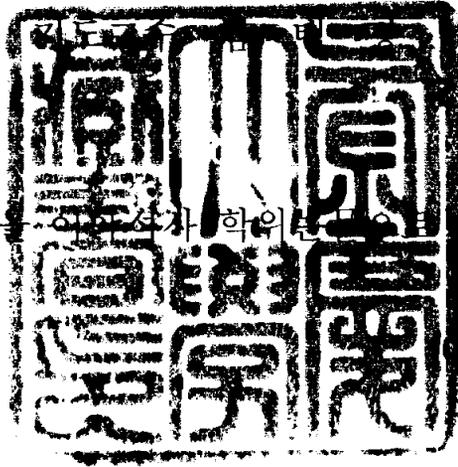


이학석사 학위논문

Polymannuronate가 흰쥐와 세포의
생리적 작용에 미치는 영향

이 논문은 이학석사 학위논문으로 제출함



2004년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

김 인 혜

김인혜의 이학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월 15일

주 심 의학박사 변 대 석 

위 원 수산학박사 김 형 락 

위 원 농학박사 남 택 정 

목 차

Abstract	1
I. 서론	5
II. 재료 및 방법	13
1. 재료	13
1) 시약 및 재료	13
2. 실험방법	14
1) Polymannuronate의 첨가가 흰쥐에 미치는 영향	14
(1) 실험동물 시료	14
① 실험식이의 조제	14
② 실험동물의 사육	16
③ 실험동물의 처리	16
(2) 실험동물 시료의 분석	16
① 혈청 및 간장조직 중의 중성지질 및 인지질	17
② 혈청 및 간장조직 중의 총콜레스테롤과 유리콜레스테롤 ..	17
③ 혈청 및 간장조직 중의 HDL- 및 LDL-콜레스테롤	17
4. 혈청 중의 혈당	18
5. 혈청 중의 GOT 및 GPT의 활성	18
6. 분변 중의 지질 분석	18
7. 분변 중의 총 담즙산 함량	18
8. 분변 중의 총 식이섬유 함량	19

⑨ 혈청 중의 leptin 분석	19
a) 혈청 중의 leptin radioimmunoassay 측정	19
b) 혈청 중의 leptin western blot	20
⑩ 혈청 중의 IGF-I immunoradiometricassay	21
⑪ 간장 조직의 조직염색	21
⑫ 간장 조직중의 leptin mRNA 분석	22
a) Total RNA의 추출	22
b) RT-PCR 분석	22
2) Polymannuronate의 첨가가 3T3-L1 지방세포에 미치는 영향	23
(1) 3T3-L1 세포 배양	23
(2) Glucose 농도 측정	24
(3) Triglyceride 농도 측정	24
(4) Oil red O 염색	25
(5) Total protein 농도 측정	25
(6) Glycerolphosphate dehydrogenase activity 측정	25
(7) 세포내의 leptin 분석	26
① 배양액 중의 leptin radioimmunoassay 측정	26
② Cell lysate 중의 leptin western blot	26
(8) 세포내의 leptin mRNA 분석	27
① Total RNA의 추출	27
② RT-PCR 분석	28
3) Polymannuronate의 첨가가 HT-29 대장암세포에 미치는 영향	28
(1) HT-29 대장암세포 배양	28
(2) HT-29 대장암세포 중의 MTS 분석	29
(3) HT-29 대장암세포 중의 IGF-IR 분석	29
① HT-29 대장암세포의 IGF-IR Immunoprecipitation	29
② HT-29 대장암세포에서 IGF-IR의 western blot	30

4) 실험결과의 통계처리	31
III. 결과 및 고찰	32
1. Polymannuronate의 첨가가 흰쥐에 미치는 영향	32
1) 체중 변화	32
2) 식이섭취량과 식이효율	32
3) 장기의 중량	34
4) 혈청 및 간장 조직 중의 지질조성에 미치는 영향	36
(1) Triglyceride의 함량	36
(2) 인지질의 함량	37
(3) 총콜레스테롤의 함량	39
(4) 유리콜레스테롤의 함량	40
(5) HDL- 및 LDL-콜레스테롤의 함량	40
5) 혈청 중의 혈당 및 GOT와 GPT 활성에 미치는 영향	43
(1) 혈당의 함량	43
(2) GOT와 GPT의 활성	43
6) 분변 중의 조성	45
(1) 일일 분변량	45
(2) 분변 중의 총콜레스테롤 함량	45
(3) 분변 중의 총 담즙산 함량	46
(4) 분변 중의 총 식이섬유 함량	48
7) 혈청 중의 leptin의 함량	51
8) 혈청 중의 IGF-I의 함량	56
9) 간장 조직의 조직염색 분석	58
2. Polymannuronate의 첨가가 3T3-L1 지방세포에 미치는 영향	60
1) 세포의 성장 및 분화 억제	60
(1) 세포 내로의 glucose 유입 억제	60

(2) 세포 내 triglyceride 축적 억제	62
(3) Oil red O 염색	62
(4) Glycerolphosphate dehydrogenase activity 억제	64
2) 세포내의 leptin 분비와 발현 억제	66
(1) Radioimmunoassay에 의한 leptin 분비 억제	66
(2) Western blot에 의한 leptin 발현 억제	68
3) Leptin mRNA 발현에 미치는 영향	70
3. Polymannuronate의 첨가가 HT-29 대장암세포에 미치는 영향 ...	72
1) MTS 분석에 의한 세포 증식 억제	72
2) Polymannuronate에 의한 IGF-IR의 신호전달기전	74
IV. 결론 및 요약	78
V. 참고 문헌	81

The effects of polymannuronate on a physiological action of the cell and the rats

In-Hye Kim

*Department of Food and Life Science, Graduate school,
Pukyong National University*

Abstract

Because alginic acid a kind of dietary fiber is not slaked, there is no value no and it deteriorates the interior of the body's utilization ratio of nutrients, but it is known to prevent obesity, hyperlipemia, arteriosclerosis, constipation, and colon cancer amongst other things.

Especially, it was more effective as a polymannuronate in the serum and liver of lipid metabolism improvement such as in cholesterol decline in groups that have high in cholesterol, and the effect was augmented in cases of low molecularization hydrolyzing alginic acid. Therefore, this research is based on alginic acid that has low molecularization and added then we polymannuronates to study rats and the 3T3 L1 adipocytes, and HT 29 colon cancer cells, examined whether it affected some physiological functions.

According to the results where we a particularly basal group, the cholesterol diet group, and a polymannuronate diet group in Sparague Dawley rats, weight change had no difference, but food intake amount in the basal group was a low quantity of ingestion. Also, the food efficiency ratio was higher in the basal group than in

the cholesterol diet group and the polymannuronate diet group, but there was no difference between the later two groups. The triglycerid and phospholipid level in the serum and liver of rats increased most in the cholesterol diet group, and total cholesterol had reduced in the polymannuronate diet group, and the content of the free cholesterol level looked to have a tendency such as total the cholesterol level. The polymannuronate diet group was low through mindfulness more than in the cholesterol diet group and the HDL-cholesterol was lowest in the basal group and the LDL-cholesterol, and these results were show to be equal in the lipids of the liver.

Blood sugar increased in quantity in the basal group, and GOT and GPT activity of the serum was no different in all groups. The polymannuronate diet group had a day of fecal and total bile acid content and total dietary fiber content more than in the other groups.

The leptin secretion level and protein expression of serum were most from the cholesterol diet group, and mRNA expression level of leptin was the mRNA revelation of formation increased more in the polymannuronate diet group than in the cholesterol diet group. The leptin secretion level and protein expression of the serum were most in cholesterol diet group, and the leptin mRNA expression of the liver appeared higher in the polymannuronate diet group than in the cholesterol diet group. Also, the level of IGF-I in the serum looked to have the opposite tendency than with leptin. Staining of liver results, showed serious local deposition from the cholesterol diet

group, and the polymannuronate diet group showed a slightly local deposition.

After differentiating for 10 days a differentiation promotion factor was added to the 3T3-L1 preadipocytes, and polymannuronate was also added. The result, show that polymannuronate checks the glucose's expenditure, triglyceride's checks the accumulation amount in the cells, and controlled fat droplet creations and differentiation, which show equal result as in Oil red O staining. Also, polymannuronate inhibited GPDH activity occurs as a result of the restrain adipogenesis promotion process in 3T3-L1 adipocytes. And the addition of the differentiation promotion factor in 3T3-L1 promotes the differentiation on adipocytes and increased the expression of the leptin level. But, the addition of polymannuronate inhibited differentiation on adipocytes and the leptin secretion level and in cells to check the leptin protein level in the culture media.

As well as this it also, inhibited the transcriptional mechanism and leptin mRNA expression.

We Examined the cellular proliferation and IGF I and IGF-IR of the signaling pathway that exist in cell adding polymanuronate in the HT 29 colon cancer cell that cultivate by fixed density. As a result of the addition of polymannuronate the HT 29 colon cancer cellular proliferation density was checked dependently, and it exposed the check of phosphorylation of the IGF IR in HT 29 colon cancer cell and the check of the IGF I in the signaling pathway.

Polymannuronate play a alginic acid that show a lipid decrease effect and preventive role in colon cancer that low molecularization hydrolyzing alginic acid and rat and 3T3-L1 adipocytes and HT-29 colon cancer cell medication or add and observe the effect. As a result a confirmed lipid decrease effect and leptin secretion decrease by rats and the 3T3 L1 adipocytes, and the HT-29 colon cancer cell influences to the IGF I signaling pathway that is concerned with the proliferation of cancer cells and reduced proliferation of cancer cells.

Therefore, the purpose of this research is the intent to verify polymannuronate as having role in the *in vivo* and *in vitro* level and the signaling pathway of research connected with polymannuronate as an effect is thought that it should be continued with leptin and the IGF I level.

I. 서 론

경제성장과 함께 국민소득의 향상으로 우리나라의 식생활양상 및 이에 따른 질병발생 유형과 사망원인이 크게 변화하고 있다. 즉, 1인당 동물성 식품소비량이 현저히 늘어났으며, 식생활이 서구화되고 외식의 기회가 잦아짐에 따라 지방함량이 많고 식이섬유 함량이 적은 가공식품의 섭취가 증가하게 되었다. 이러한 변화로 체중과다나 비만증이 점차적으로 증가하고 있으며, 이에 따른 우리나라의 주요사망원인에도 영향을 미쳐 최근 순환기 질환, 암 등이 주된 사망원인으로 나타나고 있다.

이러한, 비만이나 순환기 질환 및 암 등을 방지하기 위해서는 섭취 에너지를 줄이고 운동을 통하여 소비 에너지를 증가시켜 체내에 피하지방이 축적되지 않도록 해야 한다. 식이섬유의 섭취가 만성퇴행성 질환의 예방에 효과적이라는 가설이레로 심장병과 같은 순환기 계통의 이환율이 높은 서구에서는 1970년대부터 식이섬유의 효능에 많은 관심을 가져왔다(Burkit and Trowell, 1975). 이와 관련되어 식이섬유는 소화되지 않아 영양적 가치가 없고 영양소의 흡수를 저해하는 단점이 있으나 비만·고지혈증·동맥경화·변비 및 대장암 등을 예방하는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 가공식품에는 식이섬유를 첨가하고 있고, 식이섬유의 생리작용에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(Van, 1978; Huh *et al.*, 1993; Tasi *et al.*, 1976). 식이섬유에 대한 정의로서 일찍이 “체내효소에 의해 가수분해되지 않는 식물성 다당류와 lignin”이라고 하였으며(Trowell *et al.*, 1976), “소장에서 소화되지 않으며, 대장에서 분해 또는 발효되거나 되지 않는 섭취된 모든 식품중합체들의 총체”라고 하였다(Gordon, 1992). 식이섬유는 물리적 성질과 화학구조에 따라 크게 수용성인 pectin, gums, mucilages, 해조다당류와 불용성인 cellulose, 일부 hemicellulose, lignin으로 나누어지며, 소화관에서의 생리적인 효과도 다른 것으로 나타나 있다. 불용성 식이섬유는 bulking effect가 크므로 배설물의 보수성을 향상시켜

변의 용적 및 무게를 증가시키고 배변량 및 그 횟수를 증가시킴으로써 정상작용을 돕는다. 또한 식이섬유가 가진 양이온교환능과 흡착능은 금속이온의 흡수를 저하시키고 배설을 촉진하며 독성제거효과도 있는 것으로 보고되어 왔다. 일반적으로 수용성 식이섬유는 불용성 식이섬유에 비해 보수력이 더 커서 gel을 형성하여 점성이 더 커지므로 식후 반복감을 지속시키고 열량 섭취량을 감소시켜 체중감소를 초래할 수 있으며, gastric emptying의 지연, 위 내용물의 체류시간 연장 및 흡수억제 작용을 가짐으로써 glucose의 흡수를 저하시키고 내당능의 개선효과를 가지게 된다. 또한 장내용물의 점도 변화 및 장점막의 기능과 구조 변경으로 지방질과 콜레스테롤의 흡수 억제, 담즙산 흡수 억제 및 분비를 촉진시키거나(Gallaher *et al.*, 1993) 영양소의 흡수 저해(Ikegami *et al.*, 1990), 변을 통한 담즙산 배설량을 증가시키는 것으로 보고되어 있다(Vahouny *et al.*, 1980). 또한 수용성 식이섬유는 소장의 콜레스테롤 및 다른 영양소의 흡수를 저해하여 혈장과 간의 중성지방 및 콜레스테롤 농도를 유의적으로 낮추어준다. 그러므로, 식이섬유가 동맥경화, 비만, 체중감소에 효과가 있음이 알려져 있다(Han *et al.*, 1994; Keim *et al.*, 1979; Relser *et al.*, 1987; Muller *et al.*, 1981; Yang *et al.*, 1996; Hwang *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 1994).

수용성 식이 섬유질의 일종인 알긴산은 미역이나 다시마와 같은 갈조류의 성분 중 30-40%를 차지하는 해조다당류의 일종으로 화학적으로 탄수화물에 속하지만 전분섬유소와는 달리 poly- β D mannuronate와 poly- α L guluronate의 heteropolysaccharide로 이루어진 단위에 유리 카르복실기를 가진 천연고분자 물질로 강한 반응성을 가지며 각종 무기질과 치환반응을 일으키는 것으로 알려져 있다(Standford., 1883; Haug *et al.*, 1974; Nishide *et al.*, 1988). Fisher *et al.* (1955)의 연구에 따르면 알긴산은 paper chromatography에 의해 β D mannuronate이외에 α L guluronate도 함유하고 있다고 하였으며, Whistler *et al.* (1959)는

giant kelp로부터 추출한 알긴산의 20-40%가 L-guluronate로 구성되어 있다고 하였다. Vincent (1960)는 다시마에 추출한 알긴산을 황산을 써서 가수분해하여 얻은 수종의 oligouronide를 분석한 결과 알긴산의 분자 일부는 D-mannuronate와 L-guluronate를 동시에 함유한다고 하였다. 알긴산은 대개 산이나 알칼리로 가수분해하는 방법을 많이 사용하는데, 이들 추출방법에 따라 구성당의 조성 및 물리적 성질의 변화가 일어난다. Haug *et al.* (1962)은 다시마의 알긴산을 황산으로 가수분해하여 조건별 uronate의 조성을 orcinol 반응에 의하여 측정하였으며, Penman *et al.* (1972)은 다시마와 큰다시마에서 추출한 알긴산에 대하여 동질중합획분과 이질중합획분으로 분획하여 mannuronate block과 guluronate block으로 구분, 그 비율을 측정하였다. 한편 알긴산의 물성에 관한 보고들을 살펴보면, Haug (1959)는 다시마에서 추출한 알긴산의 경우 D-mannuronate가 많은 획분이 Ca와 K의 이온 교환능이 낮았고, 수종 갈조류에서 추출한 알긴산의 Pb, Cu, Zn, Ca 등 2가 금속이온과의 친화도에 관해서도 보고하였다. Iso *et al.* (1978)은 일본 연안이 다시마와 툿 등에서 추출한 알긴산의 함량과 점도 및 분자량에 관하여 보고하였으며, Fujihara *et al.* (1989)은 모자반으로부터 추출한 알긴산을 여러 가지 조건으로 부분가수분해 시킨 후 점도와 분자량을 측정하여 그 상관관계를 구하였다. 이처럼 알긴산은 추출방법 및 구성당의 조성 등에 의하여 점성, 용해성 및 유화능 등의 물성이 좌우되며, 더욱이 이 같은 물성은 D-mannuronate와 L-guluronate 및 각각 구성당 block의 상대적인 비율에 의하여서도 많은 영향을 받는다고 알려져 있다.

이러한 알긴산은 다른 영양성분의 체내이용률을 저하시키는 반면, 혈청 중의 총콜레스테롤 및 중성지방의 함량을 감소시켜 동맥경화 및 고지혈증에 효과적일 뿐만 아니라 피하지방의 축적과 비만을 해소시키는 작용도 가진다(Tsuji *et al.*, 1968 ;Tsuji *et al.*, 1974). 특히, L-polyguluronate와 D-polymannuronate를 많이 함유하는 알긴산을 각

각 구분하여 흰쥐에 급여시킨 결과 D polymannuronate가 많이 함유된 급여군에서 혈청 및 간장 콜레스테롤 저하 등 지질대사 개선이 더 효과가 있었다(Suzuki *et al.*, 1993). 또한 알긴산을 부분가수분해하여 저분자화할 경우, 그 효과가 증대되었다는 보고도 있어(Lee *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998) 본 실험에서는 알긴산을 부분가수분해하여 40kDa으로 저분자화 시킨 polymannuronate를 사용하여 흰쥐와 3T3-L1 지방세포 및 HT 29 대장암세포에 미치는 효과를 보고자 하였다.

3T3-L1 세포는 mouse fibroblast인 3T3 세포에서 유래된 세포주로서 적절한 조건하에서 배양하면 adipocyte로 분화하는 성질을 가지고 있으며 (Green and Kehinde, 1974), 분화시 collagen IV, entactin 및 laminin과 같은 단백질들의 분비가 촉진되는 등(Aratani and Kitagawa, 1988), 그 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있어 지방세포의 대사과정은 물론 지방축적과 지방세포의 분화과정을 연구하는 모델로 많이 사용되고 있다(Eun *et al.*, 1993; Green *et al.* 1976). 이러한 지방세포는 에너지의 저장과 방출이라는 기능을 수행하는 세포인데, 에너지가 과잉일 경우 에너지는 지방세포에서 triglyceride(TG)의 형태로 저장되었다가 에너지가 부족할 경우 TG는 가수분해되어 유리지방산과 glycerol로 방출된다. 지방세포는 이러한 에너지 저장에 적응하기 위하여 직경을 20배까지 변화시킬 수 있고 그 결과 세포 용적은 수 천배까지 증가된다(Kim *et al.*, 1992). 지방세포가 에너지 균형을 유지하는 데는 adipogenesis와 lipolysis에 관여하는 효소와 조절인자들이 필요하다. Adipogenesis에 관여하는 효소들로는 ATP citrate Lyase(CL), Acetyl CoA Carboxylase(ACC), Fatty Acid Synthetase(FAS), lipoprotein lipase, adenylate cyclase, pyruvate carboxylase, glycerolphosphate dehydrogenase(GPDH), glycogen synthetase kinase 3 β 등이며, 이들 효소들의 활성화로 인하여 세포 내로의 지방축적이 진행된다 (Hwang *et al.*, 2000). 따라서, 배양액에 분화촉진인자(ascorbate, cAMP, insulin,

1-methyl-3-isobutylxanthine, corticosteron hemin, cadmium, prostaglandin F_{2α} 등을 첨가함으로써 세포분화를 촉진할 수가 있으며, 반대로 분화억제인자(retinol, retinoic acid, vitamin D group, vitamin E, nicotinamide, phorbol ester, lithium, dihydrotelicidin B, myostatin, tumor necrosis factor α , bromodeoxyuridine, actinomycin D) 등을 첨가함으로써 분화를 억제할 수도 있다. 분화 유도 인자들에 의해 분화된 3T3-L1 세포는 세포 내 지방이 축적되는 등 지방세포로서의 형태를 나타내게 되며, 지방세포 특유의 유전자 발현 및 지방축적을 유도하는 호소의 활성화가 일어나게 된다(Ailhaud *et al.*, 1992; Eun *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001). 이러한 지방세포에서 분비되는 분비되는 16kDa의 leptin 유전자(Ob gene)와 leptin의 발견은 비만의 생리적 기전을 이해하는데 있어 새로운 가능성을 제시하게 되었다(Zhang *et al.*, 1994). 이들 상염색체 열성으로 유전되는 비만 모델 ob/ob 마우스에 leptin을 투여하였을 때 식품 섭취 감소와 에너지 소비가 증가하여 체중 및 체지방량이 감소되었는데, (Coleman, 1978; Choi, 1995). 이것으로 leptin이 식이 섭취와 에너지 평형을 변화시킴으로써 체지방량을 조절하는 내분비 기능이 있다는 것을 알 수 있었다. 혈 중 leptin은 체중 및 체지방 축적에 관련이 있다고 알려져 있으며 에너지 균형을 위한 뇌와 지방조직 사이의 신호전달물질로 알려져 있다. leptin의 일차적인 작용은 식이 섭취 감소 및 체온상승과 대사율 증가이며 식욕을 조절하는 곳으로 알려진 시상하부를 통해 일어나고 있다고 알려져 있다(Lee *et al.*, 2000; Pelleymounter *et al.*, 1995; Casabiell *et al.*, 2000; Sheila *et al.*, 1996; Halaas *et al.*, 1995; Hans *et al.*, 1999; Sujean *et al.*, 1999; Andrea *et al.*, 2000; Woods *et al.*, 1998; Ricardo *et al.*, 1997; Noriko *et al.*, 1999; Stephen *et al.*, 1998). 또한 leptin에 의한 기초대사량 증가는 교감신경계에 의해 활성화되는 갈색 지방조직의 발열반응에 의해 일어난다고 설명되고 있다. 이와 같이 leptin의 항비만효과 발견은 동물의 지방

조직 조절이해에 큰 진전을 가져왔으며 체중과 체조직 구성 성분의 변화와 관련된 여러 가지 임상적 소견을 나타내는 병태를 이해하는데 큰 도움이 되었다. 설치류에 있어서 leptin은 여러 가지 신경내분비물질 뿐 아니라 동물의 번식기능과도 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 최근에는 leptin과 그 수용체가 지방조직뿐만 아니라 뇌하수체, 골수, 태반, 위장, 유방 상피세포, 골격근과 같은 세포나 기관에서도 발견되는 것으로 밝혀졌다(Zang *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 1996). 지방세포에서 leptin과 leptin mRNA 발현은 주로 autocrin과 paracrin의 negative 피드백 신호와 다양한 인자들을 통하여 조절된다. leptin 수준은 triglyceride 축적과 지방조직의 양과 밀접한 관련이 있으며(Shannon *et al.*, 2000; Jean, 1998), 지방세포의 leptin 분비를 자극하는 호르몬은 glucocorticoid, β estradiol, insulin이며, leptin 분비를 억제하는 호르몬은 smatostatine, T₃(Triiodothyronine), 성장호르몬, catecholamines 등이 있다. 그리고 leptin mRNA의 발현에는 다양한 유전인자와 환경적 인자가 관여하는데, 대표적인 전사인자는 PPAR γ 와 C/EBP α 이다. 이들 전사인자들은 상반되는 형식으로 지방 분화 및 leptin mRNA 발현을 조절한다. PPAR γ 는 세포내 수송과 지방산 산화에 필수적인 UCP3 발현에 관여하고, insulin이 유도하는 glucose 수송의 필수 인자인 C/EBP α 는 당신생과 지방합성에 관여하는 다양한 유전자 코딩을 조절한다. 따라서 leptin 유전자 발현은 C/EBP α 에 의해 positive하게 유도되고, PPAR γ 에 의해 negative하게 감소하는 것으로 보고되었다. 그러나, leptin의 합성과 분비를 조절하는 생화학적·분자적 메카니즘은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다.

