, 생후 연간 평균 0.13%씩 감소되는 것으로 나타났다. 1세 때 평균 텔로미어 함유율이 2.36% 였으나 10세 이후 1.18%로 연령이 증가함에 따라 백혈구 세포의 telomeric DNA 함유량은 일관되게 점진적이며 유의적으로 감소되는 양상을 나타내었다(p<0.0001). 또한 텔로미어의 연간 감소율(telomere shortening rate; TSR)은 3세 때까지 매년 상대적으로 높은 감소율을 나타내다가 이후 8세 때까지 중정도의 안정된 감소율을 보이고, 9세 이후에는 다소 낮은 감소율을 나타내었다. 본 결과에서 7세 때의 telomeric DNA 함량이 6세 때의 telomeric DNA 함량보다 높게 나타난 것은 분석 개체의 성 및 품종에 대한 다소의 표본 편의(bias)가 있었기 때문인 것으로 사료된다.

생체 노화와 세포내 텔로미어 길이 감축 간에 매우 연관성이 높다는 사실(Monagan과 Hausmann, 2006)이 밝혀진 이래 사람(Zeichner 등, 1999)을 비롯한 생쥐(Kotrschal 등, 2007), 고양이

(Brummendorf 등, 2002), 조류(Hall 등, 2004; Pauliny 등, 2006; 정 등, 2006) 등 대부분의 동물에서 연령이 증가함에 따라 텔로미어 길이가 감축되는 양상을 보고하였다. 또한 유아기 및 성장기 때의 텔로미어 감축 속도가 성인 및 노년기에 비해 빠르게 나타난다고 하였다(Frenck 등, 1998; Metcalfe와 Monaghan, 2001; Rollo, 2002; Monaghan, 2008). 더불어 거의 모든 조직의 세포들이 노화에 따른 텔로미어의 감축양상을 보이나 뇌와 같은 비증식성 세포의 감축률이 혈액세포와 같은 증식성 세포에 비해 다소 낮은 감축율을 보인다(Cherif 등, 2003; 정 등, 2006; Nakamura 등, 2007). 소에 있어서도 최 등(2008)이 1~6세의 136두의 한우 및 홀스타인종을 대상으로 백혈구 세포들의 telomeric DNA 함유율 분석에서 연령이 증가함에 따라 telomeric DNA 함유율이 초기 성장시 급격히 감소하고 이후 점진적으로 감소된다고 하였고, Miyashita 등(2002)은 0~18년생의 Japanese Black Cattle 50마리의 텔로미어 길이를 분석한 결과, 연령이 증가함에 따라 텔로미어 길이는 유의적으로 감소한다고 보고하였다. 이상의 연구 결과들과 더불어 소의 성장, 발달, 노화 단계별 백혈구 세포내 telomeric DNA 함량 분석을 통하여 축우의 경우에도 연령이 증가함에 따라 텔로미어가 점진적으로 감소한다는 이론을 재 입증하였고, telomeric DNA 함량이 개체의 노화표지로 활용할 수 있음을 제시한다.

## 2. 소 품종간 텔로미어 함량 비교

소의 품종별 telomeric DNA 함량을 비교 분석하기 위하여 한우와 홀스타인 종을 대상으로 품종별 동일 연령의 암컷 혈액을 이용하여 Q-FISH를 수행하였고, 이들 telomeric DNA의 상대적 함량 값을 Table 2에 제시하였다. 각 품종별 telomeric DNA 함유율을 생후 72개월까지 12개월 단위로 나누어 연령대 별로 분석한 바, 모든 연령대에서 한우가 홀스타인에 비해 높은 텔로미어 함유율을 나타내었고, 평균 telomeric DNA 함유율은 한우가 1.90%, 홀스타인은 1.59%로 한우가 홀스타인에 비해 유의적으로 높은 telomeric DNA 함량을 보였다 ( $p < 0.0001$ ).

