

2018년 한우자조금 연구용역과제 최종보고서

한우육의 면역기능 개선 효과 규명

연구기관 : 강원대학교

 한우자조금관리위원회

한우육의 면역기능 개선 효과 규명

2018. 08. 08.

주관연구기관명 : 강원대학교

연구책임자 : 장애라

참여연구원 : 최정우

문기원

김동욱

김혜진

김희진

김정수

김한나

조코수지오

제 출 문

한우자조금관리위원장 귀하

본 보고서를 “한우육의 면역기능 개선 효과 규명” 과제의
최종보고서로 제출합니다.

2018년 8월 8일

연구책임자 : 강원대학교 교수 장애라

※ 본 연구 결과는 연구진의 의견 및 주장이며, 한우자조금의 공식
입장과는 다를 수 있음.

목 차

제1장. 연구의 개요	1
제1절. 연구의 배경 및 필요성	1
1. 연구의 배경	1
2. 연구의 필요성	6
제2절. 연구의 목적	7
제2장. 연구 방법	8
제1절. 한우육 인공소화 분해물 제조 및 항산화 활성 규명	8
제2절. 한우육 인공소화 분해물의 면역기능 증진 효과 규명 ...	13
제3절. 한우육 급여가 실험동물의 면역기능 개선에 미치는 영향 규명 ...	17
제3장. 연구 결과	29
제1절. 한우육 인공소화 분해물 제조 및 항산화 활성 규명	29
1. 소화관 효소를 이용하여 한우육 인공소화 분해물 제조 및 분해 패턴 규명	29
2. 한우육 인공소화 분해물의 항산화 활성 규명	44
제2절. 한우육 인공소화 분해물의 면역기능 증진 효과 규명 ...	49
1. 한우육 인공소화 분해물의 면역기능 증진 효과 규명	49
2. 한우육 인공소화 분해물의 면역기능 증진 메커니즘 규명 ...	68
제3절. 한우육 급여가 실험동물의 면역기능 개선에 미치는 영향 규명 ...	74
1. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 면역기능 증진 효과 규명	74
2. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 규명	91
3. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 아토피 피부염 억제 효과 규명	103

제4장. 목표달성도	116
제1절. 연구추진 일정 및 달성도	116
제5장. 요약 및 결론	117
제6장. 참고문헌	121
[별첨] 용어 해설	

표 목 차

- 표 1. 한우육 인공소화액 성분
- 표 2. 한우 등심 사료 식이 조성(면역기능 증진 효과 규명)
- 표 3. 한우 등심 사료 식이 조성(피부염 억제 효과 규명)
- 표 4. 인공소화 후 한우 등심(1+, 생육)의 지방산 조성 변화
- 표 5. 인공소화 후 한우 등심(1+, 조리육)의 지방산 조성 변화
- 표 6. 인공소화 후 한우 등심(1, 생육)의 지방산 조성 변화
- 표 7. 인공소화 후 한우 등심(1, 조리육)의 지방산 조성 변화
- 표 8. 인공소화 후 한우 우둔(1+, 생육)의 지방산 조성 변화
- 표 9. 인공소화 후 한우 우둔(1+, 조리육)의 지방산 조성 변화
- 표 10. 한우육 인공소화 분해물(생육, 조리육)의 ABTS 라디칼 소거능
- 표 11. 한우육 인공소화 분해물(생육, 조리육)의 FRAP 활성
- 표 12. 한우육 인공소화 분해물(생육, 조리육)의 ORAC 활성
- 표 13. 한우육 인공소화 분해물(생육, 조리육)의 지질과산화물 함량
- 표 14. 한우 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 생존율
- 표 15. 한우육 인공소화 분해물 처리에 의한 대식세포의 NO, PGE₂, IL-6, TNF- α 분비율
- 표 16. 한우육 급여 처리구(면역기능 증진 효과 규명)
- 표 17. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 실험동물의 체중, 사료섭취량 및 식이 효율에 미치는 영향
- 표 18. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 실험동물의 장기무게에 미치는 영향
- 표 19. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 실험동물의 혈청 내 지질 성분에 미치는 영향
- 표 20. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 실험동물의 분변 내 지질 성분에 미치는 영향
- 표 21. 한우육 급여 처리구(급성 피부염 억제 효과 규명)
- 표 22. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 체중,

사료섭취량 및 식이 효율에 미치는 영향

표 23. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 장기 무게에 미치는 영향

표 24. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 혈청 내 IgE 함량에 미치는 영향

표 25. 한우육 급여 처리구(아토피 피부염 억제 효과 규명)

표 26. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 체중, 사료섭취량 및 식이 효율에 미치는 영향

표 27. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 장기무게에 미치는 영향

표 28. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 혈청 내 IgE 함량에 미치는 영향

그림 목 차

- 그림 1. 인공소화 후 한우육(생육, 조리육)의 형태 변화
- 그림 2. 한우육 인공소화 분해물(생육)의 소화단계별 단백질 분해 패턴
- 그림 3. 한우육 인공소화 분해물(조리육)의 소화단계별 단백질 분해 패턴
- 그림 4. 한우육 인공소화 분해물 선정 모식도
- 그림 5. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물의 대식세포에 대한 세포독성
- 그림 6. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물의 대식세포에 대한 세포독성
- 그림 7. 한우 우둔(1+, 생육) 인공소화 분해물의 대식세포에 대한 세포독성
- 그림 8. 한우 우둔(1+, 조리육) 인공소화 분해물의 대식세포에 대한 세포독성
- 그림 9. 한우 등심(1+) 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포형태
- 그림 10. 한우 우둔(1+) 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포형태
- 그림 11. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 생존율
- 그림 12. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 생존율
- 그림 13. 한우 우둔(1+, 생육) 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 생존율
- 그림 14. 한우 우둔(1+, 조리육) 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 생존율
- 그림 15. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 NO 분비에 미치는 영향
- 그림 16. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 NO 분비에 미치는 영향
- 그림 17. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 PGE₂ 분비에 미치는 영향
- 그림 18. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 PGE₂ 분비에 미치는 영향

- 그림 19. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 IL-6 분비에 미치는 영향
- 그림 20. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 IL-6 분비에 미치는 영향
- 그림 21. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 TNF- α 분비에 미치는 영향
- 그림 22. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 TNF- α 분비에 미치는 영향
- 그림 23. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 염증성 단백질 발현에 미치는 영향
- 그림 24. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 염증성 단백질(iNOS, COX-2) 발현에 미치는 영향
- 그림 25. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 염증성 단백질(iNOS, COX-2) 발현에 미치는 영향
- 그림 26. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 MAPK 인산화 단백질 발현에 미치는 영향
- 그림 27. 한우육 급여에 따른 실험동물의 면역기능 증진 효과 규명 실험설계
- 그림 28. 한우육(1+, 생육/조리육) 급여가 마우스로부터 분리한 비장세포 증식능에 미치는 영향
- 그림 29. 한우육(1+, 생육/조리육) 급여가 마우스로부터 분리한 비장세포 Th1 cytokine 분비능에 미치는 영향
- 그림 30. 한우육(1+, 생육/조리육) 급여가 마우스로부터 분리한 비장세포 Th2 cytokine 분비능에 미치는 영향
- 그림 31. 한우육(1+, 생육/조리육) 급여가 Th1/Th2 cytokine 비율에 미치는 영향
- 그림 32. 한우육(1+, 생육/조리육) 급여가 비장 내 림프구 아집단(CD4+, CD8+) 비율에 미치는 영향

- 그림 33. 한우육(1+, 생육/조리육) 급여가 분변 내 미생물 군총 변화에 미치는 영향
- 그림 34. 한우육(1+, 생육/조리육) 급여가 분변 내 Firmicutes와 Bacteroidetes 분포에 미치는 영향
- 그림 35. 한우육 급여에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 실험설계
- 그림 36. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 중증도 평가에 미치는 영향
- 그림 37. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 긁음 횟수에 미치는 영향
- 그림 38. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 경표피 수분 손실량에 미치는 영향
- 그림 39. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 표피 두께에 미치는 영향
- 그림 40. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 피부 조직 내 mast cell수에 미치는 영향
- 그림 41. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th1 cytokine 분비에 미치는 영향
- 그림 42. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th2 cytokine 분비에 미치는 영향
- 그림 43. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th1/Th2 cytokine 비율에 미치는 영향
- 그림 44. 한우육 급여에 따른 실험동물의 아토피 피부염 억제 효과 실험설계
- 그림 45. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 중증도 평가에 미치는 영향
- 그림 46. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 긁음 횟수에 미치는 영향

그림 47. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 경표피 수분 손실량에 미치는 영향

그림 48. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 표피 두께에 미치는 영향

그림 49. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 피부 조직 내 mast cell수에 미치는 영향

그림 50. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th1 cytokine 분비에 미치는 영향

그림 51. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th2 cytokine 분비에 미치는 영향

그림 52. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th1/Th2 cytokine 비율에 미치는 영향

연구 요약

본 연구에서는 인체 내 소화조건과 유사한 'Human digestion model'을 통하여 한우육 인공소화 분해물을 제조하여 한우육의 면역기능 개선 효과 규명하고자 하였다.

◎ 한우육은 부위별(등심/우둔), 조리유무별(생육/조리육)로 나누어 인공소화 하였으며, 인공소화 과정을 통해 한우육(식육)은 펩신이 작용하는 위소화 단계에서부터 단백질의 분해가 이루어짐을 확인하였다. 한우육 인공소화 분해물의 항산화 활성을 분석한 결과, 생육이 조리육보다 항산화 활성이 높은 경향을 나타냈으며, 등심이 우둔보다 높은 항산화 활성을 나타내었다.

◎ 한우육 인공소화 분해물을 대식세포에 10~500 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때 모든 농도에서 독성을 나타내지 않았으며, 미토젠(LPS) 처리로 인해 감소한 세포 생존율을 유의적으로 증가시켰다. 한우 등심(1+) 인공소화 분해물이 LPS의 자극으로 인해 증가한 세포의 염증인자(NO, PGE₂, IL-6, TNF- α) 억제에 미치는 영향을 분석한 결과, NO는 최대 19.23% 감소시켰으며 PGE₂는 80.56%, IL-6와 TNF- α 는 각각 최대 55.29%와 22.51% 감소시켰다. 이와 같은 항염증 효과는 대식세포 내 MAPK 신호전달 체계와 염증성 단백질(iNOS, COX-2) 발현을 감소시키는 메커니즘에 의한 것으로 확인되었다.

◎ 한우 등심(1+)을 5% 또는 10%의 농도로 8주간 실험동물에게 급여하여 면역기능 개선에 미치는 영향을 규명한 결과, 한우육 급여에 따른 생체지표 및 장기에 대한 독성은 보이지 않았으며 한우 등심(1+, 조리육) 5% 처리구는 분변으로 배출되는 총콜레스테롤의 함량을 증가시키고 혈청 내 총콜레스테롤 함량을 감소시켰다. 한우

등심(1+)의 급여는 LPS와 ConA으로 자극시킨 비장세포의 증식능을 증가시켜 실험동물의 면역을 활성화 시켰다. 또한 비장세포가 분비하는 **염증성 싸이토카인**(Th1; TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-2)을 감소시키고 **항염증성 싸이토카인**(Th2; IL-4)을 증가시켜 결과적으로 Th1/Th2 **싸이토카인**의 비율을 감소시켜 항염증 효과를 나타내었다. 또한 비장세포 내 **보조 T 림프구(CD4+)**와 **세포독성 T 림프구(CD8+)**를 증가시켜 면역 활성화효과를 나타내었다.

◎ 한우 등심(1+) 5%의 급여가 DNCB로 아토피 피부염을 유발한 실험동물의 아토피 피부염 억제에 미치는 효과를 규명한 결과, 한우 등심(1+, 조리육) 급여가 아토피 피부염 유발로 증가한 경표피 수분 손실량과 표피두께, 그리고 피부조직에 침윤된 비만세포 수를 유의적으로 감소시켰다. 아토피 피부염 발생 시 과생성 되는 것으로 알려진 혈청 내 IgE 항체 함량도 한우 등심(1+) 급여로 인해 11.4%~12.4%까지 감소되었다. 또한 아토피 피부염으로 증가된 비장세포 내 Th1 싸이토카인(TNF- α , IFN- γ)과 Th2 싸이토카인(IL-5, IL-4) 함량을 감소시키고, Th1/Th2 비율을 감소시켜 아토피 피부염에 대한 항염증 효과를 나타내었다.

결론적으로 한우 등심(1+)의 섭취는 실험동물의 면역을 활성화 시키고 아토피 피부염을 **개선시키는 것으로** 사료되며, 본 연구 결과를 통해 한우육 섭취가 면역증진에 긍정적인 영향을 줄 수 있다는 과학적 근거 자료를 제시할 수 있을 것이라 사료된다.

제1장. 연구의 개요

제1절. 연구의 배경 및 필요성

1. 연구의 배경

- 최근 현대인들은 미세먼지등과 같은 환경적 요인들과 스트레스, 불균형 식습관 등으로 인해 면역계 질환 발병률이 해마다 급격하게 늘어나고 있으며, 국내 면역기능개선 식품의 소비에 대한 수요가 크게 증가하고 있다.

스페쉬 "미세먼지로 약해진 면역력, 가려움 두드러기 유발돼... 면역력 관리 중요"

김나희 미래한국 기자 | 송현 2018.04.06 11:01

따뜻한 봄 기운을 느끼고 싶지만 외출이 쉽지 않은 날이 이어지고 있다. 미세먼지와 중국발 황사 때문이다. 미세먼지의 경우 피부와 눈, 코 등에 접촉해 물리적 자극을 유발하는 것은 물론 인해 곳곳에 영향을 미친다.

따라서 전문가들은 미세먼지와 황사로부터 건강을 지키기 위해서는 외출 시 마스크를 착용해야 한다고 말한다. 또한 외출 후에는 손과 발을 꼼꼼히 씻어야 추가 바이러스 감염을 예방할 수 있으며 집안의 환기와 청결에도 보다 신경을 써야 한다.



[미세먼지 막아라-②]면역력식품 판매 급증

우울감 호소 부쩍 늘어, 어린이 노년 등 환자 급증
두드러짐, 알레르기, 만성질환 관련 판매 급증...커져 대신 티 인기

김보호 기자 (ybh4015@ebn.co.kr) | 2018-03-28 15:29

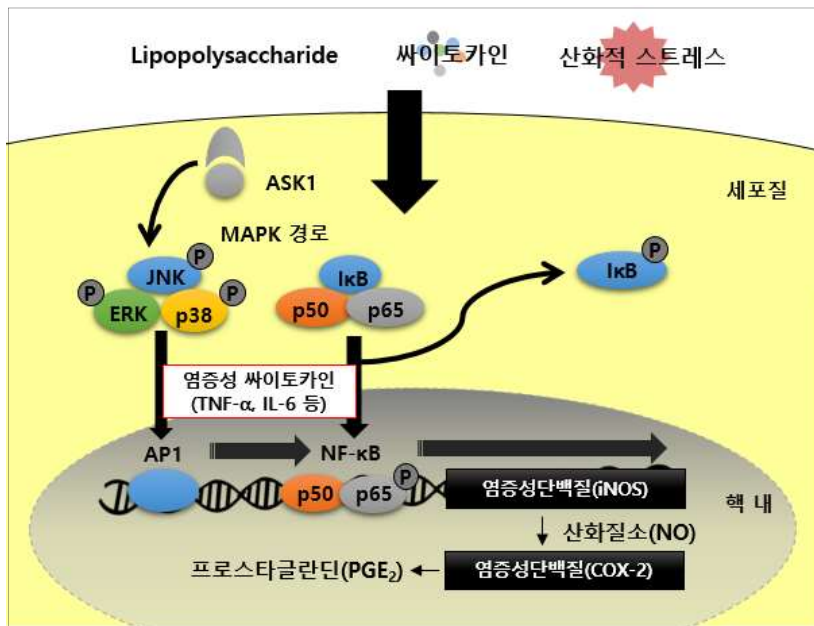
추운 겨울을 내보내는 봄이 왔지만, 몇년전부터 한반도의 봄은 마냥 반갑지 않은 대상이 됐다. 중국 동북지역에서 발생한 미세먼지가 편서풍을 타고 한반도로 몰려오고 있기 때문이다. 미세먼지가 갈수록 심각해지면서 공포감까지 조성되고 있다. 병원은 가려진 환자가 북적이고, 겉옷대 국민결명에는 해를 요구하는 수천개의 제안글이 올라오고 있다. 국민들도 미세먼지를 막기 위해 적극적인 방어조치에 들어갔다. 마스크가 일상화됐으며, 면역력을 높이는 식품과 관련 자료 및 방어 의약품이 불티나게 팔리고 있다. [편집자 주]

우리나라 미세먼지 발생은 국내요인으로 있지만 절반 이상은 중국에서 날라오고 있다. 중국 중북지역의 공업단지에서 배출된 미세먼지가 불철 편서풍을 타고 하루만에 우리나라로 오고 있다. 이는 우리나라 내에서의 대책만으로는 미세먼지 문제를 해결하는데 한계가 있다는 뜻이다.

한반도를 뒤덮고 있는 미세먼지로 인해 국민건강에 적신호가 켜졌다. 막에 나가지 못하고 현병도 되지 못하면서 우울감을 호소하는 이들이 늘고 있고, 병행에는 어린이와 노약자를 중심으로 기관지염을 호소하는 환자들로 북적이고 있다.

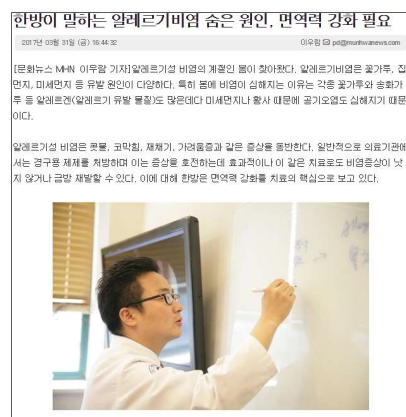
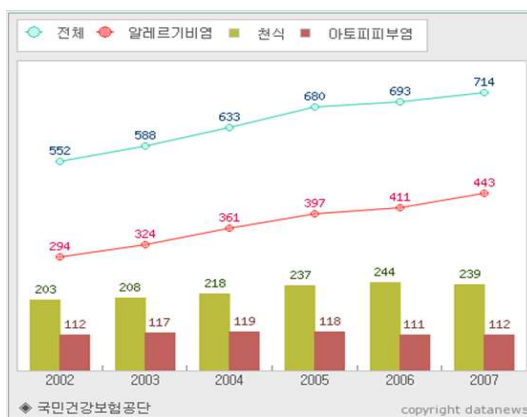
<환경변화에 대응한 면역력 강화에 대한 관심증가>

- 미세먼지등과 같은 외부로부터 들어온 자극은 MAPK pathway (p38, JNK, ERK), NF- κ B pathway(I κ B, NF- κ B p65, p50) 등을 활성화 시켜 iNOS와 COX-2를 발현시킨다.
- 발현된 iNOS는 nitric oxide(NO)를 생성시키고, COX-2는 prostaglandin E₂(PGE₂)를 생성시켜 염증반응을 유발한다.



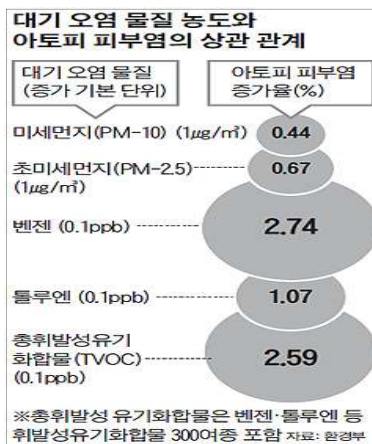
<신체 내 염증 반응 진행 과정>

- 최근 증가하고 있는 천식, 알러지 비염, 아토피 피부염, 두드러기 등의 질환은 알러지(allergy)의 일종으로 인체 외부에서 내부로 들어온 어떤 물질에 대해 면역체계가 지나치게 반응을 보이는 과민반응(hyperresponsiveness) 증상이다(Jo et al., 2016).



<연도별 알러지 진료 환자 추이> <면역력 강화의 필요성>

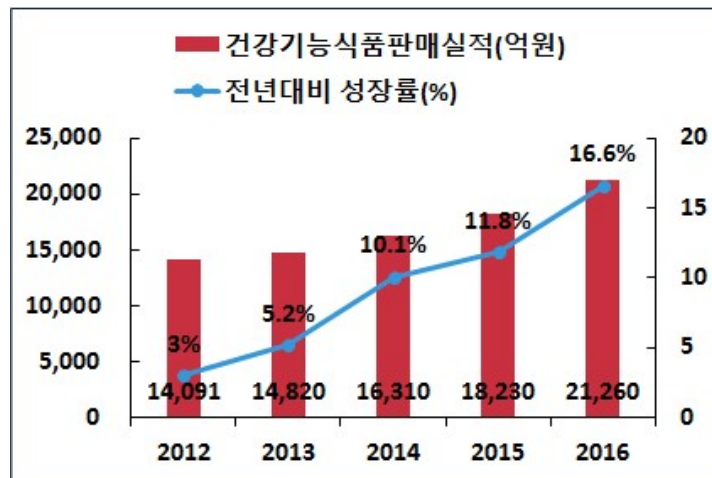
- 피부는 다양한 외부의 오염물질로부터 신체를 방어하는 주요한 장벽으로 미세먼지 등의 환경적인 요인에 의해 면역력이 약해지고 아토피 피부염, 피부건선, 여드름 등의 형태로 질병이 유발 될 수 있다(Kim et al. 2016).
- 성인남녀 2,000명을 대상으로 미세먼지와 피부건강에 대한 설문조사를 실시한 결과, 응답자의 과반수가 미세먼지로 인해 피부 이상 반응을 느꼈으며, 건조함이 51%로 가장 많은 비율을 보였고, 피부염은 17%를 차지했다(클라리소닉, 2004).



<대기오염 물질과 아토피 <미세먼지와 피부건강관련 설문조사 피부염의 상관관계> 결과>

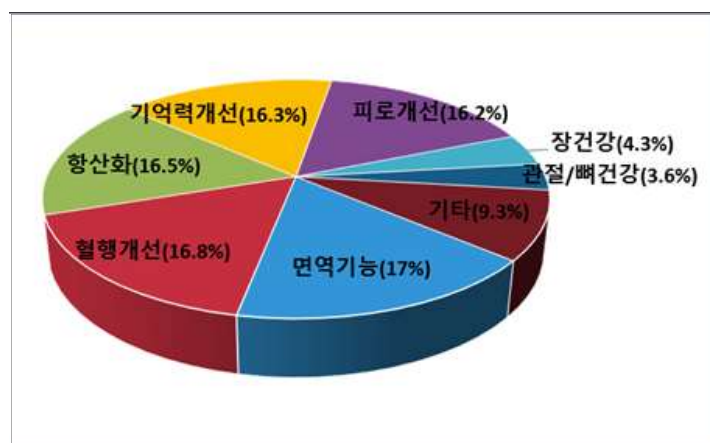
- 알러지 반응은 외부의 항원에 의해 IgE를 매개로 비만세포의 탈과립화를 유도하고 유리된 히스타민을 비롯한 다양한 화학적 매개 물질로 인해 염증이 발생한다(Amin, 2012).
- 이러한 알러지는 나이에 따라 다양한 형태로 나타날 수 있으며, 면역력이 약한 노인과 영유아에서 특히 주의가 요구된다.

- 건강에 대한 관심이 증가하면서 건강기능 식품 시장 규모는 꾸준히 증가하고 있다. 국내 건강기능식품 판매실적은 2016년에도 2조 1,260억원으로 매년 증가하고 있다(식품의약품안전처, 2015).



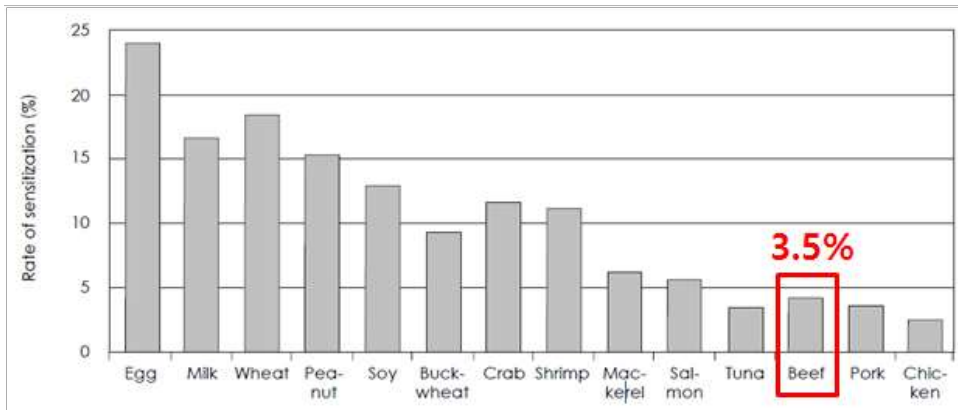
<국내 건강기능식품 시장 규모>

- 기능성별 매출은 면역기능 제품이 1조 984억원(17%)으로 가장 높은 비중을 차지하였다(한국식품안전관리인증원, 2016).



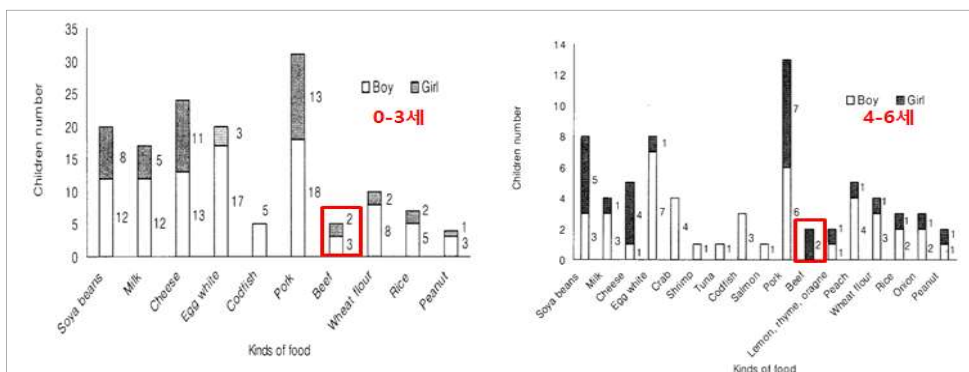
<기능성별 매출 현황>

- 소고기와 같은 단백질 식품은 알러지 질환을 악화시킬 수 있다는 오해가 존재한다. 하지만 식품별로 알러지 감작률을 분석한 결과, 계란이 24.3%로 가장 높았으며, 소고기는 3.5% 감작률로 낮은 수치를 나타냈다(Han et al., 2004).



<식품별 알러지 감작률>

- 어린이에게 주로 알러지를 유발하는 식품들은 우유, 계란, 밀, 콩 등이며, 식품군 중 돼지고기는 영유아와 유아에 있어서 알러지 반응을 많이 일으키는 반면에 소고기는 거의 반응을 일으키지 않았다(Moon et al., 2007).



<식품에 알러지 반응을 보인 유아 수>

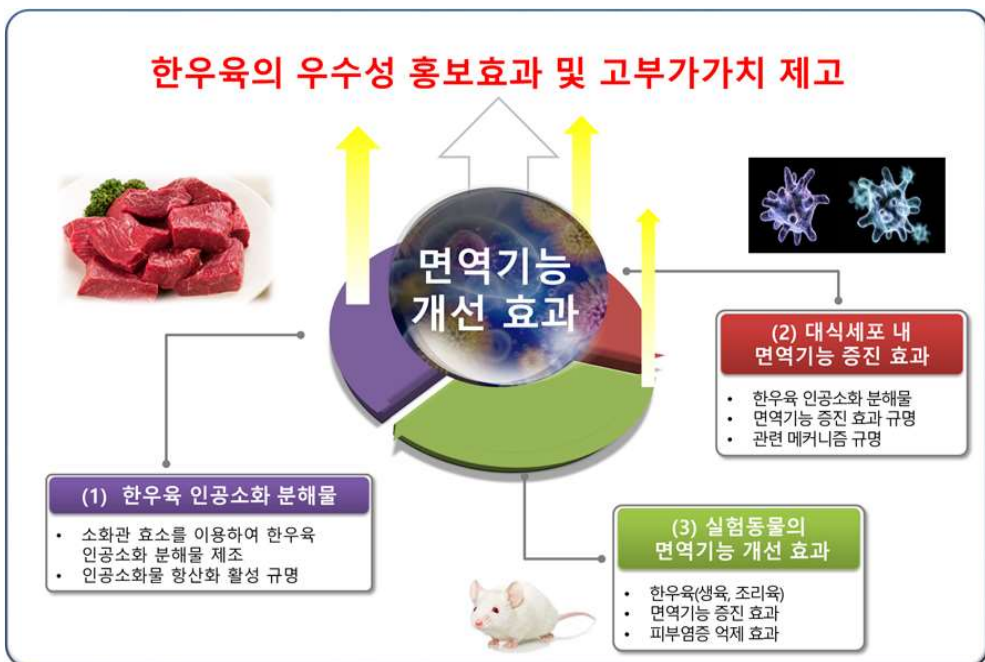
- 소고기 내에는 면역기능 증진에 관여하는 물질이 다량 함유되어 있다. 소고기는 중요한 단백질 공급원일 뿐만 아니라 비타민 B군, 무기질, 철, 셀레늄과 아연이 풍부하다(Roseiro et al., 2014).
- 아연은 효소적 시스템과 세포의 분화와 성장, 면역과 생식 기능에 중요한 역할을 하는 필수적인 영양소이며, 셀레늄은 심장질환이나 암을 예방하는 등 항산화효과를 가진다(Pereira et al., 2013).
- 아연은 말초림프구 세포에서 IL-6, IL-1과 TNF- α 의 생성증가 뿐만 아니라 관련된 mRNA의 발현도 증가 시켜 면역에 관여한다(Vasto et al., 2007).
- 비타민 B6 부족 시 세포매개 면역 반응이 감소한다는 보고가 있었으며, 사람에게 coenzyme Q10과 비타민 B6 투여 시 IgG의 생성량이 증가하고 CD4+ T세포와 CD8+ T세포가 증가하여 면역 활성을 보였다고 하였다(Dobbelstein et al., 1974).

2. 연구의 필요성

- 최근 면역에 대한 관심의 증가로 한우육의 면역기능 개선 효과에 대한 과학적인 근거가 필요하다.
- 한우육의 면역기능 개선 효과를 검증하고 한우육에 대한 오해를 해결함에 따라 한우육에 대한 긍정적 인식을 제고하고 소비 촉진이 필요하다.
- 체내에서 분비되는 소화효소를 이용하여 한우육 인공소화 분해물을 제조하고 실제 한우육 섭취 시 인체 내 작용될 수 있는 면역기능 개선효과 검증이 필요하다.

제2절. 연구의 목적

- 소화관 효소를 이용하여 한우육 인공소화물 제조 및 유용성 규명
- 한우육 인공소화 분해물의 대식세포 내 면역기능 증진 효과 및 메커니즘 규명
- 한우육 인공소화 분해물의 세포 내 면역기능 증진 효과 규명을 통한 실질적인 한우육 섭취의 우수성 홍보 효과 및 고부가가치 제고
- 한우육 급여에 따른 실험동물의 면역기능 증진 및 피부 염증 억제 효과에 미치는 영향 규명을 통한 인체 적용 가능한 면역기능 개선 효과 규명



<연구 목표 모식도>

제2장. 연구 방법

제1절. 한우육 인공소화 분해물 제조 및 항산화 활성 규명

1. 소화관 효소를 이용하여 한우육 인공소화 분해물 제조 및 분해 패턴 규명

가. 재료(한우육)

본 연구에서는 강원도 소재 식육포장처리장에서 도축 후 24시간 후의 등급별(1+, 1등급), 부위별(등심, 우둔) 한우육을 구입하여 실험에 이용하였다.

나. Human digestion model을 이용한 인공소화

한우육 인공소화를 위한 human digestion model은 Van Hecke 등 (2014)의 방법을 이용하여 다음과 같이 입, 위, 소장 소화액을 채액과 가장 유사하게 제조한 후 37℃ shaking incubator에서 60rpm 속도로 교반하며 실시하였다. 각 한우육을 1~2cm²로 절단한 후 믹서기로 5~10초간 균질하였다. 분쇄된 한우육(4.5g)에 연속적으로 입소화액 6ml을 넣고 5분간 반응시킨 후, 위소화액 12ml을 넣고 2시간 배양시킨 다음 소장 소화액 12ml과 담즙산 6ml, bicarbonate buffer(1M, pH 8.0)을 넣고 2시간 배양하였다. 위소화 시 pH가 3.0 이하가 되도록 조정하였으며, 소장소화 시 pH가 5~8이 되도록 조정하였다. 이후 최종적으로 소장소화 단계까지 거친 소화액을 원심 분리(3,000×g, 30분, 4℃)하여 상층액을 분리하여 이를 인공소화 분해물로 명명하였으며, 인공소화 분해물은 95℃에서 10분간 끓여 효소 불활성화를 실시하였다. 인공소화 분해물은 동결 건조하여 이후 분석에 이용하였다.