우리나라는 최근 20여 년간 경제수준의 향상과 의료기술의 발달로 평균수명이 급속히 증가하였다. 그러나, 경제적 발달과 식품의 수입개방 등은 식생활의 서구화를 유도하여 질병 형태의 변화를 초래하였고 대표

적인 예가 암의 발생빈도와 암에 의한 사망률이 증가한 것이다. 특히 과거 서구 선진국에서 다발하는 암으로 알려진 대장암, 전립선암, 유방암, 폐암 등의 유병률이 우리나라에서도 급증하고 있다. 대장암의 발생은 환경적인 원인에 의하여 크게 영향을 받는데, 고지방·고단백·고열량 식이는 대장암의 발생률을 증가시키며, 섬유소, 비타민 A, 비타민 E, 비타민 C, 셀레니움 등의 충분한 섭취는 발생률을 감소시키는 것으로 보고되었다(Shike, 1990; Weisburger, 1991; Statland, 1992). 대부분의 연구에서 식이지방과 대장암은 정의 상관관계가 있음을 보고하고 있으나 식이지방이 대장암 발생에 미치는 영향이 항상 일관성 있는 것은 아니었는데, 이는 섭취하는 지방의 형태에 따라서 지방산 조성이 다르기 때문이라고 하였다(Raddy, 1986; Raddy *et al.*, 1978). 한편, 역학조사에서 다량의 식이섬유를 섭취하는 나라는 대장암의 발병률이 낮았던 반면, 식이섬유가 거의 없는 정제된 당질을 섭취하는 나라에서는 대장암의 발병률이 높았다(Weisburger and Wynder, 1987; Hill *et al.*, 1971). 또한, 대장암 발병의 증가는 고지방/저섬유 식이의 섭취와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있으나 아직 그에 대한 기전은 명확하게 규명되어 있지 않다(Song and Park, 1994; Jacobs, 1986; Lynne and Ausman, 1993).

Insulin like growth factors(IGFs)는 한 개의 사슬로 이루어진 폴리펩타이드로서 정상 또는 악성조직에서 mitogenic 또는 항세포사멸(antiapoptosis) 인자로 작용한다. IGFs는 주로 간에서 생성 분비되어 혈액을 통해 각 조직에 운반되는 endocrine hormone의 역할 뿐 아니라 체내 여러 조직에서 생성되어 조직에서 autocrine/paracrine 방법으로 세포의 성장이나 분화를 조절한다. 세포의 성장이나 분화를 조절하는 IGFs의 작용은 세포의 plasma membrane에 존재하는 특이한 수용체인 IGF receptor에 IGF가 결합한 후 그 작용이 세포 내로 전달됨으로써 이루어진다(Czech, 1989). IGFs은 강한 친화력을 갖는 여러 종류의

IGF-binding protein (IGFBP)에 결합하여 순환되고 존재하는데, 세포에서 생성된 IGFs를 다른 조직이나 세포로 운반하는 운반체의 역할을 하거나 IGFs가 receptor에 결합하는 것을 증가 또는 감소시킴으로서 IGFs의 작용을 촉진하거나 억제한다고 알려져 있다(Baxter, 2000). IGFs는 정상조직의 세포증식을 촉진할 뿐만 아니라 종양생성과 암세포의 증식과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 근래에는 IGF I과 IGF I receptor(IGF-IR)가 종양발생에 주요한 역할을 하는 것이 보고되었다. 대장암 세포를 비롯한 여러 암세포에서 IGF-I이 세포사멸을 방해할 뿐만 아니라 성장을 촉진하는 역할이 있음이 밝혀지고 있다. 또한 인간의 대장암에는 정상적인 주위의 점막조직과 비교하여 IGF IR의 수가 증가된 것이 보고되었다(Guo, 1992).

따라서, 본 연구는 식이섭유의 한 종류이며, 혈중 지질개선에 효과와 비만 방지 및 대장암에 효과가 있다고 알려져 있는 알긴산을 저분자화시킨 polymannuronate를 첨가하여 *in vivo*와 *in vitro*수준에서 살펴보고자 하였다. 먼저 polymannuronate를 급여한 흰쥐의 혈청과 간장지질 및 분변지질의 함량을 살펴보고, 이와 더불어 혈청과 간장조직중의 leptin 수준에 대해서도 살펴보고자 하였다. 그리고 3T3-L1 지방세포에서는 비만 방지에 효과가 있는 polymannuronate의 첨가가 지방세포로의 분화를 억제하고, 지방구의 축적을 감소시킨다는 가설을 세우고 glucose, triglyceride, GPDH 활성 및 세포 중의 leptin 수준을 살펴보고자 하였다. 또한, HT 29 대장암세포에서 polymannuronate의 항암작용이 IGF-I signal pathway를 통하여 일어난다는 가설을 세우고, MTS 분석과 IGF IR의 신호전달을 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 재료

본 실험에 사용된 polymannuronate(M.w. 40kDa)는 (주) KBP(경기도, 평택소재)로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 동물실험에 사용된 측정용 kit는 WAKO(WAKO, Japan), 신양화학(신양화학, Korea)제품을 사용하였으며, LEPTIN RIA KIT(Linco Research, USA)는 Linco제품을, IGF-I IRMA kit(DSL, USA)는 DSL 제품을 사용하였다. amyloglucosidase는 Sigma(Sigma Chemical Co., USA)제품을 사용하였으며, 그 외의 유기 용매와 같은 일반시약은 특급시약을 사용하였다. 3T3-L1 세포와 HT-29 세포배양에 사용된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), RPMI 1640, PBS(phosphate buffered saline), penicillin streptomycin은 Gibco BRL(Life Technologies, Gibco BRL, USA) 제품을 사용하였으며, FBS(Fetal bovine serum), sodium bicarbonate, BSA(Bovine Serum Albumin), trypsin, methylisobutylxanthine, dexamethasone, insulin, Oil red O, IGF-I, Protein A Sepharose는 Sigma(Sigma Chemical Co., USA)와 USB(Amersham Pharmacia bioscience, England) 제품을 사용하였다. Western blot에 사용한 protein standard marker는 rainbow high, low molecular marker(Amersham Pharmacia bioscience, England; RPN756, RPN755)를 사용하였고 detection reagent로는 Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution과 세포의 단백질 농도를 측정하기 위한 BCA Protein Assay Kit(PIERCE, USA)를 사용하였다. Western blot과 immunoprecipitation에 사용한 leptin antibody, phosphotyrosine

antibody, IGF I receptor antibody는 Santa Cruz(Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)와 SIGMA(Sigma Chemical Co., USA)제품을 사용하였다. 세포 생존율을 측정하기 위한 MTS/PMS solution (CellTiter 96 AQueous Non Radioactive Cell Proliferation Assay Kit, Promega Co., USA)은 Promega제품을 사용하였다. 세포 배양용 culture dish, 6-well plate, 96-well plate, corning tube 및 scraper는 Corning(Corning, USA)과 Falcon(Becton Dickinson Labware, USA) 제품을 사용하였고 세포의 RNA 추출용으로는 Intron(Intron Biotechnology, Inc., Korea) 제품인 easy BLUE™ Total RNA Extraction kit로 추출하였다. 전기영동용 agarose는 SeaKem LE agarose(BMA, USA)를 사용하였고, 100bp DNA ladder는 Bioneer(Bioneer Co., Korea)에서 구입하였다. cDNA 합성에 사용한 leptin primer는 제노텍에 의뢰, 합성하여 사용하였으며, 그 외 RNA와 DNA 실험용 시약은 molecular biology용으로 Sigma 제품과 특급시약을 사용하였다.

2. 실험방법

1) Polymannuronate의 첨가가 혈류에 미치는 영향

(1) 실험동물 사료

① 실험사료의 조제

기초식이, 콜레스테롤식이 및 실험사료의 조성은 Table 1과 같으며, 콜레스테롤식은 기초식에서 콜레스테롤 1%를 첨가한 양만큼 corn starch의 양을 줄여 조제하였고, 실험사료는 기초식에서의 corn starch의 양에서 콜레스테롤 1%와 polymannuronate의 5%에 해당하는 양만큼을 줄인 수준에서 각각 조제하였다.

Table 1. Formulation of experimental diets

Constituents	Test animal group ^{*1}		
	B ^{*2}	CHOL.	POLYMAN
Corn starch	496	483.5	433.5
Sucrose	124	124	124
Casein	180	180	180
Lard	100	100	100
Corn oil	50	50	50
Mineral mixture	35	35	35
Vitamin mixture	10	10	10
Choline chloride	2	2	2
Methionine	3	3	3
Cholesterol	0	10	10
Sodium cholate	0	2.5	2.5
Polymannuronate	0	0	50

*1 Test animal: Strain, Sparague Dawley age, 4 weeks; average body weight; 100±10g; feeding period, 4 weeks by experimental diet after a week of basal diet.

*2. Codes of experimental diet. B, fed the basal diet; CHOL., fed the cholesterol diet; POLYMAN, fed the cholesterol diet containing the polymannuronate

② 실험동물의 사육

실험동물의 실험식은 기초식이, 콜레스테롤식이, polymannuronate식이로 구분하여 실시하였다. 동물실험은 효창사이언스에서 분양받은 4주령 된 Sparague Dawley계 숫쥐(체중 $100 \pm 10g$)를 사용하였다. 각 10마리씩 분류하여 연립식 사육케이지에 넣고, 일반사료로서 7일간 순치 예비사육한 후에 기초식이와 콜레스테롤식이, polymannuronate를 함유하는 식이를 급여하였다. 예비사육 및 본 사육기간 중의 물과 식이는 자유급이(*ad libitum*) 섭취시켰으며, 사육기간 중에는 체중과 섭이량을 일정시간에 칭량·급여 하였다. 그리고 사육실 온도($22 \pm 1^\circ C$), 습도($50 \pm 10\%$) 및 병암(12시간, 08:00~18:00 주기로 조명)을 엄격히 조절하였다.

③ 실험동물의 처리

실험동물의 처리는 실험사육 최종일에 12시간 동안 절식시킨 후에 단두하여 채혈하였고, 각 혈액시료는 병수 중에 1시간 방치한 후에 원심분리(3,000rpm, 15min, $4^\circ C$)하여 취한 혈청을 저온($-70^\circ C$)에 보관하면서 실험에 사용하였다. 그리고 간장, 신장, 비장, 심장, 소장, 대장도 별도로 적출하여 생리식염수로 씻은 후, 그 무게를 칭량하였다. 특히, 간장은 RNA를 추출하기위해 즉시 액체질소에 넣어 급속동결시킨 후 실험에 사용할 때까지 $-70^\circ C$ 에 보관하였다. 분변은 실험식이 급여기간 중 실험종료 전 7일간 metabolic cage로부터 수집하였으며, 수집 후 즉시 wet weight를 측정하였고, 항량에 도달할 때까지 건조시킨 다음 건조 중량을 측정하여 wet weight와의 차이를 수분함량으로 하였다.

(2) 실험동물 시료의 분석

총콜레스테롤, 유리콜레스테롤, HDL 과 LDL 콜레스테롤, 중성지질 및 인지질, GOT, GPT의 분석시료 중, 혈청은 저온보관중의 시료를 그대로 분석하였다. 간장분석시료는 간장조직 1g을 취하여 마쇄한 후,

hexan:isopropanol 혼액(3:1, v/v)으로 지질을 추출하고 N₂ gas로 농축하였다. 농축한 시료에 chloroform:methanol 혼액(2:1, v/v) 1ml에 용해하여 분석용 시료로 사용하였다.

① 혈청 및 간장조직 중의 중성지질 및 인지질

혈청과 간장조직 중의 중성지질의 농도는 추출시료 각 100 μ l를 취하여 TRIGLYCERIDE-V "Eiken" kit(신양화학, Korea)를 써서 Enzymatic 법으로, 인지질의 농도는 추출시료 각 100 μ l를 취하여 Phospholipid C test kit(Wako, Japan)를 써서 콜린 옥시데이즈·DAOS 법으로 반응시켜 분광광도계(Ultrospec 2001 pro, Amersham Pharmacia biotech, England)로 각각 측정하였다.

② 혈청 및 간장조직 중의 총콜레스테롤과 유리콜레스테롤

혈청과 간장조직 중의 총콜레스테롤과 유리콜레스테롤은 추출시료 각 100 μ l를 취하여 총 콜레스테롤 측정용 CHOLESTE ZYME V "Eiken" kit(신양화학, Korea)를 써서 Enzymatic COD법으로, 유리콜레스테롤은 Free cholesterol C-test kit(Wako, Japan)를 써서 콜레스테롤 옥시데이즈·페놀법으로 반응시켜 분광광도계(Ultrospec 2001 pro, Amersham Pharmacia biotech, England)로 각각 측정하였다.

③ 혈청 및 간장조직 중의 HDL- 및 LDL-콜레스테롤

혈청과 간장조직 중의 HDL 콜레스테롤의 농도는 추출시료 각 100 μ l를 취하여 HDL C555 kit(신양화학, Korea)를 써서 phosphotungstic acid Mg⁺⁺ 헤파린·망간 결합 침전법으로 반응시켜 분광광도계(Ultrospec 2001 pro, Amersham Pharmacia biotech, England)로 측정하였으며, LDL 콜레스테롤은 (총콜레스테롤의 농도 - HDL-콜레스테롤) (중성지질/5)로 계산하여 나타내었다(Friedewald et al., 1972).

④ 혈청 중의 혈당

Enzymatic glucose oxidase와 peroxidase법에 따라 제조된 혈당측정용 GL ZYME "Eiken" kit(신양화학, Korea)을 써서 분광광도계(Ultrospec 2001 pro, Amersham Phamacia biotech, England)로써 500nm에서 측정하였다.

⑤ 혈청 중의 GOT 및 GPT의 활성

Reitman-Frankel의 방법에 따라 제조된 Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) 및 Glutamic pyruvic transaminase(GPT) 활성측정용 혈청 transaminase 측정 kit(신양화학, Korea)를 써서 분광광도계(Ultrospec 2001 pro, Amersham Phamacia biotech, England)로 505nm에서 측정하였다.

⑥ 분변 중의 지질 분석

분변 시료 중 0.5g을 취하여 chloroform:methanol(3:1, v/v) 15mℓ로 지질을 추출하고 여액을 회수하여 N₂ gas로 용매를 증발시킨 후 1g 당 chloroform:methanol(2:1, v/v) 혼합액을 1mℓ 첨가하여 완전히 용해시킨 후 총콜레스테롤 분석용 시료로 혈청과 동일한 방법으로 측정하였다.

⑦ 분변 중의 총 담즙산 함량

분변 중의 총 담즙산의 함량을 측정하기 위해 다음과 같이 실험하였다(Crowell and MacDonald; 1980) 즉, 마쇄한 0.2g의 분변에 4% KOH/glycerol 1mℓ을 첨가하여 20분간 습열멸균하고 20% NaCl을 첨가하여 ether로 2회 추출하였다. 추출한 잔사에 HCl 1.2mℓ를 첨가하여 산성화(pH 1~2) 시킨 후 ether 5mℓ로 4회 추출하여 상층액을 회수하였다. 상층액을 N₂ gas로 용매를 증발시켜 methanol:H₂O(5:1, v/v) 혼합액 1mℓ에 녹였다. 이것을 총 담즙산 test kit(Wako, Japan)를 이용하여

효소비색법으로 측정하였다.

⑧ 분변 중의 총 식이섬유 함량

분변 중의 총 식이섬유 함량은 AOAC OFFICIAL METHODS of ANALYSIS (1990)을 변형하여 Enzymatic-Gravimetric method로 측정하였다. 분변 시료 중 0.5g을 취하여 chloroform:methanol(3:1, v/v) 15 ml로 지질을 추출한 후 여액은 버리고 잔사에 증류수 10ml를 첨가하여 95°C water bath에서 15분 가열한 후 55°C water bath에서 15분 냉각시켰다. 여기에 250 μ l의 amyloglucosidase(Sigma)를 가하여 55°C에서 1시간 30분, 95°C에서 30분 동안 water bath에서 가열한 후, 여과한 여액에 250 μ l의 amyloglucosidase를 넣어 55°C에서 1시간 30분 가온하였다. 그런 다음, 실온에서 1시간 방치 후 alcohol과 acetone으로 탈수하여 잔사를 회수하고 건조하여 함량을 구한 다음, 525°C 회화로에 4시간 회화시켜 회분을 구하였다. 즉, 분변 당 회분 함량에서 수분 함량의 차를 분변 중의 총 식이섬유소로 하였다.

⑨ 혈청 중의 leptin 분석

① 혈청 중의 leptin radioimmunoassay 측정

혈청 중으로 분리된 leptin의 농도를 측정하고자 ¹²⁵I를 이용한 LEPTIN RIA KIT(Linco Research, Inc, USA)로 측정하였다(Ma *et al.*, 1996). 측정용 tube에 0.05% Triton X 100, 0.08% sodium azide, 0.025M EDTA, 1% BSA가 함유된 pH 7.4의 0.05M phosphosaline (assay buffer)용액 100 μ l를 취하여 standard, control, 그리고 각 군별로 회수한 혈청을 100 μ l씩 넣었다. Kit 내에 포함된 Rat Leptin Antibody를 각각 100 μ l씩 넣은 다음, 잘 혼합하여 실온에서 24시간 반응시켰다. 그 반응액에 ¹²⁵I Rat Leptin Tracer를 100 μ l 넣은 후, 잘 혼합하여 실온에서 다시 24시간 반응시켰다. 그런다음, Precipitating

Reagent 1ml씩 첨가하여 잘 혼합한 후 4℃에 20분간 방치하였다가 원심분리(3000rpm, 30min, 4℃)하였다. 상층액을 제거한 tube를 gamma counter(Wallac 1470 wizard, Amersham Pharmacia Biotech, England)에서 1분 간격으로 radio activity를 측정하였으며 ng/ml으로 나타내었다.

⑥ 혈청 중의 leptin western blot

혈청 중의 leptin western blot은 혈청 2 μ l를 취하여 최종농도가 1 \times Laemmi sample buffer와 0.1M DDT가 되도록 희석하여 전기영동 샘플로 사용하였다. 12.5% polyacrylamide gel에 loading시켜 분리된 단백질을 Immobilon P membran(Millipore, pore size: 0.1 μ m, USA)으로 옮겼다. 이때 표준 분자량은 rainbow high molecular marker (Amersham)를 사용하였다. 분리된 단백질은 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE, Biotechnology, Inc., USA)를 이용하여 leptin 단백질 발현을 확인하였다. 5% fat free milk를 함유하는 1 \times TBS(tris-buffered saline; 20mM Tris-base, 137mM NaCl, 1M HCl)에서 하룻밤 blocking한 다음, TBS T(tris buffered saline containing 0.1% Tween20; 20mM Tris-base, 137mM NaCl, 1M HCl, 0.1% Tween20, pH 7.6)로 10분간 세척하였다. 세척한 membrane에 leptin 1차 항체(Anti-leptin polyclonal rabbit IgG, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)를 TBS T에 1:1,500으로 희석하여 실온에서 2시간 반응시켰다. TBS T로 10분간 3번 세척한 후 peroxidase labelled anti rabbit antibodies 2차 항체(1:1,500)를 사용하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 2차 항체로 반응시킨 membrane은 TBS T로 10분간 3번 세척하고 Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution을 사용하여 KODAK X ray 필름에 감광시켰다. X ray 필름을 현상하여 leptin의 protein

expression 수준을 밴드로 확인하였다.

⑩ 혈청 중의 IGF-I Immunoradiometric assay

혈청의 IGF-I의 농도는 ^{125}I 를 이용한 two-site immunoradiometric assay(IRMA) kit(DSL-5600 ACTIVE IGF I Coated Tube IRMA kit, USA)로 측정하였다. 시험관에 혈청과 extraction solution을 가하여 실온에서 30분간 방치하고 원심분리(10,000rpm, 5min, 4°C)하여 IGFBP을 제거하였다. IGFBP을 제거한 혈청에 neutralizing solution을 첨가하여 중화시킨 후, anti-IGF-I coated tube에 넣고 ^{125}I 가 label 되어있는 anti-IGF-I reagent를 첨가하여 실온에서 3시간 동안 shaking incubation하였다. 3시간 후 anti-IGF-I coated tube내의 반응액은 제거하고 tube는 탈이온수로 세척하였다. 세척 후, 물기를 제거한 anti-IGF-I coated tube는 gamma counter(Wallac 1470 wizard, Amersham Pharmacia Biotech, England)로 radio activity를 측정하였으며, ng/ml²으로 나타내었다.