인종별 텔로미어 길이의 비교분석에서 미국내 흑인(African Americans)이 백인(Whites)에 비해 텔로미어 길이가 유의적으로 긴 것으로 보고하여 인종 간 차이가 있음을 제시한 바 있다(Hunt 등, 2008). 그러나 심장병과 관련한 또 다른 연구에서는 백인이 오히려 흑인 및 히스파닉인(Hispanics)에 비해 텔로미어 길이가 길었다는 상반된 결과도 제시하였다(Roux 등, 2009). 이러한 상반된 결과들은 생활환경의 여러 요인들에 의해 텔로미어 길이의 감축 정도가 달라지고, 종족별 생활습관 또한 이에 영향하기 때문에 추출 표본의 상이성에 기인된 결과로 생각된다. 품종 간 텔로미어 함유율에 대한 차이는 인간에 비해 가축의 경우 보다 합리적인 구멍이 가능할 것으로 사료되는데 이는 동일한 사양 조건하에 동일 연령 대비 비교 분석이 가능하기 때문이다. 닭의 경우 김 등(2007)이 10주령부터 80주령의 한국재래계와 화이트 레그혼종간의 telomeric DNA 함량 분석에서 한국재래계가 레그혼에 비해 이의 함량이 유의적으로 높게 나타났다고 하였다. 또한 손 등(2008)이 Yorkshire, Landrace, Duroc 및 Berkshire의 돼지 품종을 대상으로 백혈구 세포의 telomeric DNA 함량을 90일령과 180일령으로 나누어 분석한 바, 성장 초기인 90일령에 순종버크셔가 다른 종에 비해 유의적으로 높은 telomeric DNA 함유율을 보여 품종 간 차이를 나타내었다고 하였다. 이러한 결과와 더불어 소에 있어서도 동일 연령 대비 품종 간의 telomeric DNA 함량 차이가 있음을 알 수 있었는데 이러한 차이는 유전적 차이에 기인된 결과로 사료되어 세포의 노화 및 증식에 있어 품종 간에 차이가 있는 것으로 생각된다.

## 3. 소의 암수간 텔로미어 함량 비교

소의 성별 간 텔로미어 함량을 비교 분석하기 위하여 한우 동일 연령 별 암컷과 수컷의 혈액을 이용하여 Q-FISH를 수행하였다. 한우 암수 간 동일 연령 대비 백혈구 세포내 telomeric DNA의 상대적 함량 값을 Table 3에 제시하였다. 분석 연령이 제한된 수컷의 연령대를 중심으로 생후 36개월까지 12개월 단위로 동일 연령의 암컷과 비교 분석한 바 3세까지 모든 연령에서 수컷이 암컷에 비해 telomeric DNA 함유율이 높게 나타났으며, 수컷의 평균

Table 2. Comparison of the relative amount of telomeric DNA of leukocytes in Korean cattle and Holstein breed

Age	Korean cattle females		Holstein females		Prob.
	No. of cattle	telomeric DNA(%)	No. of cattle	telomeric DNA(%)	
1 yr	22	2.243±0.006	12	2.132±0.012	0.0423
2 yr	24	2.127±0.005	32	1.806±0.006	<0.0001
3 yr	39	1.896±0.005	36	1.594±0.004	<0.0001
4 yr	45	1.870±0.007	34	1.498±0.003	<0.0001
5 yr	24	1.708±0.005	11	1.353±0.006	<0.0001
6 yr	22	1.570±0.007	12	1.161±0.010	<0.0001
Mean		1.902±0.102		1.591±0.140	<0.0001

The values are means±SEM.

Prob : P values by t-test for the means of telomeric DNA within a same row.

Table 3. Comparison of the relative amount of telomeric DNA of leukocytes in Korean cattle males and females

Age	Males		Females		Prob.
	No. of cattle	telomeric DNA(%)	No. of cattle	telomeric DNA(%)	
1 yr	25	2.560±0.012	22	2.243±0.006	<0.0001
2 yr	28	2.285±0.004	24	2.127±0.005	<0.0001
3 yr	14	2.127±0.008	39	1.896±0.005	<0.0001
Mean		2.324±0.127		2.089±0.102	<0.0001

The values are mean ± SEM.