표 1. 한우육 인공소화액 성분 (500ml 기준)

구분	입소화단계	위소화단계	소장소화단계	
	입소화액	위소화액	소장소화액	담즙산
무기성분	5ml KCl 89.6g/L 5ml KSCN 20g/L 5ml NaH ₂ PO ₄ 88.8g/L 5ml NaSO ₄ 57g/L 0.85ml NaCl 175.3g/L 10ml NaHCO ₃ 84.7g/L	7.85ml NaCl 175.3g/L 1.5ml NaH ₂ PO ₄ 88.8g/L 4.6ml KCl 89.6g/L 9ml CaCl ₂ ·2H ₂ O 22.2g/L 5ml NH ₄ Cl 30.6g/L 3.25ml HCl 37%	20ml NaCl 175.3g/L 20ml NaHCO ₃ 84.7g/L 5ml KH ₂ PO ₄ 8g/L 3.15ml KCl 89.6g/L 5ml MgCl ₂ 5g/L 90μl HCl 37% g/g	15ml NaCl 175.3g/L 34.15ml NaHCO ₃ 84.7g/L 2.1ml KCl 89.6g/L 75μl HCl 37% g/g
유기성분	4ml urea 25g/L	5ml glucose 65g/L 5ml glucuronic acid 2g/L 1.7ml urea 25g/L 5ml glucosamine HCl 33g/L	2ml urea 25g/L	5ml urea 25g/L
효소	145mg α-amylase 7.5mg uric acid 12.5mg mucin	0.5g BSA 1.25g pepsin 1.5g mucin	4.5ml CaCl ₂ ·2H ₂ O 22.2g/L 0.5g BSA 4.5g pancreatin 0.75g lipase	5ml CaCl ₂ ·2H ₂ O 22.2g/L 0.9g BSA 15g bile
pH	6.8 ± 0.2	1.3 ± 0.02	8.1 ± 0.2	8.2 ± 0.2

다. 단백질 전기영동(SDS-PAGE)

소화 단계별 인공소화 분해물의 단백질 분해 패턴을 분석하기 위해 소화전단계의 인공소화 분해물은 한우육(4.5g)에 증류수 38ml을 넣고 균질화한 액으로 이용하였으며, 각각 소화전, 입소화, 위소화, 소장소화 단계별로 인공소화 분해물을 분리하여 동결건조 후 분석에 이용하였다. 단백질 전기영동(Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 분석하였으며, prosi prestained protein marker(GenDEPOT, USA)를 사용하였다. 5% stacking gel과 15% separating gel을 만들어 사용하였으며, 인공소화 분해물은 bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Sigma Chemical Co., USA)를 이용하여 단백질 정량 후, 2X sample buffer와 1:1로 혼합하여 95℃에서 5분간 열처리 하여 사용하였다. 이후 전기영동장치(Page Run, AE-6531, ATTO, Japan)를 이용하여 120V로 전기영동 하였으며, coomassie brilliant blue staining(EzStain Aqua, ATTO, Japan)을 이용하여 염색시킨 다음 탈색하여 밴드를 확인하였다.

라. 지방산 조성

지방산 조성을 분석하기 위해 Folch 등(1957)의 방법에 따라 Folch 용액(chloroform:methanol=2:1)을 사용하여 지방을 추출하였으며, 14% BF₃-methanol 용액을 사용하여 methylation 시켜 이를 gas chromatography(Agilent 6890N, Agilent Technologies, USA)로 분석하였다. 사용된 컬럼은 CP-Sil 88 capillary column(Agilent CP7489, 100m×0.25mm×0.20μm)으로 injection 온도는 260℃로 유지하였으며, 이동상은 헬륨(He) 가스를 사용하였다. 분석결과는 전체 피크면적에 대한 비율(%)로 계산하였다.

마. 통계 분석

본 실험의 모든 결과는 SAS program(ver. 9.4 Statistics Analytical System)의 General Linear Model(GLM) 방법을 이용하여 분산 분석하였다. 처리군의 평균값간의 비교를 위해 tukey 방법에 의해 5% 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

2. 한우육 인공소화 분해물의 항산화 활성 규명

가. 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 라디칼 소거능
ABTS 라디칼 소거능은 Re 등(1999)의 방법을 이용하여 측정하였다. 7mM ABTS 용액과 2.45mM Potassium persulphate 용액을 혼합하고, ABTS 라디칼을 만들기 위해 실온에서 12~16시간 동안 암소 반응시켰다. 라디칼이 생성된 용액을 735nm에서 흡광도 값이 0.700 ± 0.02 가 되도록 희석하였다. 그 후 시료 50 μ l와 ABTS 라디칼 용액 950 μ l를 혼합하여 30 $^{\circ}$ C 암실에서 30분간 반응시킨 다음 735nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 trolox를 표준물질로 하여 trolox equivalent mmol/ml digest로 나타내었다.

나. Ferric reducing antioxidant power(FRAP) 활성

FRAP 활성은 Benzie와 Strainin(1996)의 방법을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. 300mM acetate buffer(pH 3.6), 40mM HCl로 용해시킨 10mM 2,4,6-tripyridyl-S-triazine(TPTZ) 용액과 20mM FeCl₃·6H₂O를 각각 10:1:1의 비율로 혼합하여 사용하였다. 시료 25 μ l와 혼합액 175 μ l을 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치 후 590nm에서 흡광도를 측정 하였다. 결과는 trolox를 표준물질로 하여 trolox equivalent μ mol/ml digest로 나타내었다.

다. Oxygen radical absorbance capacity(ORAC) 활성

ORAC 활성은 Gillespie 등(2007)의 방법에 따라 측정하였다. Black 96 well plate에 25 μ l의 표준시약(trolox) 또는 시료를 넣고, 150 μ l의 80nM fluorescein을 넣어 혼합한 뒤 37 $^{\circ}$ C incubator에서 15분 동안 방치하였다. 이 후 150mM AAPH를 25 μ l씩 넣고 완전하게 혼합한 뒤 fluorescent microplate reader(SpectraMax M2e, Molecular Devices, USA)를 사용하여 excitation 파장은 485nm, emission 파장은 520nm으로 하여 37 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 1분 간격으로 fluorescence의 감소율을 측정하였다. 표준시약(trolox)과 시료의 area under the curve(AUC)를 측정하였으며, 표준시약 농도와 AUC 간의 회귀곡선을 이용하여 최종 결과는 trolox equivalent mmol/ml digest로 나타내었다.

라. 지질과산화물(MDA) 함량

지질과산화물(malondialdehyde, MDA) 함량은 Li 등(2010)의 방법을 변형하여 분석하였다. 한우육 인공소화 분해물 120 μ l에 3N NaOH 40 μ l와 증류수 40 μ l를 넣고, 60 $^{\circ}$ C의 water bath에서 45분 동안 가수 분해 시킨다. 이후 6% H₃PO₄ 200 μ l를 이용하여 산성화시킨 후 0.8% TBA를 200 μ l 넣고, 90 $^{\circ}$ C에서 45분간 반응시킨다. 이후 10% SDS 80 μ l와 n-butanol 480 μ l을 이용하여 분홍색의 malondialdehyde (TBA)₂화합물을 추출한 후 원심분리하여 상층액을 532nm에서 분석하였다. Sigma(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입한 표준물질을 농도별로 측정하여 얻은 검량곡선을 이용하여 nmol/ml digest로 표시하였다.

마. 통계 분석

제2장, 제1절의 [1. 소화관 효소를 이용하여 한우육 인공소화 분해물 제조 및 분해 패턴 규명]의 ‘마. 통계 분석’ 분석 방법과 동일하게 진행하였다.

제2절. 한우육 인공소화 분해물의 면역기능 증진 효과 규명

1. 한우육 인공소화 분해물의 면역기능 증진 효과 규명

가. 대식세포(RAW 264.7) 배양

RAW 264.7 세포주(ATCC# TIB-71)는 미국 세포주 은행(American Type Culture Collection; ATCC)에서 구입하였다. Penicillin/streptomycin 1%와 fetal bovine serum 10%가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

나. 세포독성

한우 인공소화 분해물의 농도에 따른 세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 방법을 이용하였다. 대식세포를 48 well plate에 5×10^4 cells/well의 농도가 되도록 분주한 후 24시간 동안 배양하여 안정화를 실시하였다. 24시간 후 각각의 한우 인공소화 분해물을 0~1,000µg/ml의 농도로 처리한 후 24, 48, 72시간 배양한 후 각 well에 MTT(최종 농도 0.5mg/ml)용액을 4시간 동안 처리하였다. 각 well에 dimethyl sulfoxide(DMSO) 용액을 첨가하여 생성된 formazan을 용해시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식으로 세포생존율을 산출하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = (\text{한우육 인공소화 분해물을 처리한 세포의 흡광도} / \text{처리하지 않은 세포의 흡광도}) \times 100$$

다. 세포생존율

한우 인공소화 분해물의 세포 생존율을 측정하기 위해 대식세포를 24 well plate에 4×10^5 cells/well의 농도가 되도록 분주한 후 24시간 동안 배양하여 안정화를 실시하였다. 24시간 후 각각의 한우 인공소화 분해물을 0~500µg/ml의 농도로 처리하였다. 그 후 대조구를 제외한 well에 lipopolysaccharide(LPS)를 1µg/ml을 처리하였다. 24시간 후 각 well에 MTT(최종 농도 0.5mg/ml)용액을 처리한 후 4시간 뒤에 생성된 formazan을 DMSO에 용해시켜 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 결과 값은 대조구에 대한 백분율로 나타내었다.

라. Nitric oxide(NO) 함량

한우 인공소화 분해물이 LPS로 활성화된 대식세포의 NO 함량에 미치는 영향을 알아보기 위해 Griess reagent(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하였다. 24 well plate에 4×10^5 cells/well의 농도가 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 한우 인공소화 분해물을 0, 10, 50, 100, 250, 500 µg/ml 농도로 처리한 후 1 µg/ml 농도의 LPS를 처리하였다. 24시간 배양 후 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액 또는 standard 50 µl와 Griess reagent 100 µl를 혼합하여 암실에서 10분 동안 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. Prostaglandin E₂(PGE₂) 함량

NO 함량 측정과 같은 방법으로 세포를 배양한 후, 각 well에서 상등액을 회수 하였다. 상등액 내 Prostaglandin E₂(PGE₂) 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(R&D system, Minneapolis, MI, USA)를 이용하여 450nm에서 측정하였다.

바. 염증성 cytokine(IL-6, TNF-α) 함량

염증성 cytokine(IL-6, TNF-α) 생성량은 NO 함량 측정과 같은 방법으로 세포를 배양한 후, 각 well에서 상등액을 회수하여 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 450nm에서 측정하였다.

사. 통계 분석

제2장, 제1절의 [1. 소화관 효소를 이용하여 한우육 인공소화 분해물 제조 및 분해 패턴 규명]의 ‘마. 통계 분석’ 분석 방법과 동일하게 진행하였다.

2. 한우육 인공소화 분해물의 면역기능 증진 메커니즘 규명

가. 염증성 단백질(iNOS, COX-2) 발현

한우 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 내 염증성 단백질 발현 분석은 western blotting을 이용하였다. 대식세포를 6 well plate에 1×10^6 cells/well의 농도가 되도록 분주한 후 24시간 동안 배양하여 안정화를 실시하였다. 이후 한우 인공소화 분해물을 0, 10, 50, 100, 250, 500 μ g/ml 농도로 처리한 다음, LPS(1 μ g/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 1X phosphate buffered saline(PBS)로 두번 세척 후 RIPA lysis buffer (GenDEPOT, TX, USA)를 넣어 세포를 용해시켰다. 용해된 세포의 단백질 함량은 bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Sigma Chemical Co., USA)를 이용하여 정량하였다.

단백질 함량을 동일하게 맞춘 후 2X sample buffer를 넣어 95℃에서 10분간 반응시킨 후 10% separating gel에 전기영동 하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane으로 transblotting 한 후 5% bovine serum albumin(BSA)에서 2시간 동안 blocking 하였다. iNOS, COX-2, β -actin의 1차 항체는 1:200의 비율로 4℃에서 overnight 시킨 후 0.05% tris-buffered saline Tween-20(TBST) buffer로 10분간 3번 세척하였다. iNOS는 2차 항체로 mouse IgG kappa binding protein(m-IgGkBP) conjugated to Horseradish Peroxidase(HRP)를 1:3,000의 비율로 희석하여 4℃에서 6시간 동안 부착시켰으며, COX-2와 β -actin는 2차 항체로 각각 donkey anti-goat IgG-HRP, goat anti-mouse IgG-HRP를 1:3,000 비율로 희석하여 실온에서 2시간 동안 부착시켰다. 모든 항체는 Santa Cruz Biotechnology 사(Santa Cruz, CA, USA)로 부터 구입하였다. 이 후 0.05% TBST buffer로 3번 세척한 뒤 membrane에 ECL(Bio-rad, Hercules, CA, USA)을 처리하여 chemiluminescence detector(AE-9150 EZ-Capture II, Atto, Tokyo, Japan)로 발현양을 분석하였다.

나. MAPKs pathway(JNK, ERK, p38)의 인산화 단백질 발현

한우 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 내 MAPKs pathway(JNK, ERK, p38)의 인산화 단백질 발현분석은 염증성 단백질 발현 분석과 같은 방법으로 western blotting을 이용하여 분석하였다.

iNOS, COX-2 발현 측정과 같은 방법으로 세포를 배양한 후, 각 well에서 상등액을 회수하였다. 단백질 함량을 동일하게 맞춘 후 2X sample buffer를 넣어 95℃에서 10분간 반응시킨 후 10% separating gel에 전기영동 하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane으로 transblotting 한 후 5% BSA에서 2시간 동안 blocking 하였다. ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, p38, p-p38의 1차 항체는 1:200으로 희석하여 4℃에서 overnight 시킨 후 0.05% TBST buffer로 10분간 3번 세척하였다. 2차 항체로 각각 ERK(goat anti-rabbit IgG-HRP, 1:3,000, 실온 2시간), p-ERK(goat anti-mouse IgG-HRP, 1:3,000, 4℃ 6시간), JNK(donkey anti-goat IgG-HRP, 1:3,000, 4℃ 6시간), p-JNK(goat anti-mouse IgG-HRP, 1:3,000, 4℃ 6시간), p38(goat anti-mouse IgG-HRP, 1:3000, 실온 2시간), p-p38(goat anti-rabbit IgG-HRP, 1:5,000, 4℃ 6시간)를 부착한 후 0.05% TBST buffer로 10분간 3번 세척하였다. 모든 항체는 Santa Cruz Biotechnology 사(Santa Cruz, CA, USA)로 부터 구입하였다. 이 후 membrane에 ECL(Bio-rad, Hercules, CA, USA)을 처리하여 chemiluminescence detector(AE-9150 EZ-Capture II, Atto, Tokyo, Japan)로 발현양을 분석하였다.

다. 통계 분석

제2장, 제1절의 [1. 소화관 효소를 이용하여 한우육 인공소화 분해물 제조 및 분해 패턴 규명]의 ‘마. 통계 분석’ 분석 방법과 동일하게 진행하였다.

제3절. 한우육 급여가 실험동물의 면역기능 개선에 미치는 영향 규명

1. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 면역기능 증진 효과 규명

가. 실험동물

한우 등심(생육, 조리육) 급여에 따른 실험동물의 면역기능 증진 효과 규명을 위해 4주령 BALB/c 마우스 스킷 60마리를 이용하였다. 실험에 사용된 마우스는 (주)오리엔트 바이오로부터 공급받았으며, 사육은 12시간 명암주기로 일정한 온도(20~22℃)와 습도(50~55%)를 유지하였다.

나. 한우육 사료 제조

사료 제조에 이용된 한우 등심은 1+등급으로 강원도 소재의 식육 포장처리장에서 도축 후 24시간 이내의 시료를 이용하였다. 생육은 아무런 처리를 하지 않았으며, 조리육은 심부온도가 75℃가 되도록 water bath에서 조리 후 사료제조에 이용하였다. 각각의 한우 등심(1+) 생육, 조리육은 동결건조 후 일반식이(AIN-93G)의 단백질과 지방을 한우 등심으로 저농도(5%), 고농도(10%)로 대체하여 최종적으로 총단백질을 20.3%, 지방 7%로 맞추어 아래와 같이 식이를 제조하였다.

다. 실험 설계

실험동물은 일주일간 환경에 적응 후 12마리씩 6처리구로 나누었다. 실험 처리구는 대조구(일반식이)과 한우 등심(1+) 생육을 각각 5, 10% 급여한 처리구, 한우 등심(1+) 조리육을 각각 5, 10% 급여한 처리구로 나누어 총 8주 동안 한우육을 급여하였다.

표 2. 한우 등심 사료 식이 조성(면역기능 증진 효과 규명)

재료	조성(g/kg diet)				
	대조구	등심(생육) 5%	등심(생육) 10%	등심(조리육) 5%	등심(조리육) 10%
Casein	200.00	179.33	158.66	179.30	158.61
Sucrose	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Dextrose ¹⁾	132.00	132.00	132.00	132.00	132.00
Corn starch	397.486	395.296	393.096	396.406	395.316
Cellulose ²⁾	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
Soybean oil	70.00	42.86	15.73	41.78	13.56
등심(1+, 생육)		50.00	100.00		
등심(1+, 조리육)				50.00	100.00
TBHQ ³⁾	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
AIN 93 mineral Mixture(Ca.P free)	35	35	35	35	35
AIN 93 vitamin mix	10	10	10	10	10
L-cystine	3	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Total protein	203.00	203.00	203.00	203.00	203.00
Total fat	70.00	70.00	70.00	70.00	70.00

¹⁾ Heilongjiang Haotian Corn Develkoping Co., Ltd., China

²⁾ J.Rettenmaier & Sohne JRS, Germany

³⁾ tert-Butylhydroquinone(Alfa Aesar, USA)

라. 혈청 내 지질성분

실험 종료일에 마우스를 14 ± 2 시간 절식 후 에테르로 마취하여 심장 채혈법으로 채혈하였다. 혈액은 실온에서 30분 방치시킨 후 원심분리(4°C , 3,000rpm, 15min) 하여 상등액(혈청)을 취하여 분석 전까지 -70°C 에서 보관하였다. 혈청 내 총콜레스테롤(TC), 중성지방(TG), 고밀도 지단백콜레스테롤(HDL-C)농도는 효소 kit(Asan Pharm, Korea)를 사용하였으며, 저밀도 지단백콜레스테롤(LDL-C) 농도는 Friedwald 등(1972)의 계산식으로 구하였다. 혈청 내 TC 함량은 혈청 0.02ml과 효소시액 3.0ml을 혼합하여, 37°C 5분간 방치 한 후 500nm 에서 흡광도 측정하였다. TG 측정 방법은 혈청 0.02ml과 효소시액 3.0ml을 혼합하여, 37°C 10분간 방치 한 후 550nm에서 흡광도 측정하였다. HDL-C 측정방법은 혈청 0.2ml과 분리시액 0.2ml을 혼합하여 실온에 방치 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 0.1ml 상등액과 효소시액 3.0ml을 잘 혼합하여 37°C 에서 5분간 방치한 후 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. 분변 내 지질성분

분변 내 TG, TC, HDL-C 및 LDL-C 농도를 측정하기 위해 Folch 등(1957)의 방법을 이용하여 지질 성분을 추출한 후 분석하였다. 분변은 전처리하기 전에 dry oven(60°C)에서 15시간 건조 후 사용하였다. 분변 1g에 25ml의 Folch 용액(chloroform/methanol=2/1)을 넣고 homogenizer(PolyTron ® PT-2500E, Kinematica, Switzerland)를 사용하여 균질하였다. 3,000rpm 10분간 원심분리 후, filter paper (No.1)로 여과하였다. 0.88% KCl 2ml을 넣고 혼합 한 후 24시간 동안 방치 한 다음에 층 분리가 되면 지질을 함유하고 있는 하층액인 chloroform 층을 분리하여, N_2 gas로 농축 한 다음에 에탄올 2ml에 녹여 분석에 이용하였다. 지질성분 분석은 효소 kit(Asan Pharm, Korea)를 사용하였다.

바. 비장세포 분리 및 배양

마우스로부터 비장을 무균적으로 적출하여 10% FBS-RPMI 1640 배지로 세척 후 멸균 유리병으로 분쇄하여 세포를 분리시켰다. 분리된 세포 현탁액을 40 μ m mesh에 여과시킨 후 원심 분리하여 (3,000rpm, 10분) 상등액을 제거하여 비장세포를 회수하였다. 이후, RBC lysis buffer로 잔여 적혈구를 제거한 뒤 10% FBS-RPMI 1640 배지를 이용하여 2회 세척하였다. 회수된 비장 세포를 1×10^6 cells/ml 농도로 희석하여 다음 분석에 이용하였다.

사. 비장세포 증식능

각 처리구별로 마우스 비장세포 부유액을 1×10^6 cells/ml 농도로 희석한 후 각 처리구당 mitogen인 LPS(B 세포 증식), ConA(T 세포 증식)를 최종농도 2.5 μ g/ml이 되도록 분주하고, 대조구에는 dPBS를 동량으로 분주하였다. 각 plate는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하여 MTT 시약(최종 농도 0.5mg/ml)을 4시간 동안 처리한 다음 원심분리(1,200rpm, 5min)하여 배지를 제거하였다. 생성된 formazan을 DMSO에 녹인 후 540nm에서 흡광도를 측정하고, 결과 값은 대조구에 대한 백분율로 나타내었다.

아. 비장세포 cytokine 분비량

비장세포의 cytokine 분비량을 분석하기 위해 1×10^6 cells/ml 농도로 비장세포를 24 well plate에 분주한 후 LPS와 ConA를 2.5 μ g/ml 농도로 처리한 후 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이후 mitogen을 처리하지 않은 세포와, LPS와 ConA를 처리한 세포의 상등액을 각각 회수하여 TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-2, IL-5, IL-10, IL-4의 분비량을 ELISA kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

자. 비장 내 림프구 아집단 비율

비장 내 림프구 아집단(CD4+, CD8+)은 fluorescence-activated cell sorting(FACS)을 이용하여 측정하였다. 분리된 비장세포를 RPMI 1640 배지를 이용하여 1×10^6 cells/ml 농도로 희석한 후 4% paraformaldehyde 로 고정시켰다. 고정시킨 비장 세포에 phycoerythrin(PE) Rat anti-mouse CD4, Allophycocyanin(APC) Rat anti-mouse CD8a(BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 단클론항체를 첨가하여 30분간 반응시켰다. FACS buffer로 3번 세척 후, FACS Calibur(BD Biosciences, USA)를 이용하여 비장세포 내 림프구 아집단 비율을 측정하였다.

차. 장내 미생물 군총

한우육 급여 따른 장내 미생물 군총 변화를 분석하기 위해 real-time PCR 방법(StepOnePlus Real-Time PCR System; Thermo Fisher Scientific Inc.)을 이용하였으며, 분변의 total genomic DNA는 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit(QIAGEN)을 이용하여 추출하였다. Taq-man assay법을 사용하여 *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*와 *Clostridium spp.*에 대해 제작된 primer와 probe를 이용하여 정량하였다. 결과는 세가지 균의 합에 대한 각각의 비율로 나타내었다. 분변 내 Firmicutes속과 Bacteroidetes속 비율 또한 real-time PCR 방법을 이용하여 정량한 후 합에 대한 각각의 비율로 나타내었다.

카. 통계 분석

제2장, 제1절의 [1. 소화관 효소를 이용하여 한우육 인공소화 분해물 제조 및 분해 패턴 규명]의 ‘마. 통계 분석’ 분석 방법과 동일하게 진행하였다.

2. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 규명

가. 실험동물

한우 등심(생육, 조리육) 급여에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 규명을 위해 4주령 BALB/c 마우스 숫컷 48마리를 이용하였다. 실험에 사용된 마우스는 (주)오리엔트 바이오로부터 공급받았으며, 사육은 12시간 명암주기로 일정한 온도(20~22℃)와 습도(50~55%)를 유지하였다.

나. 한우육 사료 제조

사료 제조에 이용된 한우 등심은 1+등급으로 강원도 소재의 식육 포장처리장에서 도축 후 24시간 이내의 시료를 이용하였다. 생육은 아무런 처리를 하지 않았으며, 조리육은 심부온도가 75℃가 되도록 water bath에서 조리 후 사료제조에 이용하였다. 동결 건조된 한우 등심(1+) 생육, 조리육은 5%의 농도로 일반식이(AIN-93G) 단백질과 지방을 한우 등심으로 대체하여 총단백질을 20.3%, 지방 7%로 맞추어 식이를 제조하였다.

다. 실험 설계 및 급성 피부염 모델 제작

실험동물은 일주일간 환경에 적응 후 12마리씩 4처리구(n=12)로 나누었다. 실험 처리구는 일반사료를 급여하는 정상 대조구(CON)과 염증을 유발한 급성 피부염 대조구(DNCB), 염증을 유발하면서 한우 등심(1+) 생육 5%(DNCB+5RHL)와 조리육 5%(DNCB+5CHL)를 급여한 처리구로 나누었다. 한우 등심(1+)은 총 8주 동안 급여하였으며, 마지막 2주 동안에는 급성 피부염을 유발하기 위해 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB, Sigma)를 등에 도포하였다.

급성 피부염 모델을 제작하기 위해 6주차에 마우스 등의 털을 제모한 후 하루 동안 미세한 상처가 회복되도록 방치하였다. 이 후 1% DNCB를 200μl씩 1주 동안 총 2번 등에 도포하였고, 그 다음 1주

동안에는 0.2% DNCB 200 μ l씩 총 2번 등에 도포하여 급성 피부염을 유도하였다.

표 3. 한우 등심 사료 식이 조성(피부염 억제 효과 규명)

재료	조성(g/kg diet)		
	AIN-93G	등심 생육 5%	등심 조리육 5%
Casein	200.00	179.33	179.30
Sucrose	100.00	100.00	100.00
Dextrose ¹⁾	132.00	132.00	132.00
Corn starch	397.486	395.296	396.406
Cellulose ²⁾	50.00	50.00	50.00
Soybean oil	70.00	42.86	41.78
등심(1+, 생육)		50.00	
등심(1+, 조리육)			50.00
TBHQ ³⁾	0.014	0.014	0.014
AIN 93 mineral Mixture(Ca.P free)	35	35	35
AIN 93 vitamin mix	10	10	10
L-cystine	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
Total protein	203.00	203.00	203.00
Total fat	70.00	70.00	70.00

¹⁾ Heilongjiang Haotian Corn Devekoping Co., Ltd. china

²⁾ J.Rettenmaier & Sohne JRS. Germany

³⁾ tert-Butylhydroquinone(Alfa Aesar USA)

라. 피부염 중증도 평가

DNCB 처리에 따른 급성 피부염의 중증도를 육안평가법으로 실시하였다. 홍반/출혈, 부종, 표피박리/긁무름, 각질/건조 항목에 대해 정도에 따라 0(이상없음)~3(심함)의 점수를 부여한 후 합산으로 나타내었다(최대 12점).

마. 긁는 횟수 평가

한우 등심의 급여가 급성 피부염 발생으로 인한 긁음 행위에 미치는 영향을 알아보기로 observation chamber에 마우스를 넣어 10분간 뒷다리로 환부를 긁는 횟수를 측정하였다.

바. 경표피 수분 손실량(transepidermal water loss, TEWL)

실험 종료 2일전, 각 처리구의 등 피부에서 Cutometer MPA 580(courage khazaka, Germany)을 이용하여 경표피 수분 손실량을 측정하였다. 측정 당시 환경 조건은 습도 $60\pm5\%$, 온도 $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 이었다. 각 개체별로 측정 부위는 동일한 곳으로 하였으며, 측정면은 항상 평행하게 하고 탐침의 측정 면에 대한 압력을 일정하게 유지하였다.

사. 조직 병리학적 검사

실험 종료 후 피부 조직을 분리하여 동일한 부위를 조직 병리학적 검사에 이용하였다. 피부 조직을 10% 포르말린에 고정시킨 후 파라핀 블록을 제작하였다. 이후 $4\mu\text{m}$ 로 절편하여 슬라이드를 제작하고 hematoxylin and eosin(H&E) 염색을 한 후 표피 두께를 측정하였다. 조직 내 mast cell 수를 카운팅 하기 위하여 toluidine blue 염색을 한 후 mm^2 당 mast cell수를 카운팅 하였다.

아. 혈청 내 IgE 함량

실험 종료일에 마우스를 14 ± 2 시간 절식 후 에테르로 마취하여 심장 채혈법으로 채혈하였다. 혈액은 실온에서 30분 방치시킨 후 원심분리 (4°C , 3,000rpm, 15분)하여 상등액(혈청)을 취하여 분석 전까지 -70°C 에서 보관하였다. 혈청 내 IgE 함량은 ELISA kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

자. 비장세포 분리 및 배양

마우스로부터 비장을 무균적으로 적출하여 10% FBS-RPMI 1640 배지로 세척 후 멸균 유리병으로 분쇄하여 세포를 분리시켰다. 분리된 세포 현탁액을 $40\mu\text{m}$ mesh에 여과시킨 후 원심 분리하여 (3,000rpm, 10분) 상등액을 제거하여 비장세포를 회수하였다. 이후, RBC lysis buffer로 잔여 적혈구를 제거한 뒤 10% FBS-RPMI 1640 배지를 이용하여 2회 세척하였다. 회수된 비장 세포를 1×10^6 cells/ml 농도로 조절하여 부유액을 다음 분석에 사용하였다.

차. 비장세포 cytokine 분비량

비장세포의 cytokine 분비량을 분석하기 위해 1×10^6 cells/ml 농도로 비장세포를 24 well plate에 분주 후 ConA $2.5\mu\text{g/ml}$ 로 자극시켜 48 시간 동안 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 이후 상등액을 회수하여 TNF- α , IL-5의 양을 ELISA kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 cytokine 측정하였다.

카. 통계 분석

제2장, 제1절의 [1. 소화관 효소를 이용하여 한우육 인공소화 분해물 제조 및 분해 패턴 규명]의 ‘마. 통계 분석’ 분석 방법과 동일하게 진행하였다.

3. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 아토피 피부염 억제 효과 규명

가. 실험동물

한우 등심(생육, 조리육) 급여에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 규명을 위해 6주령 BALB/c 마우스 숫컷 48마리를 이용하였다. 실험에 사용된 마우스는 오리엔트 바이오(주)로부터 공급받았으며, 사육은 12시간 명암주기로 일정한 온도(20~22℃)와 습도(50~55%)를 유지하였다.

나. 한우육 사료 제조

제2장, 제3절의 [2. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 규명]의 '나. 한우육 사료 제조'방법과 동일하게 진행하였다.

다. 실험 설계 및 아토피 피부염 모델 제작

실험동물은 일주일간 환경에 적응 후 12마리씩 4처리구(n=12)로 나누었다. 실험 처리구는 일반사료를 급여하는 정상 대조구(CON)과 아토피 피부염 대조구(AD), 아토피 피부염을 유발하면서 한우 등심(1+) 생육 5%(AD+5RHL)와 조리육 5%(AD+5CHL)를 급여한 처리구로 나누었다. 아토피 피부염 모델을 제작하기 위해 2주 동안 1% DNCB를 200μl씩 총 4번(2회/주) 등에 도포하였다. 그 다음 4주 동안에는 0.2% DNCB 200μl씩 총 8번(2회/주) 등에 도포하여 만성 아토피 피부염을 유발하였으며, 4주의 기간 동안 한우육을 동시 급여하였다.

라. 피부염 중증도 평가

제2장, 제3절의 [2. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 규명]의 '라. 피부염 중증도 평가'분석 방법과 동일하게 진행하였다.

마. 굵는 횡수 평가

제2장, 제3절의 [2. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 규명]의 ‘마. 굵는 횡수 평가’ 분석 방법과 동일하게 진행하였다.

바. 경표피 수분 손실량(transepidermal water loss, TEWL)

제2장, 제3절의 [2. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 규명]의 ‘바. 경표피 수분 손실량’ 분석 방법과 동일하게 진행하였다.