⑪ 간장조직염색

각 실험식이별로 사육한 흰쥐의 간장조직을 떼어내어 생리식염수로 가볍게 씻어 혈액을 제거하였다. 간장 조직의 일부를 절단하여 0.5cm 두께로 잘라 Bouin 고정용액(picric acid:formalin:glacial acetate=15:5:1)에 고정하고, 동일 고정액을 사용하여 24시간 안에 tissue capsule에 넣어 재고정하였다. 이를 수세하여 자동침투기(autotechnicon)에 넣어 순차농도 알코올에 탈수하고 xylene으로 투명화시켰다. embedding center에서 tissue capsule에 paraffin을 침투시켜 포매(embedding)하여 block으로 만들었다. Rotary microtome으로 block을 이를 5 μm 두께로 박절하여 부유 항온수조에서 충분히 펴지도록 둔 후 깨끗한 slide glass에 부착시켰다. 그런 다음, slide glass와 조직절편을 단단히 집착시켜주기 위해서

60℃ 정도의 온도를 유지하는 slide warmer에 방치하였다. 마지막으로 기본적으로 세포의 배열과 형태학적 변화를 보기 위해 모든 조직절편을 핵과 세포질을 구분해서 볼 수 있는 Hematoxylin & Eosin 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

⑫ 간장 조직중의 leptin mRNA 분석

㉑ Total RNA의 추출

식이군별로 사육한 흰쥐의 간장 조직중의 leptin mRNA를 정량하기 위해서 total RNA를 추출하였다. 각 조건별로 사육한 간장 조직을 0.5g 칭량하여 RNA extraction reagent인 easy BLUE™ Total RNA Extraction kit(Intron Biothechnology, Inc, Korea)를 넣고 homogenizer로 균질화시킨 후, 18₁₂G needle을 통과한 액만을 멸균 tube에 옮겼다. 강하게 섞은 후 실온에 방치하였다. 여기에 chloroform:isoamyl alcohol(49:1)을 첨가하여 실온에서 30초간 섞어 원심분리(13,000rpm, 10min, 4℃)하였다. RNA가 포함된 상층액을 멸균된 1.5ml tube에 옮기고 동량의 isopropanol을 넣어 -70℃에서 1시간 방치하였다. 1시간 경과 후, 다시 원심분리하여 상층을 제거하고 pellet으로 남아있는 total RNA는 차가운 70% ethanol로 2번 세척한 후 실온에서 건조시켰다. 0.1% DEPC에 녹인 후, 260 및 280nm의 파장에서 흡광도를 측정(Ultrospec 2001 pro, Amersham Pharmacia biotech, England)하여 total RNA 함량 및 순도를 확인하고 정량한 total RNA는 1.2% 변성 formaldehyde agarose 겔에 전기영동(Mupid 2, mini gel migration unit)하여 동일한 크기의 밴드를 확인하고 70℃에 보관하면서 reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)에 사용하였다.

㉒ RT-PCR 분석

식이군별로 사육한 흰쥐 간장조직에 존재하는 leptin mRNA의 발현량

을 살펴보고자 하였다. RT-PCR은 QIAGEN One step RNA PCR Kit를 사용하였는데, 각 군별로 추출한 template total RNA 1 μ g과 함께 5X QIAGEN buffer, QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix, 10mM dNTP Mix, 1U RNase inhibitor, 20 μ mol leptin primers, RNase-free water를 포함한 Master mix를 첨가하였다. 이 혼합물을 PCR thermal cycler 480(TAKARA)으로 옮긴 후, 50 $^{\circ}$ C에서 30분, 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 reverse transcription반응시킨 다음 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 59 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분씩 35cycle을 반응시켰다. 이때 사용한 20 μ mol primers는 다음과 같다.

5'-CCCTCATCAAGACCATTTGTCACC-3' (sense)

5'-GCAGCCTGCTCAAAGCCACC 3' (antisense)

PCR 반응 후의 생성물은 EtBr(0.5 μ g/ml)을 함유하는 1.2% agarose gel에 전기영동하고 100bp DNA molecular weight marker(Bioneer Co., Korea)와 비교하여 증폭된 cDNA의 크기와 양을 확인하였다.

2) Polymannuronate의 첨가가 3T3-L1 지방세포에 미치는 영향

(1) 3T3 L1 세포 배양

Mouse의 배아에서 유래한 세포주인 3T3-L1 세포는 ATCC(ATCC, USA)에서 분양받아 사용하였으며, 100mm dish에 10% Fetal Bovine Serum(FBS)을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)으로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂가 유지되는 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포가 약 80%정도 confluent되면 PBS-EDTA로 monolayer를 씻어내고 trypsin-EDTA로 처리하여 계대배양하고 배지는 3일마다 교환하였다. 세포가 confluent되면 polymannuronate에 의한 3T3 L1 세포의 분화현상을 관찰하기 위해서 0.5mM methylisobutylxanthine(MIX), 0.25 μ M dexamethasone

(DEX), 10 μ g/ml insulin(I)이 함유된 10% FBS-DMEM으로 교환하여 분화를 유도하고 이때부터 2일에 한번씩 10 μ g/ml insulin이 포함된 배양액으로 교환하였다. 즉, 3T3-L1 세포가 90%이상 confluent 되면, 0.5mM methylisobutylxanthine(M), 0.25 μ M dexamethasone(D), 10 μ g/ml insulin(I)으로 처리하여 10일간 분화를 유도한 것을 MDI처리군으로 배양하여 control로 보았다. 농도별에 따른 polymannuronate처리군은 MDI처리하고 10일간 분화시킨 후 무혈청(serum free medium)으로 배양액을 교환하였다. 24시간 후 농도별로 polymannuronate를 처리하여 48시간 더 배양하였다. 실험 종료 후 배양액(conditioned media), cell lysate 및 triglyceride sample을 취하여 실험에 사용할 때까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

(2) Glucose 농도 측정

실험 종료 후 회수한 배양액은 원심분리(3,000rpm, 20min, 4 $^{\circ}$ C)하여 상층액을 회수하여 GL ZYME "Eiken" kit를 사용하여 Enzymatic GOD-POD법으로 세포내 사용된 glucose 소비량을 측정하였다. 배양액을 취하여 파장 500nm에서 glucose 농도를 측정하였다.

(3) Triglyceride 농도 측정

Green *et al.* (1974)의 방법으로 세포내의 triglyceride(TG) 축적량을 측정하였다. 배양액을 모은 다음 PBS EDTA로 세척한 후 trypsin처리로 세포를 수축시킨 다음 원심분리(12,000rpm, 3min, 4 $^{\circ}$ C)하여 상층액을 제거하였다. pellet에 다시 PBS로 세척하여 세포를 회수하였다. 그 다음 methanol:chloroform:H₂O=2:1:0.8의 비율로 만들어진 TG 추출용 solution으로 세포 내 TG를 추출하였다. TG 농도는 TRIGLYZYME-V "Eiken" kit를 사용하여 Enzymatic법으로 시료를 취하여 파장 505nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) Oil red O 염색

세포내 지방구 생성을 확인하기 위해 Miller *et al.* (1996)의 방법을 일부 변형한 방법으로 Oil red O 염색을 하였다. PBS-EDTA로 세포를 세척하고 10% buffered neutral formalin으로 30분간 고정하고, 다시 70% ethanol로 1회 세척한 다음 Oil red O로 2시간 동안 염색한 후, 마지막으로 PBS로 세척 후 건조하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(5) Total protein 농도 측정

Cell lysate는 배양액을 회수한 다음 PBS-EDTA로 세척한 후 1 μ M Pepstatin A, 1mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1 μ M Leupeptin, 0.1 μ M Aprotinin의 protein inhibitor가 첨가된 PRP-PREP Protein Extraction Solution(iNtRON, Biotechnology, Inc)로 scrapping하여 세포단백질 추출물을 취해서 원심분리(13,000rpm, 5min, 4 $^{\circ}$ C)후 상층액을 회수하여 보관하였다. 회수한 cell lysate를 취해 Buret법으로 세포내 총 단백질량을 측정하였다. Buret법을 변형한 BIURET 시약을 사용하여 파장 540nm의 흡광도를 측정한 후 단백질 함량을 g/dl $^{\circ}$ 으로 계산하였다.

(6) Glycerolphosphate dhydrogenase activity 측정

Polymannuronate를 농도별로 처리한 GPDH 활성 측정은 Wise *et al.* (1978)의 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 2.5mM EDTA, 100mM triethanolamine HCl buffer(Sigma, pH 7.5), 0.12mM NADH(Sigma), 0.1mM β mercaptoethanol(Sigma)이 포함된 reaction mixture buffer에 sample을 첨가하고 0.2mM dehydroxyacetone phosphate(Sigma)인 start buffer를 첨가하여 340nm에서 흡광도를 측정하여 GPDH의 활성을 산출하였다. 효소 활성 1unit는 1 μ mol NADH/min가 산화되는 정도로 하였다.

(7) 세포내의 leptin 분석

① 배양액 중의 leptin radioimmunoassay 측정

Polymannuronate를 처리한 배양액 중의 leptin 농도는 ^{125}I 를 이용한 RIA LEPTIN RIA KIT(Linco Research, Inc)로 측정하였다. 측정용 tube에 0.05% Triton X-100, 0.08% sodium azide, 0.025M EDTA, 1% BSA가 함유된 pH 7.4의 0.05M phosphosaline(assay buffer)용액 $100\mu\text{l}$ 를 취하여 standard, control, 그리고 각 군별로 회수한 conditioned media를 $100\mu\text{l}$ 씩 넣었다. Kit 내에 포함된 Rat Leptin Antibody를 각각 $100\mu\text{l}$ 씩 넣은 다음, 잘 혼합하여 실온에서 24시간 반응시켰다. 그 반응액에 ^{125}I Rat Leptin Tracer를 $100\mu\text{l}$ 넣은 후, 잘 혼합하여 실온에서 다시 24시간 반응시켰다. 그런 다음, Precipitating Reagent 1ml 씩 첨가하여 잘 혼합한 후 4°C 에 20분간 방치하였다가 원심분리(3000rpm, 30min, 4°C)하였다. 상층액을 제거한 tube를 gamma counter(Wallac 1470 wizard, Amersham Pharmacia Biotech, England)에서 1분 간격으로 radio activity를 측정하였으며 ng/ml²으로 나타내었다.

② Cell lysate 중의 leptin western blot

Leptin western blot은 3T3-L1 지방세포에 polymannuronate를 농도별로 배양하여 회수한 cell lysate에 최종농도가 $1\times$ Laemmi sample buffer와 0.1M DDT가 되도록 희석하여 전기영동 샘플로 사용하였다. 12.5% polyacrylamide gel에 loading시켜 분리된 단백질은 Immobilon-P membrane(Millipore, pore size: $0.1\mu\text{m}$, USA)으로 옮겼다. 이때 표준 분자량은 rainbow high molecular marker(Amersham)를 사용하였다. 분리된 단백질은 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate(PIERCE, Biotechnology, Inc., USA)를 이용하여 leptin 단백질 발현을 확인하였다. 5% fat free milk를 함유하는 $1\times$ TBS(tris buffered saline: 20mM Tris base, 137mM NaCl, 1M HCl)에서 하룻밤 blocking한 다

음, TBS-T(tris buffered saline containing 0.1% Tween20; 20mM Tris-base, 137mM NaCl, 1M HCl, 0.1% Tween20, pH 7.6)로 10분간 세척하였다. 세척한 membrane에 leptin 1차 항체(Anti-leptin polyclonal rabbit IgG, Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 TBS-T에 1:1,500으로 희석하여 실온에서 2시간 반응시켰다. TBS-T로 10분간 3번 세척한 후 peroxidase labelled anti-rabbit antibodies 2차 항체(1:1,500)를 사용하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 2차 항체로 반응시킨 membrane은 TBS-T로 10분간 3번 세척하고 Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution을 사용하여 KODAK X ray 필름에 감광시켰다. X-ray 필름을 현상하여 leptin의 protein expression 수준을 밴드로 확인하였다.

(8) 세포내의 leptin mRNA 분석

① Total RNA의 추출

각 polymannuronate 농도별로 배양한 3T3-L1 지방세포는 배양액을 제거하고, RNA extraction reagent인 easy BLUE™ Total RNA Extraction kit(Intron Biothechnology, Inc)를 넣고 scrapping하여 회수한 cell lysate을 멸균 tube에 옮기고 chloroform:isoamyl alcohol(49:1)을 첨가하여 실온에서 30초간 섞어 원심분리(13,000rpm, 10min, 4℃)하였다. RNA가 포함된 상층액을 멸균된 1.5ml tube에 옮기고 동량의 isopropanol을 넣어 -70℃에서 1시간 방치하였다. 1시간 경과 후, 다시 원심분리하여 상층을 제거하고 pellet으로 남아있는 total RNA는 차가운 70% ethanol로 2번 세척한 후 실온에서 건조시켰다. 0.1% DEPC에 녹인 후, 260 및 280nm의 파장에서 흡광도를 측정(Ultrospec 2001 pro, Amersham Pharmacia biotech, England)하여 total RNA 함량 및 순도를 확인하고 정량한 total RNA는 1.2% 변성 formaldehyde agarose 겔에 전기영동(Mupid-2, mini gel migration unit)하여 동일한 크기의 밴

드를 확인하고 70°C에 보관하면서 reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)에 사용하였다.

② RT-PCR 분석

Polymannuronate를 농도별로 처리하여 회수한 세포내에 존재하는 leptin mRNA의 발현량을 살펴보고자 하였다. RT-PCR은 QIAGEN One step RNA PCR Kit를 사용하였는데, 각 군별로 추출한 PCR 전용 tube에 5X QIAGEN buffer, QIAGEN One Step RT PCR Enzyme Mix, 10mM dNTP Mix, 1U RNase inhibitor, 100 μ mol leptin primers, RNase-free water를 포함한 Master mix와 template total RNA 5 μ g을 첨가하였다. 이 반응혼합물을 PCR thermal cycler 480(TAKARA)으로 옮긴 후, 50°C에서 30분, 95°C에서 15분간 reverse transcription반응시킨 다음 95°C에서 1분, 59°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30cycle을 반응시켰다. 이때 사용한 100 μ mol primers는 다음과 같다.

5' CCCTCATCAAGACCATTTGTCACC-3' (sense)

5' GCAGCCTGCTCAAAGCCACC 3' (antisense)

PCR 반응 후의 생성물은 EtBr(0.5 μ g/ml)을 함유하는 1.2% agarose gel에 전기영동하고 100bp DNA molecular weight marker(Bioneer Co., Korea)와 비교하여 증폭된 cDNA의 크기와 양을 확인하였다.

3) Polymannuronate의 첨가가 HT 29 대장암세포에 미치는 영향

(1) HT 29 대장암세포 배양

인간에서 유래된 대장암세포주인 HT 29 세포(human colon carcinoma cell)는 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 분양받아 사용하였다. HT 29 대장암세포는 10% FBS가 함유된 RPMI 1640(Gibco, USA)배지를 사용하

여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포가 80%정도 confluent 되면 PBS-EDTA로 monolayer를 씻어내고 trypsin EDTA 처리하여 계대배양하였으며 배지는 2일마다 교환하였다.

(2) HT-29 대장암세포 중의 MTS 분석

Polymannuronate가 HT-29 대장암세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HT-29 세포를 96-well plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 분주하고 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지로 희석하여 배양하였다. 24시간이 지난 후에 serum free RPMI 1640 배지로 교환하고 24시간 serum starvation시켰다. 그 후, 배지에 polymannuronate를 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 경과 후, MTS/PMS solution(CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit, Promega Co., USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양한 다음, ELISA plate reader를 사용하여 490nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

(3) HT 29 대장암세포 중의 IGF IR 분석

① HT 29 대장암세포의 IGF-IR Immunoprecipitation

HT-29 대장암세포를 1×10^6 cells/dish의 농도가 되도록 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 희석하여 60-mm diameter culture dish에 분주하였다. 80% confluent 되면, 새로운 serum free RPMI 1640 배지로 교환하고 24시간 동안 serum starvation 하였다. dish에 polymannuronate를 0.25%의 농도로 첨가하여 48시간 배양하였다. 48시간 후, 배지를 제거하고 세포를 PBS EDTA로 세척하여 RIPA buffer(Preparation of Modified Radioimmunoprecipitation buffer; 50mM Tris HCl, pH 7.4, 1% NP 40, 0.25% Na deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM PMSF, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin, 1mM

NaF, 1mM NaVO₃)로 얼음 위에서 신속하게 cell lysate를 회수하였다. 회수한 cell lysate는 14,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상청액을 다시 회수하고 BCA Protein Assay Kit(PIERCE, Biotechnology, Inc., USA)를 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 또한 polymannuronate의 항암작용이 IGF-IR를 매개하여 일어나는지 보기 위하여 배양액에 IGF-I을 첨가하여 실험하였다. 즉, polymannuronate를 0.25%의 농도로 첨가하여 세포를 배양한 뒤 회수 직전 100ng/ml의 IGF-I(SIGMA Co., USA)을 넣고 각각 0, 1, 5, 60분 간격으로 처리한 후, RIPA buffer로 cell lysate를 회수하고 위에서와 같이 단백질 농도를 측정하였다. 농도를 일정하게 맞춘 cell lysate에 anti-IGF-IR β antibody를 처리하여(1:300) 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후, Protein A Sepharose(Sigma Co., USA)를 넣어 4°C에서 2시간 방치하고 14,000rpm에서 2분간 원심분리하여 항체와 결합한 IGF IR 단백질을 Protein A Sepharose와 함께 침전시켰다. Protein A Sepharose는 RIPA buffer로 3번 반복하여 세척하고 0.1M DDT를 함유하는 1×Laemmli sample buffer에 넣어 10분간 water bath에서 끓인 후, sample buffer만 조심스럽게 회수하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis(SDS-PAGE)에서 단백질을 분리하고 Immobilon™ P membrane(Millipore, Bedford, MA, USA)에 transfer 하였다.

② HT 29 대장암세포에서 IGF-IR의 western blot

Immunoprecipitation 후, 전기영동과 transfer를 마친 membrane은 anti phosphotyrosine 항체(1:500, mouse monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology Inc.)로 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후, 2차 항체로는 anti mouse IgG conjugated horseradish peroxidase(1:10,000)를 사용하여 실온에서 1시간 반응시켰다. TBS-T로 세척 후, Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico

Luminol/Enhancer Solution을 사용하여 KODAK X-ray 필름에 감광시키고 현상하여 IGF-IR의 protein 인산화 정도를 확인하였다. 인산화를 살펴 본 membrane은 stripping하여 IGF-IR의 protein 수준 검토에 사용하기 위하여 anti-IGF-IR β 항체(1:500)로 4℃에서 하룻밤 반응시킨 후, Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution을 사용하여 KODAK X ray 필름에 감광시켜 IGF-IR의 단백질 발현 수준을 밴드로 확인하였다.

4) 실험결과의 통계처리

실험의 분석결과는 각각의 군별로 평균치와 표준편차(mean \pm S.D.)를 사용하여 표기하였으며, 유의성 검정에는 Student's *t*-test(Steel and Torrie, 1960)를 이용하였으며, $P < 0.05$ 수준에서 살펴보았다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Polymannuronate의 첨가가 흰쥐에 미치는 영향

1) 체중 변화

각각 실험동물을 구분하여 예비사육 1주, polymannuronate를 4주간 급여하면서 사육기간에 대한 체중 변화의 관계를 Table 2에 나타내었다. 체중의 증가는 각 실험군에서 차이를 보였는데, 기초식이군과 polymannuronate 식이군이 콜레스테롤식이군에 비하여 유의적으로 낮은 값을 보였다. Tsuji *et al.* (1968)은 5% 알긴산 급여군에서 콜레스테롤을 급여한 군과 기초식이군, 그리고 끈약성분과 펙틴 등의 다른 식이 섬유를 급여한 군에 비해 체중의 감소를 확인하였고, Oku *et al.* (1981)은 흰쥐를 실험동물로 했을 때 셀룰로오스를 급여한 군에 비해 글루코만난을 급여한 군이 보다 낮은 체중증가를 보였다고 하였고, Suzuki *et al.* (1993)도 다시마를 급여한 군에서의 체중증가율이 유의적으로 낮은 경향을 나타내었다고 하였는데, 본 연구에서도 polymannuronate의 급여로 인하여 체중이 감소되었음을 확인하였다.

2) 식이섭취량과 식이효율

기초식이 및 실험식이를 급여한 흰쥐의 초기체중과 사육 최종일의 체중증가량과 사육기간 중의 사료섭취량 및 식이효율을 Table 2에 나타내었다. 체중변동과 함께 식이섭취량을 계측한 결과, 식이섭취량은 콜레스테롤식이군과 다른 모든 군에서 전 사육기간에 걸쳐 비슷한 섭취량을 보였다. 이에 비해 식이효율은 polymannuronate 식이군에서 콜레스테롤식이군보다 유의적으로 감소하였다. Tsuji *et al.* (1968)은 5% 알긴산을 급여한 군에서 성장지연을 확인하였고, Harmuth Hoene *et al.* (1979)는 흰쥐에 알긴산을 섭취시켰을 때 사료 섭취량의 감소로 체중증가량이 적어진다고 하여 본 실험과 유사한 결과를 보였다.

Table 2. Weight gains, feed intakes and its efficiency ratio in the rats fed the experimental diets

Test animal group ¹	(Mean ± S.D.)		
	B	CHOL	POLYMAN
Initial body weight (g)	145.7 ± 15.49	162.7 ± 8.67*	128.0 ± 14.89*
Weight gain (g/4weeks)	141.5 ± 6.35	170.0 ± 9.27*	148.0 ± 6.16*
Feed intake (g/day)	19.78 ± 1.38	19.95 ± 1.35	20.50 ± 1.31
Feed efficiency ratio(%)	0.26 ± 0.02	0.30 ± 0.02*	0.26 ± 0.02*

¹ Refer to the footnote of Table 1.

All data were calculated by Mean ± S.D. for 10 individuals.

² *: Significantly different in student *T*-test from B or CHOL(*p<0.05).