Prob: P values by t-test for the means of telomeric DNA within a same row.

telomeric DNA 함유율은 2.32%, 암컷은 2.09%로 전체 평균값에 있어서도 수컷이 암컷에 비해 유의적으로 높은 telomeric DNA 함량을 보였다 ( $p < 0.0001$ ).

이러한 결과는 최 등(2007)이 48개월령 이전 소의 백혈구 세포의 성별 간 telomeric DNA 함량 비교에서 수컷이 암컷에 비해 높은 telomeric DNA 함유율을 나타내어 성별 간 유의적 차이가 있었다는 보고와 동일한 결과이다. 또한 손 등(2008)이 90일령 및 180일령 돼지의 성별 간 백혈구 세포의 telomeric DNA 함량 비교에서 90일령에서 수컷의 함유율이 암컷에 비해 높았다고 하였다. 그러나 사람의 경우, Benetos 등(2001)과 Perner 등(2003)은 여자의 염색체 내 텔로미어 길이가 남자에 비해 상대적으로 길고 감축률이 낮았다고 하였으며, 김 등(2007)은 닭의 성별 간 telomeric DNA 함유율을 10주령에서 80주령까지 10주령 단위로 비교 분석한 바, 초기 성장 및 노화 단계에서 암컷의 함량이 수컷에 비해 유의적으로 높았다고 하였다. 이와 같이 모든 종(種)에 있어 성별 간 telomeric DNA의 함량의 차이가 인정되나 중간에는 다소 상이한 결과들을 나타내어 이러한 차이가 종 특이적인 유전적 차이인지, 아니면 이들 종들의 생활 환경적 차이에 기인된 결과인지는 향후 또 달리 연구되어야 할 과제로 사료된다.

#### 4. 텔로미어 함량을 이용한 연령예측 함수 추정

소의 경우 연령별 telomeric DNA 함량분석 결과 연령이 증가함에 따라 telomeric DNA 함유율이 점진적이고 유의적으로 감소된다는 결과를 바탕으로 텔로미어 함량 분석 값을 이용한 소의 연령예측을 시도하고자 하였다.

소의 품종별, 성별 간의 telomeric DNA 함량 분석 결과 한우와 홀스타인종 간에 뚜렷한 유의적 함량 차이를 보임으로 두 품종별 유전적인 차이와 생리학적인 품종 특이성을 확인하였고, 또한 한우의 성별 간 telomeric DNA 함량 분석 결과에서도 수컷이 암컷에 비해 telomeric DNA 함유율이 유의적으로 높게 나타남으로 성간의 생리적인 차이를 확인하였다. 따라서 본 연구에서 소의 품종 간, 성별 간의 telomeric DNA 함량 차이를 인정하고 분석의 편의(bias)를 줄이고자 암컷만을 대상으로 한우와 홀스타인종에 대한 각각의 연령예측 함수식을 추정하였다. 연령예측 함수 추정 방법은 변수들 사이의 함수 관계를 추정하는데 널리 사용되어지는 자료분

석 기법인 회귀분석을 이용하였다. 이는 소의 연령과 telomeric DNA 함량 간의 관련성을 근거로 이들 두 변수들 간의 함수관계를 분석하여 telomeric DNA 함량으로서 개체의 연령을 추정할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서 연령예측함수 추정 방법은 telomeric DNA 함유율을 독립변수(X)로 두고, 연령을 종속변수(Y)로 설정하여 2차 회귀함수식을 도출하였다. 또한 회귀계수의 유의성 검정 및 결정계수( $R^2$ ) 값을 분석하여, 도출한 회귀모형을 설명하였다.