사. 조직 병리학적 검사

제2장, 제3절의 [2. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 규명]의 ‘사. 조직 병리학적 검사’ 분석 방법과 동일하게 진행하였다.

아. 혈청 내 IgE 함량

제2장, 제3절의 [2. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 규명]의 ‘아. 혈청 내 IgE 함량’ 분석 방법과 동일하게 진행하였다.

자. 비장세포 분리 및 배양

제2장, 제3절의 [2. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 규명]의 ‘자. 비장세포 분리 및 배양’ 분석 방법과 동일하게 진행하였다.

차. 비장세포 cytokine 분비량

비장세포의 cytokine 분비량을 분석하기 위해 1×10^6 cells/ml 농도로 비장세포를 24 well plate에 분주 후 ConA $2.5 \mu\text{g/ml}$ 로 자극시켜 48 시간 동안 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 이후 상등액을

회수하여 TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-4의 양을 ELISA kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 cytokine 측정하였다.

카. 통계 분석

제2장, 제1절의 [1. 소화관 효소를 이용하여 한우육 인공소화 분해물 제조 및 분해 패턴 규명]의 ‘마. 통계 분석’ 분석 방법과 동일하게 진행하였다.

제3장. 연구 결과

제1절. 한우육 인공소화 분해물 제조 및 항산화 활성 규명

1. 소화관 효소를 이용하여 한우육 인공소화 분해물 제조 및 분해 패턴 규명

가. Human digestion model을 이용한 한우육(등심, 우둔)의 인공소화 분해물 제조(in vitro)

처리구		소화 전	소장소화 후
등심(1+)	생육		
	조리육		
등심(1)	생육		
	조리육		
우둔(1+)	생육		
	조리육		

그림 1. 인공소화 후 한우육(생육, 조리육)의 형태 변화

Human digestion model을 이용하여 한우육을 인공소화한 후 형태 변화는 그림 1에 나타내었다. 소화 전에는 사람이 입으로 저작 운동을 했을 때의 작은 조각 형태였으며, 이후 입, 위, 소장소화까지 화학적 및 물리적 소화 과정을 거친 후 그 형태가 죽과 같이 묽어졌음을 확인하였다. 특히 생육보다는 조리육이 더 묽은 형태를 나타내어 같은 조건일 때 조리육이 소화가 더 잘되었음을 확인하였다. 이 후 인공소화 분해물(소화액)에 분리되어 나온 단백질의 형태를 단백질 전기영동(SDS-PAGE)를 통해 확인하였다.

나. SDS-PAGE를 이용한 각 단계별 한우육 인공소화 분해물의 단백질 분해 패턴

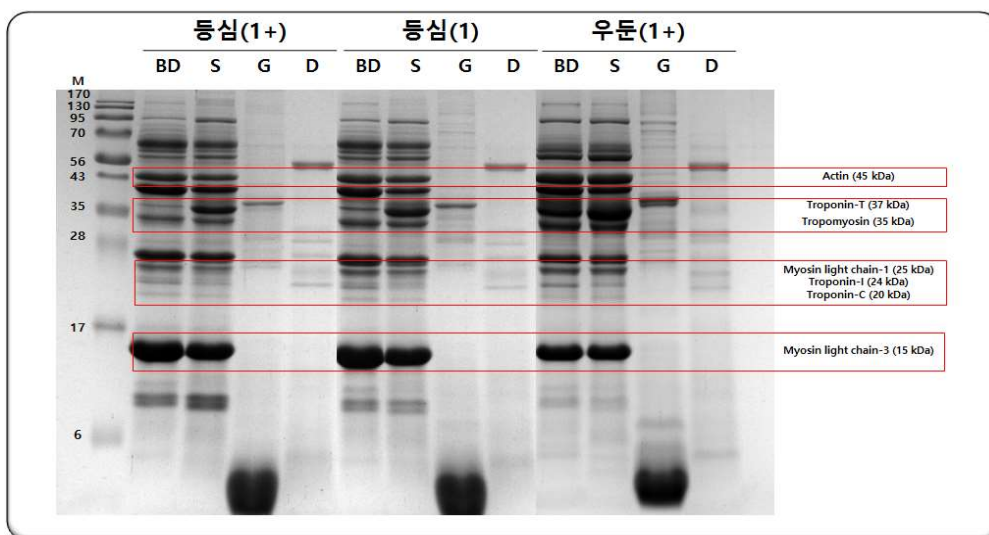


그림 2. 한우육 인공소화 분해물(생육)의 소화단계별 단백질 분해 패턴
BD : 소화전, S : 입소화분해물, G : 위소화분해물, D : 소장소화분해물(최종)

한우육 인공소화 분해물(생육)의 소화단계별 단백질 분해 패턴을 분석한 결과는 그림 2에 나타내었다. 입소화분해물(S)은 소화전과 크게 차이가 없었으나, 위소화분해물(G)에서부터 고기 내 주요 단백질인 actin(45kDa), tropomyosin(35kDa), myosin light chain-3(15kDa)이 소화되어 단백질 밴드가 나타나지 않았다.

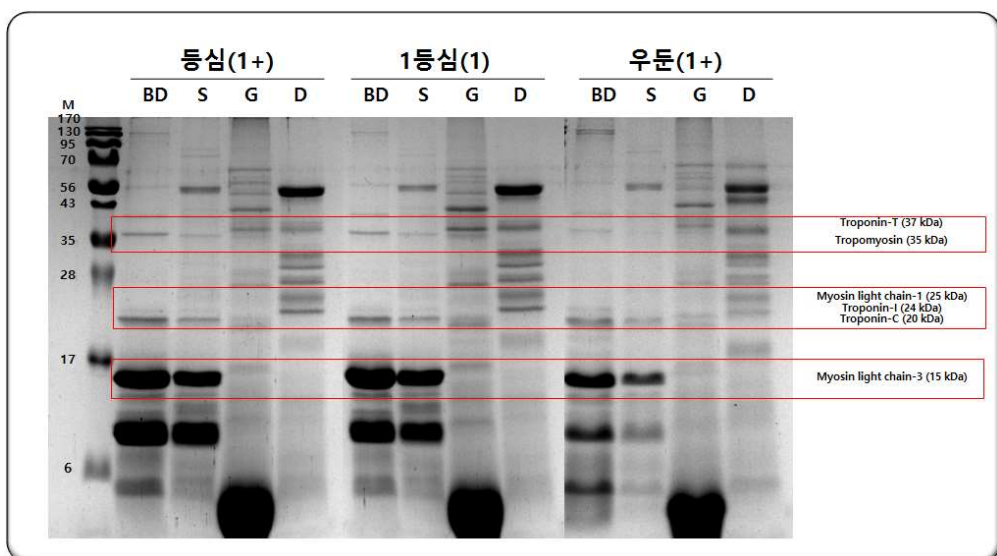


그림 3. 한우육 인공소화 분해물(조리육)의 소화단계별 단백질 분해 패턴
 BD : 소화전, S : 입소화분해물, G : 위소화분해물, D : 소장소화분해물(최종)

한우육 인공소화 분해물(조리육)의 소화단계별 단백질 분해 패턴 분석 결과, 생육과 다르게 조리과정에 의해 고분자 단백질 밴드가 연하게 나타났다(그림 3). 이후 소화단계별로 myosin light chain-3 (15kDa) 밴드의 굵기가 얇아지며 위소화분해물(G) 이후에는 소화되어 밴드가 사라진 것을 관찰하였다.

따라서 한우 생육과 조리육 모두 공통적으로 단백질과 지방의 함량이 높고 탄수화물은 거의 포함하지 않는 소고기의 특성상 한우육 소화는 입소화 단계의 α -amylase 효소 보다는 이후 위소화 단계의 pepsin 효소와 소장소화 단계의 pancreatin, lipase 효소에 의해 더 큰 영향을 받는 것을 확인하였다.

다. 한우육 인공소화 분해물의 지방산 조성

표 4. 인공소화 후 한우 등심(1+, 생육)의 지방산 조성 변화

지방산(%)	등심(1+, 생육)		SEM ¹⁾
	소화 전	소화 후	
C14:0(myristic acid)	2.34 ^b	2.83 ^a	0.019
C16:0(palmitic acid)	23.36 ^b	24.33 ^a	0.230
C16:1n7(palmitoleic acid)	3.28 ^a	3.33 ^a	0.132
C18:0(stearic acid)	15.41 ^a	14.19 ^b	0.121
C18:1n9(oleic acid)	40.44 ^b	45.84 ^a	0.444
C18:1n7(vaccenic acid)	4.83 ^a	5.50 ^a	0.352
C18:2n6(linoleic acid)	7.13 ^a	3.30 ^b	0.108
C18:3n3(α -linolenic acid)	0.30 ^a	0.07 ^b	0.008
C20:4n6(arachidonic acid)	2.91 ^a	0.60 ^b	0.029
SFA ²⁾	41.35 ^a	41.10 ^a	0.353
UFA ³⁾	58.90 ^a	58.65 ^a	0.353
MUFA ⁴⁾	48.55 ^b	54.68 ^a	0.382
PUFA ⁵⁾	10.35 ^a	3.97 ^b	0.132
MUFA/SFA	1.18 ^b	1.32 ^a	0.021
PUFA/SFA	0.25 ^a	0.10 ^b	0.005

^{a-b} Means within a row with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ SEM : standard error of means

²⁾ SFA : Saturated fatty acids

³⁾ UFA : Unsaturated fatty acids

⁴⁾ MUFA : Monounsaturated fatty acids

⁵⁾ PUFA : Polyunsaturated fatty acids

인공소화된 한우 등심(1+, 생육)의 지방산 조성은 표 4에 나타내었다. 분석에 이용한 한우 등심(1+, 생육)은 포화지방산(SFA)이 41.35%, 불포화지방산(UFA)이 58.90%였다. 소화 후 주요 지방산 중 stearic acid(C18:0), linoleic acid (C18:2n6), arachidonic acid(C20:4n6)는 유의적으로 감소하였다. 반면에 palmitic acid(C16:0)와 oleic acid(C18:1n9)는 증가하였으며, 특히 oleic acid가 40.44%에서 45.84%로 증가하였다 ($p<0.05$). 결과적으로 총 포화지방산과 불포화지방산의 비율은 소화 후 변화가 없었지만, 불포화지방산 중 단가불포화지방산(MUFA)의 비율이 증가하고 다가불포화지방산(PUFA)의 비율이 감소하였다 ($p<0.05$).

표 5. 인공소화 후 한우 등심(1+, 조리육)의 지방산 조성 변화

지방산(%)	등심(1+, 조리육)		SEM ¹⁾
	소화 전	소화 후	
C14:0(myristic acid)	2.63 ^b	2.80 ^a	0.029
C16:0(palmitic acid)	24.29 ^a	24.79 ^a	0.149
C16:1n7(palmitoleic acid)	3.85 ^b	4.60 ^a	0.032
C18:0(stearic acid)	15.43 ^a	14.66 ^b	0.111
C18:1n9(oleic acid)	41.59 ^b	47.52 ^a	0.219
C18:1n7(vaccenic acid)	5.32 ^a	2.60 ^b	0.255
C18:2n6(linoleic acid)	4.87 ^a	2.56 ^b	0.070
C18:3n3(α -linolenic acid)	0.34 ^a	0.02 ^b	0.011
C20:4n6(arachidonic acid)	1.55 ^a	0.46 ^b	0.069
SFA ²⁾	42.33 ^a	42.26 ^a	0.116
UFA ³⁾	57.74 ^a	57.67 ^a	0.116
MUFA ⁴⁾	50.76 ^b	54.71 ^a	0.132
PUFA ⁵⁾	6.91 ^a	3.03 ^b	0.115
MUFA/SFA	1.20 ^b	1.29 ^a	0.005
PUFA/SFA	0.16 ^a	0.07 ^b	0.002

^{a-b} Means within a row with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ SEM : standard error of means

²⁾ SFA : Saturated fatty acids

³⁾ UFA : Unsaturated fatty acids

⁴⁾ MUFA : Monounsaturated fatty acids

⁵⁾ PUFA : Polyunsaturated fatty acids

인공소화된 한우 등심(1+, 조리육)의 지방산 조성은 표 5에 나타내었다. 분석에 이용한 한우 등심(1+, 조리육)은 포화지방산(SFA)이 42.33%, 불포화지방산(UFA)은 57.74%로 한우 등심(1+, 생육)과 유사하였다(표 4). 소화 후 주요 지방산 중 palmitic acid(C16:0)는 변화가 없었으며, stearic acid(C18:0), linoleic acid(C18:2n6), arachidonic acid(C20:4n6)는 유의적으로 감소하였다. 반면에 oleic acid(C18:1n9)는 41.59%에서 47.52%로 증가하였다($p<0.05$). 총 포화지방산과 불포화지방산의 비율은 소화 후 변화가 없었지만, 불포화지방산 중 단가불포화지방산(MUFA)의 비율이 증가하고 다가불포화지방산(PUFA)의 비율이 감소하였다($p<0.05$).

표 6. 인공소화 후 한우 등심(1, 생육)의 지방산 조성 변화

지방산(%)	등심(1, 생육)		SEM ¹⁾
	소화 전	소화 후	
C14:0(myristic acid)	3.72 ^a	3.86 ^a	0.056
C16:0(palmitic acid)	28.65 ^a	27.19 ^a	0.392
C16:1n7(palmitoleic acid)	6.18 ^a	5.89 ^a	0.211
C18:0(stearic acid)	9.63 ^a	8.80 ^b	0.114
C18:1n9(oleic acid)	38.66 ^b	44.18 ^a	0.722
C18:1n7(vaccenic acid)	5.77 ^a	5.24 ^a	0.353
C18:2n6(linoleic acid)	5.48 ^a	4.00 ^b	0.117
C18:3n3(α -linolenic acid)	0.32 ^a	0.08 ^b	0.007
C20:4n6(arachidonic acid)	1.59 ^a	0.76 ^b	0.025
SFA ²⁾	42.00 ^a	39.85 ^a	0.548
UFA ³⁾	58.00 ^a	60.15 ^a	0.548
MUFA ⁴⁾	50.61 ^b	55.31 ^a	0.588
PUFA ⁵⁾	7.39 ^a	4.84 ^b	0.141
MUFA/SFA	1.21 ^b	1.39 ^a	0.029
PUFA/SFA	0.18 ^a	0.12 ^b	0.003

^{a-b} Means within a row with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ SEM : standard error of means

²⁾ SFA : Saturated fatty acids

³⁾ UFA : Unsaturated fatty acids

⁴⁾ MUFA : Monounsaturated fatty acids

⁵⁾ PUFA : Polyunsaturated fatty acids

인공소화된 한우 등심(1, 생육)의 지방산 조성은 표 6에 나타내었다. 분석에 이용한 한우 등심(1, 생육)은 포화지방산(SFA)이 42.00%, 불포화지방산(UFA)은 58.00%였다. 한우 등심(1+, 생육)과 마찬가지로 (표 4) 소화 후 주요 지방산 중 palmitic acid(C16:0)는 변화가 없었으며, stearic acid(C18:0), linoleic acid(C18:2n6), arachidonic acid (C20:4n6)는 유의적으로 감소하였다. 반면에 oleic acid(C18:1n9)는 38.66%에서 44.18%로 증가하였다($p<0.05$). 소화 후 총 포화지방산과 불포화지방산의 비율은 변화가 없었지만, 불포화지방산 중 단가불포화지방산(MUFA)의 비율이 증가하고 다가불포화지방산(PUFA)의 비율이 감소하였다($p<0.05$).

표 7. 인공소화 후 한우 등심(1, 조리육)의 지방산 조성 변화

지방산(%)	등심(1, 조리육)		SEM ¹⁾
	소화 전	소화 후	
C14:0(myristic acid)	3.02 ^b	3.86 ^a	0.083
C16:0(palmitic acid)	27.35 ^a	28.33 ^a	0.354
C16:1n7(palmitoleic acid)	4.09 ^b	5.48 ^a	0.103
C18:0(stearic acid)	11.32 ^a	9.28 ^b	0.237
C18:1n9(oleic acid)	39.20 ^b	43.70 ^a	0.283
C18:1n7(vaccenic acid)	5.33 ^a	4.22 ^b	0.127
C18:2n6(linoleic acid)	6.32 ^a	4.46 ^b	0.099
C18:3n3(α -linolenic acid)	0.28 ^a	0.06 ^b	0.007
C20:4n6(arachidonic acid)	3.12 ^a	0.59 ^b	0.239
SFA ²⁾	41.69 ^a	41.46 ^a	0.271
UFA ³⁾	58.31 ^a	58.54 ^a	0.271
MUFA ⁴⁾	48.59 ^b	53.43 ^a	0.237
PUFA ⁵⁾	9.72 ^a	5.11 ^b	0.158
MUFA/SFA	1.17 ^b	1.29 ^a	0.012
PUFA/SFA	0.24 ^a	0.12 ^b	0.005

^{a-b} Means within a row with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ SEM : standard error of means

²⁾ SFA : Saturated fatty acids

³⁾ UFA : Unsaturated fatty acids

⁴⁾ MUFA : Monounsaturated fatty acids

⁵⁾ PUFA : Polyunsaturated fatty acids

인공소화된 한우 등심(1, 조리육)의 지방산 조성은 표 7에 나타내었다. 분석에 이용한 한우 등심(1, 조리육)은 포화지방산(SFA)이 41.69%, 불포화지방산(UFA)은 58.31%로 한우 등심(1, 생육)과 유사하였다(표 6). 소화 후 주요 지방산 중 palmitic acid(C16:0)는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, stearic acid(C18:0), linoleic acid(C18:2n6), α -linolenic acid(C18:3n3), arachidonic acid(C20:4n6)는 유의적으로 감소하였다. oleic acid(C18:1n9)는 소화전 39.20%에서 43.70%로 증가하였다($p<0.05$). 한우 등심(1, 생육)과 마찬가지로 소화 후 총 포화지방산과 불포화지방산의 비율은 변화가 없었지만, 불포화지방산 중 다가불포화지방산(MUFA)의 비율이 증가하고 다가불포화지방산(PUFA)의 비율이 감소하였다($p<0.05$).

표 8. 인공소화 후 한우 우둔(1+, 생육)의 지방산 조성 변화

지방산(%)	우둔(1+, 생육)		SEM ¹⁾
	소화 전	소화 후	
C14:0(myristic acid)	2.11 ^b	2.25 ^a	0.003
C16:0(palmitic acid)	26.97 ^a	27.06 ^a	0.061
C16:1n7(palmitoleic acid)	3.26 ^b	4.06 ^a	0.018
C18:0(stearic acid)	11.46 ^a	10.83 ^b	0.056
C18:1n9(oleic acid)	36.77 ^b	44.98 ^a	0.269
C18:1n7(vaccenic acid)	7.18 ^a	5.53 ^b	0.380
C18:2n6(linoleic acid)	8.23 ^a	3.94 ^b	0.104
C18:3n3(α -linolenic acid)	0.33 ^a	0.05 ^b	0.004
C20:4n6(arachidonic acid)	3.67 ^a	1.31 ^b	0.043
SFA ²⁾	40.54 ^a	40.13 ^a	0.109
UFA ³⁾	59.46 ^a	59.87 ^a	0.109
MUFA ⁴⁾	47.22 ^b	54.57 ^a	0.175
PUFA ⁵⁾	12.23 ^a	5.30 ^b	0.148
MUFA/SFA	1.17 ^b	1.36 ^a	0.008
PUFA/SFA	0.30 ^a	0.10 ^b	0.004

^{a-b} Means within a row with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ SEM : standard error of means

²⁾ SFA : Saturated fatty acids

³⁾ UFA : Unsaturated fatty acids

⁴⁾ MUFA : Monounsaturated fatty acids

⁵⁾ PUFA : Polyunsaturated fatty acids

인공소화된 한우 우둔(1+, 생육)의 지방산 조성은 표 8에 나타내었다. 분석에 이용한 한우 우둔(1+, 생육)은 포화지방산(SFA)이 40.54%, 불포화지방산(UFA)은 59.46%를 나타내었다(표 4). 소화 후 주요 지방산 중 palmitic acid(C16:0)는 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, stearic acid(C18:0), linoleic acid(C18:2n6), arachidonic acid(C20:4n6)는 유의적으로 감소하였다. oleic acid(C18:1n9)는 소화전 36.77%에서 44.98%로 증가하였다($p<0.05$). 소화 후 총 포화지방산과 불포화지방산의 비율은 변화가 없었지만, 불포화지방산 중 단가불포화지방산(MUFA)의 비율이 증가하고 다가불포화지방산(PUFA)의 비율이 감소하였다($p<0.05$).

표 9. 인공소화 후 한우 우둔(1+, 조리육)의 지방산 조성 변화

지방산(%)	우둔(1+, 조리육)		SEM ¹⁾
	소화 전	소화 후	
C14:0(myristic acid)	2.01 ^b	2.37 ^a	0.014
C16:0(palmitic acid)	27.78 ^a	27.46 ^a	0.339
C16:1n7(palmitoleic acid)	3.61 ^a	3.53 ^a	0.104
C18:0(stearic acid)	12.23 ^a	11.78 ^a	0.205
C18:1n9(oleic acid)	38.20 ^b	44.82 ^a	0.534
C18:1n7(vaccenic acid)	4.67 ^a	5.32 ^a	0.361
C18:2n6(linoleic acid)	7.89 ^a	3.57 ^b	0.090
C18:3n3(α -linolenic acid)	0.37 ^a	0.03 ^b	0.016
C20:4n6(arachidonic acid)	3.24 ^a	1.11 ^b	0.047
SFA ²⁾	42.02 ^a	41.60 ^a	0.494
UFA ³⁾	57.98 ^a	58.40 ^a	0.494
MUFA ⁴⁾	46.49 ^b	53.67 ^a	0.373
PUFA ⁵⁾	11.50 ^a	4.72 ^b	0.152
MUFA/SFA	1.11 ^b	1.29 ^a	0.023
PUFA/SFA	0.27 ^a	0.11 ^b	0.005

^{a-b} Means within a row with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ SEM : standard error of means

²⁾ SFA : Saturated fatty acids

³⁾ UFA : Unsaturated fatty acids

⁴⁾ MUFA : Monounsaturated fatty acids

⁵⁾ PUFA : Polyunsaturated fatty acids

인공소화된 한우 우둔(1+, 조리육)의 지방산 조성은 표 9에 나타내었다. 분석에 이용한 한우 우둔(1+, 조리육)은 포화지방산(SFA)이 42.02%, 불포화지방산(UFA)은 57.98%으로 한우 우둔(1+, 생육)과 유사하였다(표 8). 소화 후 주요 지방산 중 palmitic acid(C16:0)와 stearic acid(C18:0)는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, linoleic acid(C18:2n6), arachidonic acid(C20:4n6)는 유의적으로 감소하였다. oleic acid(C18:1n9)는 소화전 38.20%에서 44.82%로 증가하였다 ($p<0.05$). 한우 우둔(1+, 생육)과 마찬가지로 소화 후 총 포화지방산과 불포화지방산의 비율은 변화가 없었지만, 불포화지방산 중 단가불포화지방산(MUFA)의 비율이 증가하고 다가불포화지방산(PUFA)의 비율이 감소하였다($p<0.05$).

2. 한우육 인공소화 분해물의 항산화 활성 규명

가. 한우육 인공소화 분해물의 항산화 활성

(1) ABTS 라디칼 소거능

표 10. 한우육 인공소화 분해물(생육, 조리육)의 ABTS 라디칼 소거능

부위	ABTS 라디칼 소거능 (Trolox equivalent mmol/ml digest)		SEM ¹⁾
	생육	조리육	
등심(1+)	1.83 ^{Aa}	1.50 ^{Ab}	0.002
등심(1)	1.82 ^{Aa}	1.45 ^{ABb}	0.007
우둔(1+)	1.74 ^{Ba}	1.41 ^{Bb}	0.015
SEM	0.005	0.013	

^{A-B} Means within a column with different superscript differ significantly at $p<0.05$.

^{a-b} Means within a row with different superscript differ significantly at $p<0.05$.

¹⁾ SEM : standard error of means

한우육 인공소화 분해물의 ABTS 라디칼 소거능 분석 결과는 표 10에 나타내었다. ABTS 라디칼 소거능은 항산화물질이 생성된 양이온 ABTS 라디칼을 얼마나 소거할 수 있는지 분석하는 방법으로 ABTS 라디칼 소거능이 높을수록 인체 내에 생성되는 여러 라디칼들을 소거하여 높은 항산화 활성을 나타낸다. 생육의 경우 부위별로 1.74~1.83 trolox equivalent mmol/ml digest의 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었으며, 조리육의 경우 1.41~1.50 trolox equivalent mmol/ml digest의 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었다. 모두 생육이 조리육보다 유의적으로 높은 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었다.

부위별, 등급별 한우육 인공소화물의 ABTS 라디칼 소거능을 비교한 결과, 생육의 경우 한우 등심(1+, 1) 인공소화 분해물이 우둔보다 높은 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었으며($p<0.05$), 등급별로는 차이를 보이지 않았다. 조리육의 경우 한우 등심(1+) 인공소화 분해물이 한우 우둔(1+)보다 높은 ABTS 활성을 나타내었다($p<0.05$).

(2) FRAP 활성

표 11. 한우육 인공소화 분해물(생육, 조리육)의 FRAP 활성

부위	FRAP 활성 (Trolox equivalent $\mu\text{mol/ml}$ digest)		SEM ¹⁾
	생육	조리육	
등심(1+)	346.79 ^{Aa}	278.04 ^{Bb}	7.406
등심(1)	311.43 ^{ABa}	260.00 ^{Bb}	5.987
우둔(1+)	284.82 ^{Bb}	329.76 ^{Aa}	7.976
SEM	9.214	4.239	

^{A-B} Means within a column with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

^{a-b} Means within a row with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ SEM : standard error of means

한우육 인공소화 분해물의 FRAP 활성 분석 결과는 표 11에 나타내었다. FRAP 활성은 라디칼 소거능이 아닌 환원력에 기반을 둔 항산화 측정방법으로 FRAP 활성이 높을수록 환원력이 높아 인체 내 산화작용을 억제하여 높은 항산화 활성을 나타낸다. 생육의 경우 부위별로 284.82~346.79 trolox equivalent $\mu\text{mol/ml}$ digest의 FRAP 활성을 나타내었으며, 조리육의 경우 260.00~329.76 trolox equivalent $\mu\text{mol/ml}$ digest의 FRAP 활성을 나타내었다. 한우 우둔(1+)을 제외한 등급별 한우 등심(1+, 1)은 생육이 조리육보다 유의적으로 높은 FRAP 활성을 나타내었다.

부위별, 등급별 한우육 인공소화물 분해물의 FRAP 활성을 비교한 결과, 생육의 경우 한우 등심(1+) 인공소화 분해물이 한우 우둔(1+) 인공소화 분해물에 비해 유의적으로 FRAP 활성이 높았다. 하지만 조리육의 경우 한우 우둔(1+) 인공소화 분해물의 유의적으로 가장 높은 FRAP 활성을 나타내었다.

(3) ORAC 활성

표 12. 한우육 인공소화 분해물(생육, 조리육)의 ORAC 활성

부위	ORAC 활성 (Trolox equivalent mmol/ml digest)		SEM ¹⁾
	생육	조리육	
등심(1+)	7.38 ^{Bb}	8.03 ^{Aa}	0.066
등심(1)	8.67 ^{Aa}	7.67 ^{ABa}	0.293
우둔(1+)	8.77 ^{Aa}	6.87 ^{Bb}	0.142
SEM	0.194	0.192	

^{A-B} Means within a column with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

^{a-b} Means within a row with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ SEM : standard error of means

한우육 인공소화 분해물의 ORAC 활성 분석 결과는 표 12에 나타내었다. ORAC 활성은 활성산소의 일종인 퍼옥시 라디칼을 소거하는 능력으로 이와 같은 퍼옥시 라디칼은 인체 내에 산화적인 반응에 의해 생성될 수 있다. 따라서 ORAC 활성이 높을수록 인체 내 활성산소의 생성을 억제할 수 있는 높은 항산화 활성을 나타낸다. 생육의 경우 부위별로 7.38~8.77 trolox equivalent mmol/ml digest의 ORAC 활성을 나타내었으며, 조리육의 경우 6.87~8.03 trolox equivalent mmol/ml digest의 ORAC 활성을 나타내었다. 한우 등심(1+)은 조리육이, 한우 우둔(1+)은 생육이 유의적으로 높은 ORAC 활성을 나타내었으며, 한우 등심(1)은 생육과 조리육이 유의적인 차이를 보이지 않았다.

부위별, 등급별 한우육 인공소화물 분해물의 ORAC 활성을 비교한 결과, 생육의 경우 한우 등심(1)과 한우 우둔(1+) 인공소화 분해물이 유의적으로 가장 높은 ORAC 활성을 나타내었다. 하지만 조리육의 경우 한우 등심(1+) 인공소화 분해물이 한우 우둔(1+) 인공소화 분해물보다 유의적으로 높은 ORAC 활성을 나타내었다.

나. 한우육 인공소화 분해물의 지질 산화 억제 효과

표 13. 한우육 인공소화 분해물(생육, 조리육)의 지질과산화물 함량

부위	Malondialdehyde 함량(nmol/ml digest)		SEM ¹⁾
	생육	조리육	
등심(1+)	21.48 ^{Ab}	25.78 ^{Aa}	0.531
등심(1)	17.78 ^{Bb}	24.51 ^{ABa}	0.491
우둔(1+)	17.31 ^{Bb}	22.71 ^{Ba}	0.584
SEM	0.436	0.621	

^{A-B} Means within a column with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

^{a-b} Means within a row with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ SEM : standard error of means

한우육 인공소화분해물의 지질과산화물(malondialdehyde) 함량을 분석한 결과는 표 13에 나타내었다. 생육의 경우 부위별로 17.31~21.48 nmol/ml digest를, 조리육의 경우 22.71~25.78nmol/ml digest의 함량을 나타내었다. 기존 연구결과에 따르면 소화과정을 거치면서 산화 반응이 증가되고 특히 십이지장 소화 단계에서 MDA와 4-hydroxy-2-hexenal (4-HNE)와 같은 지질과산화물의 생성이 촉진될 수 있다(Van Hecke et al., 2014). 본 연구결과 조리육이 생육보다 유의적으로 높은 지질과산화물 함량을 나타내었으며, 이는 조리과정 중에 가해지는 열에 의해 한우육 내 지방이 산화되어 야기된 결과로 사료 된다. 부위별, 등급별 한우육 인공소화물의 지질과산화물 함량을 비교한 결과, 지방의 함량이 높은 한우 등심(1+)이 한우 우둔(1+) 보다 유의적으로 높은 지질과산화물 함량을 나타내었다. 하지만 본 연구에서 생성된 MDA 함량은 정상적인 소화과정에서 생성되는 양으로 판단된다.

결과적으로 한우육 인공소화 분해물의 향산화 활성 분석 결과, 등심 부위가 우둔부위보다 향산화 활성이 높았으며 등심 부위의 경우 등급별로 큰 차이를 보이지 않았다. 한우고기 소비유통 모니터링 보고서(한우자조금, 2017)에 의하면 한우고기 주 구입 등급은 ‘1+등급’이 51.8%로 가장 높았으며, ‘1+등급’은 2015년도부터 지속적으로 구입량이 증가하고 있는 추세이다. 하지만 ‘1등급’은 21.2%로 지속적으로 구입량이 감소하는 추세라고 보고 했다. 따라서 소비자들의 구입 선호도가 높은 1+등급 한우 등심(생육/조리육)과 1+등급 한우 우둔(생육/조리육)을 선정하여 다음 실험에 이용하였다.