3) 장기의 중량

실험식이물 급이한 후 실험동물을 해부하여 각 실험군의 장기중량을 측정된 결과를 Table 3에 나타내었다. 먼저 간의 중량이 콜레스테롤식이군에서 현저하게 높았고, polymannuronate 식이군에서도 기초식이군에 비하여 간의 중대가 관찰되었다. 이는 콜레스테롤의 섭취에 의한 영향으로 보이며, 콜레스테롤과 polymannuronate를 같이 섭취한 식이군은 콜레스테롤만을 단독으로 급이한 콜레스테롤식이군보다는 간의 중량이 다소 가벼운 것을 알 수 있었다. Soloff *et al.* (1973)은 고지방식이의 급여가 간의 내부에 지방 축적을 유도하여 간의 무게가 증가한다고 하였으며, Yang *et al.* (1996)은 수용성 식이섬유의 일종인 sodium alginate 식이군이 정상 식이군에 비해 간의 무게가 유의적으로 가벼웠다고 보고하였다. 그리고 심장과 비장 및 신장은 각 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 맹장에 있어서 polymannuronate 식이군이 콜레스테롤 급이군과 기초식이군에 비하여 유의적으로 높은 중량을 보였다. Oku *et al.* (1981)은 글루코만난을 흰쥐에 급이시킨 결과 셀룰로오스를 급이시킨 군보다 맹장의 무게가 유의적으로 증가하였다고 보고하였으며, Suzuki *et al.* (1993)은 다시마를 급이한 군에서의 간, 췌장 및 신장의 중량에 있어서는 큰 차이가 없었고, 맹장과 소장 및 대장의 크기는 다시마를 급이한 군이 유의적으로 큰 경향을 나타냈다고 하였으며, streptozotocin으로 유도한 당뇨쥐에 5% 셀룰로오즈, 펙틴, 구아검을 급여했을 때 대장의 길이가 모두 유의적으로 증가했다는 보고도 있어 본 연구의 결과와 일치함을 알 수 있었다.

Table 3. Weight of the organs in the rats fed the experimental diets

Test animal group ¹	(Mean ± S.D.)		
	B	CHOL	POLYMAN
Liver	8.70 ± 0.65	14.2 ± 1.32*	12.5 ± 1.10*
Kidney	2.0 ± 0.03	2.1 ± 0.16	2.2 ± 0.12
Heart	0.8 ± 0.15	1.0 ± 0.24*	0.8 ± 0.14*
Spleen	1.0 ± 0.18	1.2 ± 0.21*	1.1 ± 0.14
Large Intestine	0.6 ± 0.05	0.8 ± 0.29*	0.9 ± 0.07
Small Intestine	4.7 ± 0.37	4.3 ± 0.74	4.8 ± 0.05
Cecum	0.6 ± 0.13	0.7 ± 0.03*	0.8 ± 0.05*

1 Refer to the footnote of Table 1.

All data were calculated by Mean ± S.D. for 10 individuals.

2 *: Significantly different in student *T*-test from B or CHOL(*p<0.05).

4) 혈청 및 간장 조직 중의 지질조성에 미치는 영향

(1) Triglyceride의 함량

사람은 당질, 지질 및 단백질을 필요이상으로 섭취하게 되면 잉여에너지는 triglyceride의 형태로 체내에 축적되는데 고지혈증 중 임상적으로 가장 문제시되고 있는 것은 고콜레스테롤 혈증과 고중성지방 혈증이다. 실험식이에 따른 혈청과 간장조직에서의 triglyceride의 함량을 Table 4에 나타내었다. 본 실험에서 혈청 중의 triglyceride의 양은 콜레스테롤식이군에서 가장 높았고, polymannuronate 식이군이 유의적으로 낮은 함량을 보였다. 간장에 있어서는 혈청과 유사한 경향을 나타내었는데, 콜레스테롤식이군에서 가장 높았고, 기초식이군에서 가장 낮았다. 이는 polymannuronate의 1차구조와 관련되어 저분자화될때 유리 카복실기 등 기능기들이 노출되어 장에서 담즙산과 결합하여 체외로 배출되어 혈청 및 간장의 triglyceride의 함량이 유의적으로 감소한 것으로 생각된다. Oku *et al.* (1981)은 셀룰로오스와 글루코만난을 첨가한 실험모두에서 triglyceride의 함량이 저하하였는데 특히, 글루코만난 급여군에서 훨씬 낮았고, Kinnunen *et al.* (1983) 및 Vigne *et al.* (1987)은 혈청 중성지질의 농도저하작용은 모세혈관벽에 존재하는 lipoprotein lipase가 triglyceride의 주요 운반체인 chylomicron과 VLDL의 분해를 촉진하기 때문이라고 하였다. 또한, Akiba *et al.* (1982)은 닭에게 식이 섬유를 급여한 결과 혈청 중의 중성지질의 농도가 현저하게 저하되었고, Venter *et al.* (1990)은 글루코만난을 급여한 군에서 triglyceride의 농도가 기초식이군 보다 낮았다고 하여, 본 연구와 유사한 결과를 보였다.

(2) 인지질의 함량

일반적으로 혈중 인지질의 농도 증가는 고콜레스테롤 혈증으로 수반되는 경우가 많은데, 실험식이에 따른 혈청 중의 인지질의 함량을 측정 한 결과를 Table 4에 나타내었다. 그 결과, 콜레스테롤식이군에서 인지질의 함량이 가장 높았고, 기초식이군과 polymannuronate 식이군에서 유의적으로 낮은 값을 보였다. George *et al.* (1982)은 식이섬유가 소장 내에서 담즙산과 결합함으로써 lipid의 체내 소화 흡수를 직접적으로 저해한다고 하였으며, Mueller *et al.* (1983)은 흰쥐에 과량의 펙틴과 셀룰로오스를 첨가하였을 때 인지질의 농도를 감소시켰다고 하였으며, Akiba *et al.* (1982)은 식이섬유의 섭취가 혈청 인지질의 농도를 낮춘다고 하여 본 실험과 유사한 결과를 보였다.

Table 4. Triglyceride and phospholipid levels in the serum and liver of the rats fed the experimental diets

	(Mean \pm S.D.)		
Test animal group ¹	B	CHOL	POLYMAN
Triglycerid level			
Scrum (mg/dℓ)	26.2 \pm 3.40	46.7 \pm 4.30*	27.5 \pm 4.80*
Liver (mg/g)	94.4 \pm 5.60	133.1 \pm 7.30*	96.7 \pm 3.20*
Phospholipid level			
Serum (mg/dℓ)	115.4 \pm 10.50*	167.2 \pm 14.10	123.8 \pm 9.20*

1 Refer to the footnote of Table 1.

All data were calculated by Mean \pm S.D. for 10 individuals.

2 *: Significantly different in student *T-test* from B or CHOL(*p<0.05).

(3) 총콜레스테롤의 함량

콜레스테롤은 세포막의 필수 구성성분으로 대부분의 콜레스테롤은 간장에서 합성되며 콜레스테롤의 합성이 조절되지 않으면 사람의 경우에 동맥경화 등의 질병을 유발한다. 실험식을 급여한 흰쥐의 혈청과 간장 중의 총콜레스테롤의 함량을 측정된 결과를 Table 5에 나타내었다. 본 실험에서 총콜레스테롤의 함량은 혈청과 간장에서 기초식이군이 낮았으며, 콜레스테롤식이군이 가장 높았다. Polymannuronate 식이군은 콜레스테롤식이군에 비하여 유의적으로 낮은 함량을 보였다. Tsuji *et al.* (1968)은 콜레스테롤 대사에 미치는 다당류의 영향에서 펙틴과 곤약분말이 혈청 콜레스테롤의 감소에 효과가 컸고, 알긴산도 콜레스테롤식이군과 기초식이군에 비하여 혈청 콜레스테롤 저하효과가 있다고 보고하였다. 또, Fernandez *et al.* (1990)은 고콜레스테롤 식이에 1%의 낮은 농도로 펙틴을 첨가한 결과 유의적이지는 않으나 혈장 VLDL-콜레스테롤이 약간 증가했고, LDL 및 HDL 콜레스테롤은 현저히 감소했으며 간의 총 콜레스테롤 및 유리콜레스테롤 또한 현저히 감소했음을 보고하였다. Tsuji *et al.* (1974)은 펙틴, 곤약분말, 구아검으로부터 혈청 및 간장의 콜레스테롤 저하효과를 확인하였고, 알긴산은 간장과 혈청의 콜레스테롤 상승을 억제한다고 하였다. Lee *et al.* (1996)은 미역이나 김 혼합 식이가 당뇨 유발 흰쥐의 혈장 콜레스테롤을 현저하게 저하시켰으며, Oku *et al.* (1981)은 글루코만난이 혈청콜레스테롤의 감소에 유효하다고 하였고, Ney *et al.* (1988)은 귀리섬유 급여군에서 흰쥐 혈장은 총 콜레스테롤이 25~45%까지 감소시킴을 확인하였다. Chung *et al.* (1988)은 고지방 식이가 흰쥐의 간장의 총 지질, 중성지질, 총 콜레스테롤 함량을 증가시켰다고 하였으며, Yang *et al.* (1996) 및 Kang *et al.* (1994)은 해조류에서 추출한 sodium alginate의 식이는 간장의 총 지질, 중성지질, 총 콜레스테롤 함량을 저하시켰다고 보고하였다. Suzuki *et al.* (1993)의 연구에서는 알긴산을 급여한 군에서 혈청과 간장 모두 콜

레스테롤의 저하효과가 있었고, 그 효과는 mannuronate가 많이 함유된 균에서 현저하다고 하였는데 본 연구의 결과에서도, polymannuronate 식이균에서 현저한 감소효과를 보여주었다.

(4) 유리콜레스테롤의 함량

유리콜레스테롤은 담즙 중의 콜레스테롤과 같이 다른 지방성분들과 micelle을 만들어 소장장점막중으로 유입되어 에스테르화되어 림프관과 흉관을 거쳐 혈중으로 유입된다. 실험식이를 급이한 흰쥐의 유리콜레스테롤은 Table 5에서 나타낸 바와 같이 본 실험에서 혈청에서 콜레스테롤식이균이 가장 높았고, 기초식이균과 polymannuronate 식이균에서는 유의적으로 낮은 값을 보였다. 이는 총콜레스테롤에서의 결과와 마찬가지로 저분자화합에 따라 기능기들의 노출증가로 담즙산과 결합하여 체외로 배출하는 효과를 가져 온 것으로 생각된다. Goodman (1968)에 의하면 콜레스테롤은 소장 상부에서 흡수되는 동안 cholesteryl ester의 형태로 점막세포에 유입되는데, 그중 약 80%가 에스테르화된다고 하였으며, Garg *et al.* (1988)은 흰쥐에 콜레스테롤을 급이하면 혈중 유리콜레스테롤의 농도가 상승된다고 하였다. Tsuji *et al.* (1974)의 연구에서 알긴산을 급이한 흰쥐의 혈청 및 간장의 유리콜레스테롤이 저하하였다고 보고하였는데 이는 본 연구의 결과와도 일치하였다.

(5) HDL 및 LDL 콜레스테롤의 함량

HDL 콜레스테롤은 간장과 소장에서 합성되어 분비되며 혈중에서 조직 중의 콜레스테롤을 에스테르화한다. 실험식이를 급이한 흰쥐의 혈청 및 간장 중의 HDL 콜레스테롤의 양을 측정된 결과를 Table 5에 나타내었다. 그 결과, 혈청에서의 HDL 콜레스테롤의 함량은 총콜레스테롤의 결과와 마찬가지로 기초식이균에서 가장 낮았고, 콜레스테롤식이균이 가장 높았으나, 간장조직에서는 기초식이균, polymannuronate 식이

균순으로 감소하였다. HDL-콜레스테롤은 발초조직으로부터 콜레스테롤을 간장으로 운반하고 LDL-콜레스테롤이 혈관벽에 축적되는 것을 방지할 뿐만 아니라 혈관벽에 축적된 콜레스테롤을 제거하여 동맥경화를 방지한다고 알려져 있다(Nicoll *et al.*, 1980; Castelli *et al.*, 1986). Ney *et al.* (1988)도 콜레스테롤을 급이한 흰쥐의 혈장에서 귀리섬유 급이군이 25~40% 정도로 HDL-콜레스테롤이 증가했다고 하였다.

LDL 콜레스테롤은 혈청콜레스테롤의 주된 운반형으로 동맥벽 및 발초조직에 콜레스테롤을 운반하여 축적시켜 동맥경화를 유발하는 인자로 알려져 있다(Gordon *et al.*, 1981; Suamles *et al.*, 1986; Smith, 1974; Wen-ju and Anderson, 1981). 본 연구에서는 LDL-콜레스테롤의 값을 Table 5에 나타내었는데 혈청 중에서는 콜레스테롤 급이군과 polymannuronate 식이군이 기초식이군 보다 유의적으로 높았으나 polymannuronate 식이군 또한 콜레스테롤식이군에 비해 유의적으로 감소하였다. 간장에 있어서는 콜레스테롤식이군이 유의적으로 높았으며, polymannuronate 식이군에서는 LDL-콜레스테롤이 유의적으로 낮은 값을 보였다. 이들 결과는 polymannuronate의 섭취로 알긴산의 기능기가 담즙산과 결합하여 콜레스테롤의 배출을 증가시킨 것으로 생각되어진다. Lipsky *et al.* (1990)은 psyllium의 수용성 섬유를 저지방식이에 첨가시켰을 때 고콜레스테롤 혈증환자의 혈청콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤의 농도는 저하하였고, HDL 콜레스테롤 농도는 상승되었다고 하였으나 곡류 첨가군에서는 유의적인 차이가 없다고 하였으며, Kirby *et al.* (1981)은 고콜레스테롤혈증시 수용성 식이섬유의 급여로 LDL-콜레스테롤 농도를 감소시켰다고 하였다. 특히 수용성 식이섬유인 펙틴, 검, mucilages, 해조류의 다당류 등은 총 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤의 농도를 낮추고 HDL 콜레스테롤의 농도를 높이는 효과가 있다고 하여 본 실험과 같은 결과를 나타내었다(Yang *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 1994; Fernandez *et al.*, 1990).

Table 5. Cholesterol levels in the serum and liver of the rats fed the experimental diets

(Mean \pm S.D.)

Test animal group ¹	B	CHOL	POLYMAN
Total cholesterol level			
Serum (mg/dl)	74.3 \pm 6.10	174.0 \pm 14.20*	122.1 \pm 10.90*
Liver (mg/g)	68.6 \pm 6.20	77.9 \pm 2.20	63.7 \pm 2.60*
HDL-cholesterol level			
Serum (mg/dl)	16.9 \pm 2.10	27.6 \pm 4.10*	25.8 \pm 3.70*
Liver (mg/g)	42.5 \pm 3.12	37.0 \pm 1.50	40.9 \pm 3.50*
LDL-cholesterol level			
Serum (mg/dl)	20.4 \pm 4.70	121.3 \pm 6.20*	99.9 \pm 6.90*
Liver (mg/g)	27.2 \pm 5.60	41.4 \pm 2.60*	27.8 \pm 3.70*
Free cholesterol level			
Serum (mg/dl)	21.9 \pm 2.90	29.0 \pm 3.30*	19.2 \pm 2.70*

1 Refer to the footnote of Table 1.

All data were calculated by Mean \pm S.D. for 10 individuals.

2 *: Significantly different in student *T-test* from B or CHOL(*p<0.05).

5) 혈청 중의 혈당 및 GOT와 GPT 활성화에 미치는 영향

(1) 혈당의 함량

기초식이와 실험식이를 급여한 흰쥐의 혈당의 함량을 측정하여 Table 6에 나타내었다. 그 결과 세군 모두에서 비슷한 값을 보였다. Jenkins *et al.* (1977)은 점질성 식이섭유를 섭취하였을 때 식후의 혈당 및 인슐린의 농도가 저하한다고 하였고, Venter *et al.* (1990)은 서구식이를 급여한 개코원숭이에 곤약과 글루코만난을 혼성하여 급여한 결과 혈당이 감소하였다고 하였으나, 본 연구 결과와는 일치하지 않았다.

(2) GOT와 GPT의 활성화

기초식이와 실험식이를 급여한 흰쥐에서 GOT와 GPT의 활성을 측정하여 Table 6에 나타내었다. GOT활성은 콜레스테롤식이군에서 높은 값을 보였으나 기초식이군과 polymannuronate 식이군 모두에서 정상범위의 수치를 나타냈다. GPT활성은 콜레스테롤식이군에서 가장 높았고, 기초식이군과 polymannuronate 식이군에서 유의적으로 낮은 수치를 보였으나, 이 또한 GOT활성과 마찬가지로 정상범위의 수치를 보였다.

Table 6. Glucose levels, GOT and GPT in the serum of the rats fed the experimental diets

	(Mean ± S.D.)		
Test animal group ¹	B	CHOL	POLYMAN
Glucose level			
Serum (mg/dl)	170.9 ± 15.68	168.6 ± 5.92	163.5 ± 15.96
Serum level			
GOT (Karmen)	38.9 ± 2.50	48.3 ± 3.07 ²	40.4 ± 5.51 [*]
GPT (Karmen)	17.1 ± 4.40	32.0 ± 9.15 ²	12.5 ± 3.02 [*]

1 Refer to the footnote of Table 1.

All data were calculated by Mean ± S.D. for 10 individuals.

2 ^{*}: Significantly different in student *T*-test from B or CHOL(^{*}p<0.05).

6) 분변 중의 조성

(1) 일일 분변량

실험식이에 충분히 적응이 되었다고 생각되는 22일째부터 7일간의 분변을 수집하여 분석한 결과를 Table 7에 나타내었다. 수집한 변의 하루 평균 부피는 polymannuronate 식이군에서 가장 많았으며, 결과에 제시하지는 않았지만, 분변의 wet weight 또한 polymannuronate 식이군에서 높게 나타났다. 이러한 경향은 식이섬유인 polymannuronate가 큰 보수성을 지님으로 인해 물분자가 식이섬유의 표면에 흡착되거나 또는 식이섬유의 틈새에 침입함으로써 식이섬유의 용적을 증가시키게 되고 그 결과로 분변의 부피와 무게를 증가시킨 것으로 보인다. 펙틴, wheat bran, 셀룰로오즈 등은 변으로 지방과 단백질의 배설을 증가시킨다는 보고되고 있으며(Stock Damge, 1983; Schneeman, 1982, Schneeman, 1980), 식이섬유의 섭취가 소화관내에서의 이동 시간에 영향을 미치거나(Ikegami, 1990), 장 표면의 형태학적 변화나 goblet cell 증식에 영향을 미쳐 당질과 지질대사에 변화를 초래한다는 보고들도 있다(Vahouny, 1994; Stock Damge, 1984). Spiller *et al.* (1986)은 사람에게 식이섬유원으로 wheat bran을 첨가한 빵을 섭취시킨 결과, 첨가한 wheat bran의 양이 증가함에 비례하여 변의 무게 및 수분 또한 현저히 증가하였다고 보고하였고, Tsuji *et al.* (1968) 및 Harmuth Hoene *et al.* (1979)는 알긴산을 흰쥐에 섭취시켰을 때, 사료 섭취량의 감소로 체중 증가량이 적어지고 단백질과 지방 소화율의 감소로 분변량이 증가된다고 하여 본 실험과 동일한 결과를 보였다.

(2) 분변 중의 총콜레스테롤 함량

실험식이에 따른 분변 중의 콜레스테롤 함량을 Table 7에 나타내었다. 분변 중의 총콜레스테롤은 polymannuronate 식이군이 기초식이군과 콜레스테롤식이군에 비해 높았다. 식이섬유는 소장에서 콜레스테롤과 담즙산의 재흡수를 저해하는데 식이섬유가 소화기에서 콜레스테롤

및 담즙산과 직접 결합하므로써 흡수가 억제되어 분변으로의 배설이 증가된다고 알려져 있다(Mirttinen, 1987; Vahouny, 1978; Vahouny, 1987). Ikegami *et al.* (1983)은 5% 알긴산과 펙틴을, Schneeman and Gallaher (1980)은 20% 셀룰로오스를 급여한 흰쥐의 소장에서 소화되지 않은 성분들로 인하여 장내용물이 증가되면서 분변으로의 단백질과 지질 배설도 증가한다고 하였다. 또, 펙틴 등과 같은 수용성 식이섬유는 높은 점성으로 인해 흰쥐의 소장에서 콜레스테롤과 중성지방의 흡수를 저해하여 이들의 배설을 촉진하고, 또한 gel을 형성하는 식이섬유의 이러한 성질이 장관에서 콜레스테롤 및 중성지방과 직접 결합하여 이들의 배설을 증가시킴으로써 흡수를 억제하는 것으로 보고되고 있으며(Vahouny *et al.*, 1980), 이러한 콜레스테롤 pool size의 감소가 혈중 또는 간장중의 콜레스테롤 전환속도를 증가시키는 것으로 알려져 있다(Gallaher *et al.*, 1986). 임상실험에서도 점성이 높은 식이섬유는 점성이 낮은 식이섬유에 비해 콜레스테롤 농도를 낮추었다고 보고하였으며(Mirttinen, 1987), 또한 식이섬유의 섭취가 소장상피세포에 닿아있는 goblet cell로부터 mucin의 분비를 촉진시켜 영양소의 흡수를 제한하는 diffusion barrier로 작용함으로써 영양소의 흡수가 저해된다고 보고하였다(Ikegami *et al.*, 1990). 이러한 수용성 식이섬유의 영양소 흡수 저해 효과는 혈장 중성지방의 농도와 간장중의 중성지방 및 콜레스테롤 농도를 저하시키는 기작으로 보이며, 위의 연구결과와 일치하였다.

(3) 분변 중의 총 담즙산 함량

간은 지질대사의 중심역할을 한다. 대부분의 지단백질의 합성과 분해 특히, LDL과 VLDL의 운반조절, 내인성 콜레스테롤을 합성하고, 콜레스테롤을 담즙산으로 전환시키거나 담즙으로 배출시킴으로서 콜레스테롤을 제거하여 콜레스테롤 항상성을 조절한다. 간의 콜레스테롤 농도변화는 혈액에서의 콜레스테롤 농도변화를 초래하고, 간의 수용체 의존적

LDL 농도조절을 통해 혈중 LDL-콜레스테롤을 유지하게 된다. 식이섬유 특히 수용성 섬유소가 cholesterol을 저하시킬 수 있다는 보고는 많은데 이는 주로 섬유소들의 담즙산과의 결합능에 의한 것이라고 알려져 있다. 실험식이에 따른 분변 중의 총 담즙산 함량을 Table 7에 나타내었다. 그 결과, polymannuronate 식이균에서 분변 중의 총 담즙산 함량이 가장 많았다. 식이섬유는 소장에서 콜레스테롤과 담즙산의 재흡수를 저해하는데 식이섬유가 콜레스테롤 및 담즙산과 직접 결합하므로써 흡수가 억제되어 분변으로의 배설이 증가된다고 알려져 있는데(Mirtinen, 1987; Vahouny *et al.*, 1978; Vahouny *et al.*, 1987), 그 이유는 담즙산이 콜레스테롤로부터 합성되는 물질로서 체내 콜레스테롤이 체외로 배설되는 유일한 경로이기 때문이다. Schrijver *et al.* (1992)은 oat bran의 섭취가 혈장 콜레스테롤의 농도를 낮추는 동시에 변으로의 담즙산 배설을 증가시킴으로써, 분변 중 담즙산 배설과 건조중량, 질소, 식이섬유간에는 역상관관계가 성립함을 보고하였으며, 이는 oat bran으로부터 나온 소화되지 않은 물질이 담즙산과 결합함으로써 그 output을 촉진한다고 제안하고 이로써 oat bran이 콜레스테롤 저하효과를 설명할 수 있다고 하였다. 식이섬유가 담즙 배설능에 미치는 영향은 식이섬유의 종류에 따라 다양한 결과를 보여주고 있는데(Ebihara *et al.*, 1989; Gallaher *et al.*, 1986; Lafont *et al.*, 1985), 특히 콜레스테롤 저하효과가 없는 불용성 식이섬유인 셀룰로오즈도 분변으로의 담즙 배설을 증가시킨다고 보고 하였다. Ikegami *et al.* (1990)은 식이섬유의 섭취가 담즙의 소화관으로의 유출에 미치는 영향을 알아보기 위해 무콜레스테롤 식이에 다양한 형태의 식이섬유를 섭취시키고 십이지장으로 유출되는 담즙의 양을 측정하였다. 그 결과 고도의 점성 다당류인 sodium alginate, 구아검, gum xanthan, locust bean gum 등은 담즙의 분비를 증가시킨 반면, 불용성 다당류인 calcium alginate는 담즙분비에 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 특히, 수용성 식이섬유는 높은 점성으로 인해 지질

및 담즙산의 흡수저해가 증가된다고 하여(Arjmandi *et al.*, 1992; Hilman *et al.*, 1985; Kelsay *et al.*, 1981), 본 연구결과와 동일하게 나타났다.