이러한 텔로미어 함량을 이용한 연령 예측에 관한 연구로서 사람의 경우 Hewakapuge 등(2008)이 백인종, 동양의 남아시아인, 아프리카인, 미국 본토인, 중동 태생인을 대상으로 하여 Q-PCR을 이용하여 텔로미어 함량을 분석하고 이를 독립변수로 하여 연령에 대한 회귀식을 추정 한 바 도출한 1차 회귀식의 결정계수( $R^2$ )가 0.0368로서 매우 낮은 상관성을 보임에 따라 연령 예측의 어려움을 보고 한 바 있다. 그러나 Ren 등(2009)은 중국의 두 인종을 대상으로 TRF 방법으로 분석한 텔로미어 함량으로서 연령예측을 시도하여 다소 높은 상관도를 가진 회귀식을 도출하였다. 인간의 경우 대상 표본에 따른 텔로미어 길이의 변이가 크다는 것을 알 수 있는데, 이는 텔로미어 길이가 태생에 의하여 나타나는 변이와 후생적 변이가 모두 영향을 미치기 때문이다(Okuda 등, 2002). 따라서 인간은 인종 및 다양한 환경 변이로 인하여 텔로미어 길이를 이용한 연령예측이 매우 난해한 것으로 판단되나 가축의 경우 동일한 품종을 대상으로 유사한 사양 조건에서 사육하여 환경적 변이를 최소화함으로써 텔로미어 함량을 이용한 연령 예측의 높은 신뢰성을 기대할 수 있다.

##### (1) 한우 암컷 연령예측 함수 추정

Telomeric DNA 함량을 이용하여 한우 암컷의 연령을 추정하기 위하여 3개월에서 166개월령의 암컷 한우 245두를 이용하여 12개월 단위로 개체별 telomeric DNA 함량을 분석하였다. Fig. 3은 연령에 따른 telomeric DNA 함유율의 변화 양상을 나타낸 것으로 0~12개월은 2.24%, 25~36개월은 1.90%, 49~60개월은 1.71%, 73~84개월은 1.50%, 97~108개월은 1.33%로 연령이 증가함에 따라 telomeric DNA의 함유율이 유의적으로 감소되는 양상을 확인할 수 있었다. 본 연구결과를 이용하여 telomeric DNA 함유율과 연령 간 회귀분석으로 한우 암컷의 월령을 추정할 수 있는 연령예

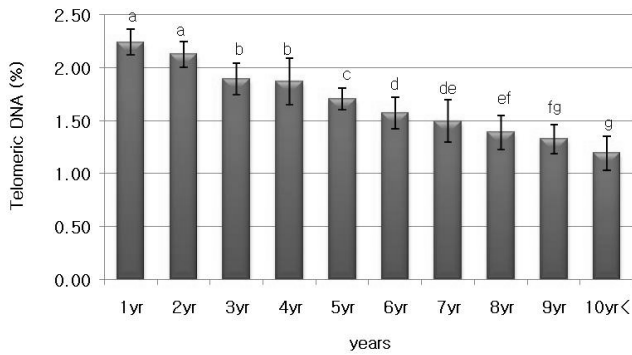


Fig. 3. The trend of leukocytes telomeric DNA quantity along with age in Korean cattle females.

추회귀합수를 추정하였고, 그 결과를 Fig. 4에 제시하였다. 한우 암컷의 연령예측을 위한 추정 회귀식은 다음과 같다.

$$\hat{Y} = 38.102X^2 - 20.103X + 318.309 \quad (p < 0.0001, R^2 = 0.8019)$$

여기서,  $\hat{Y}$ 는 한우 암컷 추정 월령, X는 해당 개체 백혈구의 텔로미어 함유율

본 분석에서 추정된 연령예측회귀함수는 2차회귀함수로 각각의 회귀계수는 38.102와 - 20.103으로서 회귀계수에 대한 유의성 검정 결과  $p < 0.0001$ 로서 고도의 유의성이 인정되어 회귀 모형의 높은 신뢰성을 나타내었다. 추정 회귀식의 결정계수( $R^2$ )는 0.8019로서 텔로미어 함량과 연령간에 매우 높은 상관성을 나타내어 본 식을 이용하여 한우 암컷의 경우 telomeric DNA 함유율로써 개체의 연령을 신뢰할만한 수준에서 예측이 가능할 것으로 사료된다.