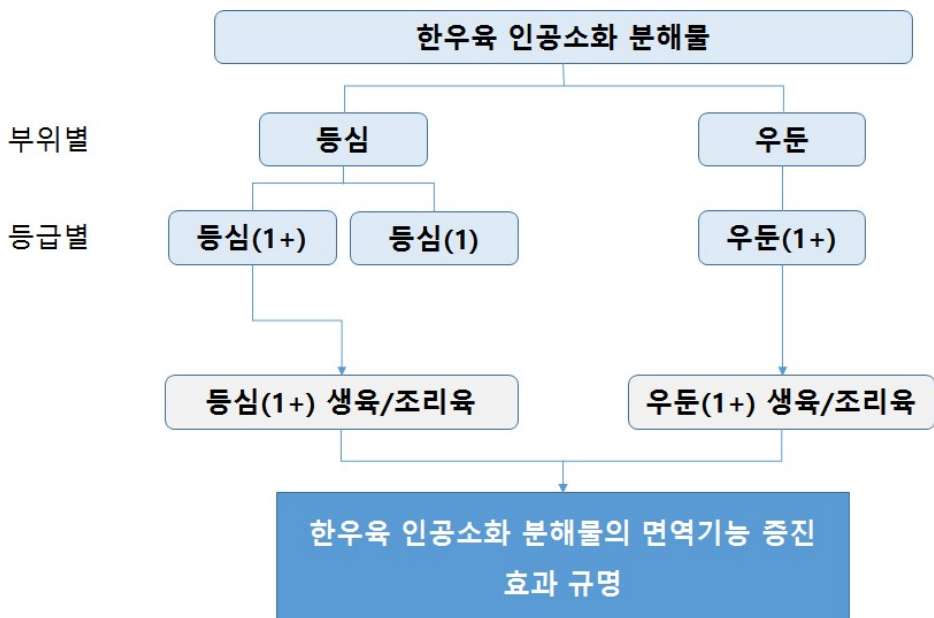


그림 4. 한우육 인공소화 분해물 선정 모식도

제2절. 한우육 인공소화 분해물의 면역기능 증진 효과 규명

1. 한우육 인공소화 분해물의 면역기능 증진 효과 규명

가. 대식세포(RAW 264.7)의 세포독성, 생존율 및 세포 형태 확인

(1) 세포 독성

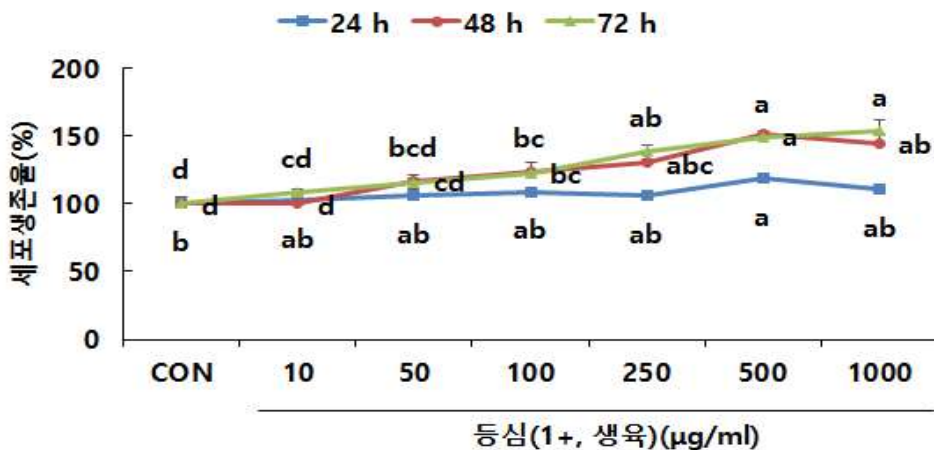


그림 5. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물의 대식세포에 대한 세포독성

^{a-d} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

대식세포는 NO, PGE₂, 그리고 각종 cytokine을 분비하며 면역을 조절하는데 중요한 역할을 한다(Iontcheva et al., 2004). 하지만 이러한 면역 물질들이 과잉 생산되었을 때에는 만성 염증, 자가면역질환 등이 발생할 수 있다(Kim et al., 2013).

한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 대식세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 농도별(10~1,000µg/ml)로 처리한 후 MTT assay 방법을 이용하여 세포 독성을 확인하였다(그림 5). 그 결과, 모든 농도에서 세포 독성을 보이지 않았으며, 1,000µg/ml 처리 시 각각 48, 72시간 배양 후 세포 생존율이 145.08과 153.84%을 보여 CON보다

유의적으로 세포 증식이 증가하였다.

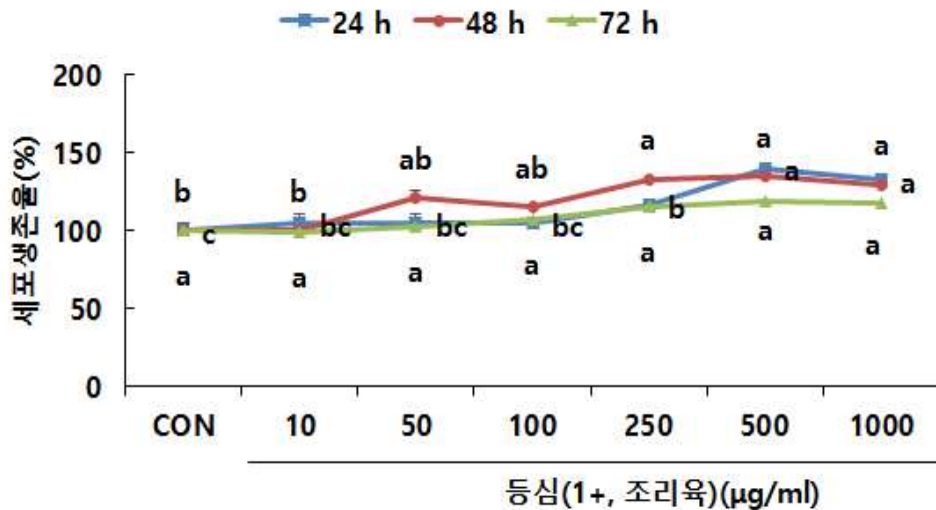


그림 6. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물의 대식세포에 대한 세포독성

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 대식세포에 미치는 영향을 확인한 결과(그림 6), 모든 농도에서 세포 독성을 보이지 않았으며, 1,000µg/ml 처리 시 각각 24, 48시간 배양 후 세포 생존율이 132.47과 129.75%을 보여 CON보다 유의적으로 세포 증식이 증가하였다.

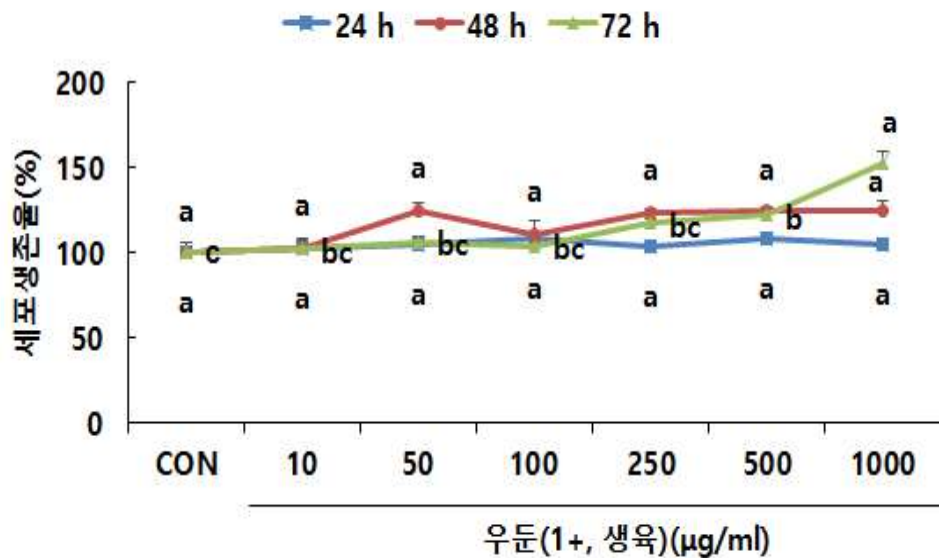


그림 7. 한우 우둔(1+, 생육) 인공소화 분해물의 대식세포에 대한 세포독성

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

한우 우둔(1+, 생육) 인공소화 분해물이 대식세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 농도별(10~1,000 μg/ml)로 처리한 후 MTT assay 방법을 이용하여 세포 독성을 확인하였다(그림 7). 모든 농도에서 세포 독성을 보이지 않았으며, 72시간 배양 후 1,000 μg/ml 농도에서 152.03%로 CON보다 유의적으로 세포 증식이 증가하였다.

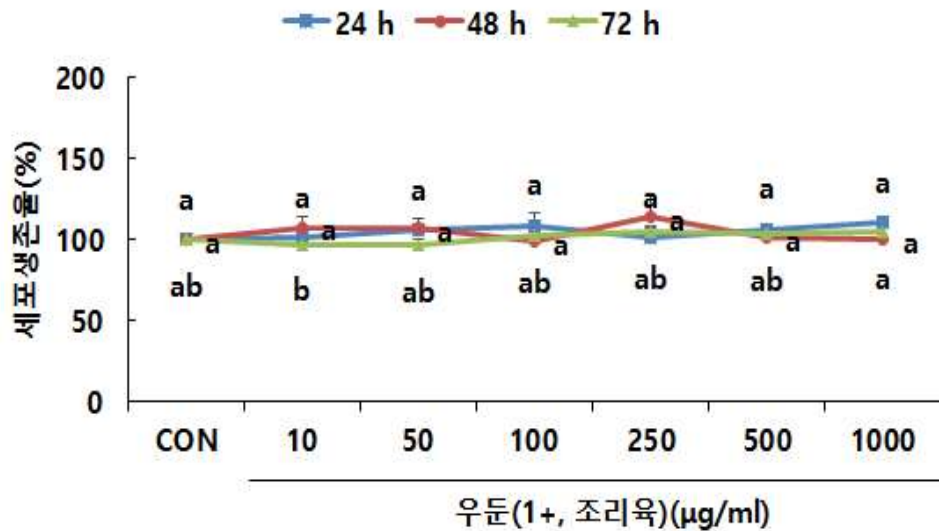


그림 8. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물의 대식세포에 대한 세포독성

^{a-b} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

한우 우둔(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 대식세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 농도별(10~1,000 µg/ml)로 처리한 후 MTT assay 방법을 이용하여 세포 독성을 확인하였다(그림 8). 한우 우둔(1+, 생육) 인공소화 분해물과 마찬가지로 모든 농도에서 세포 독성을 보이지 않았으며, 농도별로 세포 생존율의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

따라서 독성을 나타내지 않았던 농도 10, 50, 100, 250, 500 µg/ml의 농도로 한우 인공소화 분해물을 대식세포에 처리하여 LPS 처리에 따른 세포 생존율을 분석하였다.

(2) 세포형태 (morphology)

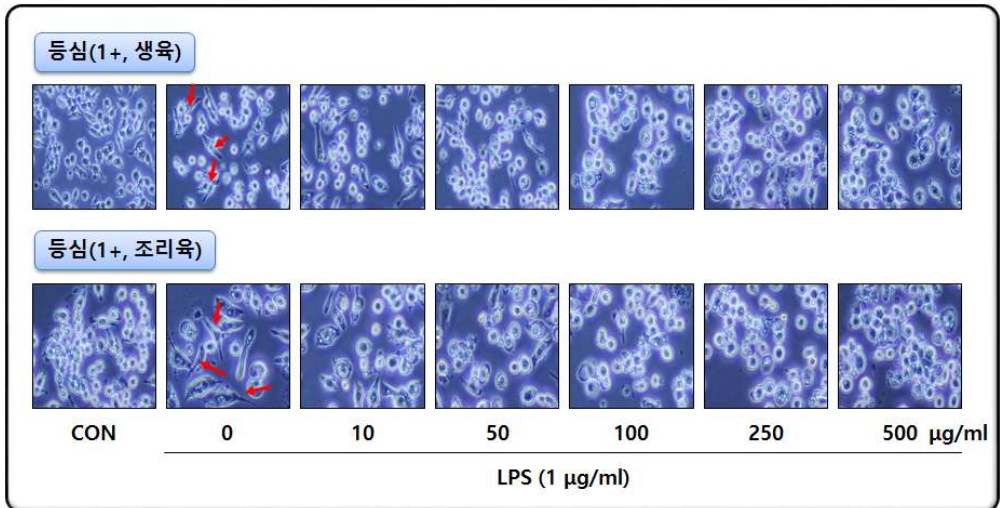


그림 9. 한우 등심(1+) 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 형태

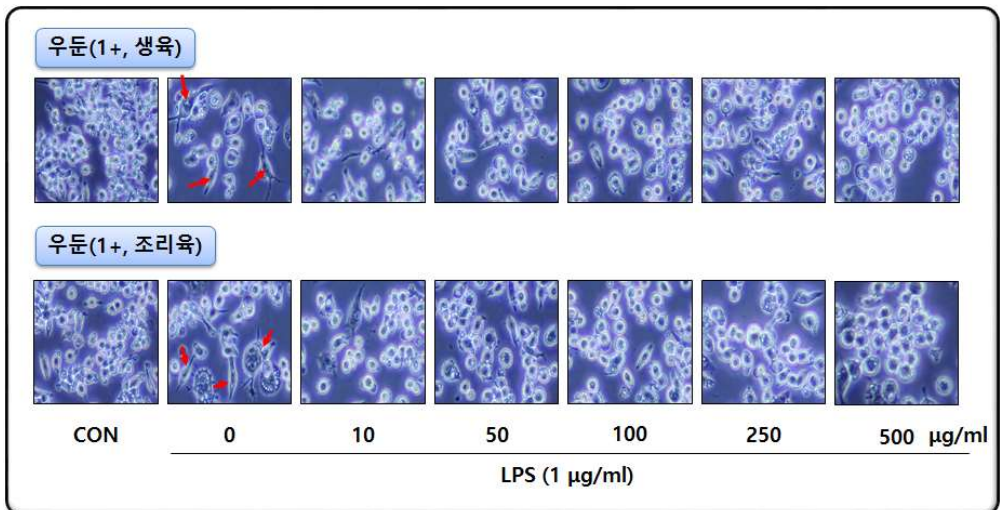


그림 10. 한우 우둔(1+) 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 형태

대식세포의 분화를 유도시키는 mitogen으로 LPS를 1µg/ml 농도로 처리하였을 때 전형적인 대식세포의 분화를 의미하는 형태학적 변화를

관찰할 수 있었다(화살표, 그림 9~10). 이후 한우 인공소화 분해물 처리에 의해 세포의 형태가 대조구(CON)와 유사하게 회복되는 것을 관찰하였다.

(3) 세포 생존율

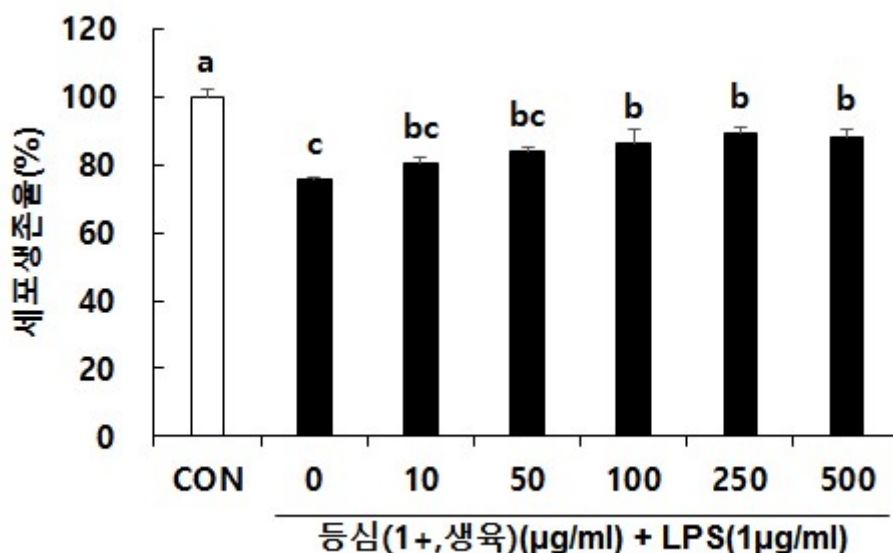


그림 11. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 생존율

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

MTT assay를 이용하여 LPS 처리로 인해 감소된 세포 생존율에 대한 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물의 영향을 확인하였다(그림 11). 그 결과, LPS 단독 처리 시 75.65%로 낮아진 세포 생존율을 최소 농도 $100\mu\text{g/ml}$ 에서 86.22%로 유의적으로 세포 생존율을 증가시켰다.

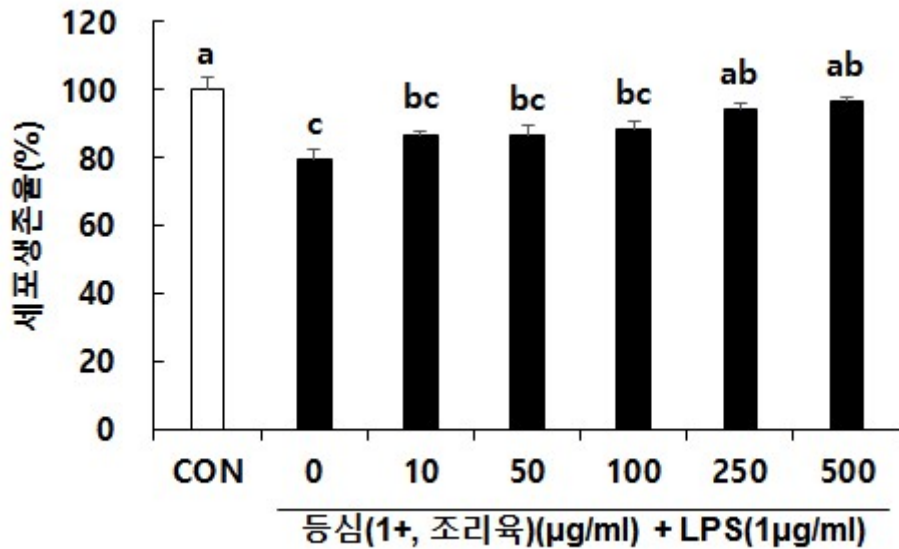


그림 12. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 생존율

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 대식세포 생존율에 미치는 영향을 확인한 결과(그림 12), LPS 단독 처리 시 79.52%로 낮아진 세포 생존율이 최소 농도 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 94.05%로 유의적으로 세포 생존율을 증가하였다. 또한 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리 시 각각 94.05, 96.60%으로 LPS를 처리하지 않은 대조구(CON)과 유의적인 차이를 보이지 않았다.

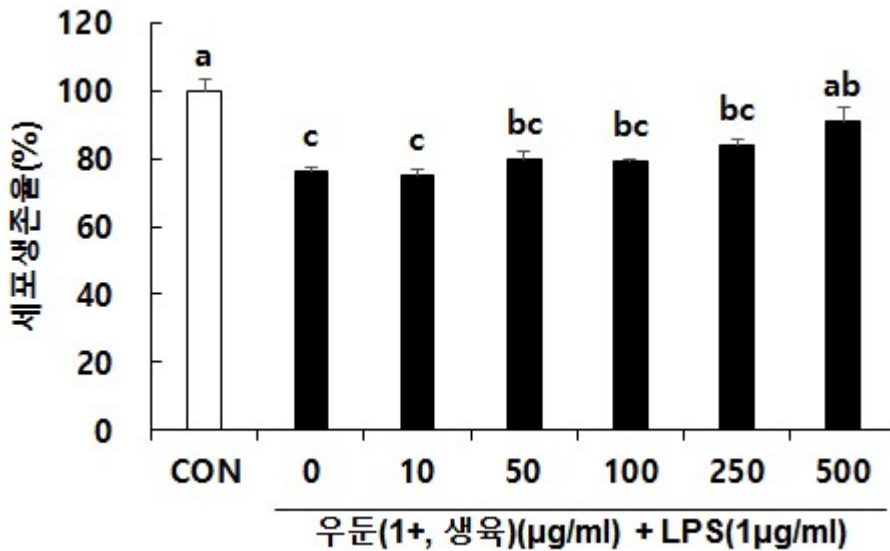


그림 13. 한우 우둔(1+, 생육) 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 생존율

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

한우 우둔(1+, 생육) 인공소화 분해물이 대식세포 생존율에 미치는 영향을 확인한 결과(그림 13), LPS 단독 처리 시 76.25%로 낮아진 세포 생존율이 500 μ g/ml에서 90.93%로 유의적으로 증가하였다.

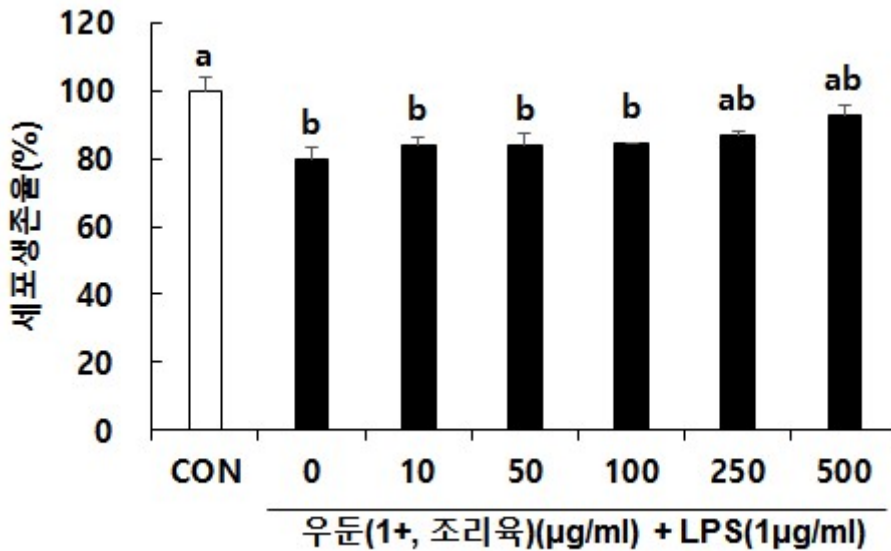


그림 14. 한우 우둔(1+, 조리육) 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 생존율

^{a-b} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

한우 우둔(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 대식세포 생존율에 미치는 영향을 확인한 결과는 그림 14에 나타내었다. LPS 단독 처리 시 79.97%로 세포 생존율이 감소하였으며, 한우 우둔(1+, 조리육) 인공소화 분해물 처리 시 유의적인 차이를 나타내지 않아 세포 회복 효과를 보이지 않았다.

표 14. 한우 인공소화 분해물 처리에 따른 대식세포 생존율

처리구	한우 인공소화 분해물($\mu\text{g/ml}$) + LPS($1\mu\text{g/ml}$)					
	0	10	50	100	250	500
등심 (1+, 생육)	100.00	106.49	110.89	113.98	118.30	116.75
등심 (1+, 조리육)	100.00	109.13	108.73	110.91	118.26	121.47
우둔 (1+, 생육)	100.00	98.57	104.40	103.74	110.16	119.25
우둔 (1+, 조리육)	100.00	104.87	104.87	105.67	108.43	116.10

한우 인공소화 분해물별로 대식세포 생존율(%)을 비교하기 위해 LPS만 단독처리한 처리구를 100%로 기준하여 나타내었다(표 14). LPS 단독 처리와 비교하였을 때 세포 생존율에 유의적인 차이를 보였던 최소 농도 $100\mu\text{g/ml}$ 를 기준으로 각 한우 인공소화 분해물의 세포 생존율을 비교하였다. 각각 113.98, 110.91, 103.74, 105.67%로 한우 등심(1+, 생육/조리육) 인공소화 분해물이 가장 높은 세포 생존율을 나타내었다.

한우 등심 부위는 조리여부와 상관없이 우둔 부위보다 유의적으로 높은 ABTS 라디칼 소거능 나타내었으며(표 10), 한우 등심(1+, 생육)과 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화분해물은 우둔 부위보다 각각 높은 FRAP 활성(표 11)과 ORAC 활성(표 12)을 나타내었다($p < 0.05$). 세포 생존율 또한 한우 등심(1+, 생육/조리육) 인공소화 분해물이 한우 우둔(1+, 생육/ 조리육)보다 높았다. 따라서 최종적으로 한우 등심(1+, 생육/조리육) 인공소화 분해물을 선정하여 NO, PGE_2 , 염증성 cytokine 억제율을 분석하였다.

나. 한우육 인공소화 분해물의 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), 염증성 cytokine 억제 효과

Mitogen의 일종인 LPS는 대식세포를 활성화 시켜 염증성 cytokine 들을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Funk et al., 1991; Willeaume et al., 1995). 또한 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A2의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO 형성 과정으로 이어지게 된다(Masferrer et al., 1994). 체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 PGE₂ 등의 염증인자가 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase (COX)에 의해 형성된다.

(1) Nitric oxide (NO)

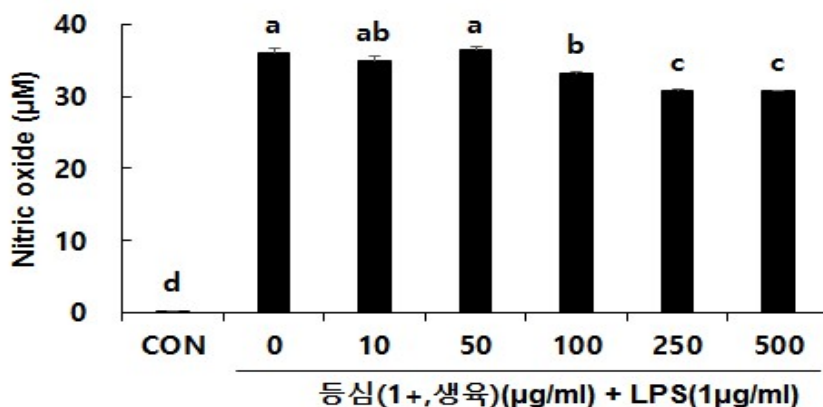


그림 15. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 NO 분비에 미치는 영향

^{a-d} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

NO는 NO 합성효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 무기 유리체로 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관 이완 등 여러 생물학적인 과정에 관여하며 농도에 따라 세포기능유지에 중요한 작용을 하기도 하지만 과생성 시 세포독성을 일으키기도 한다(Kim

et al., 2010). 항염증 활성을 측정하기 위해 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 LPS 자극에 의해 유도된 대식세포 내 NO 분비에 미치는 영향을 측정한 결과를 확인하였다(그림 15). 대식세포에 LPS(1 μ g/ml)를 처리하였을 때, 생성된 NO의 함량은 36.08 μ M로 LPS를 처리하지 않은 대조구(CON)에 비해 100배 이상 증가($p<0.05$)한 것으로 보아 LPS에 의한 염증반응이 충분히 활성화된 것을 확인하였다. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물을 농도별로 처리한 결과, 최소농도 100 μ g/ml에서 33.21 μ M로 NO 분비를 유의적으로 감소시켰다.

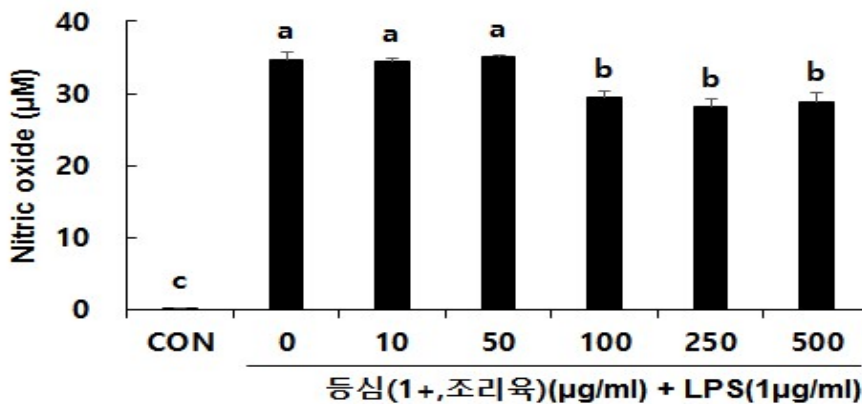


그림 16. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 NO 분비에 미치는 영향

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p<0.05$.

한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS 자극에 의해 유도된 대식세포 내 NO 분비에 미치는 영향을 측정한 결과(그림16), 대식세포에 LPS(1 μ g/ml)를 처리하였을 때 생성된 NO의 함량은 34.79 μ M로 LPS를 처리하지 않은 대조구(CON)에 비해 100배 이상 증가하였다($p<0.05$). 하지만 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물 100 μ g/ml 농도에서 29.42 μ M로 NO 분비를 유의적으로 감소시켰다.

(2) Prostaglandin E₂(PGE₂)

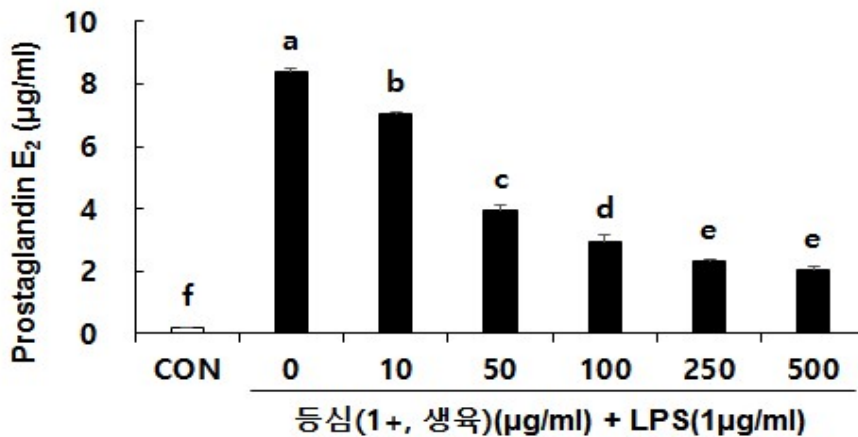


그림 17. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 PGE₂ 분비에 미치는 영향

^{a-f} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

PGE₂는 NO와 함께 염증성 질환의 병리기전에서 가장 중요한 염증 촉진물질 중의 하나이다. LPS 자극에 의해 유도된 대식세포 내 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물처리에 따른 PGE₂ 분비에 미치는 영향을 측정한 결과는 그림 17에 나타내었다. 그 결과, LPS 처리에 의해 PGE₂ 함량이 8.38µg/ml으로 LPS를 처리하지 않은 대조구(CON)에 비해 약 40배 증가하였다($p < 0.05$). 하지만 한우 등심(1+, 생육) 분해물 처리에 의해 농도 의존적으로 PGE₂ 분비를 감소시켰으며($p < 0.05$), 농도 250, 500µg/ml에서 각각 72.43, 75.43%의 감소율을 나타내었다.

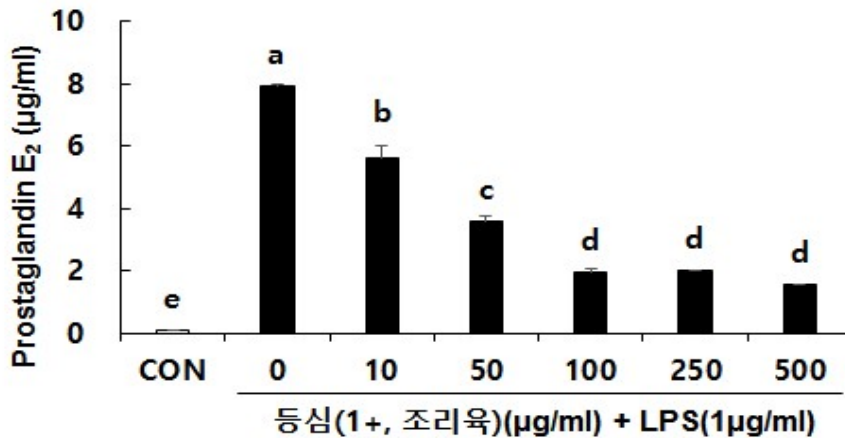


그림 18. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 PGE₂ 분비에 미치는 영향

^{a-e} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

LPS에 의해 자극된 대식세포에 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물을 처리하여 PGE₂ 분비에 미치는 영향을 측정한 결과(그림 18), 그림 17의 결과와 마찬가지로 대조구에 비해 LPS 처리에 의해 PGE₂ 함량이 7.90µg/ml으로 증가하였다($p < 0.05$). 이후 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물 처리에 의해 농도 의존적으로 PGE₂ 분비를 감소시켰으며($p < 0.05$), 농도 100~500µg/ml에서 각각 75.15, 74.70, 80.56%의 감소율을 나타내었다.