(4) 분변 중의 총 식이섬유 함량

실험식이에 따른 분변 중의 총 식이섬유 함량에 따른 결과를 Table 8에 나타내었다. 분변 중의 총 식이섬유 함량은 polymannuronate 식이군이 기초식이군과 콜레스테롤식이군에 비해 높게 나타났으며, 이러한 경향은 식이섬유인 polymannuronate가 장내에서 발효되지 않으므로써 대부분이 분변으로 배설되었기 때문이라고 보고한 Nyman *et al.* (1990)의 결과와 유사하였다. 이 결과는 분변 중의 총 담즙산 함량과 일치하는 경향을 보였는데, 이는 식이섬유의 작용에 의하여 소장에서 담즙산과 결합하여 분변으로 배설된 것으로 추측된다.

Table 7. Fecal cholesterol and total bile acids contents of the rats fed the experimental diets

(Mean ± S.D.)

Test animal group ¹	B	CHOL	POLYMAN
Fecal (g/day)	0.38 ± 0.087	0.35 ± 0.124	1.13 ± 0.190*
Total cholesterol (mg/g)	15.4 ± 1.9	24.9 ± 2.7*	161.4 ± 19.1*
Total bile acid (μmol/mg)	42.1 ± 4.1	46.4 ± 2.9*	160.9 ± 10.7*

1 Refer to the footnote of Table 1.

All data were calculated by Mean ± S.D. for 10 individuals.

2 *: Significantly different in student *T-test* from B or CHOL(*p<0.05).

Table 8. Fecal of total dietary fiber (TDF) in the rats fed the experimental diets

	(Mean \pm S.D.)		
Test animal group ¹	B	CHOL	POLYMAN
Fecal (g/day)	0.41 \pm 0.081	0.56 \pm 0.081*	0.84 \pm 0.154*
TDF (g/day)	0.055 \pm 0.004	0.080 \pm 0.008*	0.132 \pm 0.008*

1 Refer to the footnote of Table 1.

All data were calculated by Mean \pm S.D. for 10 individuals.

2 *: Significantly different in student *T*-test from B or CHOL(* p <0.05).

7) 혈청 중의 leptin의 함량

실험식이에 따른 혈청 중의 leptin 발현과 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈청을 취하여 RIA 분석과 western blot 및 RT-PCR을 통해 살펴본 결과이다. Fig. 1에서와 같이 RIA 분석으로 혈청 중의 leptin 분비에 미치는 영향을 살펴본 것이다. 콜레스테롤식이군의 leptin 분비량이 polymannuronate 식이군에서 보다 높은 수치를 보였다. 최근 비만 조절에 있어서의 leptin의 작용을 살펴보고자 고지방식으로 비만을 유도한 후에 혈중 leptin의 변화에 대한 연구가 시도되었다. 고지방식이 섭취시 마우스의 혈중 leptin 농도가 유의적으로 증가했으며 이는 증가된 체지방 크기를 반영할 수 있다고 하였다(Klein *et al.*, 1996; Frederich *et al.*, 1995; Recves *et al.*, 1993). 체지방 분포가 leptin 생성에 미치는 효과는 분명치 않다. Alessi *et al.* (1997)은 피하지방과 복부지방에서 생성되는 leptin의 양은 차이가 없다고 하였지만, Hannelen *et al.* (1998)은 혈상의 총 leptin 농도는 주로 피하지방에서 생성되는 leptin의 양에 따른다고 하였다. 또 Halaas *et al.* (1995) 및 Pelleymounter *et al.* (1995)이 보고한 leptin의 식욕억제 및 대사의 증가 기능은 그 후의 연구 결과에서 대부분 비만 대상자들에게서 정상인에 비해 leptin 농도가 유의적으로 높다고 하였다. 본 실험결과에서 콜레스테롤 첨가로 인하여 피하지방과 복부지방에서 생성되는 leptin의 양이 증가하였고 leptin 농도가 유의적으로 높았으나, polymannuronate 식이로 인하여 leptin 생성과 농도가 감소하였음을 확인할 수 있었다.

Fig. 2는 혈청 중의 leptin을 western blot으로 확인한 결과, 분자량 16kDa 단백질인 leptin 밴드를 확인할 수 있었는데, polymannuronate 식이군이 콜레스테롤식이군보다 약한 밴드를 보였다. leptin mRNA 발현 또한 동일한 경향을 보였다(Fig. 3). 최근에 혈중 leptin 농도의 조절에 관여하는 여러 요소에 대한 연구들이 활발하게 진행중이다. Masuzaki *et al.* (1995)은 2주 동안의 고에너지/고지방식이 섭취시 지방

조직에서 leptin의 mRNA의 증가를 보고하였고, Bucolo *et al.* (1973)은 지방조직에서 leptin mRNA가 증가되었다고 하였으며, Ferderich *et al.* (1995)은 12주 동안의 고지방식이 섭취 시 지방조직에서 leptin 단백질의 증가를 보고함으로써 고지방식이 섭취 시 나타나는 혈 중 leptin 농도의 증가는 ob 유전자 발현의 증가에 따른 것임을 시사하였다. 혈액 중 leptin의 양이 체지방 함량과 양의 상관관계가 있다는 보고들은 많으며(Klen *et al.*, 1996; Frederich *et al.*, 1995; Ahren *et al.*, 1997; Maffei *et al.*, 1995), 사람과 동물을 대상으로 한 연구에서 대부분의 비만 대상자들에게서 정상에 비해 혈중 leptin 농도가 높았고(Lonnqvist *et al.*, 1997; Ostrund *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 1996), 유전 혹은 식이에 의하여 비만을 유발시킨 동물에게서 정상군에 비해 leptin의 농도가 높았다(Frederich *et al.*, 1995; Masuzaki *et al.*, 1995; Maffei *et al.*, 1995). 본 연구에서도 콜레스테롤을 식이에 첨가하였을 때 혈 중 leptin 농도가 유의적으로 증가했으며 polymannuronate 식이시 혈 중 leptin 농도가 감소하였으며, leptin mRNA 발현에서부터 감소되는 것으로 나타났다.

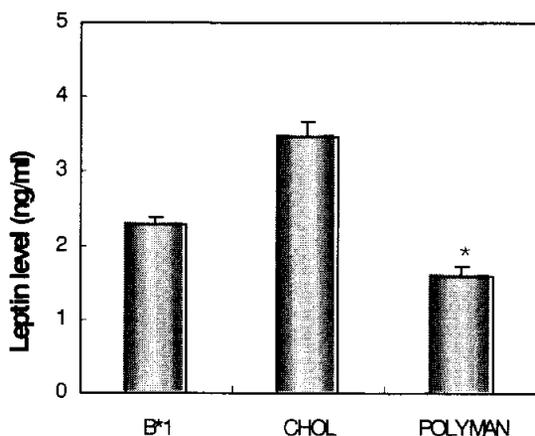
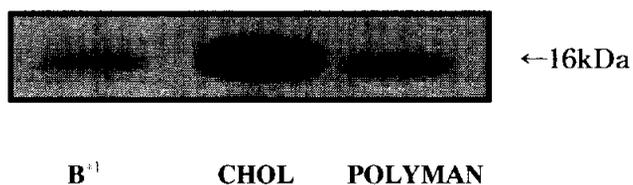


Fig. 1. The level of serum leptin in the experimental rats

The rats serum leptin were determined by RIA with reagents from Linco Research(St. Louis, MO, USA). The RIA mixtures, consisted of increasing concentrations of recombinant rat leptin diluted in assay buffer, anti-rat leptin antiserum(IgG rabbit anti leptin) and assay buffer. The mixture was incubated for 24h at R.T., then ^{125}I -rat leptin was added and the mixture was further incubated for 24 h at R.T.. Following the addition of PEG(12.5%) and a goat anti-guinea IgG antibody and centrifugation(3,000rpm, 30 min, 4°C), the supernatants were discarded and radioactivity in the pellets was counted to determine bound radioactivity. Calculate the $\text{ng/ml}^{\#}$ of rat leptin in sample using automated data reduction procedures. 1 Refer to the footnote of Table 1.

1 All data were calculated by Mean \pm S.D. for 10 individuals.

2 *: Significantly different in student *T-test* from B or CHOL(* $p < 0.05$).



**Fig. 2. Western blot for detecting leptin protein levels
in the serum of rats**

Serum was mixed with loading buffer and loaded onto an 12.5% polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and blotted against primary Antibody. Membranes were washed and incubated with a 1: 1500 dilution of HRP-conjugated secondary Antibody. Protein bands were visualized by an enhanced chemiluminescence reaction. Experiments were performed at least three times with a representative experiment being shown.

Refer to the footnote of Table 1.

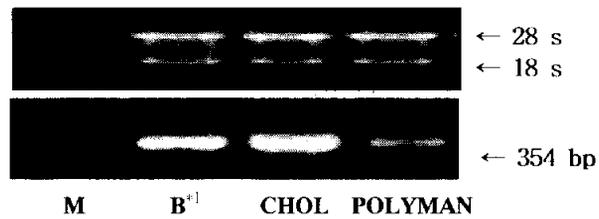


Fig. 3. Gene expression of leptin by in the liver of rats by RT-PCR analysis

The RT-PCR analysis was performed as previously in Materials and methods. Total RNA was extracted from liver of rats. PCR primers for standard were designed according to gene sequences. RT-PCR samples were run for analysis on an ethidium bromide stained 1.2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Refer to the footnote of Table 1.

8) 혈청 중의 IGF I 의 함량

많은 연구에서 비만이 성장 호르몬의 감소를 일으키고 체중이 감량되면 성장 호르몬이 증가되는 것을 증명하여 왔다. 일반적으로, 성장호르몬은 인체에서 뼈와 연골조직, 골격근 및 다른 조직의 성장과정에 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있으며(Galbo. *et al.*, 1983), 직접적으로 에너지원으로서 지방의 이용률을 증가시키는 반면 탄수화물의 이용을 억제하는 기능 또한 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 그 중 성장호르몬의 하나인 IGF I은 분자량이 적은 펩타이드계 호르몬으로, 세포 성장 및 대사에 관여하는 중요한 대사성 인자이며, 내분비 기전에 의한 작용뿐만 아니라 autocrine 경로나 paracrine 경로를 통하여 대부분의 세포에 생물학적 효과를 나타낸다. Fig. 4는 식이효과에 의해 혈청 중의 IGF-I 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 IRMA 분석을 통해 알아본 결과, 앞선 혈청 중의 leptin 농도와는 반대의 경향을 보였다. Nam *et al.* (1996)의 연구에서 비만인들의 경우는 성장 호르몬의 분비가 정상인들보다도 감소되고 혈청 유리지방산의 농도는 증가하여 성장호르몬의 분비 장애가 지속된다고 하였고, Caufriez *et al.* (1984)은 비만인의 혈중 총 IGF-I 농도에 대해서는 정상이거나, Hochberg *et al.* (1992)은 높다고 하였다. 또, Copeland *et al.* (1994)은 비만인의 총 IGF I의 농도는 정상인에 비해 낮다고 하였으며, Rasmussen *et al.* (1995)은 IGF I 농도는 신체질량지수와 역상관이 있다고 하였는데, 이에 대해 모든 연구들이 일관된 견해를 보이지는 않았지만 대부분의 비만인에서 총 IGF I이 감소되는 경향에 대해서는 비만과 관련된 고인슐린혈증이 IGFBP 1을 감소시키기 때문인 것으로 알려져 있다. 앞선 leptin 결과에서 콜레스테롤식이군이 비만모델이라고 한다면 지방세포의 생성이 증가되어 비만도가 높아져 leptin의 농도가 증가되었고, 그와는 반대로 혈 중의 IGF I의 농도는 콜레스테롤식이군에서 혈 중으로 적게 분비되어 leptin과는 음의 상관관계를 보여주었다.

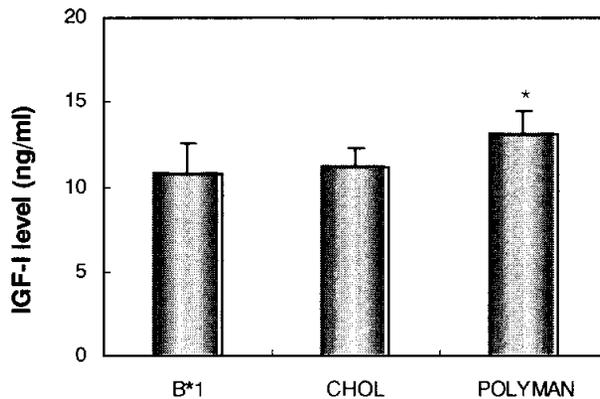


Fig. 4. The level of serum IGF-I in the experimental rats

The rats serum IGF-I were determined by IRMA with reagents from DSL-5600 ACTIVE IGF-I Coated-Tube IRMA kit(DSL, USA). The RIA mixtures, consisted of increasing concentrations of recombinant rat leptin diluted in assay buffer, anti-rat leptin antiserum (IgG rabbit anti leptin) and assay buffer. The mixture was incubated for 24h at R.T., then ¹²⁵I-rat leptin was added and the mixture was further incubated for 24 h at R.T. Following the addition of PEG (12.5%) and a goat anti-guinea IgG antibody and centrifugation (3,000rpm, 30 min, 4°C), the supernatants were discarded and radioactivity in the pellets was counted to determine bound radioactivity. Calculate the ng/ml of rat leptin in sample using automated data reduction procedures.

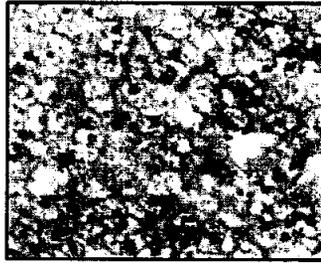
Refer to the footnote of Table 1.

9) 간장 조직의 조직염색 분석

조직학적 연구는 정상 또는 병리 조직의 형태, 이들 조직 사이의 상호 관련성 및 조직을 구성하는 각 세포들의 배열과 형태학적 변화를 자세히 관찰하기 위하여 모든 조직절편을 핵과 세포질을 구분해서 볼 수 있는 H & E 염색을 통하여 현미경하에서 볼 수 있도록 하는 방법이다. 조직 절편 검사는 조직편을 rotary microtome을 사용하여 얇고 투명한 절편을 제작하여 관찰하는 방법으로 조직의 구성, 즉 세포와 세포 사이의 상호 관련성을 보존할 수 있다는 것이 가장 큰 장점이다. 박절에 의해 얻어진 조직절편은 본래 지니고 있던 입체적인 구조가 단일 세포층으로 전환되며, 그 위에 여러 종류의 염색을 하여 세포구조를 광학현미경으로 관찰하는 방법이다. 본 실험에서는 실험식이에 따른 흰쥐의 간장조직을 조직학적으로 살펴보고자 H & E로 염색 처리한 후 광학현미경으로 관찰하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 지방구를 제외한 부분은 붉게 염색되었으며, 지방구는 투명한 색으로 존재하였다. 기초식이군은 정상 간장 조직의 것이며, 콜레스테롤식이군은 대조군으로써 아주 심한 정도의 지방침착을 관찰할 수 있었고, polymannuronate 식이군은 정상군에 가까운 정도로 아주 경한 지방변성을 보였다. 이는 콜레스테롤에 의한 영향으로 보이며, 식이섬유인 polymannuronate에 의해 간장 조직의 지방 축적이 감소되었음을 보여주는 증거이며, 간장 조직의 결과와도 동일한 결과를 보였다. Stuart *et al.* (1975)은 고콜레스테롤을 급여한 흰쥐에서 간세포질에 지방공포 출현을 관찰하였고, Drevon *et al.* (1977)도 지질을 투여한 guinea pig에서 간에 현저한 콜레스테롤 축적, 간세포 내 지방구 출현과 아울러 인지질의 증가를 보였다고 하여 본 실험과 유사한 결과를 보여 주었다.



B⁻¹



CHOL



POLYMAN

Fig. 5. Photomicrographs of H&E staining in the liver of rats

The liver of rats were fixed by Bouin fixation liquid. After being embeded in paraffin, sections of the livers were cut $5\mu\text{m}$ thick, and H & E (hematoxylin & eosin) staining was performed.

Photographs of each of the livers of were taken from every section at $\times 200$ magnification.

Refer to the footnote of Table 1.

2. Polymannuronate의 첨가가 3T3-L1 지방세포에 미치는 영향

1) 세포의 성장 및 분화 억제

(1) 세포 내로의 glucose 유입 억제

3T3-L1 지방세포에 polymannuronate를 농도별로 처리하였을 때, 배양액중의 glucose 함량을 측정하여, 세포내로의 유입량을 보고자 하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 polymannuronate의 첨가는 배양액중의 물질들을 세포 내로 이동하는 것을 억제하는 것으로 나타났으며, polymannuronate 첨가군의 glucose 이용은 control군에 비하여 감소하는 것으로 나타났다. Kim *et al.* (1992)은 insulin이 세포내로 유입된 glucose를 이용하여 adipogenesis를 촉진하고 lipolysis를 억제한다고 하였으며, Wendy *et al.* (1998)도 insulin이 glucose 수송과 leptin 분비에 중요한 인자라고 하였다. 즉, insulin이 지방세포의 glucose 이용률을 증가시켜 leptin 분비를 촉진한다고 증명하였다. Moustaid *et al.* (1996)은 사람의 지방조직에서 추출한 지방세포의 배양액 중에 insulin을 첨가하여 세포의 glucose 소비량을 살펴보았으며, 그 결과 insulin에 의해 배양액중의 glucose 이용이 insulin 처리군에서 매우 증가된 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서의 glucose 소비량 결과 control군은 insulin의 첨가로 세포내로의 glucose 유입이 증가한 반면, polymannuronate군은 glucose의 세포내 유입이 polymannuronate에 의해 저해되었다. 이것으로 보아 배양액중에 첨가한 polymannuronate가 3T3-L1 지방세포의 glucose 이용을 억제한다는 것을 확인하였다.

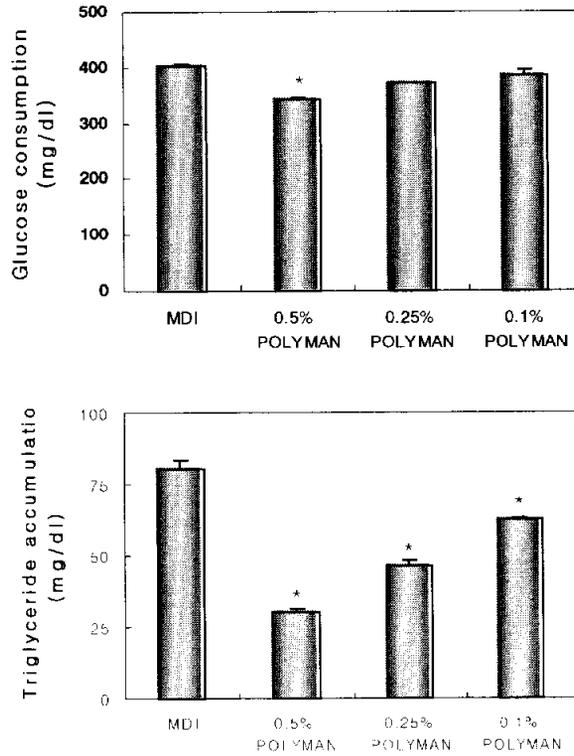


Fig. 6. Glucose consumption and Triglycerid accumulation of 3T3-L1 adipocyte

Inhibition of adipocyte differentiation after polymannuronate treatment of 3T3-L1 cells indicated by Glucose consumption and Triglycerid accumulation. Glucose concentration in the culture media was measured by Glucose kit. Glucose consumption rates were calculated subtracting residual glucose in the treated medium from glucose in nontreated medium. TG content in the cells was determined using the method of Green *et al.* For the measure of TG content in the cells, cells were collected in phosphate-buffered saline. TG was extracted by the equal volume of PBS. After chloroform:ethanol was evaporated, the precipitation was solubilized with methanol:chloroform:water(2:1:0.8). TG content was measured by a determine TG kit (SINYHANG, Korea).

1 Codes of 3T3-L1 adipocyte, MDI; 0.5mM methylisobutylxanthine, 0.25• M dexamethasone, and 10 μ g/ml of insulin with, 0.5% POLYMAN; MDI with 0.5% polymannuronate, 0.25% POLYMAN; MDI with 0.25% polymannuronate, 0.1% MDI with 0.1% polymannuronate.

(2) 세포내 triglyceride 축적 억제

3T3 L1 지방세포에 polymannuronate를 첨가하였을 때, 배양액 중에 첨가한 glucose를 이용하여 Triglyceride(TG) 합성 과정에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 세포 내 TG 축적량을 측정하였다(Fig. 6). 그 결과 polymannuronate군의 세포 내 TG 축적량은 control군에 비하여 감소하는 것으로 나타났다. 이것은 세포내 glucose 유입억제가 부분적으로 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 즉, 분화촉진인자의 첨가로 control군은 glucose를 이용한 adipogenesis가 활발히 진행되고 있음을 알 수 있었으며, Hwang *et al.* (2000), Schmidt (1990)의 연구결과와 일치하였다.