(2) 홀스타인 암컷 연령예측 함수 추정

Telomeric DNA 함량을 이용하여 홀스타인 암컷의 연령을 추정하기 위해 1개월에서 126개월령의 홀스타인 암컷 148두를 이용하여 12개월 단위로 개체별 telomeric DNA 함유율을 분석하였고, Fig. 5는 연령에 따른 telomeric DNA 함유율의 변화 양상을 나타

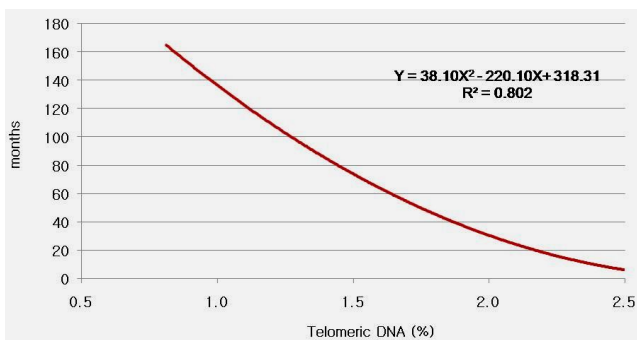


Fig. 4. Regression curve of age on the amount of leukocytes telomeric DNA in Korean cattle females.  $\hat{Y}$  is expected age in month. X is the amount of telomeric DNA.

낸 것이다. 홀스타인 암컷 역시 한우와 마찬가지로 연령이 증가함에 따라 telomeric DNA 함유율이 유의적으로 점진적 감소 양상을 나타내었다. 이를 토대로 telomeric DNA 함유율과 연령간의 회귀 분석을 이용하여 연령예측함수식을 추정하였고, 그 결과를 Fig. 6에 제시하였다. 홀스타인 암컷의 telomeric DNA 함유율을 이용한 연령에 대한 추정 회귀식은 다음과 같다.

$$\hat{Y} = 42.799X^2 - 39.682X + 242.106 \quad (p < 0.0001, R^2 = 0.8379)$$

여기서,  $\hat{Y}$ 는 홀스타인 암컷 추정 월령, X는 해당 개체 백혈구의 텔로미어 함유율

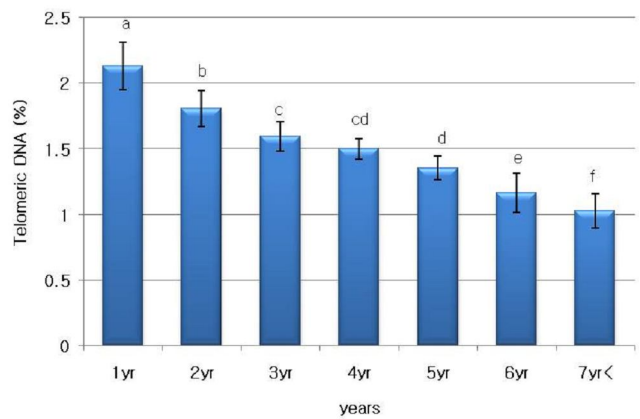


Fig. 5. The trend of leukocytes telomeric DNA quantity along with age in Holstein females.