(3) 염증성 cytokine

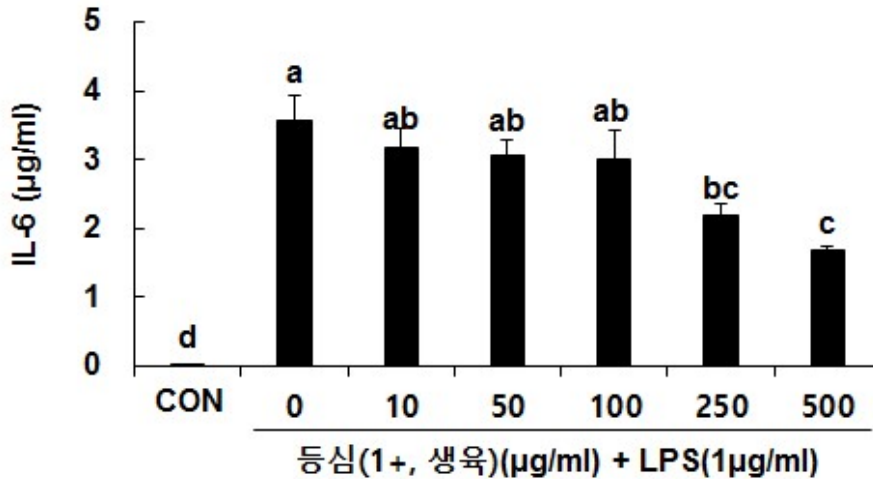


그림 19. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 IL-6 분비에 미치는 영향

^{a-d} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

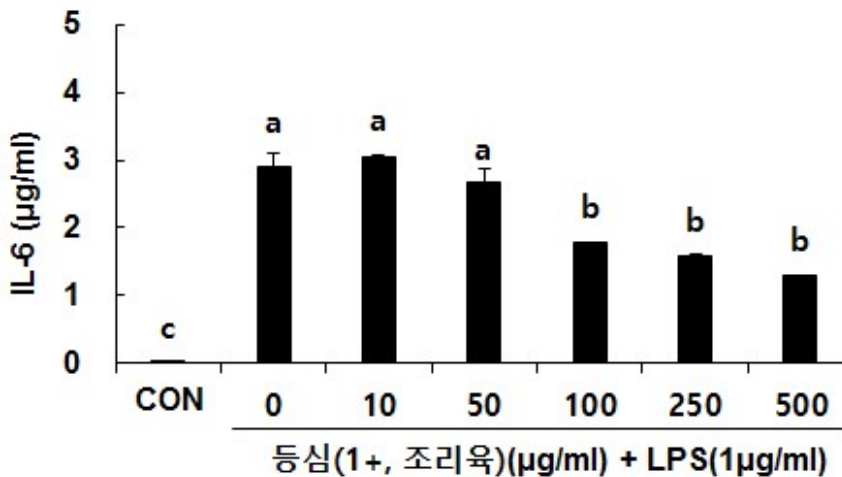


그림 20. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 IL-6 분비에 미치는 영향

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

대식세포가 LPS 자극에 의해 활성화될 때 IL-6와 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인을 분비하며, 이들 사이토카인은 염증반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Tsai et al., 2011).

한우 등심 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 IL-6 분비에 미치는 영향을 살펴본 결과(그림 19~20), LPS만 단독으로 처리(1 μ g/ml)한 처리구에서 IL-6 함량이 2.89~3.75 μ g/ml로 LPS를 처리하지 않은 대조구(CON)에 비해 증가하였다($p < 0.05$). 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물을 농도별로 처리한 결과, 최소농도 250 μ g/ml에서 2.18 μ g/ml으로 IL-6 함량을 유의적으로 감소시켰다. 또한 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물 처리 시 최소농도 100 μ g/ml에서 1.78 μ g/ml으로 IL-6 함량을 유의적으로 감소시켰다.

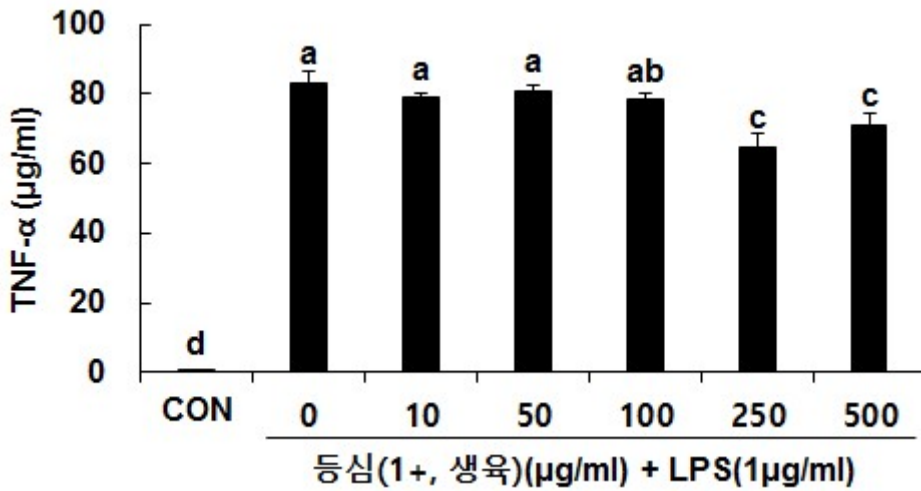


그림 21. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 TNF- α 분비에 미치는 영향

^{a-d} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

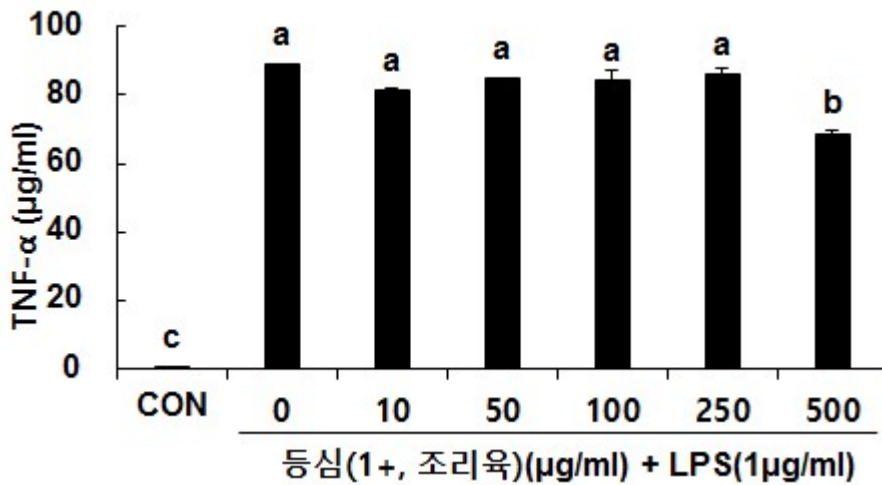


그림 22. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 TNF- α 분비에 미치는 영향

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

한우 등심 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 TNF- α 분비에 미치는 영향을 알아본 결과(그림 21~22), LPS 1 μ g/ml로 처리한 처리구에서 TNF- α 함량이 83.31~88.80 μ g/ml로 LPS를 처리하지 않은 대조구(CON)에 비해 증가하였다($p<0.05$). 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물 처리 시 최소농도 250 μ g/ml에서 64.84 μ g/ml로 유의적으로 TNF- α 함량을 감소시켰으며, 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물 처리 시 500 μ g/ml에서 68.82 μ g/ml로 유의적으로 TNF- α 함량을 감소시켰다.

따라서 한우 등심 인공소화 분해물을 LPS로 인해 증가된 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF- α 함량을 감소시켜 항염증 효과를 보이는 것으로 사료된다.

(4) 한우육 인공소화 분해물의 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), 염증성 cytokine 비교 분석

표 15. 한우육 인공소화 분해물 처리에 의한 대식세포의 NO, PGE₂, IL-6, TNF- α 분비율

(%)	처리구	한우 인공소화 분해물($\mu\text{g/ml}$) + LPS($1\mu\text{g/ml}$)					
		0	10	50	100	250	500
NO	등심 (1+, 생육)	100.00	97.05	100.99	92.03	85.49	85.35
	등심 (1+, 조리육)	100.00	99.04	100.87	84.56	80.77	83.08
PGE ₂	등심 (1+, 생육)	100.00	83.97	47.21	35.36	27.57	24.57
	등심 (1+, 조리육)	100.00	70.86	45.00	24.85	25.30	19.44
IL-6	등심 (1+, 생육)	100.00	88.93	85.44	84.41	61.19	46.99
	등심 (1+, 조리육)	100.00	105.54	91.98	61.42	54.63	44.71
TNF- α	등심 (1+, 생육)	100.00	94.59	97.01	94.02	77.83	85.35
	등심 (1+, 조리육)	100.00	91.56	95.59	94.87	96.96	77.49

한우 인공소화 분해물별로 NO, PGE₂, IL-6, TNF- α 분비율(%)을 비교하기 위해 LPS만 단독처리한 처리구를 100%로 기준하여 나타내었다(표 15). LPS 단독처리구와 유의적으로 차이가 난 최소농도를 기준으로 비교하였다. NO, PGE₂, IL-6의 경우 각각의 최소 농도인 100, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 모두 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 억제율이 높았다. 반면에 TNF- α 의 경우 최소농도 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 TNF- α 억제율이 높았다. 따라서 생육 보다는 조리육이 대식세포에 대한 항염증 효과가 큰 것으로 사료된다.

2. 한우육 인공소화 분해물의 면역기능 증진 메커니즘 규명

가. Lipopolysaccharide(LPS)로 활성화된 대식세포 내 염증성 단백질 (iNOS, COX-2) 발현

iNOS는 외부자극이나 염증성 사이토카인 등에 의하여 자극을 받으면 hepatocytes, smooth muscle cells, bone marrow cells, monocytes, macrophages 등 다양한 세포에서 발현이 급격히 증가되어 다량의 NO를 합성한다(Kim et al., 2012). COX는 arachidonic acid를 PGE₂로 전환시키는 효소로 그 중 COX-2는 염증성 사이토카인, 자외선, 독소 등 염증반응을 촉진하는 자극이 주어졌을 때 단기간에 과발현되어 PGE₂의 생성을 증가하게 하는 효소이다(Kim et al., 2013). 따라서 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하는 것은 염증반응 억제할 수 있는 메커니즘으로 작용할 수 있다.

본 연구 결과 LPS를 처리한 대식세포에서 한우 등심(1+) 인공소화 분해물이 NO와 PGE₂ 분비량을 유의하게 억제시켰는데, 이러한 결과가 iNOS와 COX-2의 합성 저해로 인한 것인지 그 메커니즘을 규명하기 위해 한우 등심 인공소화 분해물을 대식세포에 처리 후 western blot 분석을 시행하였다.

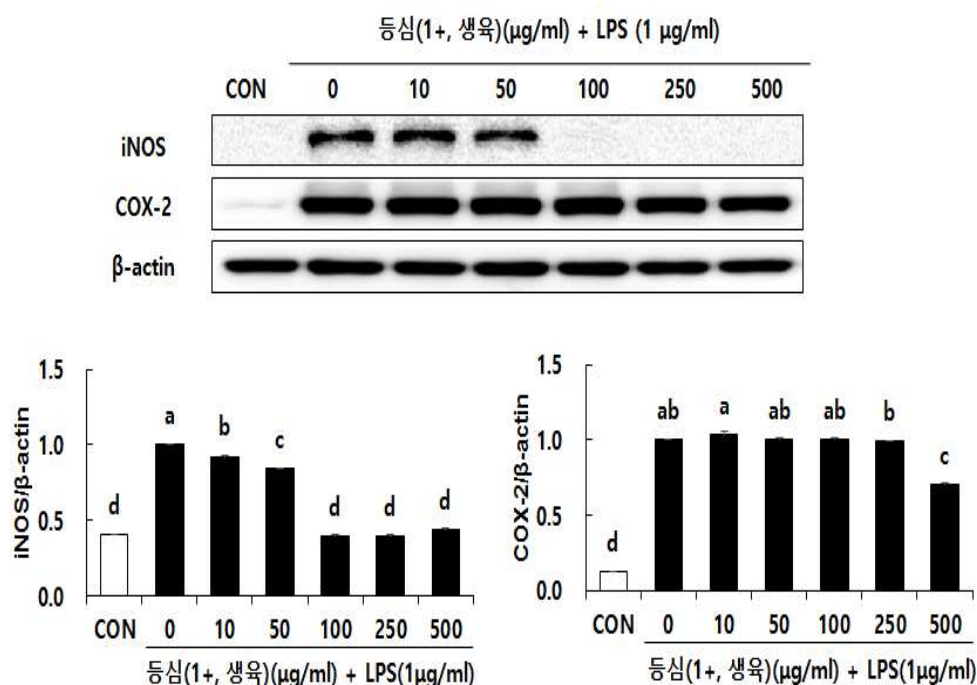


그림 23. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 염증성 단백질(iNOS, COX-2) 발현에 미치는 영향

^{a-d} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

LPS를 처리하지 않은 대조구(CON)에서는 염증성 단백질인 iNOS와 COX-2 단백질이 거의 발현되지 않았으나 LPS를 처리한 처리구에서는 iNOS와 COX-2 단백질 합성량이 크게 상승하였다(그림 23). 하지만 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물을 농도별로 처리함에 따라 최소저해 농도 $10\mu\text{g/ml}$ 에서 iNOS 발현이 감소하기 시작하였으며, $100\sim 500\mu\text{g/ml}$ 에서 정상 대조구(CON)과 유사한 효과를 나타내었다. COX-2의 경우 $500\mu\text{g/ml}$ 에서 유의적으로 COX-2 발현을 감소시켰다.

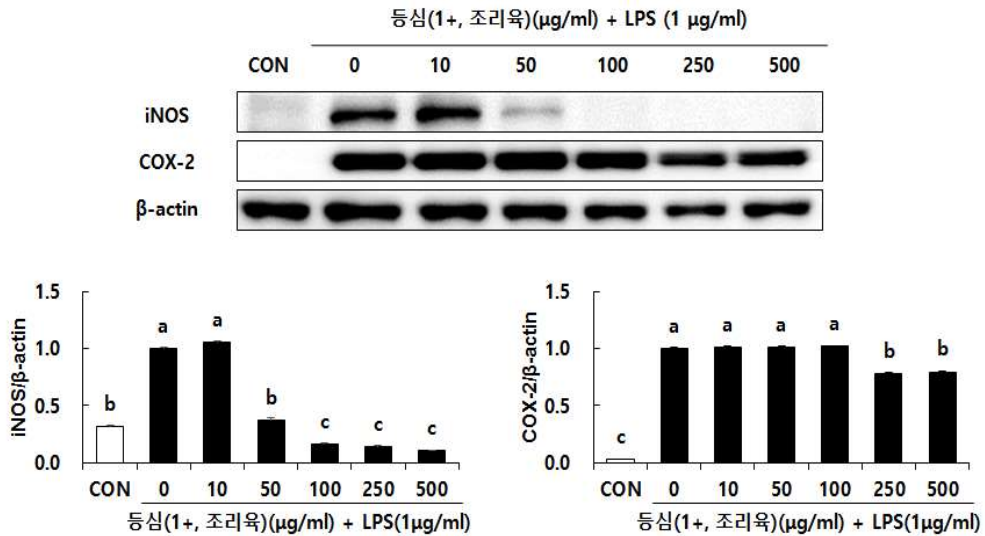


그림 24. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 염증성 단백질(iNOS, COX-2) 발현에 미치는 영향

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 염증성 단백질 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, CON에서는 iNOS와 COX-2 단백질이 거의 보이지 않았으나 LPS를 처리한 처리구에서는 iNOS와 COX-2 단백질 합성량이 매우 크게 상승하였다. 하지만 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물을 농도별로 처리함에 따라 최소저해 농도 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 iNOS 발현이 감소하기 시작하였으며, 100~500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 LPS 대조구 보다 유의적으로 낮은 단백질 발현을 나타내었다. COX-2의 경우 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 COX-2의 발현을 감소 시켰다($p < 0.05$).

따라서 한우 등심 인공소화 분해물은 대식세포에서 LPS에 의해 증가한 염증성 단백질인 iNOS와 COX-2의 합성을 억제함으로써 NO와 PGE₂의 생성을 감소시키는 효과가 유도되었다는 것을 확인 하였다. 뿐만 아니라 염증성 단백질의 발현을 억제함으로 항염증 효과를 보이는 것으로 사료된다.

나. Lipopolysaccharide(LPS)로 활성화된 대식세포 내 MAPKs pathway(JNK, ERK, p38)의 인산화 단백질 발현

인체 내 대식세포에 존재하는 단백질은 LPS와 같은 외부 항원을 인식하여 NO, PGE₂, 그리고 TNF- α , IL-6와 같은 염증성 사이토카인 등 염증 매개인자를 생성하게 된다. 이러한 염증 신호는 세포 내 다양한 신호전달 분자들을 활성화 시키며, 이 중 mitogen-activated protein kinase(MAPK)는 nuclear factor- κ B(NF- κ B), activator protein-1(AP-1), activating transcription factor-2, cAMP-responsive element binding protein를 포함한 다양한 전사인자들의 serine 및 threonine 잔기에 인산화를 통하여 활성화시키는 핵심 신호전달 분자로 보고되고 있다(Dong et al., 2002). 또한 MAPK는 세포 증식, 분화, 생존과 사멸 등을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있으며, 대식세포에 염증 유도 시 활성화된 MAPK는 조직 및 인체에 손상을 줄 수 있다.

MAPK는 3가지 신호전달경로를 포함하는데 활성화된 ERK는 다양한 전사인자를 인산화 할 수 있으며, p38과 JNK는 염증성 사이토카인 같은 인자에 의한 세포 스트레스에 의해 활성화 된다(Robinson & Cobb, 1997). 특히 JNK 신호전달경로는 LPS와 TNF- α 와 같은 면역 염증자극에 반응하는 세포에서 활성화되고, 세포의 형태적 증대와 사이토카인 전사를 활성화 시킬 수 있다(Waetzig et al., 2005).

본 연구결과 한우 등심(1+) 인공소화 분해물이 NO, PGE₂, 그리고 TNF- α , IL-6와 같은 염증 매개인자를 억제하는 것을 확인하였으며, 이는 염증성 단백질인 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제를 통한 것임을 확인하였다. 따라서 한우 등심(1+) 인공소화 분해물이 염증과 관련된 신호전달 체계 즉, MAPKs pathway(JNK, ERK, p38)의 활성화에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

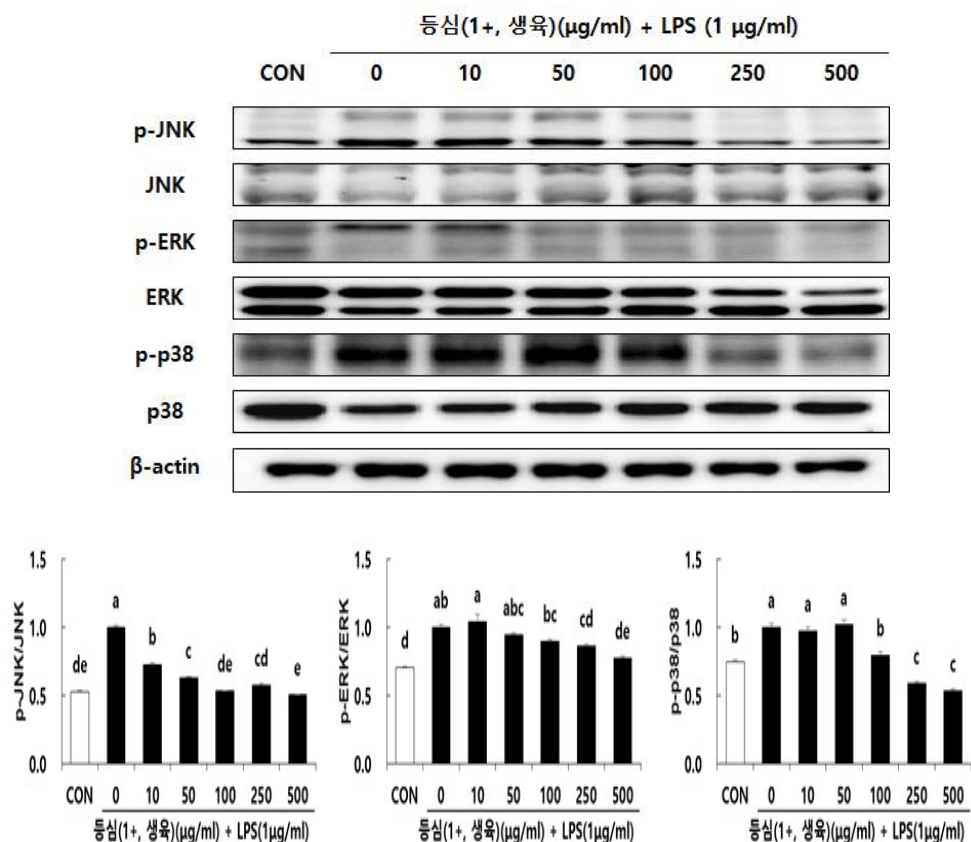


그림 25. 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 MAPK 인산화 단백질 발현에 미치는 영향

^{a-e} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

LPS로 자극한 대식세포에 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물이 JNK, ERK, p38의 인산화에 미치는 영향을 살펴본 결과, LPS를 처리하지 않은 대조구(CON) 보다 LPS로 자극한 세포에서 p-JNK, p-ERK, p-p38의 발현이 유의적으로 증가하였다(그림 25). 한우 등심(1+, 생육) 인공소화 분해물 처리에 따라 농도 의존적으로 JNK, ERK, p38의 인산화를 억제시켰다($p < 0.05$). 특히 JNK의 경우 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의적으로 인산화가 억제되었다.

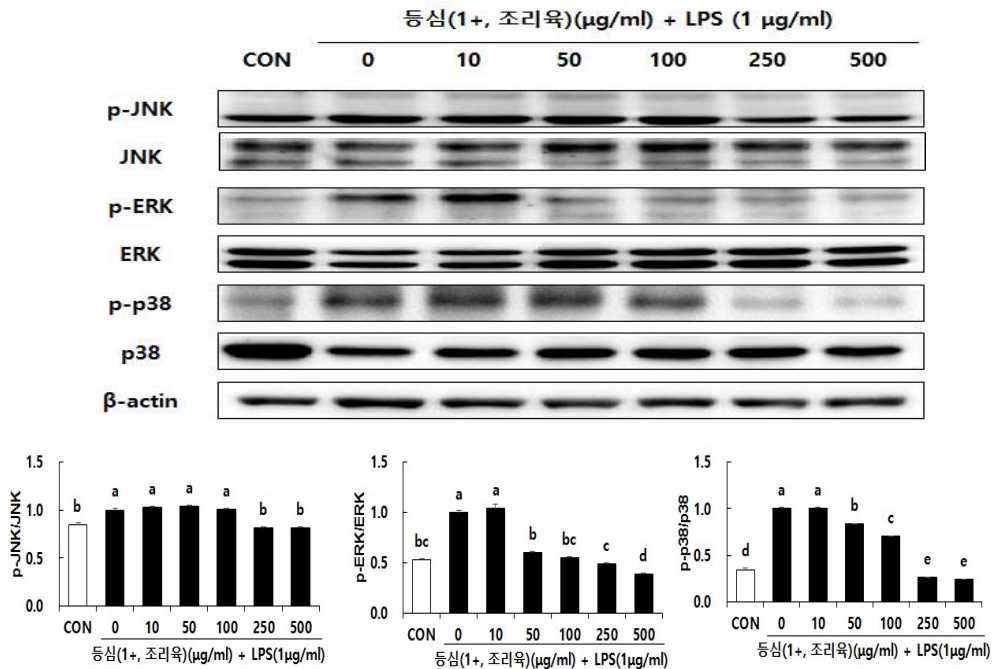


그림 26. 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 LPS를 처리한 대식세포 내 MAPK 인산화 단백질 발현에 미치는 영향

^{a-e} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

LPS로 자극한 대식세포에 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물이 JNK, ERK, p38의 인산화에 미치는 영향을 살펴본 결과, 그림 25의 결과와 마찬가지로 LPS를 처리하지 않은 대조구(CON) 보다 LPS로 자극한 세포에서 p-JNK, p-ERK, p-p38의 발현이 유의적으로 증가하였다(그림 26). 한우 등심(1+, 조리육) 인공소화 분해물 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리함에 따라 JNK의 인산화가 유의적으로 억제되었다. 또한 ERK와 p38의 인산화를 농도 의존적으로 억제시켰다($p < 0.05$).

따라서 한우 등심 인공소화 분해물은 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 MAPK pathway를 억제할 수 있는 것으로 판단된다.

제3절. 한우육 급여가 실험동물의 면역기능 개선에 미치는 영향 규명

1. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 면역기능 증진 효과 규명

가. 실험동물의 생체지표 변화에 미치는 영향 확인

(1) 체중, 사료 섭취량 및 식이 효율

표 16. 한우육 급여 처리구(면역기능 증진 효과 규명)

순번	처리구(n=12)	식이사료
1	대조구	AIN-93G
2	등심(생육)5%	AIN-93G + 등심(1+) 생육 5%
3	등심(생육)10%	AIN-93G + 등심(1+) 생육 10%
4	등심(조리육)5%	AIN-93G + 등심(1+) 조리육 5%
5	등심(조리육)10%	AIN-93G + 등심(1+) 조리육 10%

한우육 급여에 따른 실험동물의 면역기능 증진 효과 규명을 위해 BALB/c 마우스 숫컷 60마리를 이용하였다. 실험동물은 일주일간 적응 후 표 16과 같이 5개의 처리구로 나누어 총 8주간 저농도(5%) 또는 고농도(10%)로 한우 등심(1+)을 급여하였다(그림27).

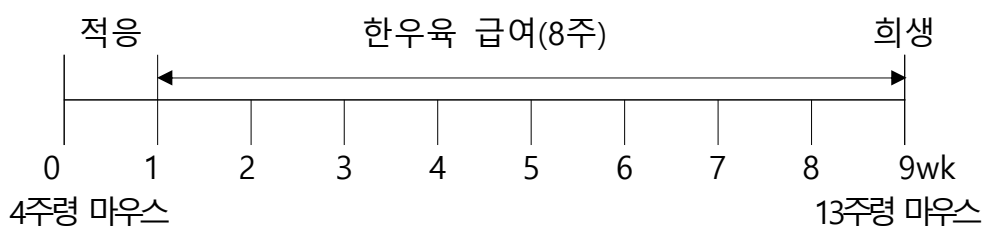


그림 27. 한우육 급여에 따른 실험동물의 면역기능 증진 효과 규명 실험설계

표 17. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 실험동물의 체중, 사료섭취량 및 식이 효율에 미치는 영향

처리구	초기체중 (g)	최종체중 (g)	체중증가량 (g/day)	사료섭취량 (g/day)	식이효율 ¹⁾
대조구	21.35	28.67	0.12	3.17	0.04
등심(생육)5%	21.25	28.85	0.12	3.69	0.03
등심(생육)10%	21.03	28.20	0.12	3.39	0.03
등심(조리육)5%	20.80	28.23	0.12	3.29	0.04
등심(조리육)10%	20.70	28.23	0.12	3.12	0.04
SEM ²⁾	0.183	0.270	0.003	0.116	0.002

¹⁾ 식이효율 = 체중증가량(g/day)/식이섭취량(g/day)

²⁾ SEM : standard error of means

한우육 급여가 실험동물의 체중, 사료섭취량 및 식이효율에 미치는 영향은 표 17에 나타내었다. 실험동물의 초기 체중은 20.70~21.35g으로 처리구 별로 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 8주간 한우육을 급여한 후 최종 체중은 28.20~28.85g으로 한우육의 급여는 실험동물의 체중 변화에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 하루 평균 사료 섭취량은 3.12~3.69g/day 였으며, 사료섭취량과 식이효율 모두 처리구 간 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

(2) 장기 무게

표 18. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 실험동물의 장기무게에 미치는 영향(%)

처리구	비장 ¹⁾	흉선	간	신장	고환
대조구	0.26	0.10	3.63	1.45	0.68
등심(생육)5%	0.25	0.11	3.67	1.40	0.70
등심(생육)10%	0.24	0.11	3.75	1.38	0.71
등심(조리육)5%	0.24	0.10	3.71	1.41	0.71
등심(조리육)10%	0.26	0.11	3.61	1.37	0.71
SEM ²⁾	0.007	0.006	0.078	0.029	0.010

¹⁾ 장기무게(%) = 장기무게(g)/체중(g)×100

²⁾ SEM : standard error of means

한우육의 급여가 실험동물의 장기무게에 미치는 영향은 표 18에 나타내었다. 비장, 흉선, 간, 신장, 고환 장기 모두 한우육 급여 처리구와 대조구간의 유의적인 차이는 없었다. 따라서 5~10% 농도의 한우육 급여는 실험동물의 장기에 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다.

나. 실험동물의 지질대사에 미치는 영향 확인

(1) 혈청 내 지질 성분

표 19. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 실험동물의 혈청 내 지질성분에 미치는 영향

처리구	지질성분(mg/dl)			
	TC ¹⁾	TG	HDL-C	LDL-C ²⁾
대조구	158.60 ^a	94.11 ^a	104.45 ^a	36.28 ^a
등심(생육)5%	146.12 ^{ab}	87.09 ^{ab}	104.37 ^a	27.06 ^a
등심(생육)10%	152.80 ^{ab}	75.33 ^{ab}	114.24 ^a	23.50 ^a
등심(조리육)5%	136.72 ^b	65.80 ^b	100.97 ^a	22.59 ^a
등심(조리육)10%	147.83 ^{ab}	66.78 ^b	107.74 ^a	26.74 ^a
SEM ³⁾	4.689	4.996	4.046	3.695

^{a-b} Means within a column with different superscript differ significantly at $p<0.05$.

¹⁾ TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol

²⁾ LDL-C = TC-HDL-TG/5

³⁾ SEM : standard error of means

한우육 급여가 혈청 내 지질성분에 미치는 영향을 분석한 결과 (표 19), 등심(조리육) 5% 처리구가 혈청 내 TC 함량을 대조구에 비해 유의적으로 감소하였다. 뿐만 아니라 등심(조리육) 5, 10% 처리구의 혈청 TG 함량이 대조구보다 유의적으로 낮았다. 하지만 혈청 내 HDL-C와 LDL-C은 처리군 별로 차이를 보이지 않았다.

(2) 분변 내 지질 성분

표 20. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 실험동물의 분변 내 지질 성분에 미치는 영향

처리구	지질성분(mg/dl)			
	TC ¹⁾	TG	HDL-C	LDL-C ²⁾
대조구	124.60 ^a	35.56 ^b	8.26 ^a	109.23 ^a
등심(생육)5%	123.45 ^a	36.13 ^b	7.50 ^a	108.85 ^a
등심(생육)10%	119.74 ^a	40.93 ^{ab}	7.16 ^a	104.40 ^a
등심(조리육)5%	123.07 ^a	43.05 ^a	8.01 ^a	106.45 ^a
등심(조리육)10%	124.45 ^a	39.40 ^{ab}	7.24 ^a	109.34 ^a
SEM ³⁾	1.221	1.261	0.526	1.255

^{a-b} Means within a column with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol

²⁾ $LDL-C = TC - HDL - TG/5$

³⁾ SEM : standard error of means

한우육 급여가 분변으로 배출되는 지질성분에 미치는 영향을 분석한 결과는 표 20에 나타내었다. 한우육 급여로 인해 분변으로 배출되는 TG, HDL-C과 LDL-C의 함량에 영향을 끼치지 않았다. 하지만 등심(조리육) 5% 처리구에서 분변 내 TG 함량을 대조구보다 유의적으로 증가시켰다. 이는 앞에서 말한 혈청 내 TG 함량이 감소하는 것과 일치하는 결과(표 16)로 혈청 내 TG의 감소는 분변으로의 배출 때문인 것으로 사료된다.