(3) Oil red O 염색

polymannuronate의 첨가가 3T3-L1 지방세포의 지방구 생성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 Oil red O로 염색을 한 후 현미경 관찰하였다(Fig. 7). MDI는 지방 분화 촉진인자인 MDI를 배양액에 첨가한 control 군으로 세포 내에 무수히 많은 작은 지방구가 생성된 것을 확인할 수 있으며, 농도별로 polymannuronate을 배양액 중에 투여했을 때 세포의 성장 및 지방구 생성이 농도 의존적으로 억제된 것을 확인할 수 있었다. 이것은 polymannuronate의 첨가로 인하여 배양액 중에 존재하는 물질들이 세포 내로의 유입이 억제됨으로써 일어나는 결과로 추측되어진다. 이상의 결과와 유사하게 본 연구에서 3T3 L1 지방세포의 현미경 관찰시 분화인자의 투여는 지방세포로의 분화를 촉진시켜 지방구를 많이 생성하였으며, polymannuronate의 투여는 insulin이 유도하는 지방세포로의 분화를 억제하여 지방구 생성을 크게 감소시키는 것을 형태학적으로 확인할 수 있었다.

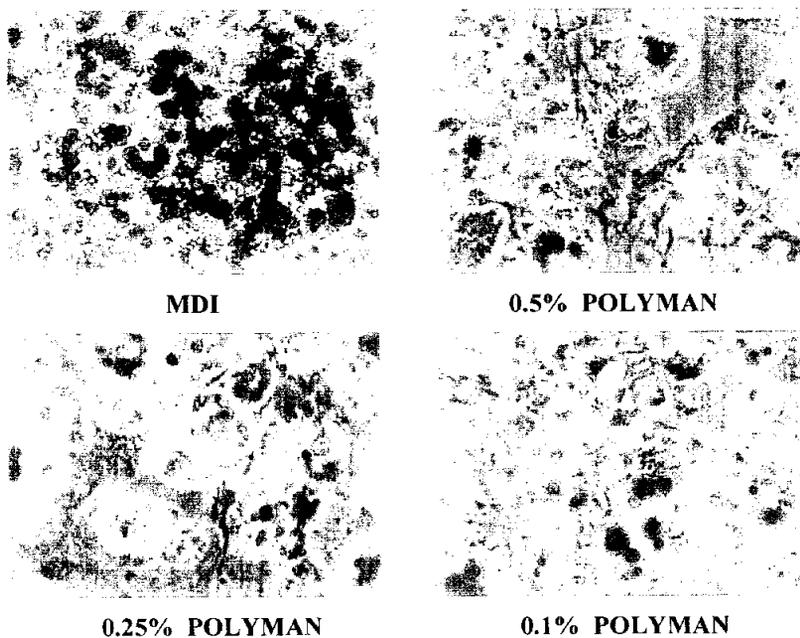


Fig. 7. Oil red O staining of 3T3-L1 adipocyte

Photographs after treatment with adipogenic inducers and 3T3-L1 cells became confluent on day 0. The adipogenic inducers (0.5mM methylisobutylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, and 10 μ g/ml of insulin) were added to the cultures on day 8. Following 48 h of treatment, cells were refed with fresh medium lacking inducers. 3T3-L1 cells were stained with oil red O solution (50 g/L oil red O in isopropanol/water (6:4)). Oil globules stained red or orange and were observed under microscopy (Olympus Vanox,Tokyo). Pictures were taken on day 10 at a total magnification of x 200.

Refer to the footnote of Fig 6.

(4) Glycerolphosphate dehydrogenase activity 억제

전지방세포가 형태학적, 생화학적으로 완벽하게 성숙된 지방세포로 분화되는 과정에는 지방세포 유전자조절부위에 중요한 전사활성인자가 활성화되어야 한다. 현재 adipogenesis 과정의 marker가 되는 인자들은 많이 밝혀져 있다. 여기에 관여하는 효소에는 acetyl-coA Carboxylase (ACC), glycerolphosphate dehydrogenase(GPDH), pyruvate carboxylase 등이 있다(Hwang *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 1997; Moustaid *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1992; Benjamine *et al.*, 1994). 즉, 전지방세포가 지방세포로 분화될 때 이 효소들의 활성이 증가 또는 감소한다. 따라서 배양액 내에 첨가한 특정 인자들의 분화 촉진 및 억제 정도를 알기 위하여 이 효소들의 활성을 측정함으로써 그 정도를 확인 할 수 있다. 그 중에서도 GPDH는 adipogenesis 과정이 진행되면서 그 활성이 증가하며(Schmidt *et al.*, 1990; Wise *et al.*, 1979; Moustaid *et al.*, 1996)은 3T3-L1 세포가 지방세포로 전환되는 동안 GPDH 활성이 증가한다고 보고하였다. Moustaid *et al.* (1996)은 GPDH 활성에서 인슐린의 효과를 증명하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 GPDH의 활성 결과는 배양액에 첨가한 특정인자들(insulin, MIX, DEX, polymannuronate)의 adipogenesis 촉진 및 억제 정도를 확인 할 수 있었으며, 이것은 앞선 glucose 소비 농도와 TG 축적량의 결과와 일치하였으며, 앞선 많은 연구 결과(Hwang *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1990; Moustaid *et al.*, 1996)들과 일치하였다.

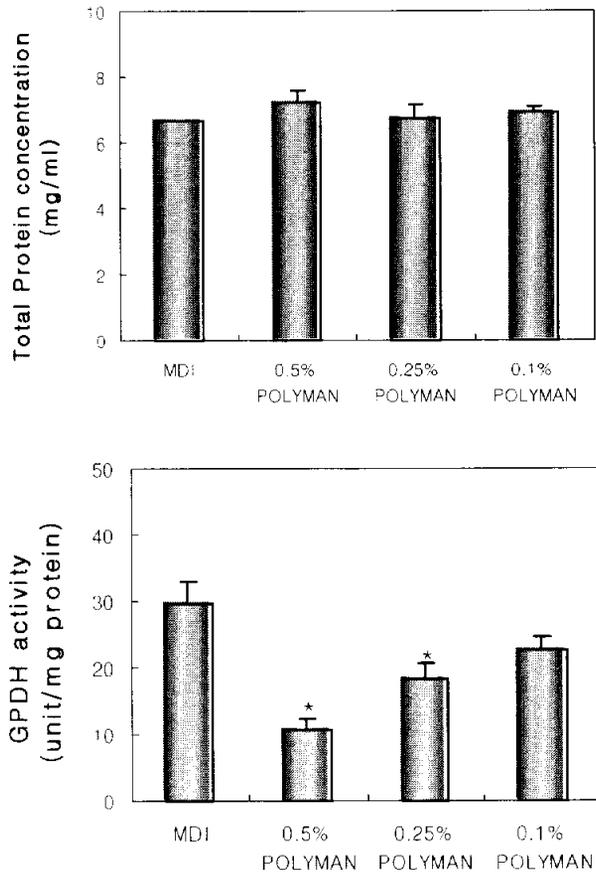


Fig. 8. Total protein concentration and GPDH activity of 3T3-L1 adipocyte

Inhibition of adipocyte differentiation after polymannuronate treatment of 3T3-L1 cells indicated by glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity. The cultures of 3T3-L1 cells became confluent on day 0. The differentiation inducers (M, D, I) were added to the cultures on day 0. Following 48 h of treatment, cells were refed with fresh medium containing $10\mu\text{g/ml}$ of insulin. 3T3-L1 cells were treated with or without polymannuronate dissolved in media during differentiation for 10 days after they had become confluent. The results are representative of three replicates per experiment and the experiment was replicated twice. Refer to the footnote of Fig 6.

2) 세포내의 leptin 분비와 발현 억제

(1) Radioimmunoassay에 의한 leptin 분비 억제

Fig. 9는 polymannuronate의 첨가에 따른 3T3-L1 지방세포의 leptin 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 배양액을 채취하여 RIA 분석을 통해 살펴 본 결과이다. 3T3 L1 지방세포는 분화되면 leptin이 생산되어 세포 중으로 분비되는 것으로 알려져 있다. Flier *et al.* (1997), Lonnqvist *et al.* (1997), Ostrund *et al.* (1996)은 대부분 비만인에게서 정상인에 비해 leptin 농도가 유의적으로 높다고 하였고, 식이조성에 따라 변화하는 leptin과 insulin사이에 나타나는 양의 상관관계를 가진다고 하였다(Ahern *et al.*, 1997; Hardie *et al.*, 1996). 또 Saladin *et al.* (1995)은 linsulin에 의해 leptin의 형성이나 leptin의 분비가 증가된다고 하였으며, leptin의 분비는 insulin과 dexamethasone에 의해 증가된다고 하였다(Muller *et al.*, 1997; Fain *et al.*, 1998). 그 결과 세포내 배양액 중의 leptin의 분비는 control군과 비교하여 polymannuronate를 첨가한 군에서 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났는데, 이와 같은 사실은 세포배양액에 증가된 leotin의 함량은 지방세포에서 합성되어 증가된 leptin의 양적 증가가 일차적인 증가요인이라 추정되며, 이는 앞선 결과와도 일치하는 것으로 나타났다.

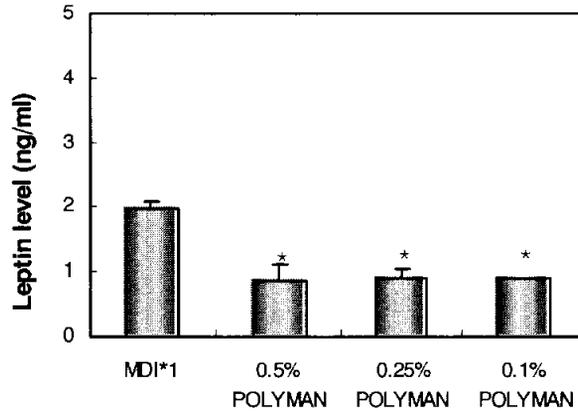


Fig. 9. The level of conditioned media leptin in the 3T3-L1 adipocyte

The 3T3-L1 conditioned media leptin were determined by RIA with reagents from Linco Research(St. Louis, MO, USA). The RIA mixtures, consisted of increasing concentrations of recombinant rat leptin diluted in assay buffer, anti-rat leptin antiserum (IGg rabbit anti leptin) and assay buffer. The mixture was incubated for 24h at R.T., then ¹²⁵I-rat leptin was added and the mixture was further incubated for 24 h at R.T.. Following the addition of PEG(12.5%) and a goat anti-guinea IgG antibody and centrifugation(3,000rpm, 30 min, 4°C), the supernatants were discarded and radioactivity in the pellets was counted to determine bound radioactivity. Calculate the ng/ml¹ of 3T3-L1 leptin in sample using automated data reduction procedures.

1 Refer to the footnote of Fig 6.

2 All data were calculated by Mean ± S.D. for 3 individuals.

3 *: Significantly different in student *T-test* from MDI(*p<0.05).

(2) Western blot에 의한 leptin 발현 억제

Fig. 10은 polymannuronate의 첨가에 따른 3T3 L1 지방세포의 leptin 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 cell lysate를 회수하여 western blot을 통해 살펴 본 결과이다. Fig. 10에서와 같이 control군, polymannuronate군 모두에서 분자량 16kDa인 leptin이 존재하였으나, polymannuronate군은 control군보다 낮은 수준을 보였다. Slicker *et al.* (1996)은 dexamethasone을 포함한 다양한 종류의 스테로이드를 처리한 마우스 지방세포에서 leptin의 발현을 증가시킨다고 하였으며, insulin이 leptin 유전자의 발현을 증가시킨다는 McDougald *et al.* (1995)의 결과와 일치하였으며 Fain *et al.* (1998), Saladin *et al.* (1995), Leroy *et al.* (1996)의 결과와도 일치하였다. 즉, 3T3 L1 지방세포에서 분화 촉진인자인 MDI투여는 지방세포로의 분화를 촉진하여 leptin의 발현을 증가시킨 반면, polymannuronate의 투여는 분화를 억제하여 leptin 발현을 억제할 것을 알 수 있었다.

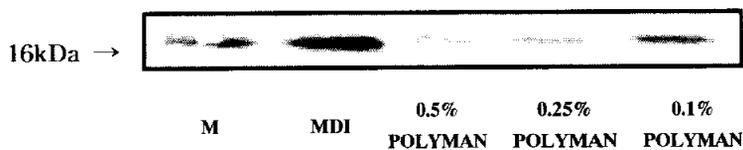


Fig. 10. Western blot for detecting leptin protein levels in the 3T3-L1 adipocyte

Cells were resuspended in lysis buffer and 40 μ g protein was mixed with loading buffer and loaded onto an 15% polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and blotted against primary Antibody. Membranes were washed and incubated with a 1: 1500 dilution of HRP-conjugated secondary Antibody. Protein bands were visualized by an enhanced chemiluminescence reaction. Experiments were performed at least three times with a representative experiment being shown.

Refer to the footnote of Fig 6.

3) Leptin mRNA 발현에 미치는 영향

Fig. 11는 polymannuronate의 첨가에 따른 3T3 L1 지방세포의 leptin mRNA 수준에 미치는 영향을 보고자 세포내의 total RNA를 추출하여 RT-PCR한 결과이다. 그 결과, control군의 leptin mRNA는 앞선 발현 및 분비 결과와 일치하는 수준으로 나타났다. 이로써 polymannuronate는 leptin mRNA의 전사적 조절 메커니즘에 관여하여 MDI가 유도하는 leptin의 합성과 분비를 억제한다는 것을 알 수 있었다. Richard *et al.* (1999)의 연구는 흰쥐의 지방세포에서 leptin 발현과 leptin mRNA를 조절할 것으로 추측되는 insulin과 dexamethasone의 효과를 northern blot과 RIA 방법을 통해 살펴보았다. 그 결과, 100nmol/L insulin 투여 후 3T3 L1 세포의 leptin mRNA 발현에는 유의적 차이가 없었으나, leptin 분비는 두 배 상승하였다. 또, 100nmol/L DEX 투여 후 leptin mRNA 발현 수준은 2~4배로 증가하였고, leptin 분비도 2배 상승하였다. 이와 같은 랩틴 mRNA 발현 수준상의 차이가 전사후 또는 전사상 메커니즘과 관련 있을 것으로 추측되어 전사억제제 및 단백질합성 억제제를 이용하여 실험하였다. 그 결과, 전사억제제인 actinomycine D(Act D) 처리는 DEX 투여군의 leptin 분비를 감소시켰지만, insulin 투여군에는 영향을 미치지 않았다. 그리고 단백질합성억제제인 cycloheximide(CHX) 처리는 DEX나 insulin투여군의 leptin mRNA 발현에 영향을 미치지 않았고 leptin 분비량은 감소시켰다. 따라서, leptin의 합성과 분비에서 insulin은 전사 후 조절 메커니즘과 관련 있고 DEX는 전사적 메커니즘을 조절한다고 보고하였다. 그리고 Sharon *et al.* (1997)도 DEX가 전지방세포에서 지방세포로 분화를 촉진시켜 leptin의 합성과 leptin mRNA 발현을 증가시킨다고 보고하였다.

이상의 결과를 종합하면, polymannuronate는 지방분화를 유도한 3T3 L1 지방세포의 성장과 분화를 저해하고, leptin mRNA 전사 억제를 통하여 leptin 분비를 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

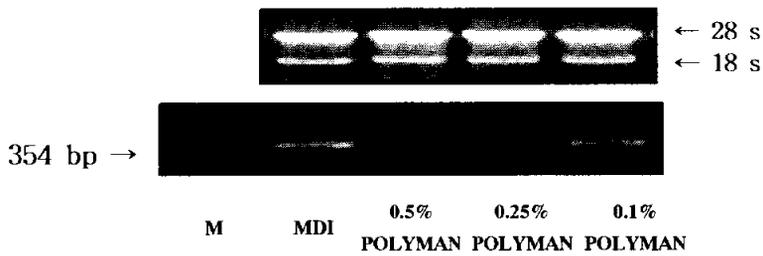


Fig. 11. Gene expression of leptin by in the total RNA of 3T3-L1 by RT-PCR analysis

The RT-PCR analysis was performed as previously in Materials and methods. Total RNA was extracted from liver of rats. PCR primers for standard were designed according to gene sequences. RT-PCR samples were run for analysis on an ethidium bromide stained 1.2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Refer to the footnote of Fig 6.

3. HT-29 대장암세포에 의한 polymannuronate의 효과

1) MTS 분석에 의한 세포 증식 억제

세포 증식을 평가하기 위해 본 연구에서 사용한 MTS 분석은 DNA 합성 정도를 증식의 평가기준으로 삼는 [^3H] thymidine incorporation 분석을 대신할 수 있는 방법으로서 세포의 증식을 비색정량에 의해 확인하는 방법이다. MTS 분석과 [^3H] thymidine incorporation 분석의 민감도는 거의 비슷하다고 보고 되어있다(Carmichael *et al.*, 1987; Cory *et al.*, 1991). HT 29 대장암세포에 polymannuronate를 농도별로 처리한 후 MTS 분석을 통하여 세포 생존율을 확인하였다(Fig. 12). 즉, 동일한 농도로 처리한 HT 29 대장암세포에 tetrazolium compound인 MTS를 투여하고 일정시간동안 배양하였다. 배양하는 동안 MTS는 세포 내 미토콘드리아에서 생산되는 succinate dehydrogenase에 의해 수용성의 formazan으로 변하고 이렇게 생성된 formazan의 양을 490nm에서의 흡광도를 측정하여 세포의 증식을 확인하였다. polymannuronate를 0.01, 0.1, 0.25, 0.5%의 농도로 첨가하였을 때, 세포의 생존율이 농도에 의존하여 감소하는 경향을 보였다. 특히, 0.25% polymannuronate 처리 시 50% 정도의 생존율을 보여 signal pathway 실험에서는 이 농도에서 살펴보았다.

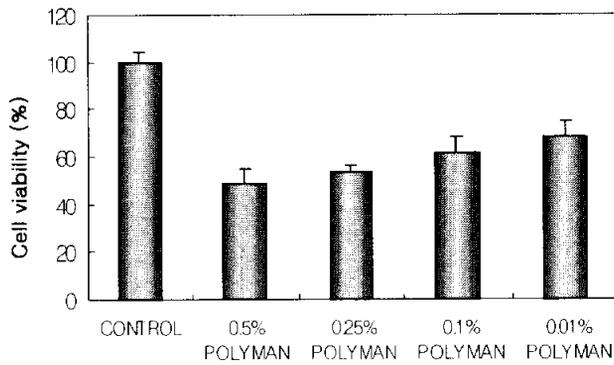


Fig. 12. Effect of polymannuronate on proliferation in HT-29 colon cancer cells

HT-29 colon cancer cells were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^4 cells/dish with RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. Twenty-four hours after plating, the monolayer were serum-starved for 24hrs. Cells treated for 1 day with or without polymannuronate (0.01~0.5%), and viable cell numbers were estimated by the MTS assay.

Each bar represents the mean \pm S.D.

2) Polymannuronate에 의한 IGF IR의 신호전달기전

IGF는 정상조직의 세포증식을 촉진할 뿐만 아니라 종양생성과 암세포의 증식과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 근래에는 IGF I 및 IGF IR가 종양발생에 주요한 역할을 하는 것이 보고되고 있다. 대장암 세포를 비롯한 여러 암세포에서 IGF I이 세포사멸을 방해할 뿐만 아니라 성장을 촉진하는 역할을 한다는 것이 보고되어, 대장암 세포에서 polymannuronate의 항암작용이 IGF I signal pathway를 통하여 일어난다는 가설을 세우고 다음과 같이 실험하였다. 대장암세포주인 HT-29 세포에 0.25%의 polymannuronate를 2일 배양하고 실험직전 IGF I을 첨가하여 시간별로 배양하여 IGF IR의 신호전달을 보았다. 그 결과 IGF IR의 단백질 수준에서는 시간에 따라 감소함을 보였다(Fig. 13).

Fig. 14에서는 앞선 방법과 동일하게 수행하여 IGF IR의 인산화 수준을 보고자 PY-99을 western blot하여 확인하였다. 앞의 결과와 동일하게 polymannuronate의 첨가시 인산화정도가 감소됨을 보였다. 이 결과에 의하면 IGF IR의 단백질 감소가 polymannuronate에 의한 IGF-IR signal의 감소원인의 하나로 보여지나 polymannuronate에 의한 인산화된 IGF IR의 수준의 감소가 IGF IR 단백질 수준의 감소보다 더 현저하였다. 암세포들이 급속도로 증식하는 원인 중의 하나는 각 조직내에서 국소적으로 생성되는 성장인자들이 autocrine 또는 paracrine 방법으로 세포증식을 촉진하기 때문이다. IGF I, IGF II, IGFBP, IGF receptor로 구성된 IGF system은 대장암을 비롯한 인간의 암 발생과 진전에 아주 밀접한 관계를 가지고 있다(Burroughs *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 1998; Cullen *et al.*, 1991; Macaulay, 1992; Singh *et al.*, 1993). 즉, 정상적인 대장점막과 비교하여 대장암에는 IGF-II와 IGFBP mRNA의 발현이 증가하고(Zhang *et al.*, 1997, Mishra *et al.*, 1998), 또 대장암에는 주위의 정상적인 점막 조직과 비교하여 IGF I

receptor(IGF-IR)의 수가 증가되었다는 보고가 있다(Guo *et al.*, 1992). IGF IR은 세포막을 가르지르는 glycoprotein으로 두 개의 α -subunit과 두 개의 β -subunit으로 구성되어 있다. 세포막에 위치한 α subunit은 IGF I, IGF II, insulin이 결합하는 여러개의 cysteine으로 구성된 domain을 포함하고 있고, β subunit은 세포막을 통과하는 부분과 세포 안의 tyrosine kinase domain을 포함하고 있다(LcRoith *et al.*, 1995). IGF IR는 세포분열을 촉진하고 암세포로의 전환에 절대적으로 필요로 하며 여러 가지 apoptotic 손상으로 세포를 보호하여 암발생과 진전을 촉진한다고 알려져 있다. 즉 정상세포가 암세포로 전환되려면 IGF-IR이 필요하고 세포의 IGF IR의 발현을 방해하면 apoptosis를 초래한다(Baserga, 1999). 혈액의 IGF-I과 IGF-II의 농도는 아주 높지만(Nystrom *et al.*, 1997) IGFBP와 결합하여 순환되어 세포막에 위치한 IGF IR에 결합할 수 없으므로(Berek *et al.*, 1996), IGF IR의 활성화는 각 조직에서 생성된 IGF들에 의해 autocrine 또는 paracrine metabolism에 의해 주로 이루어진다(Baserga *et al.*, 1997). 이 결과는 polymannuronate에 의한 IGF signaling의 억제능 IGF IR 단백질 감소뿐 아니라 polymannuronate가 직접적으로 IGF IR의 기능을 억제하기 때문인 것으로 여겨진다.