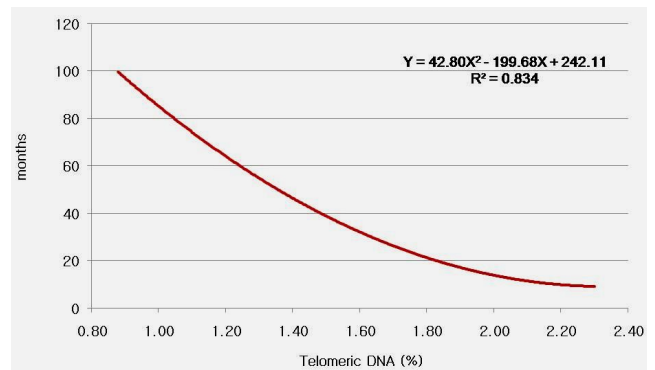


Fig. 6. Regression curve of age on the amount of leukocytes telomeric DNA in Holstein cattle females.  $\hat{Y}$  is expected age in month. X is the amount of telomeric DNA.

본 연구에서 추정된 연령예측회귀함수는 2차 회귀함수로, 추정된 각각의 회귀계수는 42.799와 - 39.682이며, 회귀계수에 대한 유의성 검정 결과  $p < 0.0001$ 로서 회귀 모형의 높은 신뢰성을 나타내었다. 추정 회귀식의 결정계수( $R^2$ )는 0.8379로서 텔로미어 함량과 연령 간에 매우 높은 상관성을 나타내어 본 식을 이용하여 홀스타인 암컷의 telomeric DNA 함유율로써 해당 개체의 연령 예측이 가능할 것으로 생각된다.

## 인 용 문 헌

이상의 결과로부터 한우 및 홀스타인 암컷에 대한 연령예측함수의 결정계수( $R^2$ )가 공히 0.8 이상이고, 두 추정 회귀식 모두가 신뢰할 수 있는 함수이므로 상기 회귀식을 이용하여 telomeric DNA 함유율로써 개체의 연령 예측이 가능할 것으로 사료되나, 상기에서 기술한 바와 같이 텔로미어 함량은 유전적 요인뿐만 아니라 많은 환경적 요인에 영향을 받고 더욱이 개체 간 변이가 큼에 따라, 보다 정확한 개체 연령 예측을 위해서는 telomeric DNA 함유율과 더불어 이를 보조할 수 있는 또 다른 age-marker의 개발이 요구된다.

## 요 약

텔로미어란 진핵세포의 염색체 양 말단에 있는 DNA-1백질 복합체로서, 특정단백질과 TTAGGG의 반복염기서열로 구성되어있다. 이들의 기능은 핵 내 염색체의 안정성에 본질적으로 작용함으로써 세포의 노화와 직접적 관련이 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 소의 간기상태의 백혈구 세포를 대상으로 연령별, 품종별, 성별간 telomeric DNA 함량을 분석하여 이러한 요인들이 텔로미어 함량에 미치는 영향을 살펴보고 또한, 텔로미어 함량을 이용한 개체의 연령예측 가능성을 제시하고자 하였다. 소의 텔로미어의 함량 분석은 1개월령에서 166개월령의 한우 및 홀스타인종 460두를 대상으로 telomeric DNA probe를 이용한 Q-FISH 방법으로 분석하였다. 분석 결과 소에 있어서 연령이 증가함에 따라 telomeric DNA 함유율이 일관되게 점진적으로 감소되는 양상을 보였다. 소의 품종간 telomeric DNA 함유율을 비교한 결과 한우의 telomeric DNA 함량이 홀스타인종에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, 성별 간에도 수컷이 암컷에 비해 유의적으로 높은 telomeric DNA 함유율을 나타내어 품종별, 성별 모두 텔로미어 함유율의 유의적인 차이가 있음 확인 할 수 있었다( $P<0.01$ ). 따라서 요인별 유의적 차이가 있으므로 한우 암컷 및 홀스타인 암컷에 대한 각기 연령예측 회귀함수를 추정하였다. Telomeric DNA 함량을 독립변수(X)로 하고, 연(월)령을 종속변수(Y)로 설정하여 2차회귀식을 도출한 바 한우 암컷의 경우  $\hat{Y} = 38.102X^2 - 20.103X + 318.309$  ( $P<0.0001$ ,  $R^2 = 0.8019$ )이고, 홀스타인 암컷은  $\hat{Y} = 42.799X^2 - 39.682X + 242.106$  ( $P<0.0001$ ,  $R^2 = 0.8379$ )으로 분석되었다. 이상의 두 회귀식 모두 유의한 함수로 결정계수( $R^2$ ) 또한 0.8 이상의 높은 상관 값을 보임에 따라 본 회귀식으로 소의 연령 예측이 가능함을 제시하고자 한다.