다. 실험동물 비장으로부터 분리한 비장세포의 증식능 확인

□대조구 ▨등심(생육)5% ▩등심(생육)10% ▪등심(조리육)5% ■등심(조리육)10%

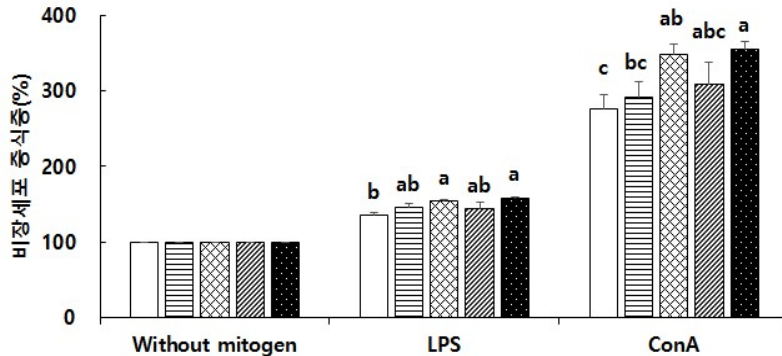


그림 28. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 마우스로부터 분리한 비장세포 증식능에 미치는 영향

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$. LPS(Lipopolysaccharide) 2.5 μ g/ml, ConA(Concanavalin A) 2.5 μ g/ml

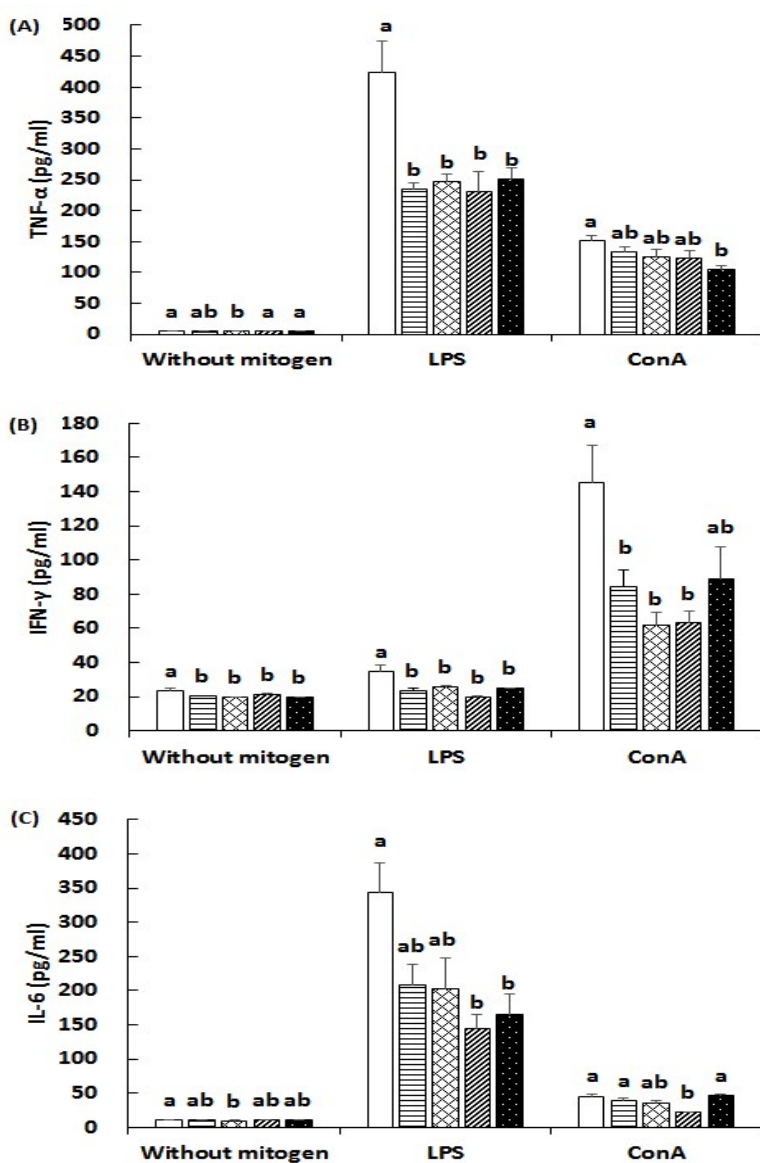
한우육 급여가 마우스 비장세포 증식능에 미치는 영향을 알아보기 위해 한우육을 8주간 급여한 뒤 비장세포를 분리하여 실험에 이용하였다. 비장세포를 활성화시키기 위해 B세포 mitogen인 LPS 2.5 μ g/ml와 T세포 mitogen인 ConA 2.5 μ g/ml 처리하였으며, mitogen을 처리하지 않은 흡광도를 100%로 하여 비교하였다.

그 결과는 그림 28과 같다. LPS와 ConA를 처리한 경우 대조구에서 각각 135.87, 276.83%로 증가하였다($p < 0.05$). 한우육 급여 처리구는 LPS 처리 시 등심(생육) 10% 처리구와 등심(조리육) 10% 처리구가 각각 153.58과 158.36%로 증가하였다($p < 0.05$). 또한 ConA 처리시 등심(생육, 조리육) 10% 처리구에서 각각 348.70%와 355.65%로 유의적으로 증가하였다. 따라서 10% 한우 등심(생육, 조리육)의 급여는 실험동물의 비장 세포의 활성을 촉진시켜 면역 활성 효과가 있는 것으로 판단된다.

라. Lipopolysaccharide(LPS)자극에 따른 Th1과 Th2 cytokine의 분비량

(1) Th1 cytokine (pro-inflammatory cytokine)

□대조구 ▨등심(생육)5% ▩등심(생육)10% ▤등심(조리육)5% ■등심(조리육)10%



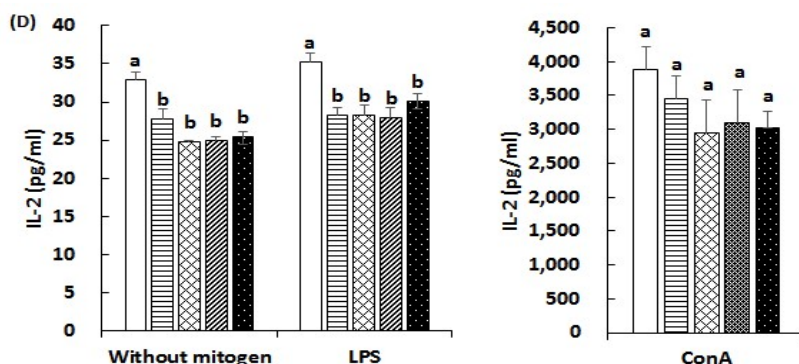


그림 29. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 마우스로부터 분리한 비장세포 Th1 cytokine 분비능에 미치는 영향

^{a-b} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$. LPS(Lipopolysaccharide) 2.5 μ g/ml, ConA(Concanavalin A) 2.5 μ g/ml

Cytokine은 면역세포로부터 분비되는 단백질로서 표적세포에 신호를 전달하여 면역반응의 활성화에 중요한 역할을 담당하고 있다. 특히 T 림프구 CD4+ 수용체가 면역반응에 의해 활성화 되어 분비되는 cytokine 종류에 따라 T helper type 1(Th1) 세포와 T helper type 2 (Th2) 세포로 나누어진다. Th1 세포에서 분비는 cytokine으로 IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α 등이 있으며, 염증성 cytokine으로서 세포 독성을 나타내며 세포성 면역 반응에 관여한다. Th2 세포에서 분비되는 cytokine으로 IL-4, IL-5, IL-10 등이 있으며, 체액성 면역 반응 조절 및 Th1 세포 활성 억제능을 가지고 있다(Mosmann et al., 2005).

한우육 급여에 따른 비장세포 Th1 cytokine 분비에 미치는 영향을 분석한 결과는 그림 29에 나타내었다. mitogen을 처리 하지 않은 한우육 급여 처리구의 Th1 cytokine 분비능은 대조구와 유사하거나 낮았다. 이 후 LPS와 ConA로 활성화 하였을때, TNF- α 생성량은 LPS를 처리했을 때 한우육 급여 처리구가 유의적으로 감소하였으며, ConA 처리 시 등심(조리육) 10% 처리구에서 유의적으로 감소하였다(그림 29A). IFN- γ 생성량은 LPS 처리 시 한우육 급여 처리구가

모두 유의적으로 감소하였으며, ConA 처리시 등심(생육) 5, 10%와 등심(조리육) 10% 처리구가 유의적으로 감소하였다(그림 29B). IL-6의 경우 LPS 처리 시 등심(조리육) 5, 10% 처리구에서 유의적으로 감소하였으며, ConA 처리 시 등심(조리육) 5% 처리구에서 유의적으로 감소하였다(그림 29C). IL-2는 LPS 처리하였을 때 한우 등심(생육, 조리육) 처리구가 모두 유의적으로 감소하였으며, ConA 처리 시 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았다(그림 29D). 따라서 한우육의 급여는 실험동물의 비장 세포에 LPS와 ConA와 같은 외부 자극이 주어졌을 때 염증성 cytokine인 Th1 cytokine 분비를 감소시키는 효과를 나타내었다.

(2) Th2 cytokine (anti-inflammatory cytokine)

□ 대조구 ▨ 등심(생육)5% ▩ 등심(생육)10% ▪ 등심(조리육)5% ■ 등심(조리육)10%

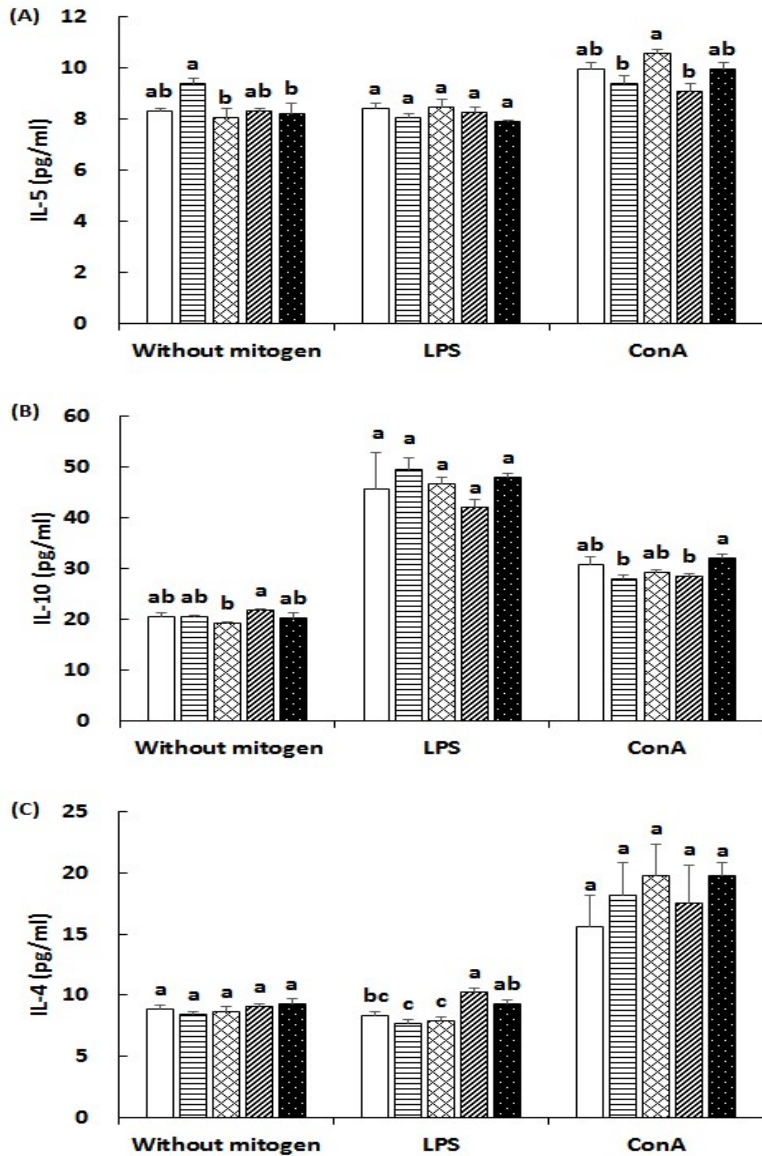


그림 30. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 마우스로부터 분리한 비장세포 Th2 cytokine 분비능에 미치는 영향

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.
LPS(Lipopolysaccharide) 2.5 μ g/ml, ConA(Concanavalin A) 2.5 μ g/ml

한우육 급여에 따른 비장세포 Th2 cytokine 증식에 미치는 영향을 분석한 결과는 그림 30에 나타내었다. Th2 cytokine 또한 mitogen을 처리 하지 않은 한우육 급여 처리구가 대조구와 유사한 Th2 cytokine 분비능을 나타내었다. Th2 cytokine의 경우 LPS와 ConA 처리 시 한우육 급여 처리구에서 큰 변화를 보이지 않았으나, 등심(조리육) 5% 처리구가 유의적으로 IL-4 함량을 증가시켰다(그림 30C). Th2 cytokine은 체내에서 Th1 cytokine의 생성을 조절하여 항염증 cytokine으로도 불리며, 활성화 될 시 B림프구를 활성화 시키고 체액성 면역을 유도하는 것으로 알려져 있다(Seo et al., 2013). 따라서 한우 등심(조리육)을 5% 급여 시 실험동물의 체액성 면역을 활성화 시키는 것으로 판단된다.

(3) Th1/Th2 cytokine 비율

□ 대조구 ▨ 등심(생육)5% ▩ 등심(생육)10% ▪ 등심(조리육)5% ■ 등심(조리육)10%

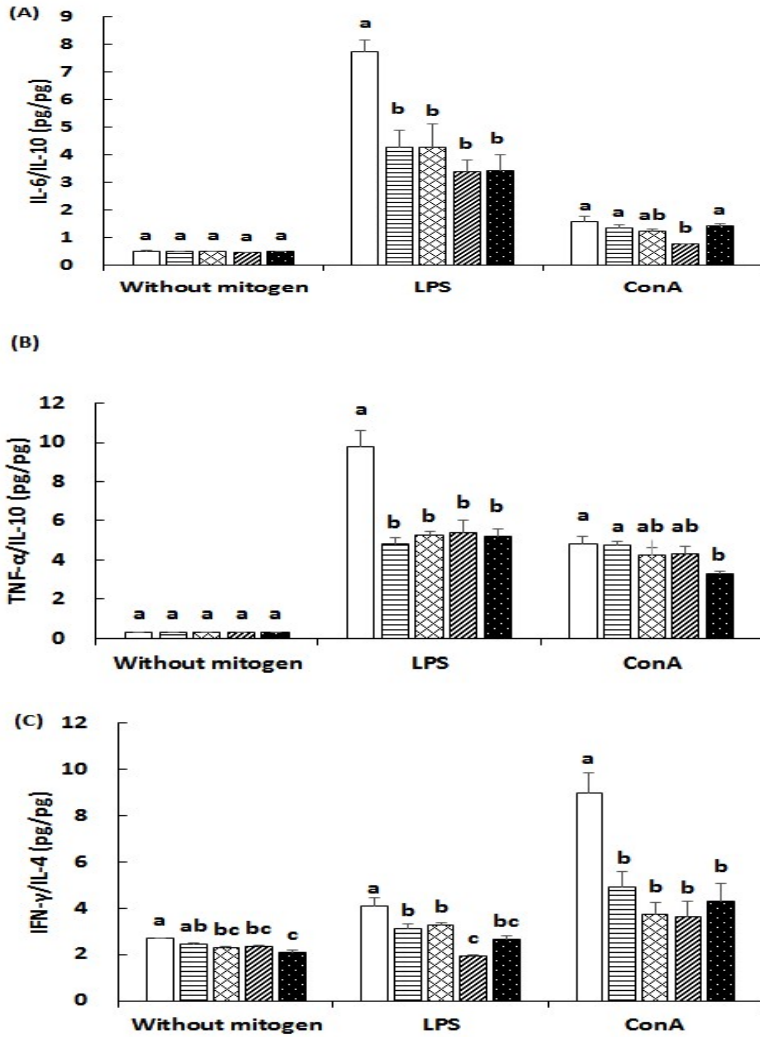


그림 31. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 Th1/Th2 cytokine 비율에 미치는 영향

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.
LPS(Lipopolysaccharide) 2.5μg/ml, ConA(Concanavalin A) 2.5μg/ml

Th1과 Th2 cytokine은 정상적인 경우 체내에서 균형을 이루게 된다. 하지만 Th1 cytokine이 과다 분비 시 자가면역질환이나 지연성과민 반응을 일으킬 수 있으며, Th2 cytokine이 과다 분비 시 알러지와 천식과 같은 질병을 일으킬 수 있다(Kim et al., 2017).

한우육 급여에 따른 비장세포 내 Th1/Th2 cytokine의 비율에 미치는 영향은 그림 31에 나타내었다. 그 결과, IL-6/IL-10 비율은 mitogen을 처리하지 않았을 때 한우육 급여에 따른 차이를 보이지 않았으나, LPS 처리시 대조구에 비해 그 비율이 현저하게 감소하였다($p<0.05$). ConA 처리시 등심(조리육) 5% 급여 처리구가 유의적으로 IL-6/IL-10 비율을 감소시켰다(그림 31A). TNF- α /IL-10의 비율 또한 mitogen을 처리하지 않았을 때 한우육 급여에 따른 차이를 보이지 않았으나, LPS 처리시 대조구에 비해 그 비율을 현저히 감소시켰다($p<0.05$). 또한 ConA 처리시 등심(조리육) 10% 급여 처리구가 유의적으로 TNF- α /IL-10비율을 감소시켰다(그림 31B). IFN- γ /IL-4 비율은 mitogen을 처리하지 않았을 때 등심(생육) 10%와 등심(조리육) 5, 10% 급여 처리구에서 대조구보다 유의적으로 낮은 비율을 나타내었다. 이후 LPS 처리에 따라 한우육 급여 처리구 모두가 대조구보다 낮은 IFN- γ /IL-4 비율을 나타내었으며, 특히 등심(조리육) 5%가 가장 낮은 비율을 나타내었다($p<0.05$). ConA 처리 시 한우육 급여 처리구 모두 그 비율이 감소하였으며($p<0.05$), 한우육 급여 처리구 간의 차이는 보이지 않았다(그림 31C).

따라서 한우 등심(1+)의 급여는 LPS와 ConA와 같은 외부의 활성 물질에 대해 Th1 cytokine의 분비능을 감소시키고, 나아가 Th1과 Th2 cytokine의 비율을 감소시킴으로 면역 조절 및 항염증 효과를 보이는 것으로 사료된다.

마. 실험동물 비장 내 림프구 아집단 비율 확인

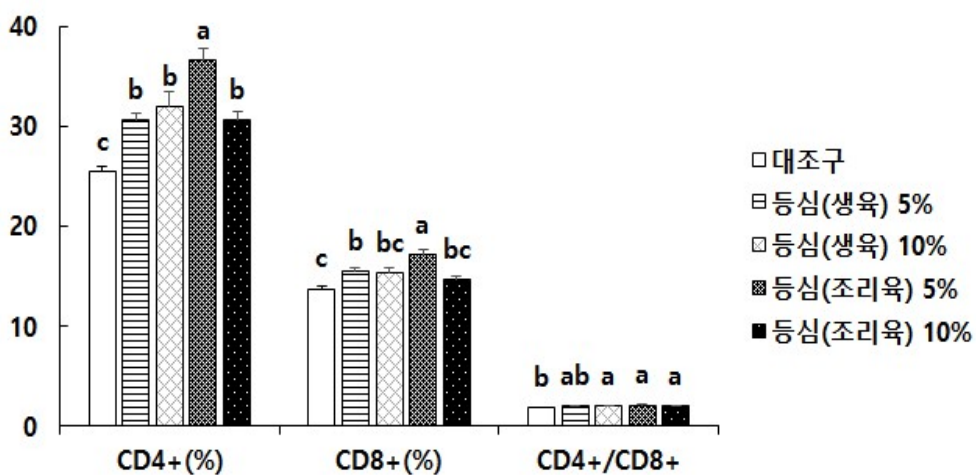
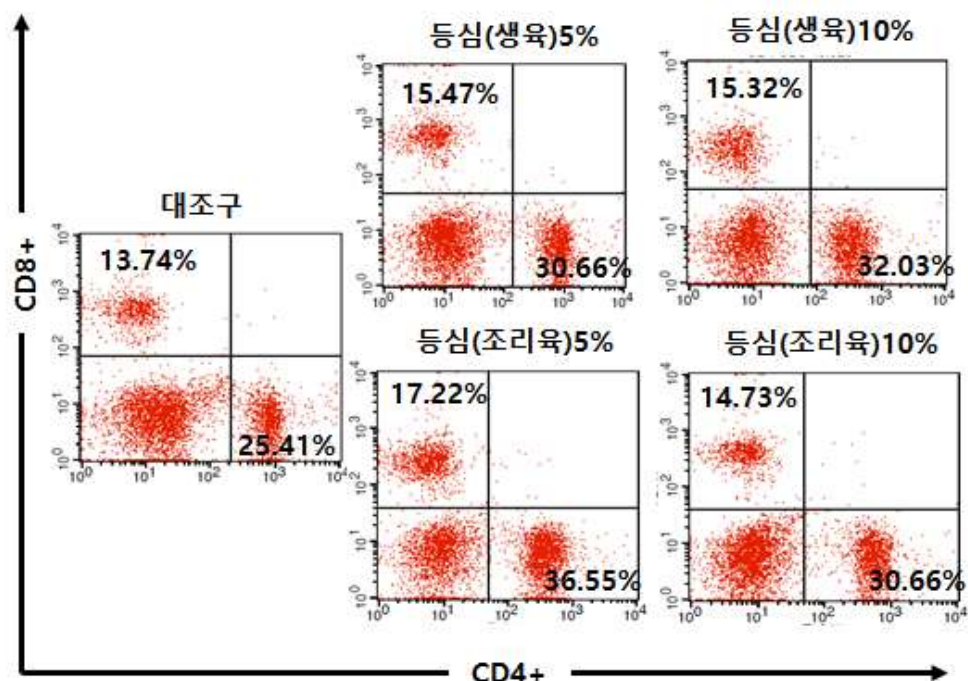


그림 32. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 비장 내 림프구 아집단 (CD4+, CD8+) 비율에 미치는 영향

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatments differ significantly at $p < 0.05$.

적응면역계 중 T 림프구는 인지된 MHC 분자에 따라서 **보조 T 림프구 (CD4+)**와 **세포독성 T 림프구(CD8+)**로 분화된다. 보조 T 림프구는 B 세포, 수지상세포, 대식세포 등과 상호작용함으로써 다른 면역 세포들을 활성화 시키고 조절하는 역할을 한다(Blackburn et al., 2009). **세포독성 T 림프구**는 바이러스 등에 감염된 세포나 종양 세포를 파괴한다.

한우육 급여가 비장 내 CD4+와 CD8+ T 세포의 비율에 미치는 영향을 알아보기 위해 8주간 한우육 급여 후 비장세포를 분리하여 유세포 분석을 실시하였다(그림 32). 그 결과, 한우육 급여에 따라 CD4+ T 세포 비율이 유의적으로 증가하였으며, 등심(조리육) 5% 처리구에서 36.55%로 유의적으로 가장 높은 CD4+ T 세포 비율을 나타내었다. CD8+ T 세포 또한 한우육 급여 따라 그 비율이 증가하였으며, 등심(조리육) 5% 처리구가 17.22%로 가장 높은 CD8+ T 세포 비율을 나타내었다($p<0.05$). CD4+/CD8+ T 세포의 비율은 계산한 결과, 1.80~2.11의 범위를 나타내었으며, 등심(생육) 10%, 등심(조리육) 5, 10% 처리구가 대조구 보다 높은 CD4+/CD8+ T 세포의 비율을 나타내었다($p<0.05$). CD4+/CD8+ T 세포의 비율은 감소되면 면역기능이 약화되었다고 볼 수 있는데, 본 연구에서는 한우육의 급여로 **보조 T 림프구**인 CD4+ T 세포와 **세포독성 T 림프구**인 CD8+ 세포 모두 증가시켰으며 결과적으로 대조구보다 CD4+/CD8+ T 세포의 비율을 증가시켜 면역기능 활성화에 긍정적인 영향을 미쳤다고 사료된다.

바. 한우육 급여에 따른 장내 미생물 군총 변화 분석

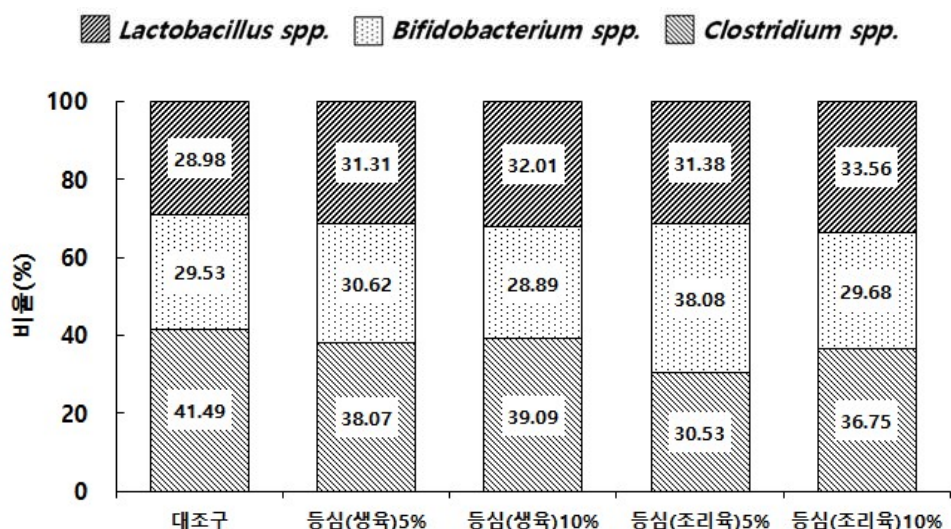


그림 33. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 분변 내 미생물 군총 변화에 미치는 영향

한우육 급여가 분변 내 미생물 군총 변화에 미치는 영향을 비교하기 위해 유익균으로 알려져 있는 *Lactobacillus spp.*와 *Bifidobacterium spp.* 그리고 유해균으로 알려져 있는 *Clostridium spp.* 군수의 합을 100으로 하여 각각의 비율을 나타내었다(그림 33). 그 결과, 유익균인 *Lactobacillus spp.*와 *Bifidobacterium spp.*의 비율은 대조구가 각각 28.98, 29.53% 였으나 한우육 급여에 따라 그 비율이 증가하였다. 반면에 유해균인 *Clostridium spp.*은 41.49%에서 한우육 급여에 따라 감소하는 경향을 나타내었으며, 등심(조리육) 5% 처리구가 30.53%로 가장 낮았다. 따라서 한우육 급여에 따라 장내 환경에 유익한 균이 상대적으로 증가함을 확인하였다.

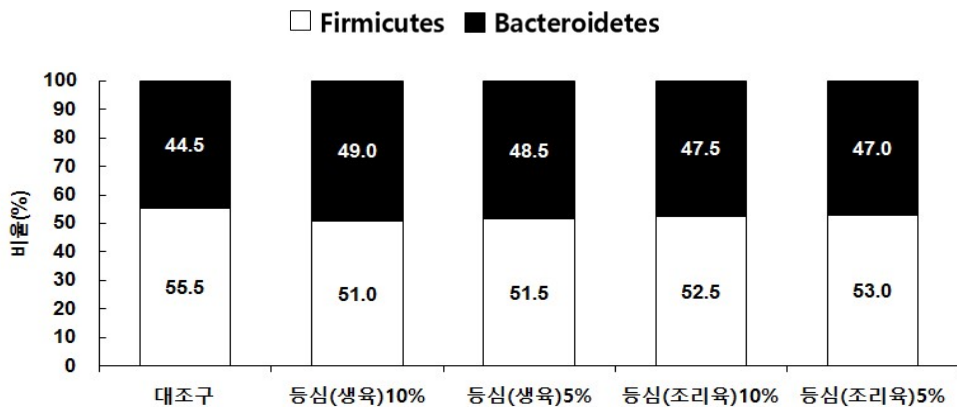


그림 34. 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여가 분변 내 Firmicutes와 Bacteroidetes 분포에 미치는 영향

장내 존재하는 미생물 무리는 Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria 등과 같은 문으로 구성되어있다. 이 중에서 그람음성균인 Bacteroidetes와 그람양성균인 Firmicutes가 유전자의 90%를 차지하고 있다(Flint et al., 2011). 최근 비만모델 마우스 실험에서 Bacteroidetes:Firmicutes 비율이 낮았다는 연구들이 보고된 바 있다(Wikoff et al., 2009; Ley et al., 2006).

본 연구 결과, 한우육 급여에 따라 대조구에 비해 Bacteroidetes의 비율이 증가하고 Firmicutes의 비율이 감소하는 경향을 보였다(그림 34). 따라서 한우육의 급여로 인해 장내 미생물 군총의 긍정적인 변화를 준 것으로 사료된다.

본 연구에서 급여한 5%와 10% 급여량은 60kg 성인을 기준으로 매일 각각 50g과 100g을 섭취하는 양이다. 통계자료에 따르면 우리나라는 인당 매일 약 28g 소고기를 섭취하고 있으며(OECD, 2018) 10%의 급여량은 매우 많은 양에 해당한다. 따라서 본 연구 결과 5% 농도로 한우육을 급여하여도 실험동물의 비장세포 내 cytokine 분비능을 조절하고 비장세포 내 CD4+, CD8+ T 세포의 비율이 증가하는 효과를 보여, 이후 한우육 급여에 따른 실험동물 급성 피부염 억제 실험에 5% 한우육을 이용하였다.

2. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 규명

가. 마우스의 생체지표 변화에 미치는 영향

(1) 체중, 사료 섭취량 및 식이 효율

표 21. 한우육 급여 처리구(급성 피부염 억제 효과 규명)

순번	처리구(n=12)		식이사료
1	CON	정상 대조구	AIN-93G
2	DNCB	급성 피부염 유발 대조구	AIN-93G
3	DNCB+5RHL	급성 피부염 유발 + 한우육 급여	AIN-93G + 등심(1+) 생육 5%
4	DNCB+5CHL	급성 피부염 유발 + 한우육 급여	AIN-93G + 등심(1+) 조리육 5%

한우육 급여(등심, 1+)에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과를 규명하기 위해 BALB/c 마우스 48마리를 일주일간 적응 후 표 21과 같이 4 처리구로 나누어 총 8주간 각각의 한우육을 급여하였다. 이 중 마우스에 급성 피부염을 유발하기 위하여 7주차(①)에는 1% DNCB를 200 μ l씩 2회 등에 도포하여 sensitization을 실시하였으며, 8주차(②)에는 0.2% DNCB 200 μ l씩 2회 등에 도포하여 challenge를 실시하였다(그림 35).



그림 35. 한우육 급여에 따른 실험동물의 급성 피부염 억제 효과 실험설계

표 22. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 체중, 사료섭취량 및 식이 효율에 미치는 영향

처리구	초기체중 (g)	최종체중 (g)	체중증가량 (g/day)	사료섭취량 (g/day)	식이효율 ¹⁾
CON ²⁾	20.83 ^a	25.55 ^a	0.090 ^a	2.59 ^a	0.035 ^a
DNCB	20.72 ^a	25.05 ^a	0.075 ^{ab}	2.66 ^a	0.028 ^{ab}
DNCB+5RHL	20.80 ^a	24.42 ^a	0.065 ^b	2.95 ^a	0.022 ^b
DNCB+5CHL	20.68 ^a	25.17 ^a	0.085 ^a	2.73 ^a	0.030 ^a
SEM ³⁾	0.208	0.357	0.0047	0.103	0.0021

^{a-b} Means within a column with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ 식이효율 = 체중증가량(g/day)/식이섭취량(g/day)

²⁾ CON: 정상 대조구; DNCB: 급성 피부염 유발 대조구; DNCB+5RHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; DNCB+5CHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

³⁾ SEM : standard error of means

한우 등심 급여가 급성 피부염 동물모델의 체중, 사료섭취량 및 식이효율에 미치는 영향은 표 22에 나타내었다. 초기 체중은 20.68~20.83g으로 처리군별로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 8주 이후 최종 체중 또한 24.42~25.55g으로 처리군별로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 사료섭취량은 평균 2.59~2.85g/day로 모두 유사하였으며, 식이효율은 DNCB+5RHL 처리구가 CON 보다 유의적으로 낮았으나, DNCB 처리구와는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

(2) 장기 무게

표 23. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 장기무게에 미치는 영향

처리구	비장 ¹⁾	흉선	간	신장	고환
CON ²⁾	0.29 ^b	0.10 ^a	3.71 ^b	1.34 ^b	0.77 ^a
DNCB	0.64 ^a	0.09 ^a	4.15 ^a	1.43 ^{ab}	0.78 ^a
DNCB+5RHL	0.64 ^a	0.08 ^a	4.23 ^a	1.50 ^a	0.78 ^a
DNCB+5CHL	0.66 ^a	0.09 ^a	4.06 ^a	1.41 ^{ab}	0.76 ^a
SEM ³⁾	0.012	0.004	0.070	0.025	0.010

^{a-b} Means within a column with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ 장기무게(%) = 장기무게(g)/체중(g)×100

²⁾ CON: 정상 대조구; DNCB: 급성 피부염 유발 대조구; DNCB+5RHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; DNCB+5CHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

³⁾ SEM : standard error of means

한우 등심 급여가 급성 피부염 동물모델의 장기무게 미치는 영향을 알아본 결과, 급성 피부염을 유발함에 따라 DNCB를 처리한 처리구에서 비장과 간의 무게가 유의적으로 증가하였다(표 23). 하지만 한우 등심 급여에 따른 차이를 보이지 않았다. 흉선과 고환의 경우 급성 피부염 유발에 따른 무게의 차이를 보이지 않았으며, 신장은 DNCB+5RHL 처리구에서 CON 보다 신장의 무게가 증가하였지만 ($p < 0.05$) DNCB 처리구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

나. 한우육 급여에 따른 피부 염증 개선 효과 확인

(1) 피부염 증상 평가

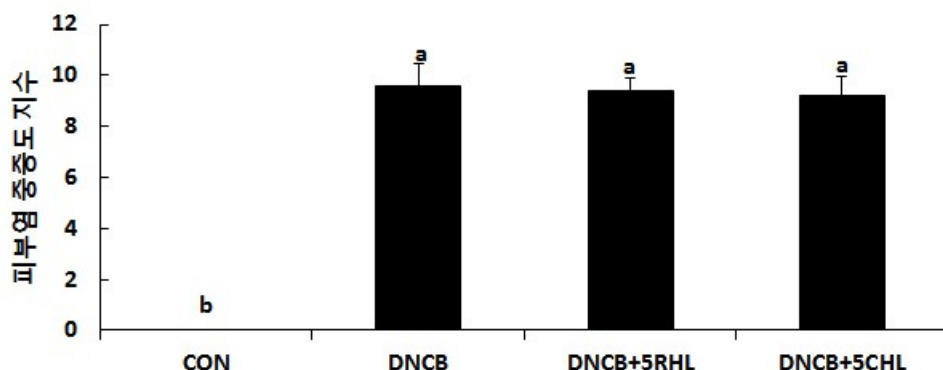


그림 36. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 중증도 평가에 미치는 영향

^{a-b} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.