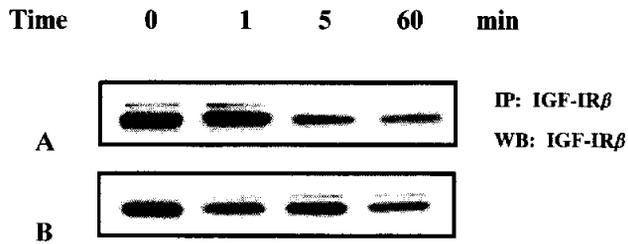


Fig. 13. Effect of polymannuronate on IGF-I induced IGF-IR β in HT-29 colon cancer cells

HT-29 colon cancer cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/dish with RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. Twenty-four hours after plating, the monolayer were serum-starved for 24hrs. Cells treated for 2 day with or without 0.25% polymannuronate. IGF-I (100 ng/ml) was added for 0~60 min immediately prior to lysate preparations. Cell lysates were incubated anti-IGF-IR β antibody and Protein A-Sepharose to immunoprecipitate proteins associated with IGF-IR. The resulting proteins were analyzed by Western blotting analysis with their relevant antibodies.

A; Control, B; 0.25% polymannuronate.

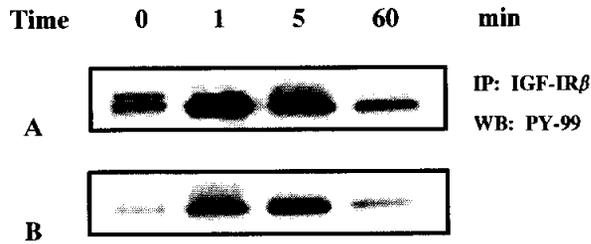


Fig. 14. Effect of polymannuronate on IGF-I induced tyrosine phosphorylation of IGF-IR in HT-29 colon cancer cells

HT-29 colon cancer cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/dish with RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. Twenty-four hours after plating, the monolayer were serum-starved for 24hrs. Cells treated for 2 day with or without 0.25% polymannuronate. IGF-I(100 ng/ml) was added for 0~60 min immediately prior to lysate preparations. Cell lysates were incubated anti-IGF-IR β antibody and Protein A-Sepharose to immunoprecipitate proteins associated with IGF-IR. The resulting proteins were analyzed by Western blotting analysis with their relevant antibodies.

A: Control, B: 0.25% polymannuronate.

IV. 요약

본 연구는 미역, 다시마와 같은 갈조류에 함유되어 있는 알긴산을 저분자화시켜 만든 polymannuronate를 흰쥐와 3T3-L1 지방세포 및 HT-29 대장암 세포에 첨가하였을 때, 어떠한 영향을 미치는지를 확인하였다.

I. Polymannuronate의 첨가가 흰쥐에 미치는 영향

S.D.계 흰쥐를 기초식이로 1주간 순치한 후에 기초식이군, 콜레스테롤식이군, polymannuronate 식이군 별로 4주간 사육한 결과,

1. 체중변화는 콜레스테롤식이군에서 가장 높았으며, 식이섭취량은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한, 식이효율은 콜레스테롤식이군이 polymannuronate 식이군과 기초식이군에 비하여 높았다.
2. Polymannuronate의 급이에 따른 혈청과 간장지질에서의 중성지질과 혈청 중의 인지질의 양은 콜레스테롤식이군에서 가장 높았다.
3. 혈청과 간장지질 중의 총콜레스테롤은 polymannuronate의 급이시 저하효과를 보였으며, 유리콜레스테롤의 함량은 총콜레스테롤과 비슷한 경향을 보였다. HDL 콜레스테롤의 함량은 기초식이군에서 가장 낮았고, LDL 콜레스테롤의 함량도 polymannuronate 식이군이 콜레스테롤식이군에 비하여 유의적으로 낮았으며, 이러한 결과는 간장지질에서도 동일한 결과를 보였다.
4. 혈당은 세군 모두에서 큰 차이를 보이지 않았다. 또한, 혈청 중의 GOT와 GPT 활성은 유의적인 차이를 보였으나, 정상범위에 속하였다.
5. Polymannuronate 식이군에서 일일 분변량, 분변의 총 담즙산 함량, 총 식이섬유 함량이 가장 많았다.
6. 혈청 중의 leptin 분비량과 단백질 발현은 콜레스테롤식이군에서 가

장 많았으며, 혈청 중의 IGF I함량은 leptin과는 반대의 경향을 보였다.

7. 간장조직염색에서 polymannuronate 식이군에서 가장 많은 지방 침착을 보였다.
8. 간장조직중의 leptin mRNA를 RT PCR로 확인한 결과, 콜레스테롤 식이군에서 polymannuronate 식이군보다 mRNA 발현수준이 증가하였다.

II. Polymannuronate의 첨가가 3T3-L1 지방세포에 미치는 영향

1. Polymannuronate는 3T3-L1 지방세포에서 glucose의 세포내 유입과, triglyceride의 세포내 축적을 저해하여 지방구 생성과 분화를 억제하였으며, Oil red O 염색에서도 동일한 결과를 보였다.
2. Polymannuronate는 3T3 L1 지방세포에서 adipogenesis 촉진과정을 억제한 결과 glycerolphosphate dehydrogenase activity를 저해하였다.
3. 분화촉진자인 insulin의 투여는 3T3 L1이 지방세포로의 분화를 촉진하여 leptin의 발현을 증가시킨 반면, polymannuronate의 투여는 insulin이 유도하는 지방세포로의 분화를 저해하여 배양액중의 leptin 분비량과 세포내 leptin 단백질 수준을 저해시켰다.
4. Polymannuronate는 전사적 조절 메카니즘을 저해하여 leptin의 mRNA 발현을 억제하였다.

III. Polymannuronate의 첨가가 HT-29 대장암세포에 미치는 영향

1. Polymannuronate의 첨가는 HT-29 대장암세포의 증식을 저해하였으며, 농도의존적인 경향을 보였다.
2. Polymannuronate는 HT-29 대장암세포에서 IGF I의 신호전달기전을 저해하였다.

이상과 같이 지질 감소 효과와 대장암 예방의 역할을 하는 알긴산을 저분자화시킨 polymannuronate를 흰쥐와 3T3-L1 지방세포 및 HT-29 대장암세포에 투여 또는 첨가하여 그 영향을 살펴본 결과, 흰쥐와 3T3-L1 지방세포에서 지질 감소 효과와 그로 인한 leptin 분비 감소를 확인하였으며, HT-29 대장암세포에서는 암세포의 증식에 관여하는 IGF-1의 신호전달기전에 영향을 미쳐 암세포의 증식을 감소시켰다. 이로써, polymannuronate의 역할을 *in vivo*와 *in vitro* 수준에서 검증하고자 하였다는 점에 본 연구의 의의가 있고 이에 leptin과 IGF-1 수준에서 polymannuronate의 효과와 관련된 신호전달기전의 연구가 계속 되어져야 할 것으로 생각된다.

V. 참고 문헌

- Ahren, B., Mansson, S., Gingerich, R. L. and Havel, P. J. Regulation of plasma leptin in mice : influence of age, high, fat diet, and fasting. *Am J Physiol* 273 : R113-R120, 1997
- Ailhaud, G., P. Grimaldi and R. Negrel. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12 : 207-233, 1992
- Akiba, Y. and Matsumoto, T. Effect of dietary fiber on lipid metabolism in liver and adipose tissue in chicks. *J Nut* 112 : 1577-1585, 1982
- Alessi, M. C., Peiretti, F., Henry, M., Nalbome, G. and Juhan-Vague, I. Production of plasminogen activator I by human adipose tissue : possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes* 46 : 860-867, 1997
- Andrea M. I., Felice S., Michele M., Massimisiano C., Antonino A., Costanzo M., Gaetano F., Giuseppe R and Andrea F. Leptin and Aging. Correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different body weight. *J clin Endocrinol Metab* 85 : 1954-1962, 2000
- AOAC. Official method of analysis, 15th ed., 1990
- Aratani, Y. and Kitagawa, Y. Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex. *J Biol Chem* 263 : 16163-16169, 1988
- Arjmandi, B. H., Ahn, J., Nathani, S. and Reeves, R. D. Dietary soluble fiber and cholesterol affect serum cholesterol concentration, hepatic portal venous short-chain fatty acid concentration and fecal sterol excretion in rats. *J Nutr* 122 : 246-253, 1992
- Bae, M. J. Effect of Ginseng Fraction Components on Fat Accumulation of Liver in the Obese Rat Induced by High Fat Dietary. *J Korean Soc Food Nutr* 20(1) : 27-14, 1991
- Baserga, R. The IGF-I receptor in cancer research. *Exp Cell Res* 253 : 1-6, 1999
- Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M. and Valentinis, B. The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochem*

- Biophys Acta* 1332 : F105-126, 1997
- Baxter, R. C. Insulin-like growth factor binding proteins : interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278 : E967-976, 2000
- Bereket, A., Wilson, T. A., Blethen, S. L., Fan, J., Frost, R. A., Gelato, M. C. and Lang, C. H. Effect of short-term fasting on free/dissociable insulin-like growth factor I concentrations in normal human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 81 : 4379-4384, 1996
- Bucolo, G. and David, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 19 : 476-479, 1973
- Burkitt, D. P. and Trowell, H. C. Refined carbohydrate food and disease : The implications of dietary fiber. *Academic Press, London*, 1975
- Burroughs, K. D., Dunn, S. E., Barrett, J. C. and Taylor, J. A. Insulin-like growth factor-I : a key regulator of human cancer risk? *J Natl Cancer Inst* 91 : 579-581, 1999
- Casabiell, X., Pineiro, V., De la Cruz, L. F., Gualillo, O., Folgar, L., Dieguez, C. and Casanueva, F. Duall effect of insulin on *in Vitro* leptin secretion by adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 276 : 477-482. 2000
- Castelli, W. P., Garrison, R. J., Wilson, P. W. F., Abbott, R. D., Kalousdian, S. and Kannel, W. B. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. *JAMA* 256 : 2835-2838, 1986
- Caufriez, A., Golstein, J., Lebrun, P., Herchuelz, A., Furlanetto, R. and Copinschi, G. Relations between immunoreactive somatomedin C, insulin and T3 patterns during fasting in obese subjects. *Clin Endocrinol* 20 : 65-70, 1984
- Chan, J. M., Stampfer, M. J., Giovannucci, E., Gann, P. H., Ma, J., Wilkinson, P., Hennekens, C. H. and Pollak, M. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk : a prospective study. *Science* 279 : 563-566, 1998
- Choi W. H. Adipocyte As Function of Endocrine Cell. *J Kor Soc Study Obesity* 4(1) : 9-13, 1995
- Chung, K. H., Cho, S. H., Shin, E. N., Choi, K. H. and Choi, Y. S. Effects of alcohol consumption and fat content in diet on chemical composition and morphology of liver in rat. *J Korean Nutr* 21 : 154-163, 1988

- Coleman. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes- obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14 : 141-148, 1978
- Copeland, K. C. and Nair, K. S. Acute growth hormones effects on amino acid and lipid metabolism. *J Endocrinol Metab* 78 ; 1040-1047, 1994
- Cullen, K. J., Yee, D. and Rosen, N. Insulin-like growth factors in human malignancy. *Cancer Invest* 9 : 443-454, 1991
- Czech, M. P. Signal transmission by the insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions. *Endocrine Rev* 16 : 3-34, 1989
- Drevon, C. A. and Hovig, J. The effects of cholesterol fat feeding on lipid levels and morphological structure in liver, kidney and spleen in guinea pig. *Acta Path Microbiol Scand Sect A* 85 : 1, 1977
- Ebihara, K. and Schneeman, B. O. Interaction of bile acids, phospholipids, cholesterol and triglyceride with dietary fibers in the small intestine of rats. *J Nutr* 119 : 1100, 1989
- Eun J. S., Hong, J. S. and So, J. N. Effects of the extracts from hoelen alba, alismatis rhizoma and atractylodes rhizoma on proliferation and differentiation of 3T3-L1 cells. *Kor J Pharmacogn* 24(2) : 131-139, 1993
- Fain, J. N. and Bahouth S. W. Hormonal regulation of 18s RNA, leptin mRNA, and leptin release in adipocytes from hypothyroid rats. *Metabolism* 47 : 1455-1461, 1998
- Fernandez, M. L., Trejo, A. and McNamara, D. J. Pectin isolated from prickly paper modifies low density lipoprotein metabolism in cholesterol- fed guinea pigs. *J Nutr* 120 : 1283, 1990
- Filer, J. S. Leptin expression and action : new experimental paradigms. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 4242-4245, 1997
- Fischer, F. C. and Dorfel, H. The polyuronic acids of brown algae. *Z Physiol Chem* 302 : 186-203, 1955
- Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Lollmann, B., Iowell, B. B. and Filer, J. S. Leptin levels reflect body lipid content in mice : evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Med* 1 : 1311-1314, 1995
- Friedewald, W. T., Levy, R. L. and Fredrickson, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol without the use of the preparation ultracentrifuge. *Clin Chem* 18 : 499-452, 1972
- Fujihara, M. and Nagume, T. Determination of the molecular weight of

- alginate by agarose gel filtration. *J Chromatography* 465 : 386-389, 1989
- Galbo, H. and Gollick, P. Hormonal changes during and after exercise. *Med Sports* 17 : 97-110, 1983
- Gallaher, D. and Schneeman, B. O. Intestinal interaction of bile acids, phospholipid, dietary fiber and cholesterylamine. *Am J Physiol* 250 : 20, 1986
- Gallaher, D. D., Hassel, C. A., Lee, K. J. and Gallaher, C. M. Viscosity and fermentability as attributes of dietary fiber responsible for the for the hypocholesterolemic effect in hamsters. *J Nutr* 123 : 244, 1993
- Garg, M. L., Thomson, A. B. and Clandinin, M. T. Effect of dietary cholesterol and ω 3 fatty acids on lipid composition and Δ 5-desaturase activity of rat liver microsomes. *J Nutr* 118 : 661-668
- George, V. V., Timothy, M. S. and Linda, L. G. Effects of cholesterol absorption, synthesis, and metabolism in the rat. *Am J Clin Nutr* 33 : 2182-2191, 1982
- Goodman, D. S. Cholesterol ester metabolism. *Physiol Rev* 45: 747-839, 1968
- Gordon, D. T. The importance of total dietary fiber in human nutrition and health. *J Kor Nutr* 25 : 75, 1992
- Gordon, T., Kannel, W. B., Castelli, W. P. and Dawber, T. R. Lipoprotein, cardiovascular disease and death the Framingham study. *Arch Inter Med* 141 : 1128, 1981
- Green, H and Kehinde, O. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3 : 127-133, 1974
- Green, H and Kehinde, O. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1 : 113-116, 1974
- Guo, Y., Narayan, S., Yallampalli, C. and Singh, P. Characterization of insulin-like growth factor I receptors in human colon cancer. *Gastroenterology* 102 : 1101-1108, 1992
- Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lallou, R. L., Burley, S. K., Friedman, J. M. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269 : 543-546, 1995
- Han, J. S., Han, Y. B., The effect high fat diet and dietary fiber on adipocyte of epididymal fat pads in Rat. *Kor J Nutr* 7(2) : 118-126, 1994

- Hannelen, V. V., Ericksson, P., Hoffstedt, J. and Amer, P. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* 47 : 913-917, 1998
- Hans F., Hisafumi M., Ingvar B., Sten R., Kerstin W. Ragnar. B., Serum Leptin levels correlate with growth hormone secretion and body fat in Children. *Endocrinology* 84(10) : 3586-3590, 1999
- Hardie, L. J., Guilhot, N. and Trayhum, P. Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm Metab Res* 28 : 685-689, 1996
- Harmuth-Hoene, A. E. and Schwerdtfeger, E. Effect of indigestible polysaccharides on protein digestibility and nitrogen retention in growing rats. *Nutr Metab* 23 : 399-407, 1979
- Haug, A. and Smidsrod, O. Determination of intrinsic viscosity of alginates. *Acta Chem Scand* 16 : 1569-1578, 1962
- Haug, A. Fractionation of alginic acid. *Acta Chem Scand* 13 : 601-601, 1959
- Haug, A. Ion exchange properties of alginate fractions. *Acta Chem Scand* 13 : 1250-1251
- Haug, A., Larsen, B. and Smidsrod, O. Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Research* 32 : 217-225, 1974
- Hill, M. J., Crowther, T. S., Drasar, B. S., Hawksworth, G., Aries, V., Williams, R. E. O. Bacteria and etiology of cancer of large bowel. *Lancet* 95-400, 1971
- Hilman, L. C., Peters, S. G. and Fischer, C. A. The effects of fiber components, pectin, cellulose and lignin on serum cholesterol levels. *Am J Clin Nutr* 42 ; 207-212, 1985
- Hochberg, Z., Hertz, P., Colin, V., Ish-shalom, S., Yeshurun, D., Youdim, M. B. H. and Amit, T. The distal axis of growth hormone in nutritional disorder : GH-binding protein, insulin-like growth factor-I and IGF-I receptors in obesity and anorexia nervosa. *Metabolism* 41 ; 106-112, 1992
- Huh, K. B., Lee, J. H., Paik, I. K., Ajn, K. J., Jung, Y. J., Kim, M. J., Lee, H. C., Lee, Y. H. and Lee, Y. J. Influence of total abnormal fat accumulation on serum lipies and lipoproteins in Korean middle-aged men. *J Kor Nutr* 26 : 299-312, 1993
- Hwang, H. J., Pyeun, J. H. and Nam, T. J. The effects of alginic acid on 3T3-L1 cell's differentiation. *J Korean Fish Soc* 33(6) : 541-545, 2000

- Ikegami, S., Tsuchihashi, F., Harada, H., Tsuchihashi, N., Nishide, E. and Innami, S. Effect of viscous indigestible polysaccharides on pancreatic-biliary secretion and digestive organs in the rats. *J Nutr* 120 : 353, 1990
- Ikegami, S., Tsuchihashi, N., Nagayama, S., Harada, H., Nishide, E. and Innami, S. Effect of indigestible polysaccharides on function of digestion and absorption in rats. *J Nutr* 3 : 163, 1983
- Iso, N., Mizuno, H., Onda, N., Saito, T., Aoyama, N. and Yokoyama, A. Solution properties of sodium alginate from brown seaweeds living along the coast of Japan-II. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 44 : 1375-1379, 1978
- Jacobs, L. R. Relationship between dietary fiber and cancer : Metabolic, physiologic and cellular mechanism. *Proc Soc Exp Biol Med* 183 : 299-310, 1986
- Jean D., Jean F. and Johan A. Leptin a pleiotropic hormone: physiology, pharmacology, and strategies for discovery of leptin modulators. *J Med Chem* 41(27) : 5339-5352, 1998
- Jenkins, D. J. A., Leeds, A. R., Ciassul, M. A., Cochet, B. and Alberti, K. G. Decrease in postprandial insulin and glucose concentration by guar and pectin. *Am Intern Med* 86 : 20, 1977
- Jin L., Burguera B. G., Couse M. E., Scheithauer B. W, Lamson J., Eberhard N. L., Kulig E. and Lloyd R. V. Leptin and Leptin receptor expression in the normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role of leptin on pituitary cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 84 : 2903-2911, 1996
- Jones, B. H, Standridge, M K and Moustaid, N. Angiotensin II increase lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 138(4) : 1512-1519, 1997
- Kang, H. J., M. J. Suh, E. H. Kim and Y. S. Song. Effect of sodium alginate and cellulose on fasting plasma lipoprotein composition and cholesterol metabolism in Rats(I). *J Korean Soc Food Nutr* 23(6) : 879-863, 1994
- Kang, H. J., M. J. Suh, E. H. Kim and Y. S. Song. Effect of sodium alginate and cellulose on postprandial plasma lipoprotein and cholesterol metabolism in Rats(II). *J Korean Soc Food Nutr* 23(6) : 887-893, 1994
- Keim k and kies C. Effects of dietary fiber on nutritional status of weaning mice. *Cereal Chem* 56(2) : 73-78, 1979

- Kelsay, J. L., Goering, H. K., Behall, K. M. and Prather, E. S. Effect of fiber from fruits and vegetables on metabolic responses of human subject : Fiber intake, fecal excretion, and apparent digestibilities. *Am J Clin Nutr* 34 : 2849-2852, 1981
- Kim, H. S., L. Liang, R. G. Dean, D. B. Hausman, D. L. Hartzell and C. A. Baile. Inhibition of preadipocyte differentiation by Myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 281 : 902-906, 2001
- Kim, Y. S. and Y. K. Choi. Adipose tissue and fat cell metabolism. *J Kor Soc Study Obesity* 1(1) : 1992
- Kinnunen, P. K., Virtanen, J. A. and Vainio, P. Lipoprotein lipase and hepatic endothelial lipase. *Atheroscler Rev* 11 : 65, 1983
- Kirby, R. W., Anderson, J. W. Sielig, B., Rees, E. D., Chen, W. L., Miller, R. E. and Kay, R. M. Oat bran intake selectively lowers serum low-density lipoprotein cholesterol concentration of hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr* 34 : 824, 1981
- Klein, S., Coppack, S. W., Mohamed-Ali, V. and Landt, M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* 45 : 984-987, 1996
- Lafont, H., Lairon, D., Vigne, J. L., Chanussot, F., Chabert, C., Porthgal, H., Pauli, A. M., Crotte, C. and Hauton, J. C. Effect of wheat bran, pectin and cellulose on the secretion of bile lipids in rats. *J. Nutr* 115 : 849, 1985
- Lee, D. S. Improved functionality of alginate from the edible brown algae by low-molecularization. *Pukyong National University*, 1997
- Lee, D. S., Kim, H. R. and Pyeun, J. H. Effect of low-molecularization on rheological properties of alginate. *J Korean Fish Soc* 31 : 82-89, 1988
- Lee, E. O., H. S. Park and H. D. Shin. Effect of complete fasting on body fatness, serum leptin and lipid profile in women. *Korean J Nutrition* 33(1) : 42-48, 2000
- Lee, H. S., Choi, M. S., Lee, Y. K., Park, S. H. and Kim, Y. J. A study on the development of high-fiber supplementation on the diabetic patients-Effect of seaweed supplements for the lipid and glucose metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 29 : 296-306, 1996
- LeRoith, D., Werner, H., Beither-Johnson, D. and Roberts, C. T. Molecular