## 사 사

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(2010-0016181)과 농림수산식품부 기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임.

- Brummendorf, T. H., Mak, J., Sabo, K. M., Baerlocher, G. M., Dietz, K., Abkowitz, J. L. and Lansdorp, P. M. 2002. Longitudinal studies of telomere length in feline blood cells: implications for hematopoietic stem cell turnover *in vivo*. *Exp. Hematol.* 30: 1147-1152.
- Benetos, A., Okuda, K., Lajemi, M., Kimura, M., Thomas, F., Skurnick, J., Labat, C., Bean, K. and Aviv, A. 2001. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension* 37(2):381-385.
- Blackburn, E. H. 1991. Structure and function of telomere. *Nature* 350:569-573.
- Cherif, H., Tarry, J. L., Ozanne, S. E. and Hales, C. N. 2003. Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acids Res.* 31(5):1576-1583.
- Epel, E. S., Blackburn, E. H., Lin, J., Dhabhar, F. S., Adler, N. E., Morrow, J. D. and Cawthon, R. M. 2004. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(49): 17312-17315.
- Faragher, R. G. and Kipling, D. 1998. How might replicative senescence contribute to human ageing? *Bioessays* 20:985-991.
- French, R. W. Jr., Blackburn, E. H. and Shannon, K. M. 1998. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(10):5607-5610.
- Greider, C. W. and Blackburn, E. H. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43:405-413.
- Hall, M. E., Nasir, L., Daunt, F., Gault, E. A., Croxall, J. P., Wanless, S. and Monaghan, P. 2004. Telomere loss in relation to age and early environment in long-lived birds. *Proc. Biol. Sci.* 271:1571-1576.
- Harley, C. B. 1991. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat. Res.* 256:271-282.
- Hewakapuge, S., van Oorschot, R. A., Lewandowski, P. and Baidur-Hudson, S. 2008. Investigation of telomere lengths measurement by quantitative real-time PCR to predict age. *Leg Med.* 10(5):236-242.
- Hunt, S. C., Chen, W., Gardner, J. P., Kimura, M., Srinivasan, S. R., Eckfeldt, J. H., Berenson, G. S. and Aviv, A. 2008. Leukocyte telomeres are longer in African Americans than in whites: the national heart, lung, and blood institute family heart study and the Bogalusa heart study. *Aging Cell* 7(4):451-458.
- Kotrschal, A., Ilmonen, P. and Penn, D. J. 2007. Stress impacts telomere dynamics. *Biol. Lett.* 3:128-130.