CON: 정상 대조구; DNCB: 급성 피부염 유발 대조구; DNCB+5RHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; DNCB+5CHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

한우 등심 급여가 급성 피부염 동물모델의 중증도 평가에 미치는 영향은 그림 36에 나타내었다. DNCB 처리구는 급성 피부염이 유발됨에 따라 CON 보다 유의적으로 높은 피부염 중증도 지수를 나타내었으나, 하지만 한우 등심 급여에 따른 육안으로 보이는 출혈, 건조, 부종 등의 피부염 중증도의 차이는 보이지 않았다.

(2) 긁음 횟수 측정

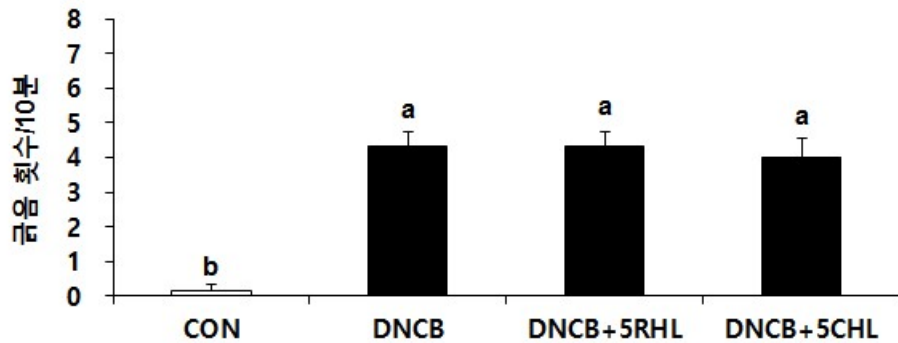


그림 37. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 긁음 횟수에 미치는 영향

^{a-b} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.

CON: 정상 대조구; DNCB: 급성 피부염 유발 대조구; DNCB+5RHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; DNCB+5CHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

한우 등심 급여가 급성 피부염 동물모델의 긁음 횟수에 미치는 영향을 알아보기 위해 10분간 실험동물이 뒷발로 환부를 긁는 횟수를 측정하였다(그림 37). 그 결과, DNCB 처리구가 4.33회로 CON 보다 유의적으로 높았으나, 한우 등심 급여에 따른 차이는 보이지 않았다.

다. 피부 기능 개선 효과에 미치는 영향 확인

(1) 경표피 수분 손실량

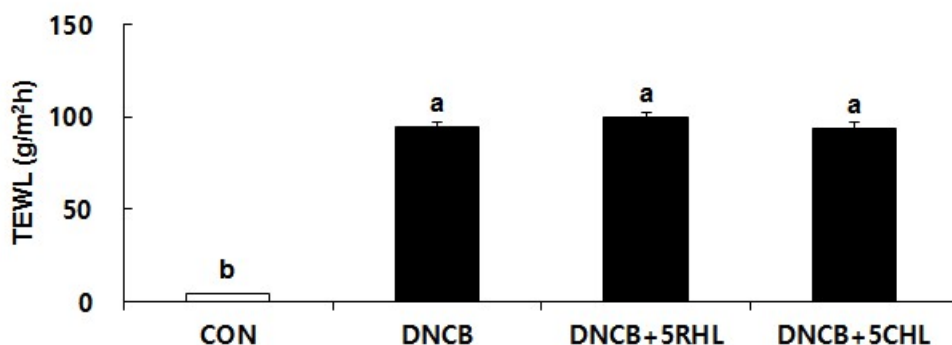


그림 38. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 경표피 수분 손실량에 미치는 영향

^{a-b} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.

CON: 정상 대조구; DNCB: 급성 피부염 유발 대조구; DNCB+5RHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; DNCB+5CHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

한우 등심 급여가 급성 피부염 동물모델의 경표피 수분 손실량에 미치는 영향은 그림 38에 나타내었다. DNCB로 급성 피부염을 유발한 실험동물의 평균 경표피 수분 손실량은 CON 보다 유의적으로 증가하여, 93.71~99.70g/m²h의 범위를 나타내었으며, 한우 등심 급여에 따른 DNCB 처리구와 차이는 보이지 않았다.

(2) 조직 병리학적 검사

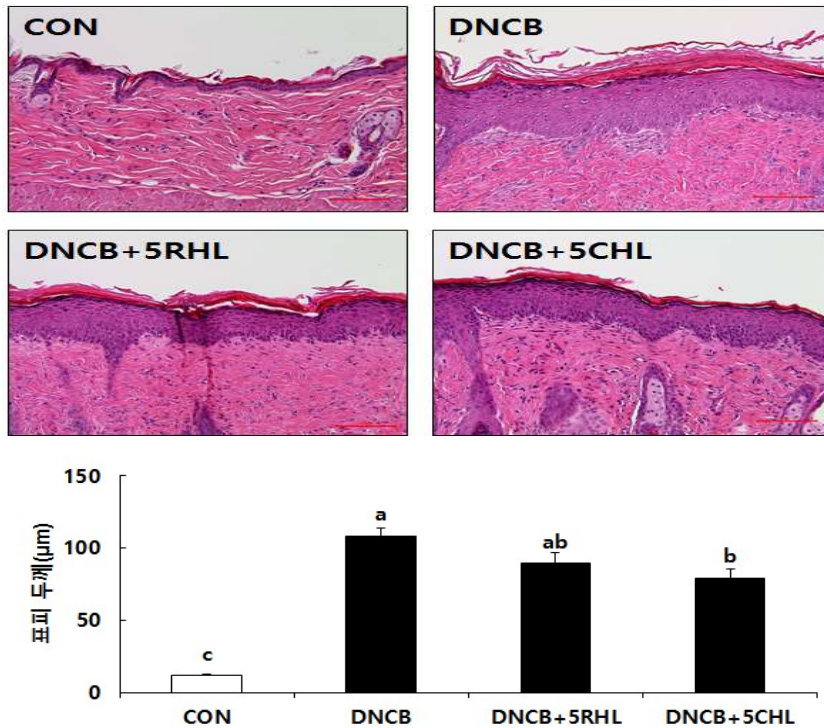


그림 39. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 표피 두께에 미치는 영향(×200)

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.
 CON: 정상 대조구; DNCB: 급성 피부염 유발 대조구; DNCB+5RHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; DNCB+5CHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여
 Scale bar: 100μm

한우 등심 급여가 급성 피부염 동물모델의 표피 두께에 미치는 영향을 알아보기 위해 피부조직을 H&E 염색한 후 현미경으로 관찰한 결과로 다음과 같다(그림 39). 급성 피부염을 유발함에 따라 DNCB 처리구의 표피 두께가 108.38μm로 11.55μm인 CON 처리구 보다 유의적으로 표피 두께가 증가하였다. 특히 DNCB+5CHL 처리구가 79.30μm으로 DNCB 처리구 보다 유의적으로 표피두께를 감소시키는 효과를 나타내었다.

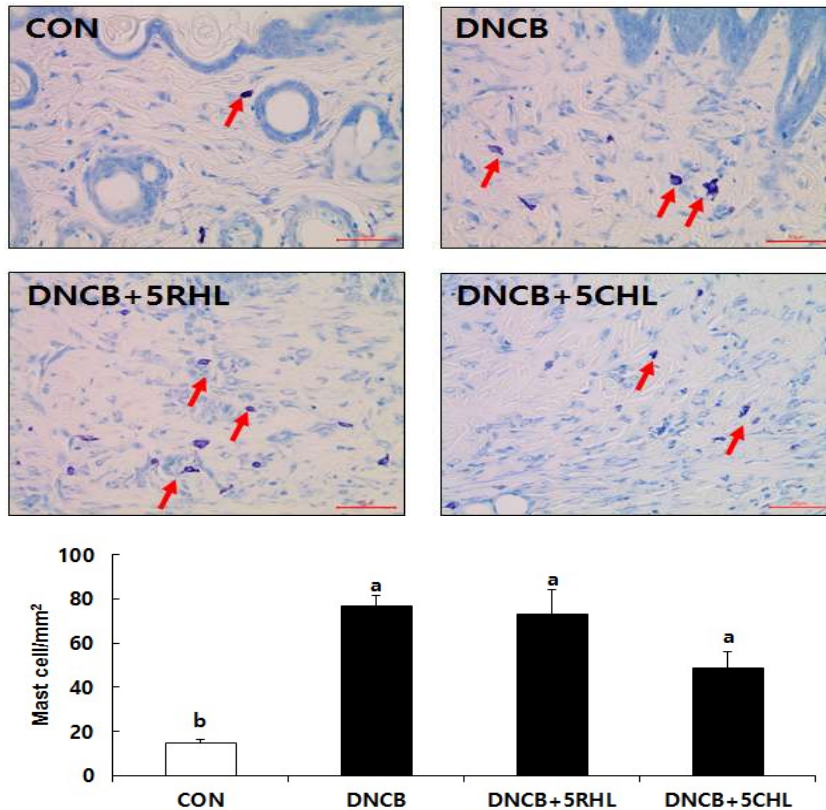


그림 40. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 피부 조직 내 mast cell 수에 미치는 영향($\times 400$)

^{a-b} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.
 CON: 정상 대조구; DNCB: 급성 피부염 유발 대조구; DNCB+5RHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; DNCB+5CHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여
 Scale bar: 50 μ m

한우 등심 급여가 급성 피부염 동물모델의 피부 조직 내 mast cell (비만세포)수에 미치는 영향을 알아보기 위해 피부조직을 toluidine blue로 염색한 후 현미경으로 관찰한 결과는 다음과 같다(그림 40). Mast cell은 그림에 나타낸바와 같이 하나의 핵을 가지며 과립을 가지고 있는 세포이다(화살표). 본 연구 결과 급성 피부염을 유발함에 따라 DNCB 처리구에서 76.80개/mm²로 CON 보다 유의적으로 수가 증가하였으나, 한우 등심 급여에 따른 차이는 보이지 않았다.

라. 한우육의 급여가 급성 피부염 동물모델의 면역 조절에 미치는 영향 확인

(1) 혈청 내 IgE 함량

표 24. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 혈청 내 IgE 함량에 미치는 영향

처리구	혈청 IgE(ng/ml)
CON ¹⁾	426.10 ^c
DNCB	4325.50 ^a
DNCB+5RHL	4938.40 ^a
DNCB+5CHL	2617.10 ^b
SEM ²⁾	161.162

^{a-c} Means within a column with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ CON: 정상 대조구; DNCB: 급성 피부염 유발 대조구; DNCB+5RHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; DNCB+5CHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

²⁾ SEM : standard error of means

DNCB로 유도된 피부염의 면역학적 특성으로 혈중 IgE 항체 수준이 유의하게 상승한다고 알려져 있다(Yoon et al., 2015). 한우 등심 급여가 급성 피부염 동물모델의 혈청 내 IgE 함량에 미치는 영향은 표 24에 나타내었다. DNCB로 급성 피부염을 유발함에 따라 DNCB 처리구에서 혈청 IgE 함량이 약 10배 증가하였다($p < 0.05$). 한우 등심 DNCB+5CHL 처리구에서 2617.10ng/ml로 DNCB 처리구 보다 유의적으로 IgE 함량을 감소시켜 급성피부염을 완화시키는 효과를 나타내었다.

(2) 마우스의 비장으로부터 분리한 비장세포 내 Th1, Th2 cytokine 분비량 확인

혈청 내 IgE의 증가로 인해 활성화된 mast cell은 histamine과 cytokine과 같은 염증 매개 인자를 방출하게 된다. 한우 등심 급여가 급성 피부염 동물모델의 면역 반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험동물로부터 비장세포를 분리 후 ConA(2.5 μ g/ml)로 활성화시킨 후 상등액의 Th1과 Th2 cytokine의 분비량을 확인하였다.

(가) Th1 cytokine (pro-inflammatory cytokine)

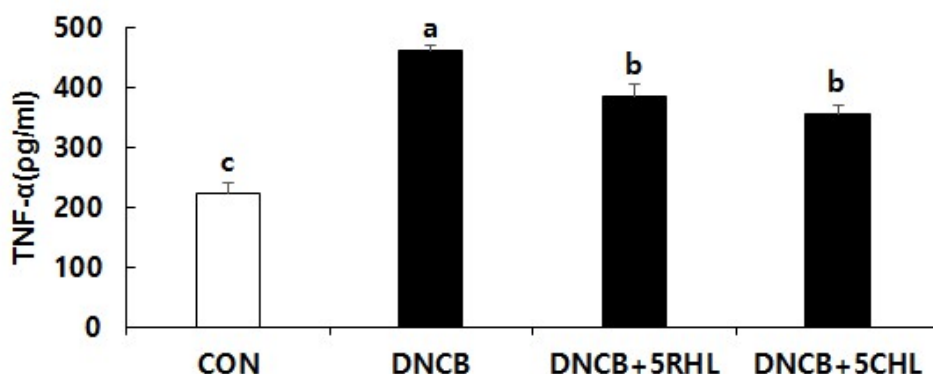


그림 41. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th1 cytokine 분비에 미치는 영향

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.

CON: 정상 대조구; DNCB: 급성 피부염 유발 대조구; DNCB+5RHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; DNCB+5CHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

염증성 cytokine인 TNF- α 는 피부염 발생의 중요한 역할을 하며, DNCB로 급성 피부염을 유발한 DNCB 처리구가 CON 보다 유의적으로 TNF- α 함량이 증가하였다(그림 41). 하지만 한우 등심 급여에 따라 증가한 TNF- α 함량이 유의적으로 감소하였다.

(나) Th2 cytokine (anti-inflammatory cytokine)

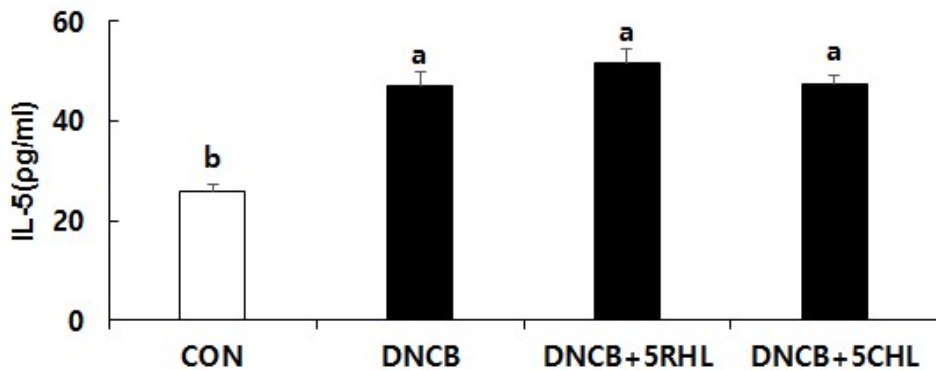


그림 42. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th2 cytokine 분비에 미치는 영향

^{a-b} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.
 CON: 정상 대조구; DNCB: 급성 피부염 유발 대조구; DNCB+5RHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; DNCB+5CHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

본 연구 결과, DNCB로 급성 피부염을 유발함에 따라 비장세포 내 IL-5의 함량이 증가하였으나($p < 0.05$), 한우 등심 급여에 따른 감소는 보이지 않았다(그림 42).

(다) Th1/Th2 cytokine 비율

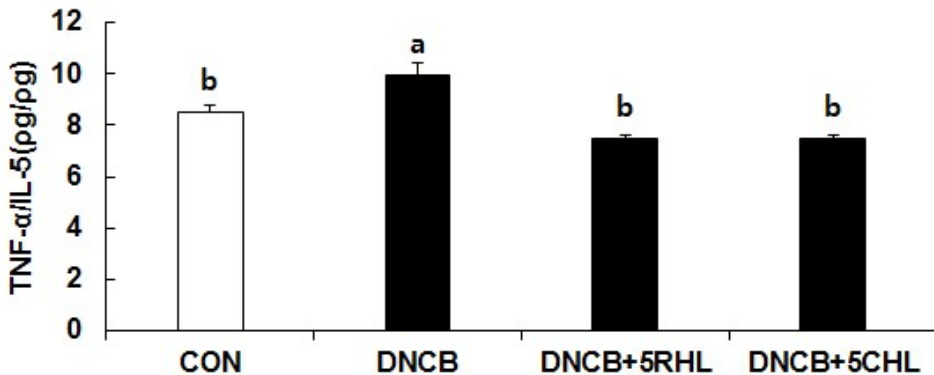


그림 43. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 급성 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th1/Th2 cytokine 비율에 미치는 영향

^{a-b} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.

CON: 정상 대조구; DNCB: 급성 피부염 유발 대조구; DNCB+5RHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; DNCB+5CHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

DNCB로 급성 피부염을 유발함에 따라 비장세포 내 Th1 cytokine(TNF- α)과 Th2 cytokine(IL-5) 모두 CON 보다 증가하였다(그림 41~42). 이후 Th1/Th2 cytokine의 비율을 나타낸 결과(그림 43), DNCB 처리구의 비율이 유의적으로 증가하여 Th1이 증가한 염증 상태임을 확인하였다. 하지만 한우 등심 급여에 따라 DNCB+5RHL과 DNCB+5CHL 처리구에서 유의적으로 TNF- α /IL-5 비율을 유의적으로 감소시켜 항염증 효과를 보이는 것으로 사료된다.

3. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 실험동물의 아토피 피부염 억제 효과 규명

가. 마우스의 생체지표 변화에 미치는 영향

(1) 체중, 사료 섭취량 및 식이 효율

표 25. 한우육 급여 처리구(아토피 피부염 억제 효과 규명)

순번	처리구(n=12)		식이사료
1	CON	정상 대조구	AIN-93G
2	AD	아토피 피부염 유발 대조구	AIN-93G
3	AD+5RHL	아토피 피부염 유발 + 한우육 급여	AIN-93G + 등심(1+) 생육 5%
4	AD+5CHL	아토피 피부염 유발 + 한우육 급여	AIN-93G + 등심(1+) 조리육 5%

한우육 급여(한우 등심, 1+)에 따른 실험동물의 아토피 피부염 억제 효과를 규명하기 위해 BALB/c 마우스 48마리를 일주일간 적응 후 표 25과 같이 4 처리구로 나누었다. 이 후 아토피 피부염을 유발하기 위해 2주 동안(①) 1% DNCB를 200 μ l 씩 총 4번(2회/주) 등에 도포하여 sensitization을 실시하였으며, 4주간(②) 0.2% DNCB 200 μ l 씩 총 8번(2회/주) 등에 도포하여 challenge를 실시하였다. 한우육 급여는 총 4주로 challenge 기간 동안 동시 처리하였다(그림 44).

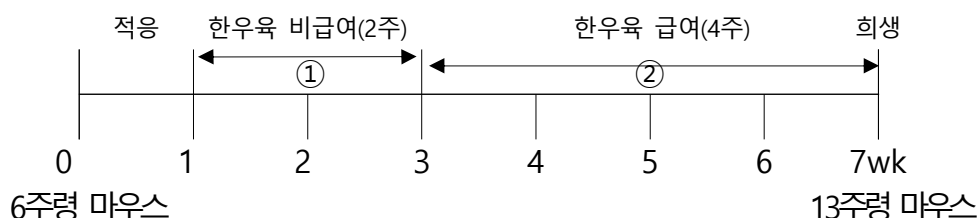


그림 44. 한우육 급여에 따른 실험동물의 아토피 피부염 억제 효과 실험설계

표 26. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 체중, 사료섭취량 및 식이 효율에 미치는 영향

처리구	초기체중 (g)	최종체중 (g)	체중증가량 (g/day)	사료섭취량 (g/day)	식이효율 ¹⁾
CON ²⁾	21.52	25.62	0.11	2.91	0.04
AD	21.27	25.60	0.11	3.35	0.03
AD+5RHL	21.55	25.58	0.11	3.35	0.03
AD+5CHL	21.05	26.18	0.12	3.30	0.03
SEM ³⁾	0.135	0.219	0.005	0.126	0.002

¹⁾ 식이효율 = 체중증가량(g/day)/식이섭취량(g/day)

²⁾ CON: 정상 대조구; AD: 아토피 피부염 유발 대조구; AD+5RHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; AD+5CHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

³⁾ SEM : standard error of means

한우 등심 급여가 아토피 피부염 동물모델의 체중, 사료섭취량 및 식이효율에 미치는 영향은 표 26에 나타내었다. 초기 체중은 21.05~21.55g 으로 처리군별로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 6주 이후 최종 체중은 25.58~26.18g으로 처리군별로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 사료섭취량은 평균 2.91~3.35g/day로 사료섭취량과 식이효율 모두 유의적인 차이를 보이지 않았다.

(2) 장기 무게

표 27. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 장기 무게에 미치는 영향(%)

처리구	비장 ¹⁾	흉선	간	신장	고환
CON ²⁾	0.32 ^c	0.10 ^c	4.02 ^b	1.40 ^a	0.80 ^a
AD	0.42 ^a	0.15 ^a	4.23 ^a	1.37 ^a	0.79 ^a
AD+5RHL	0.36 ^b	0.14 ^{ab}	4.17 ^a	1.37 ^a	0.79 ^a
AD+5CHL	0.37 ^b	0.13 ^b	4.18 ^a	1.36 ^a	0.77 ^a
SEM ³⁾	0.005	0.004	0.031	0.023	0.008

^{a-c} Means within a column with different superscript differ significantly at $p<0.05$.

¹⁾ 장기무게 (%) = 장기무게(g)/체중(g)×100

²⁾ CON: 정상 대조구; AD: 아토피 피부염 유발 대조구; AD+5RHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; AD+5CHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

³⁾ SEM : standard error of means

한우 등심 급여가 아토피 피부염 동물모델의 장기무게에 미치는 영향을 알아본 결과는 표 27에 나타내었다. 그 결과, 아토피 피부염이 유발됨에 따라 AD 처리구에서 유의적으로 비장, 흉선, 간의 무게가 증가하였다. 하지만 한우 등심 급여에 따라 비장의 무게가 유의적으로 감소하였으며, AD+5CHL 처리구가 증가한 흉선의 무게를 감소시켰다($p<0.05$). 간은 한우 등심 급여에 따른 차이를 보이지 않았다.

나. 한우육 급여에 따른 아토피 피부염 개선 효과 확인

(1) 피부염 증상 평가

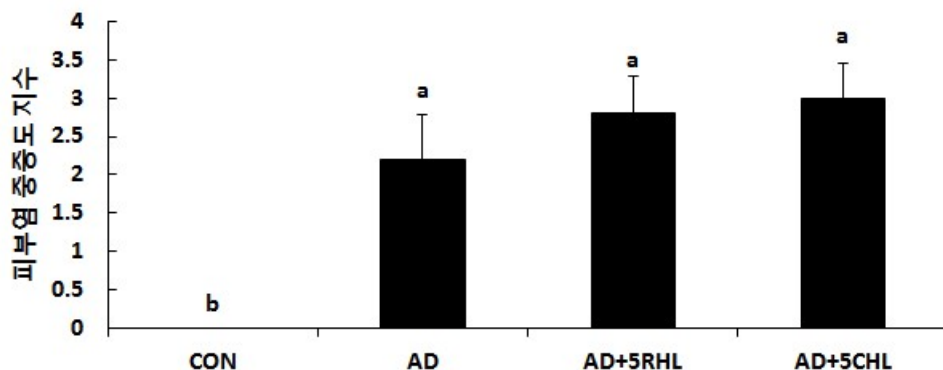


그림 45. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 중증도 평가에 미치는 영향

^{a-b} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.
 CON: 정상 대조구; AD: 아토피 피부염 유발 대조구; AD+5RHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; AD+5CHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

한우 등심 급여가 아토피 피부염 동물모델의 중증도 평가에 미치는 영향은 그림 45에 나타내었다. 아토피 피부염을 유발함에 따라 AD 처리구는 CON 보다 높은 피부염 중증도 지수를 나타내었다 ($p < 0.05$). 하지만 한우 등심 급여에 따른 육안으로 보이는 아토피 피부염에 대한 출혈, 건조, 부종 등의 중증도의 차이는 보이지 않았다.

(2) 긁음 횟수 측정

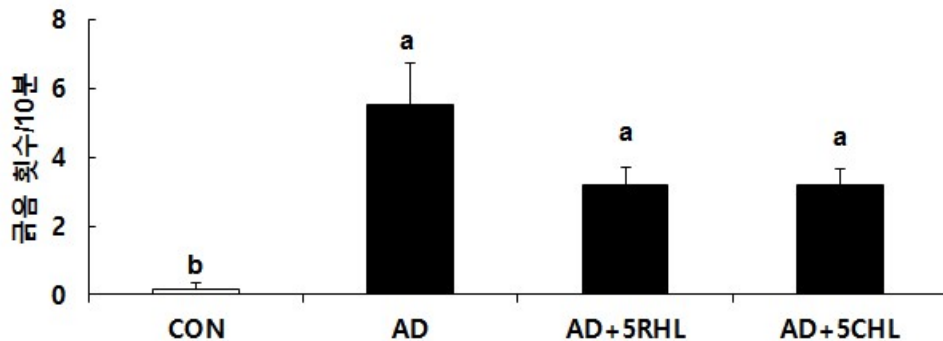


그림 46. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 긁음 횟수에 미치는 영향

^{a-b} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.
 CON: 정상 대조구; AD: 아토피 피부염 유발 대조구; AD+5RHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; AD+5CHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

한우 등심 급여가 아토피 피부염 동물모델의 긁음 횟수에 미치는 영향을 알아보기 위해 10분간 실험동물이 뒷발로 환부를 긁는 횟수를 측정하였다(그림 46). 그 결과, AD 처리구가 5.50회로 CON 보다 유의적으로 증가하였으나, 한우 등심 급여에 따른 차이는 보이지 않았다.

다. 피부 기능 개선 효과에 미치는 영향 확인

(1) 경표피 수분 손실량

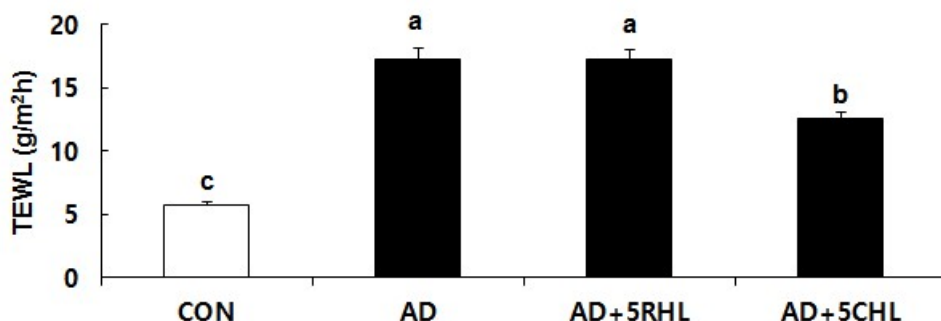


그림 47. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 경표피 수분 손실량에 미치는 영향

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.
CON: 정상 대조구; AD: 아토피 피부염 유발 대조구; AD+5RHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; AD+5CHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

한우 등심 급여가 아토피 피부염 동물모델의 경표피 수분 손실량에 미치는 영향은 그림 47에 나타내었다. 경표피 수분 손실량은 피부 장벽 능력을 나타내는 지표로 아토피 피부염 발생 시 감소하는 것으로 알려져 있다. AD 처리구의 경표피 수분 손실량은 $17.30\text{g/m}^2\text{h}$ 으로 CON 보다 유의적으로 높았으며, AD+5CHL 처리구는 $12.63\text{g/m}^2\text{h}$ 으로 AD 처리구 보다 유의적으로 낮은 경표피 수분 손실을 나타내었다.

(2) 조직 병리학적 검사(H&E 염색)

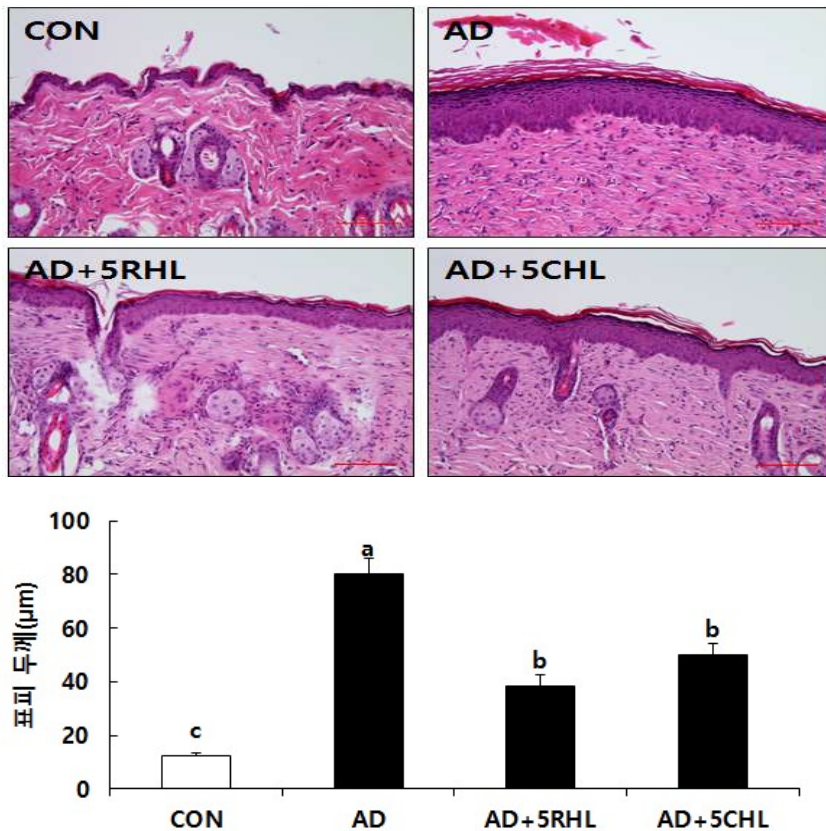


그림 48. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 표피 두께에 미치는 영향(×200)

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.
 CON: 정상 대조구; AD: 아토피 피부염 유발 대조구; AD+5RHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; AD+5CHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여
 Scale bar: 100μm

한우 등심 급여가 아토피 피부염 동물모델의 표피 두께에 미치는 영향을 알아보기 위해 피부조직을 H&E 염색한 후 현미경으로 관찰한 결과는 그림 48 나타내었다. 그 결과, 급성 피부염을 유발함에 따라 AD 처리구가 80.39μm로 CON 보다 유의적으로 표피 두께가 증가하였으나, 한우 등심을 급여함에 따라 증가된 표피 두께가 감소하였다 ($p < 0.05$).