- and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16 : 143-163, 1995
- Leroy, P., Dessolin, S., Villageois, P., Moon, B. C., Friedman, J. M., Ailhaud, G. and Dani, C. Expression of ob gene in adipose cells. *J Biol Chem* 271 : 2365-2368, 1996
- Lipsky, H., Gloer, M. and Frishman, W. H. Dietary fiber for reducing blood cholesterol. *J Clin Pharmacol* 30 : 669-703, 1990
- Lonnqvist, F., Nordfors, L., Jansson, M., Thorne A., Schalling, M. and Arner, P. Leptin secretion from adipose tissue in women. *J Clin Invest* 99 : 2398-2404, 1997
- Lynne, M. and Ausman, D. Fiber and colon cancer : Does the current evidence justify a prevention of policy? *Nutr Rev* 51 : 57-63, 1993
- Ma, Z. A., Gingerich, R. L., Santiago, J. V., Klein, S., Smith, H. C. and Landt, M. Analysis of human plasma leptin by radioimmunoassay. *Clin Chem* 42 : 942-946, 1996
- Macaulay, V. M. Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 65 : 311-320, 1992
- Macdougald OA., Hwang CS., Fan H and Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *ProcNatl Acad Sci USA* 92 : 9034-9037, 1995
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S. Kerm, P. A. and Friedman, J. M. Leptin levels in human and rodent : measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Med* 1 : 1155-1161, 1995
- Masuzaki. H., Ogawa Y and Isse N. Adipocyte-specific expressiom and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 44 : 855-858, 1995
- Miller, C. W., Casimir, D. A. and Ntambi, J. M. The mechanism of inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation by prostaglandin F2a *Endocrinology* 137 : 5641-5650, 1996
- Mirttinen, T. A. Dietary fiber and lipids. *Am J Clin Nutr* 45 : 1237-1242, 1987
- Mishra, L., Bass, B., Ooi, B., Sidawy, A. and Korman, L. Role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor, IGF-I, and IGF binding protein-2 in human colorectal cancers. *Growth Horm IGF Res* 8 : 473-479, 1998
- Moustaid, N., B.H. jones and J.W. Taylor. Insulin increase lipogenic enzyme activity in human adipocytes in primary culture. *J Nutr* 126 :

865-870, 1996

- Mueller, M. A., Cleary, M. P. and Kritchevsky, D. Influence of dietary fiber on lipid metabolism in meal-fed rats. *J Nutr* 113 : 2229, 1983
- Muller, G., Ertl, J., Gerl, M., Preibisch, G. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 272 : 10585-10593, 1997
- Muller, M. A., Cleary, M. P. and Kritchevsky D. The effect of various type of dietary fiber on lipid storage in adipose tissue. *Fed Proc* 40 : 853-859, 1981
- Nam, S. Y., Lee, E. J., Kim, H. C., Nam, M. S., Cho, J. H. and Huh, K. B. Long-term administration of acipimox potentiates growth hormone response to growth hormone-releasing hormone by decreasing serum free fatty acid in obesity. *Metabolism* 45 : 594-597, 1996
- Ney, D. M., Lasekan, J. B. and Shinnick, F. L. Soluble oat fiber tends to normalize lipoprotein composition in cholesterol-fed rats. *J Nutr* 118 : 1455-1462, 1988
- Nicoll, A., Miller, N. E., and Lewis, B. High density lipoprotein metabolism. *Adv Lipid Res* 17 : 53-105, 1980
- Nishide, E., Kinoshita, Y., Anzai, H. and Uchida, N. Distribution of hot-water extractable material, water-soluble alginate and alkali-soluble alginate in different parts of undaria pinnatifida. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54 : 1619-1622, 1988
- Noriko S., Yoshihiro O., Goro K., Yoshito N., Tetsuo T., Minoru H., Ken E., Hiroaki M., Kiminori H., Yasunao Y and Kazuwa N. Sympathetic activation of leptin Via the ventromedia hypothalamus. *Diabetes* 48 : 1787-1793, 1999
- Nyman, M., Schweizer, T. F., Tyren, S., Reimann, S. and Asp, N. Fermentation of vegetable fiber in the intestinal tract of rats and effects on fecal bulking and bile acid excretion. *J Nutr* 120 : 459, 1990
- Nystrom, F. H., Ohman, P. K., Ekman, B. A., Osterlund, M. K., Karlberg, B. E. and Amqvist, H. J. Population-based reference values for IGF-I and IGF-binding protein-1 : realations with metabolic and anthropometric variables. *Eur J Endocrinol* 136 : 165-172, 1997
- Ostrund, R. E., Yang, J. W., Klein, S. and Gingerich, R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age and

- metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 81 ; 3903-3913, 1996
- Park, S. H., Lee, Y. K. and Lee, H. S. The effect of dietary fiber feeding on gastrointestinal functions and lipid and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korea J Nutr* 27 : 311-322, 1994
- Pellymounter M, Cullen M and Baker M. Effect of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 540-543, 1995
- Penman, A. and Sanderson, G. R. A method for the determination of uronic acid sequence in alginate. *Carbohydrate Research* 25 : 273-282, 1972
- Rasmussen, M. H., Hvidberg, A., Juul, A., Main, K. M., Gotfredsen, A., Skakkebae, N. E. and Hilsted, J. Massive weight loss restores 24 hours growth hormone release profiles and serum insulin-like growth factor-I levels in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 80 : 1407-1415
- Rasmussen, M. H., Hvidberg, A., Juul, A., Main, K. M., Gotfredsen, A., Skakkebae, N. E. and Hilsted, J. Massive weight loss restores 24 hours growth hormone release profiles and serum insulin-like growth factor-I levels in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 80 : 1407-1415, 1995
- Reddy, B. S. Diet and colon cancer : Evidence from human and animal model studies. *CRC Press* 1986
- Reddy, B. S., Hedges, A. R., Laakso, K. and Wynder, E. L. Metabolic epidemiology of large bowel cancer : Fecal bulk and constituents of high-risk normal american and low-risk finish population. *Cancer* 42 : 2832-2383, 1978
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H. and Fahey, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents : final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123 : 1939-1951, 1993
- Ricardo V. G., Amalia. A., MonserRat. R., Mary L., Carlos D. and Felipe. C. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormone, and pubertal stage. *J clin Endocrinol Metab* 82 : 2849-2855, 1997
- Richard L.B and Bentley C. Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat Adipocytes. *Diabetes* 48 : 272-278, 1999
- Roda, K., Kricka, L. A., DeLuca, M., Hofmann, A. F. Bioluminescence

- measurement of primary bile acid using immobilized 7 α -hydroxy-steroid dehydrogenase : Application to serum bile acids. *J Lipid Res* 23 : 1354, 1982
- Saladin R., De Vos P., Guerre -Millo M., Lerurque A., Girard J., Staels B. and Auwerx J. Transient increases in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377 : 527-529, 1995
- Schmidt, W., Poll-Jordan, G. and Loffler, G. Adipose conversion of 3T3-L1 cells in a serum-free culture system depends on epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, corticosterone, and cyclic AMP. *J Biol Chem* 265 ; 15489-154895, 1990
- Schneeman, B. O. and Gallaher, D. Changes in small intestinal digestive enzyme activity and bile acids with dietary cellulose in rats. *J Nutr* 110 : 584, 1980
- Schneeman, B. O., Richter, B. D. and Jacobs, L. R. Response to dietary wheat bran in the exocrine pancreas and intestine of rats. *J Nutr* 112 : 283, 1982
- Schrijver, R., Fremant, D. and Verheyen, A. Cholesterol-lowering effects and utilization of protein, lipid, fiber and energy in rats fed unprocessed and baked oat bran. *J Nutr* 122, 1318-1324, 1992
- Sharon E. M., William D. R., Laura J. H. Nigel H., Mohammed T., Jonathan R. S. A and Paul T. Ob gene expression and secretion of leptin following differentiation of rat preadipocyte to adipocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 230 : 360-364 : 1997
- Sheila C., Cynthia M. K, Ann E. P., Andrew G. S., Boris A. C. and Richard S. S. Role of leptin in fat regulation. *Nature* 380(25) : 677, 1996
- Shike, M. Primary prevention of colorectal cancer. *Bulletin of the WHO* 68(3) : 377-385, 1990
- Singh, P. Rubin, N. Insulin-like growth factors and binding proteins in colon cancer. *Gastroenterology* 105 : 1218-1237, 1993
- Slieker, L. J., Sloop, K. W., Surface, P. L. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 271 : 5301-5304, 1996
- Smith, E. B. The relationship between plasma and tissue lipid in human atherosclerosis. *Adv Lipid Res* 17, 1974
- Soloff, L. A., Rutenberg, H. L. and Lacko, A. G. Serum cholesterol

- esterification in patients with coronary artery disease. *Am Heart J* 85 : 153-131, 1973
- Song, J. H., Park, H. S. Effect of perilla oil on colon tumor incidence and its relation to eicosanoid levels and fatty acid profiles of tissues in chemical carcinogen-treated rats. *J Korean Nutr* 27 : 552-541, 1994
- Spiller, G. A., Story, J. A., Wong, L. G., Nunes, J. D., Alton, M., Petro, M. S., Furumoto, E. J., Whittman, J. H. and Scala, J. Effect of increasing levels of hard wheat fiber on fecal weight, minerals and steroids and gastrointestinal transit time in healthy young women. *J Nutr* 116 : 778, 1986
- Stamles, J. and Wenlforth, J. D. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and grades? : Finding is 3566, 222 Primary screens of multiple risk factor intervention trial. *JAMA* 256 : 2823, 1986
- Statland, B. E. Nutrition and cancer. *Clin Chem* 38 : 1587-1594, 1992
- Stephen C. W., Randy J. S., Daniel P. and Michael W. S. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280(29) : 1378-1383, 1998
- Stock-Damge, C., Aprahamian, M., Raul, F., Humbert, W. and Bouchet, P. Effets wheat bran on the exocrine pancreas and the small intestinal mucosa in the dog. *J Nutr* 114 : 1076, 1984
- Stock-Damge, C., Bouchet, P., Dentinger, A., Aprahamian, M. and Grenier, J. F. Effect of dietary fiber supplementation on the secretory function of the exocrine pancreas in the dog. *Am J Clin Nutr* 38 : 843, 1983
- Stuart A. E. and Smith, I. I. Histological effects of lipids on the liver and spleen of mice. *J Pathol* 115 : 63, 1975
- Sujean C., Regina S., Mark C., Mary F and Dallman. Rats with hypothalamic obesity are insensitive to central leptin injection. *Endocrinology* 140(10) : 4426-4433, 1999
- Suzuki, T., Nakai, K., Yoshie, Y., Shirai, T. and Hirano, T. Digestibility of dietary fiber in brown alga, kombu, by rats. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59 : 879-884, 1993
- Suzuki, T., Nakai, K., Yoshie, Y., Shirai, T. and Hirano, T. Effects of sodium alginates rich in guluronic acid mannuronic acids on cholesterol levels and digestive organs of high-cholesterol-fed rats. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59 : 545-551, 1993

- Suzuki, T., Nakai, K., Yoshie, Y., Shirai, T. and Hirano, T. Seasonal variation in the dietary fiber content and molecular weight of soluble dietary fiber in brown alga. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59 : 1633, 1993
- Trowell, H. C., Southgate, D. A. T., Wolever, T. M. S., Leed, A. R., Gassul, M. A. and Jenkins, D. J. A. Dietary fiber refined. *Lancet* 967, 1976
- Tsai, A. C., Elias, J., Kelley, J. J., Lin, R. C. and Robson, J. R. K. Influence of certain dietary fibers on serum and tissue cholesterol level in rats. *J Nutr* 106 : 118-123, 1976
- Tsuji, E., Tsuji, K. and Suzuki, S. Effect of polysaccharides on cholesterol metabolism (part 6) Effect of various polysaccharides on serum and liver cholesterol levels in cholesterol-fed rats. *Eiyogaku Zasshi* 33 : 273-281, 1974
- Tsuji, K. and Tsuji, E. Effect of polysaccharides on cholesterol metabolism (part 3) Effect of several polysaccharides on serum cholesterol levels in cholesterol-fed rats. *Eiyogaku Zasshi* 32 : 155-160, 1974
- Tsuji, K., Horid, Y. and Tsuji, E. Effect of konjac flour diet on the endogenous cholesterol metabolism in rats. *Eiyogaku Zasshi* 27 : 405-411, 1974
- Tsuji, K., Oshima, E., Matsuzaki, A., Nakamura, S. and Tezuka, T. Effect of polysaccharides on cholesterol metabolism (Part 1). Studies on konnyaku powder, sodium alginate and pectin. *Jap J Nutr* 26 : 113-122, 1968
- Vahouny, G. V. and Cassidy, M. M. Dietary fiber and intestinal adaptation. In "Dietary fiber". *Plenum Press*, New York, 181, 1994
- Vahouny, G. V., Khalafi, R., Satchithanandam, S., Watkins, D. W., Story, J. A., Cassidy, M. M., Kritchevsky, D. Dietary fiber supplementation and fecal bile acid, Neutral steroids and divalent cations in rats. *J Nutr* 117 : 2009-2015, 1987
- Vahouny, G. V., Roy, T., Gallo, L. L., Story, J. A., Kritchevsky, D. and Cassidy, M. M. Dietary fiber. III. Effects of chronic intake on cholesterol absorption and metabolism in the rat. *Am J Clin Nutr* 33 : 2182-2191, 1980
- Vahouny, G. V., Roy, T., Gallo, L. L., Story, J. and Kritchevsky, D. Dietary fiber and lymphatic absorption of cholesterol in the rat. *Am J Clin Nutr* 31 : s208-212, 1978

- Van Itallite, T. B. Dietary fiber and obesity. *Am J Clin Nutr* 31 : S43-52, 1978
- Venter, C. S., Vorster, H. H. and Van Der Nest, D. G. Comparison between physiological effects of konjac-glucomannan and propionate in baboons fed "Western" diets. *J Nutr* 120 : 1046, 1990
- Vigine, J. L., Lairon, D., Borel, P., Portugal, D., Pauli, A., Hauton, J. and Lafont, H. Effect of pectin, wheat bran and cellulose on serum lipids and lipoproteins. *Br J Nutr* 58 : 405, 1987
- Vincent, D. L. Oilgosaccharides from alginic acid. *Chem Ind (London)* 1109-1111, 1960
- Weisburger, J. H. Causes, relevant mechanism and prevention of large bowel cancer. *Seminers in Oncology* 18(4) : 316-336, 1991
- Weisburger, J. H., Wynder, E. L. Etiology of colorectal cancer with emphasis on mechanism of action. *Lippincott* 79-92, 1987
- Wendy M. M., Francine M. G., Kimber L. S., Charles V. M., Tooru M. M., Craig H. W., udith S. S and Peter J. H. evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology* 139(2) : 551-558, 1998
- Wen-ju, L. C. and Anderson, J. W. Soluble and insoluble plant fiber in selected cereals and vegetables. *Am J Clin Nutr* 34 : 1077-1082, 1981
- Whistler, R. L. and Kirby, K. W. The composition of alginic acid of *Macrocystis pyrifera*. *Z. Physio Chem* 314 : 46-48, 1959
- Wise, L. S and Green H. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3-L1 cells. *J Bio Chem* 254(2) : 273-275, 1979
- Yang, J. L., M J. Suh and Y. S. Song. Effect of dietary fibers on cholesterol metabolism in cholesterol-fed Rats. *J. Korean Soc. Food Nutr* 25(3) : 392-398, 1996
- Zang Y. Preenca R, maffei M, Barone, M, Leopold L and Friedeman JM. Positional cloning of the mouse ob gene and its human homologue. *Nature* 37 : 425-432, 1994
- Zapt, T., Schoene E., Waldvogel, M., Sand, I and Froech, E. R. Effect of trypsin treatment of Rat adipocytes on biological effects and binding of insulin and insulin- like growth factor. *FEBS* : 605-609
- Zhang S., Jin L., Burguera B. G., Couse M. E., Osamura R. Y., Kulig E. and Lloyd R. V. leptin and leptin receptor expression in pituitary cell. *J*

- Clin Endocrinol Metab* 141 : 333-339, 2000
- Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276 : 1268-1272, 1997
- 김성인, 신용철, 양용석, 오근영. 1995. 질병진단을 위한 조직병리검사학. 도서출판 대학서림
- 고려대학교 의과대학 병리학 교실. 2002. 병리학. 신광출판사

감사의 글

마지막으로 감사의 글을 적으려고 보니, 그 동안의 모든 일들이 뇌리를 스치고 지나갑니다. 학부생부터 실험실의 인연으로 부족한 저를 언제나 사랑의 눈길로 봐주셨고 스승이자 제2의 아버지의 역할까지 마다하지 않으셨던, 제가 감당하기 힘든 3년이나 되는 거대한 프로젝트를 믿음의 눈으로 맡기셨던, 그리고 본 논문이 완성되기까지 시종일관 심혈을 기울여 이끌어 주시고 격려해 주신 남택정 지도교수님께 진심으로 존경과 감사를 드립니다. 학부시절 부터 세심한 검토와 가르침으로 미비한 점을 다듬어 주신 변대석 교수님, 김형락 교수님께도 뜨거운 감사의 마음을 전합니다. 그리고 학문적 성숙이 있기까지 자상한 마음으로 큰 성원을 보내주신 최진호 교수님, 류홍수 교수님, 최재수 교수님께도 진심으로 깊은 감사를 드립니다. 또, 같은 실험실에 계시면서, 진정한 스승과 제자의 관계를 보여주셨고 정년퇴임하시는 날까지 학문하는 사람의 모습을 몸소 보여주셨으며 언제나 칭찬과 격려를 아끼지 않으셨던 변재형 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

학부생부터 지금까지 꽤 오랫동안 실험실에 있어서 그런지 고마운 선생님, 선후배님들이 너무나 많습니다. 바쁜 실험시간에도 불구하고 처음 실험을 가르쳐주면서 실험이 재미있다는 것을 알게 해준 미진언니, 언제나 밝은 웃음과 실험의 조연자로 욕심 많은 저를 위해 많은 배려를 해 준 지성과 미모를 모두 갖춘 지영언니에게도 고마운 마음을 전합니다. 본 논문을 쓰는데 바탕이 되어 넓은 분야로 나갈 수 있게 힘이 되어 주었던 실험 선구자 언련언니와 곧 출산을 앞둔 혜정언니, 알긴산의 모든 분야에 걸쳐 엄청난 도움을 주셨고 실험이 무엇인지 진정으로 알게 해주셨던 이동수 선생님께도 감사드립니다. 학부생 시절 막내로 귀여워 해주었던 터프한 유희언니와 재주 많은 혜영언니, 작은 일 하나에도 많은 관심과 따뜻한 배려와 조언을 아끼지 않았던 화진언니와 민정이, 덕분에 일본까지 여행할 수 있었고 많은 것을 보게 해준 현아언니, 지금도 힘들 때 마다 생각나는 실험실 선배였던 준영선배와 항상 따뜻한 마음씨로 배려할 줄 아는 진국, 때서 너절한 선병에게도 고마운 마음을 전합니다. 2004년 한해 같은 배를 타고 갈, 멋진 녀석 인태, 곧 선생님이 되실 설희, 아무진 주진, 만능 엔터테이너 민지, 멋진 몸매의 소

유자 유진, 깨끗한 얼굴에 눈동자가 매력적인 원숙, 날카로운 지적과 솔직 담백한 성격의 소유자인 20대의 지존 인선언니, 한경희 교수님께도 고마운 마음 전하며 항상 기분 좋은 일과 멋진 추억 만들었으면 합니다. 처음 하는 동물실험에 많은 조언을 해준 수현 선배와 베풀 줄 아는 따뜻한 마음을 가진 대익선배와 지영언니, 바쁜 시간을 쪼개어 동물실험을 도와주었던 생화학 실험실의 정민이와 신이에게도 고마운 마음을 전합니다. 한번도 해본 적 없는 실험을 아무 조건 없이 열심히 가르쳐 주셨던 수산생명의학과 허민도 교수님, 많은 조언을 아끼지 않았던 호주언니에게도 감사의 마음을 전합니다.

실험실 동기로 있으면서 진해졌던 경미와 학부부터 항상 맑은 웃음 잃지 않는 지금은 우성이의 엄마인 효영이와 필근오빠, 97학번 동기 중에 둘 밖에 없던 남자, 이제는 대학원 후배가 될 민수와 봉기에게도 고마운 마음을 전합니다. 사람 사람에게 인색한 저에게 기꺼이 동아리 ‘차사랑’의 동기가 되어 주었던 승은, 고은, 수화, 신남, 태근, 재원이와 대학원 동기이기도 한 행선, 이제는 바쁜 저를 위해 기꺼이 학교로 와주는 배려할 줄 아는 멋진 남자가 되어버린 동아리 후배 한주에게도 고마운 마음을 전합니다. 고등학교 동창으로, 언제나 시원하고 솔직한 성격의 혜경과 여리지만 속 깊은 인영에게도 항상 바쁜 나를 한번도 화내지 않고 배려해 주며 부족한 1%를 채워주었음에 감사함을 전합니다.

공부하는 저를 기쁘게 여기셨으며 제가 하는 모든 일을 걱정하셨고 또 아무 말 없이 믿음으로 지켜봐주셨으며, 한번도 사랑한다고 말씀해 주신 적 없지만 지금까지 가장 저를 사랑해주셨던 아버지, 어머니께 진심으로 고개 숙여 감사드립니다. 울산에서 부산까지 누나 집을 다녀가며 아무 불평없이 항상 도움과 웃음을 주었던 국인이와 대학원 과정에 서로 가장 힘든 시기에 누나 마음을 다독여 주며 오히려 더 아파했던 정말 많이 아팠던 막내 동생, 애교 많았던 관태에게 이 논문을 바치며 그 빈자리를 채우고자 합니다.

지금의 이 자리에 서기까지 많은 분들이 도와 주셨고, 저에게 칭찬과 격려를 아끼지 않으셨던 모든 분들께 진심으로 감사드리며, 항상 실험하는 사람의 마음으로 살겠습니다.