- Londond-Vallejo, J. A., DerSarkissian, H., Cazes, L. and Thomas, G. 2001. Differences in telomere length between homologous chromosomes in human. *Nucleic Acids Res.* 29:3164-3171.
- Metcalfé, N. B. and Monaghan, P. 2001. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends Ecol. Evol.* 16:254-260.
- Miyashita, N., Shiga, K., Yonai, M., Kaneyama, K., Kobayashi, S., Kojima, T., Goto, Y., Kishi, M., Aso, H., Suzuki, T., Sakagudhi, M. and Nagai, T. 2002. Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol. Reprod.* 66:1649-1655.
- Monaghan, P. and Haussmann, M. F. 2006. Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan? *Trends Ecol Evol.* 21(1):47-53.
- Monaghan, P. 2008. Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363:1635-1645.
- Nakamura, K., Takubo, K., Izumiya-Shimomura, N., Sawabe, M., Arai, T., Kishimoto, H., Fujiwara, M., Kato, M., Oshimura, M., Ishii, A. and Ishikawa, N. 2007. Telomeric DNA length in cerebral gray and white matter is associated with longevity in individuals aged 70 years or older. *Exp. Gerontol.* 42:944-950.
- Okuda, K., Bardeguéz, A., Gardner, J. P., Rodriguez, P., Ganesh, V., Kimura, M., Skurnick, J., Awad, G. and Aviv, A. 2002. Telomere length in the newborn. *Pediatr. Res.* 52:377-381.
- Pauliny, A., Wagner, R. H., Augustin, J., Szep, T. and Blomqvist, D. 2006. Age-independent telomere length predicts fitness in two bird species. *Mol. Ecol.* 15:1681-1687.
- Perner, S., Bruderlein, S., Hasel, C., Waibel, I., Holdenried, A., Ciloglu, N., Chopurian, H., Nielsen, K. V., Plesch, A., Hogel, J. and Moller, P. 2003. Quantifying quantitative telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence *in situ* hybridization and digital imaging. *Am. J. Path.* 163:1751-1756.
- Ren, F., Li, C., Xi, H., Wen, Y. and Huang, K. 2009. Estimation of human age according to telomere shortening in peripheral blood leukocytes of Tibetan. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 30(3): 252-255.
- Rollo, C. D. 2002. Growth negatively impacts the life span of mammals. *Evol. Dev.* 4:55-61.
- Roux, A. V., Ranjit, N., Jenny, N. S., Shea, S., Cushman, M., Fitzpatrick, A. and Seeman, T. 2009. Race/ethnicity and telomere length in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Aging Cell* 8(3):251-257.
- Shay, J. W. 1999. At the end of the millennium, a view of the end. *Science* 288:1377-1379.
- von Zglinicki, T. 2000. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908:99-110.
- Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D. and Shay, J. W. 1997. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Gen. Dev.* 11:2801-2809.
- Zakian, V. A. 1995. Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 270:1601-1607.
- Zannolli, R., Mohn, A., Buoni, S., Pietrobelli, A., Messina, M., Chiarelli, F. and Miracco, C. 2008. Telomere length and obesity. *Acta. Paediatr.* 97(7):952-954.
- Zeichner, S. L., Palumbo, P., Feng, Y., Xiao, X., Gee, D., Sleasman, J., Goodenow, M., Biggar, R. and Dimitrov, D. 1999. Rapid telomere shortening in children. *Blood* 93:2824-2830.
- 김영주, 박지애, 이수희, 박원철, 손시환. 2007. 닭의 품종별, 성별 및 연령 별 각 조직의 텔로미어 함량 분석. 2007 한국동물자원과학회 학술발표회 Proceedings Vol. II:64.
- 손시환, 정현진, 최덕순. 2008. 양적형광접합보인법 (Q-FISH)에 의한 돼지 백혈구 세포의 텔로미어 함량 분석. *한국동물자원과학회지.* 50(4): 465-474.
- 손시환, Multani, A. S., Pathak, S. 2004. 소, 돼지 염색체의 telomeric DNA 분포양상. *한국동물자원과학회지.* 46(4):547-554.
- 정길선, 조은정, 최덕순, 이민정, 박철, 전익수, 손시환. 2006. 한국재래닭의 주령별 각 조직의 텔로미어 양적분포 양상과 텔로미레이스 활성도 분석. *한국가금학회지.* 33(2):97-103.
- 최덕순, 조창연, 손시환. 2008. 소의 생리적 특성에 따른 세포내 텔로미어 함량과 텔로미레이스 활성도 분석. *한국동물자원과학회지.* 50(4):445-456.
- (접수일자 : 2010. 7. 15 / 수정일자 : 2010. 10. 5 / 채택일자 : 2010. 10. 12)