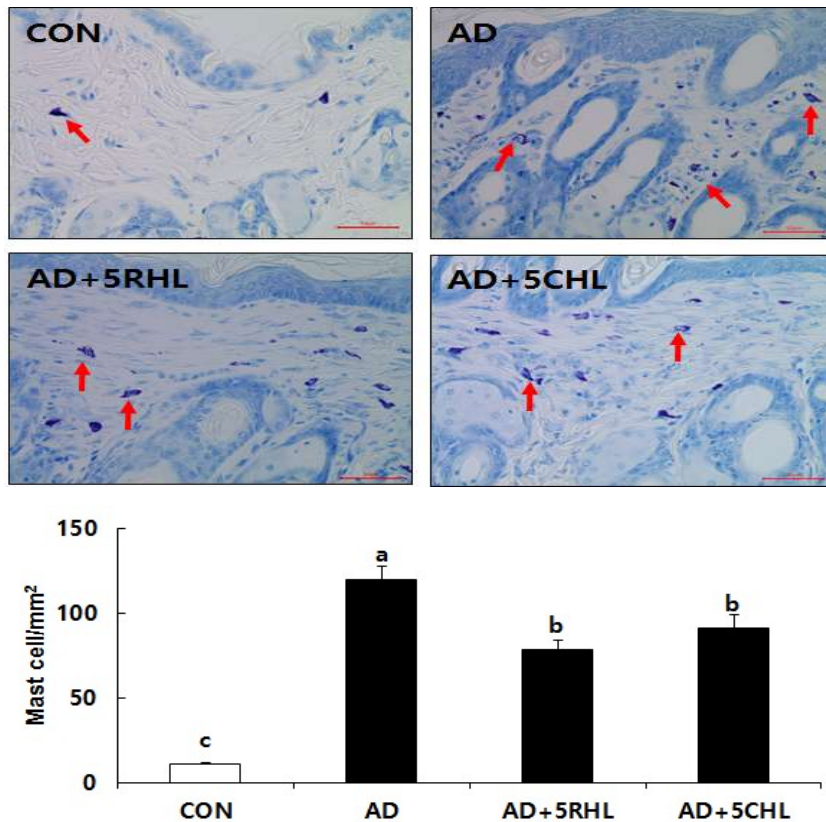


그림 49. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 피부 조직 내 mast cell수에 미치는 영향(×400)

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.
 CON: 정상 대조구; AD: 아토피 피부염 유발 대조구; AD+5RHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; AD+5CHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여
 Scale bar: 50µm

한우 등심 급여가 아토피 피부염 동물모델의 피부 조직 내 mast cell(비만세포)수에 미치는 영향을 알아보기 위해 피부조직을 toluidine blue로 염색한 후 현미경으로 관찰한 결과는 그림 49에 나타내었다. Mast cell은 그림에 나타낸바와 같이 하나의 핵을 가지며 과립을 가지고 있는 세포이다(화살표). 본 연구 결과, 아토피 피부염을 유발함에 따라 AD 처리구에서 증가한 mast cell 수가 한우 등심 급여로 인해 감소하였다($p < 0.05$). 따라서 피부 염증 완화 효과를 보이는 것으로 사료된다.

라. 한우육의 급여가 아토피 피부염 동물모델의 면역 조절에 미치는 영향 확인

(1) 혈청 내 IgE 함량

표 28. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 혈청 내 IgE 함량에 미치는 영향

처리구	혈청 IgE (ng/ml)
CON ¹⁾	283.97 ^c
AD	3751.34 ^a
AD+5RHL	3323.69 ^b
AD+5CHL	3286.14 ^b
SEM ²⁾	47.222

^{a-c} Means within a column with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

¹⁾ CON: 정상 대조구; AD: 아토피 피부염 유발 대조구; AD+5RHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; AD+5CHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

²⁾ SEM : standard error of means

한우 등심 급여가 아토피 피부염 동물모델의 혈청 내 IgE 함량에 미치는 영향은 표 28에 나타내었다. 아토피 피부염은 IgE를 매개로 하는 과민 면역 반응으로 혈청 내 IgE의 증가는 피부조직의 mast cell 침윤과 관련이 깊다(Kang et al., 2016). CON 처리구 보다 AD 처리구에서 유의적으로 혈청 내 IgE 함량이 증가하였다. 하지만 AD+5RHL과 AD+5CHL 처리구에서 한우 등심 급여에 따라 증가된 혈청 IgE 함량을 감소시켜($p < 0.05$), 아토피 피부염을 완화시키는 효과를 나타내었다.

(2) 마우스의 비장에서부터 분리한 비장세포 내 Th1, Th2 cytokine 분비량 확인

Th1과 Th2 cytokine의 불균형은 대표적인 아토피 피부염의 특징이며, 특히 Th2 cytokine의 분비가 증가하는 것으로 알려져 있다(Grewe et al., 1998). 한우 등심의 급여가 아토피 피부염 동물모델의 면역 조절효과에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험동물로부터 비장세포를 분리하여 ConA (2.5 μ g/ml)로 활성화 시킨 후 비장세포 내 Th1 (TNF- α , IFN- γ)과 Th2 (IL-4, IL-5) cytokine 분비량을 확인하였다. ConA는 주로 T 세포를 활성화시키는 mitogen으로 마우스의 비장세포로부터 높은 수준의 IFN- γ 와 IL-4 분비하도록 유도한다(Benjamini et al., 2000).

Th1 cytokine 중 TNF- α 는 T 세포의 활성화에 관여하는 염증성 cytokine으로서 내부의 항원에 대해 열을 발생키시고 leukocyte를 활성화시켜 염증을 유도한다(Moore et al., 1993). Th2 cytokine 중 IL-5는 호중구의 침윤에 주요한 역할을 하는 cytokine이며, IL-4는 B 세포가 IgE를 생산하도록 촉진한다(Kang et al., 2016).

(가) Th1 cytokine (pro-inflammatory cytokine)

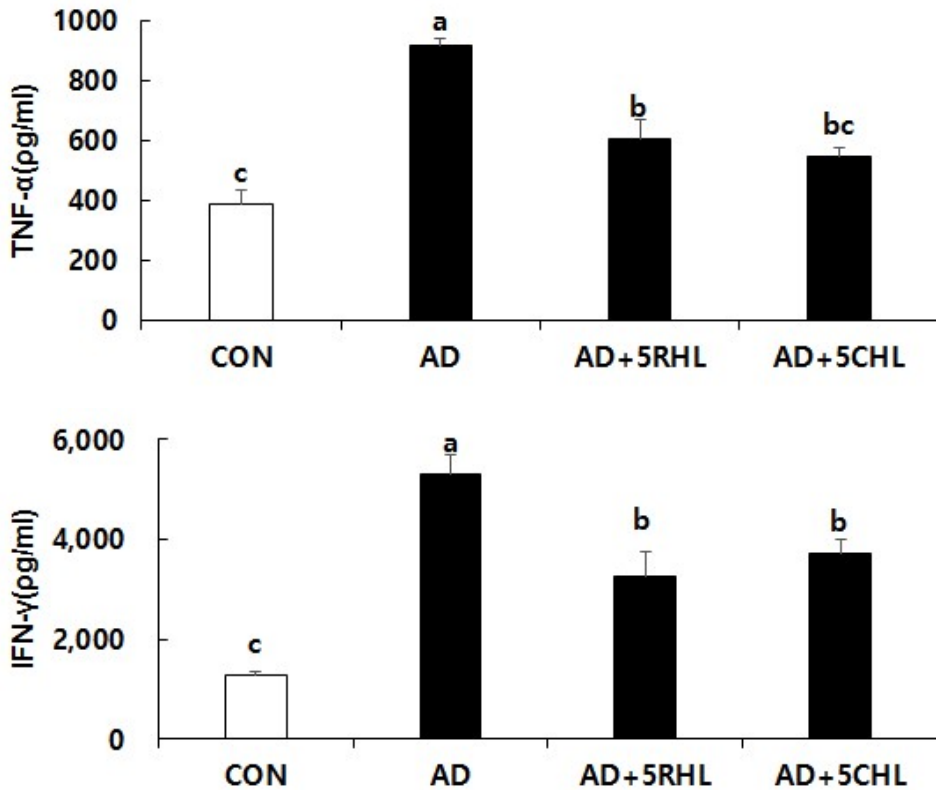


그림 50. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th1 cytokine 분비에 미치는 영향

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.

CON: 정상 대조구; AD: 아토피 피부염 유발 대조구; AD+5RHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; AD+5CHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

한우 등심 급여가 아토피 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th1 cytokine 분비에 미치는 영향을 분석한 결과(그림 50), AD 처리구가 유의적으로 TNF- α 와 IFN- γ 분비를 증가시켰다. 하지만 한우 등심 급여 처리구가 유의적으로 증가된 Th1 cytokine의 분비를 감소시켰다.

(나) Th2 cytokine (anti-inflammatory cytokine)

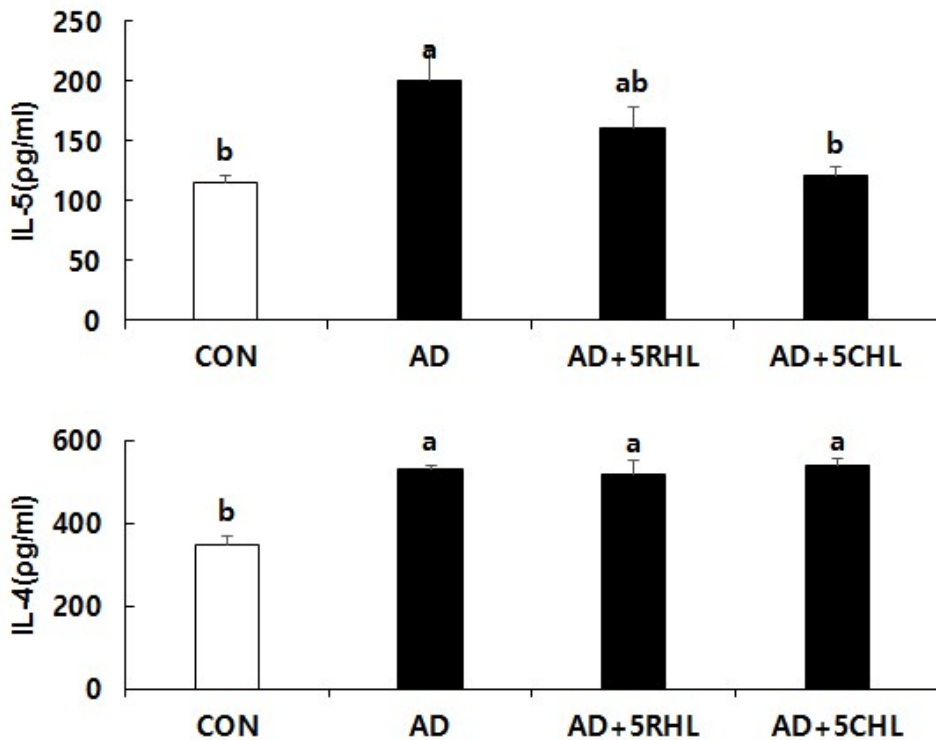


그림 51. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th2 cytokine 분비에 미치는 영향

^{a-b} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.

CON: 정상 대조구; AD: 아토피 피부염 유발 대조구; AD+5RHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; AD+5CHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

한우 등심 급여가 아토피 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th2 cytokine 분비에 미치는 영향을 분석한 결과는 그림 51에 나타내었다. CON 처리구 보다 AD 처리구에서 IL-5, IL-4 모두 유의적으로 증가하였으며, AD+5CHL 처리구가 AD 처리구 보다 유의적으로 IL-5 함량을 감소하는 효과를 나타내었다. 하지만 한우 등심 급여에 따른 IL-4 함량의 차이는 없었다.

(다) Th1/Th2 cytokine 비율

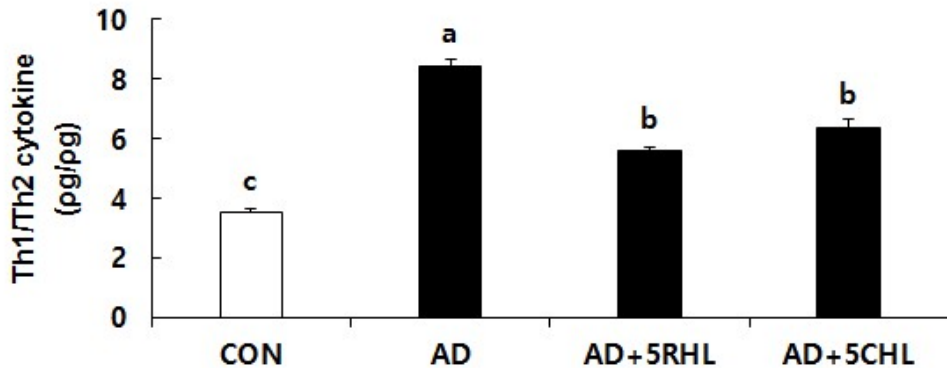


그림 52. 한우 등심(생육, 조리육) 급여가 아토피 피부염 동물모델의 비장세포 내 Th1/Th2 cytokine 비율에 미치는 영향

^{a-c} Values of bar with different superscript among treatment differ significantly at $p < 0.05$.
 CON: 정상 대조구; AD: 아토피 피부염 유발 대조구; AD+5RHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여; AD+5CHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

Th1(TNF- α + IFN- γ)/Th2(IL-5 + IL-4) cytokine의 비율을 계산한 결과는 그림 52에 나타내었다. 아토피 피부염을 유발함에 따라 Th1과 Th2 cytokine이 모두 증가하였으며, 그 비율을 계산한 결과 AD 처리구의 Th1/Th2 cytokine 비율은 8.45로 CON 보다 높았다($p < 0.05$). 한우 등심의 급여로 증가한 Th1/Th2 cytokine의 비율을 유의적으로 감소시켰다.

따라서 한우 등심의 급여는 아토피 피부염 발생으로 인해 증가한 Th1과 Th2 cytokine을 감소시켜 Th1/Th2 cytokine의 균형을 조절하여 아토피 피부염에 대한 면역 조절효과를 보이는 것으로 사료된다.

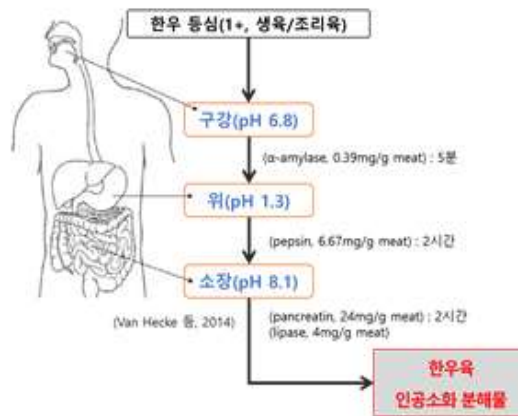
제4장. 목표달성도

제1절. 연구추진 일정 및 달성도

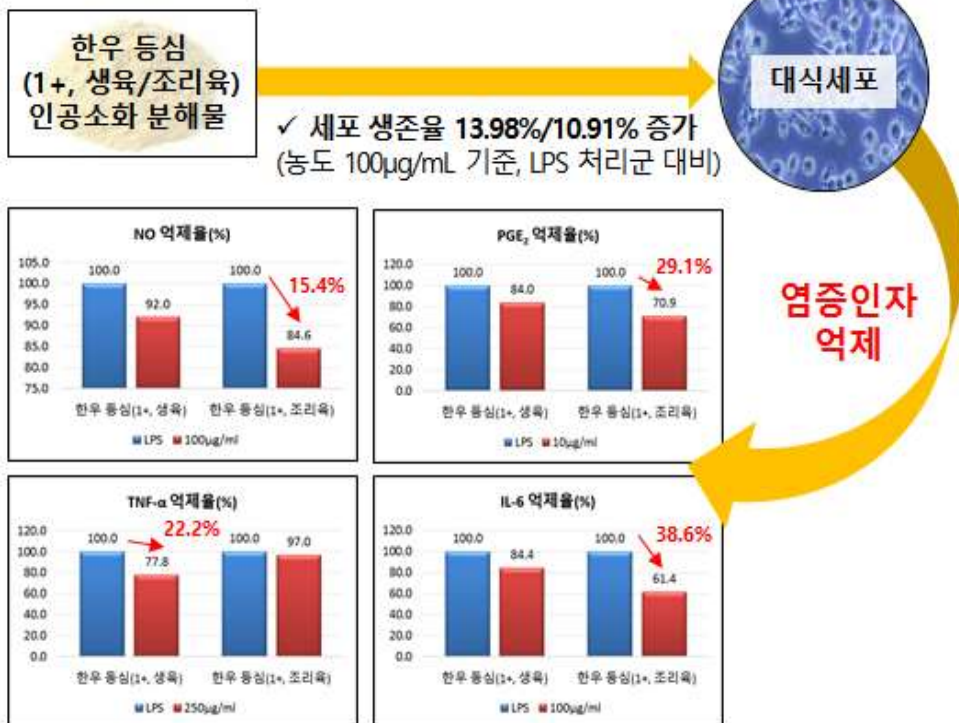
연구 내용	개 월 차												달성도 (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1. 문헌 및 자료수집	▶	▶	▶	▶									100
2. 한우육 인공소화 분해물 제조 및 항산화 활성 규명	▶	▶	▶	▶	▶								100
3. 한우육 인공소화 분해물이 면역기능 증진 효과에 미치는 영향 규명			▶	▶	▶	▶	▶						100
4. 중간보고서 제출 및 중간보고회						▶							100
5. 한우육 인공소화 분해물의 면역기능 증진 메커니즘 규명					▶	▶	▶	▶	▶				100
6. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 마우스의 면역기능 증진 효과 규명							▶	▶	▶	▶	▶		100
7. 한우육 급여(생육, 조리육)에 따른 마우스의 피부 염증 억제 효과 규명								▶	▶	▶	▶	▶	100
8. 최종 보고서(가판) 제출 및 최종보고회												▶	100
9. 수정 및 보완												▶	100
10. 최종보고서(인쇄본) 및 농가 교육용 발표 자료 제출												▶	100
추진진도 (%)	5	10	20	30	40	50	55	60	70	80	90	100	

제5장. 요약 및 결론

- Human digestion model (*in vitro*)을 통해 인체의 소화 과정과 흡수한 조건에서 '한우육 인공소화 분해물'의 제조

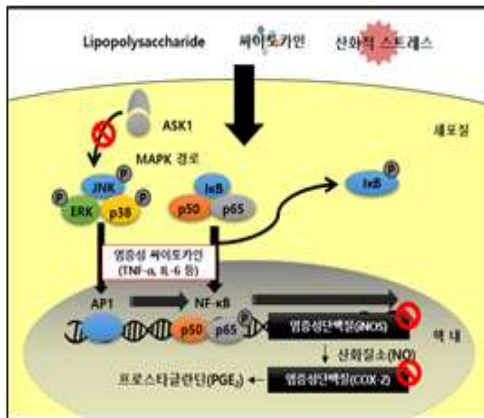


- 한우 등심(1+, 생육/조리육) 인공소화 분해물의 항염증 효과



* LPS, lipopolysaccharide; 대식세포 활성화 물질
염증인자: NO, nitric oxide; PGE₂, Prostaglandin E₂; TNF-α; IL-6

➤ 한우 등심(1+, 생육/조리육) 인공소화 분해물의 항염증 효과 메커니즘



- ✓ 염증 관련 신호전달 (MAPK pathway) 차단
- ✓ 염증성 단백질 (iNOS, COX-2) 발현 억제
- ✓ 염증매개 인자 억제

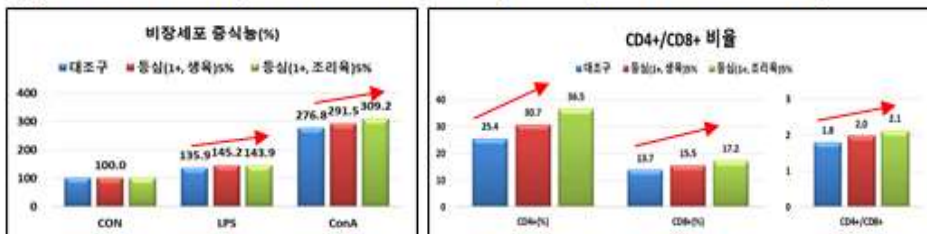
➤ 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여에 따른 실험동물의 면역기능 증진 효과

- ✓ 5% 한우 등심(1+) 생육/ 조리육 8주간 급여 (사료 내 총 단백질 20.3%, 지방 7%)



실험동물(BALB/C)

① 면역 활성 효과(비장세포 증식능 증가, CD4+/CD8+ 림프구 증가)



② 항염증 효과(Th1/Th2 cytokine 비율 감소)



* MAPK, mitogen-activated protein kinase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase-2
CON, 아무것도 처리하지 않음/LPS, lipopolysaccharide; ConA, Concanavalin A : 비장세포 활성화 물질 처리

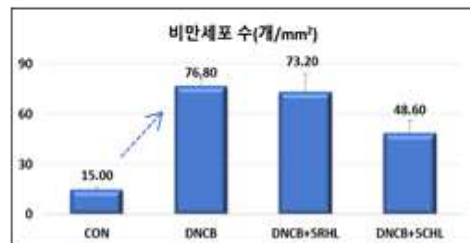
➤ 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여에 따른 실험동물의 급성 피부염 개선 효과



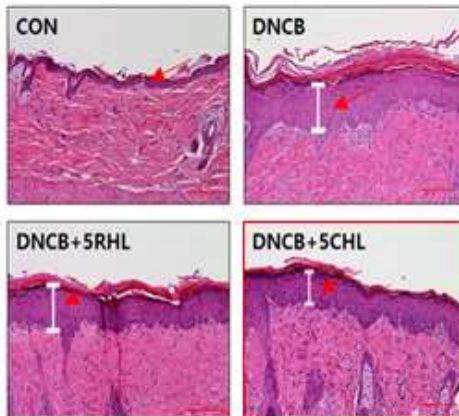
① 경표피 수분 손실량



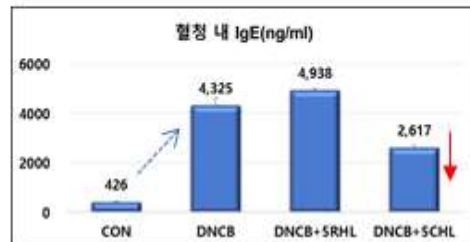
③ 피부 조직 내 비만세포 수



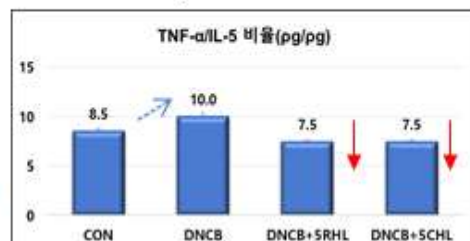
② 표피 두께



④ 증가된 혈청 내 IgE 함량 감소



⑤ 비장세포 내 면역조절 효과 (Th1/Th2 cytokine 비율 감소)



*CON: 정상 대조군; DNCB: 급성 피부염 유발 대조군;
DNCB+SRHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여;
DNCB+SCHL: 급성 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

➤ 한우 등심(1+, 생육/조리육) 급여에 따른 실험동물의 아토피 피부염 개선 효과



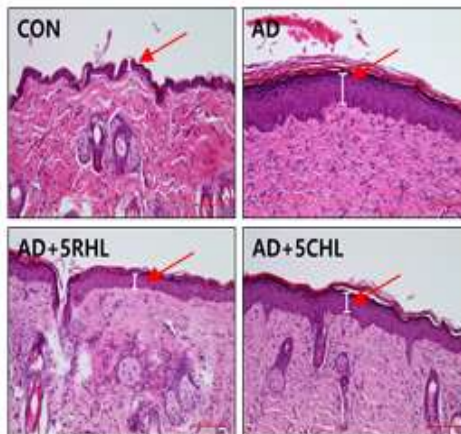
① 경표피 수분 손실량 감소



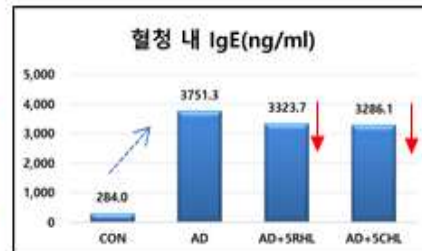
③ 피부 조직 내 비만세포 수 감소



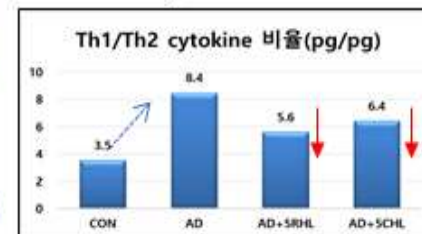
② 증가된 표피 두께 감소



④ 증가된 혈청 내 IgE 함량 감소



⑤ 비장세포 내 항염증효과
(Th1/Th2 cytokine 비율 감소)



* CON: 정상 대조군, AD: 아토피 피부염 유발 대조군,
AD+SRHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 생육) 급여,
AD+SCHL: 아토피 피부염 유발 + 5% 한우 등심(1+, 조리육) 급여

제6장. 참고문헌

1. Amin, K. (2012). The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory Medicine*, 106(1), 9–14.
2. Benjamini, E., Coico, R., & Sunshine, G. (2000). *Immunology a Short Course*, fourth ed. Wiley, New York.
3. Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
4. Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., Betts, M. R., Freeman, G. J., Vignali, D. A. A., & Wherry, E. J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology*, 10(1), 29.
5. Dobbelsstein, H., Körner, W. F., Mempel, W., Grosse-Wilde, H., & Edel, H. H. (1974). Vitamin B6 deficiency in uremia and its implications for the depression of immune responses. *Kidney International*, 5(3), 233–239.
6. Dong, C., Davis, R. J., & Flavell, R. A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 55–72.
7. Flint, H. J. (2011). Obesity and the gut microbiota. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45, S128–S132.
8. Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. (1957). Extraction of fatty acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
9. Funk, C. D., Funk, L. B., Kennedy, M. E., Pong, A. S., & Fitzgerald, G. A. (1991). Human platelet/erythroleukemia cell

- prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *The FASEB Journal*, 5(9), 2304–2312.
10. Gillespie, K. M., Chae, J. M., & Ainsworth, E. A. (2007). Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nature Protocol*, 2, 867–870.
 11. Grewe, M., Bruijnzeel–Koomen, C. A., Schöpf, E., Thepen, T., Langeveld–Wildschut, A. G., Ruzicka, T., & Krutmann, J. (1998). A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunology Today*, 19(8), 359–361.
 12. Han, Y. S., Chung, S. J., Cho, Y. Y., Choi, H. M., Ahn, K. M., & Lee, S. I. (2004). Analysis of the rate of sensitization to food allergen in children with atopic dermatitis. *Korean Journal of Community Nutrition*, 9(1), 90–97.
 13. Iontcheva, I., Amar, S., Zawawi, K. H., Kantarci, A., & Van Dyke, T. E. (2004). Role for moesin in lipopolysaccharide–stimulated signal transduction. *Infection and Immunity*, 72(4), 2312–2320.
 14. Jo, S. Y., Kang, M. S., Kim, Y. M., & Kim, H. T. (2016). An experimental study on the anti-inflammatory effects of Cheonggisang extract in allergic late inflammation. *The Journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*, 29(3), 95–105.
 15. Kang, B. K., Kim, M. J., & Ahn, D. H. (2016). In vivo and in vitro inhibitory activity of an ethanolic extract of *Sargassum fulvellum* and its component grasshopper ketone on atopic dermatitis. *International Immunopharmacology*, 40,

- 176–183.
16. Kim, D. H., Hwang, E. Y., & Son, J. H. (2013). Anti-inflammatory activity of *Carthamus tinctorious* seed extracts in Raw 264.7 cells. *Journal of Life Science*, 23(1), 55–62.
 17. Kim, E. K., Lee, S. J., Moon, S. H., Jeon, B. T., Kim, B., Park, T. K., Han, J. S., & Park, P. J. (2010). Neuroprotective effects of a novel peptide purified from venison protein. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(4), 700–707.
 18. Kim, H. J., Kim, D., Lee, M., & Jang, A. (2017). Anti-inflammatory effect of dietary pork extract on proliferation and cytokine secretion using mouse primary splenocytes. *Food Research International*, 102, 710–716.
 19. Kim, K. E., Cho, D., & Park, H. J. (2016). Air pollution and skin diseases: adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *Life Sciences*, 152, 126–134.
 20. Kim, S. R., Choi, H. S., Seo, H. S., Ku, J. M., Hong, S. H., Yoo, H. H., Shin, Y. C., & Ko, S. G. (2014). Oral administration of herbal mixture extract inhibits 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in BALB/c mice. *Mediators of Inflammation*, 2014, 319438.
 21. Kim, Y. S., Lee, S. J., Hwang, J. W., Kim, E. H., Park, P. J., & Jeong, J. H. (2012). Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264.7 macrophages. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*, 41(9), 1205–1210.
 22. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins

- during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680.
23. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444, 1022–1023.
 24. Li, Z., Henning, S. M., Zhang, Y., Zerlin, A., Li, L., Gao, K., Lee, R. P., Karp, H., Thames, G., Bowerman, S., & Heber, D. (2010). Antioxidant-rich spice added to hamburger meat during cooking results in reduced meat, plasma, and urine malondialdehyde concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1180–1184.
 25. Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C., & Seibert, K. (1994). Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), 3228–3232.
 26. Moon, E. K., Bae, H. C., Renchinhand, G., & Nam, M. S. (2007). The relationship between food allergen sensitization and allergic disease in childhood. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 27(3), 337–344.
 27. Moore, K. W., O'garra, A., Malefyt, R. D. W., Vieira, P., & Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10. *Annual Review of Immunology*, 11(1), 165–190.
 28. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, 136(7), 2348–2357.

29. Pereira, P. M. D. C. C., & Vicente, A. F. D. R. B. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93(3), 586–592.
30. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice–Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.
31. Robinson, M. J., & Cobb, M. H. (1997). Mitogen–activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2), 180–186.
32. Roseiro, L. C., Santos, C., Gonçalves, H., Moniz, C., Afonso, I., Tavares, M., & da Ponte, D. J. B. (2014). Concentration of antioxidants in two muscles of mature dairy cows from Azores. *Meat Science*, 96(2), 870–875.
33. Seo, M. J., Kang, B. W., Park, J. U., Kim, M. J., Lee, H. H., Ryu, E. J., Joo, W. H., Kwang, H., & Jeong, Y. K. (2013). Effect of black garlic extract on cytokine generation of mouse spleen cells. *Journal of Life Science*, 23(1), 63–68.
34. Tsai, M. L., Lin, C. C., Lin, W. C., & Yang, C. H. (2011). Antimicrobial, antioxidant, and anti–inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(10), 1977–1983.
35. Vasto, S., Mocchegiani, E., Malavolta, M., Cuppari, I., Listi, F., Nuzzo, D., Ditta, V., Candore, G., & Caruso, C. (2007). Zinc and inflammatory/immune response in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1100(1), 111–122.
36. Waetzig, V., Czeloth, K., Hidding, U., Mielke, K., Kanzow, M., Brecht, S., Goetz, M., Lucius, R., Herdegen, T., &

- Hanisch, U. K. (2005). c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia*, 50(3), 235–246.
37. Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., & Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), 3698–3703.
38. Willeaume, V., Kruys, V., Mijatovic, T., & Huez, G. (1995). Tumor necrosis factor- α production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *Journal of Inflammation*, 46(1), 1–12.
39. Yoon, H. J., Jang, M. S., Kim, H. W., Song, D. U., Nam, K. I., Bae, C. S., Kim, S. J., Lee, S. R., Ku, C. S., Jang, D. I., & Ahn, B. W. (2015). Protective effect of diet supplemented with rice prolamin extract against DNCB-induced atopic dermatitis in BALB/c mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine Research*, 15(1), 353.

[별첨] 용어 해설

ABTS 라디칼 소거능 : ABTS(2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)로부터 자유 라디칼을 만든 후 항산화물질과 반응시켜 환원되는 원리를 이용한 실험이며, 항산화 활성이 높을수록 ABTS 라디칼 소거능이 높음.

FRAP 활성 : 환원능력을 평가하는 항산화 활성 방법으로 Fe^{3+} 항산화제에 의해 Fe^{2+} 로 환원되는 원리를 이용하는 실험이며, 항산화 활성이 높을수록 FRAP 활성이 높음.

ORAC 활성 : 수소전자의 전달을 기본으로 생성된 활성산소를 제거하는 능력을 평가하는 방법으로 생성된 활성산소는 형광물질을 비형광물질로 산화시키게 되고 항산화 물질에 의해 형광 수치가 떨어지는 정도를 측정하는 실험임. 인체 내 항산화 작용과 가장 유사하게 작용하며 항산화 활성이 높을수록 ORAC 활성이 높음.

MDA (malondialdehyde) : 조직이 산화적 손상을 받아 생체막 등의 지질 성분이 과산화 되어 생성되는 최종생성물로 대장염 발생 시 대장에서 그 양이 증가함.

RAW 264.7 cell : 마우스에서 추출한 대식세포로 계속 증식할 수 있도록 유전자 변이를 일으킨 세포주임.

Mitogen : 세포의 분화 및 증식을 촉진시키는 물질임.

LPS (lipopolysaccharide) : 지질다당질로 그람음성 세균의 세포벽의 구성성분 중 하나임. B 세포의 증식을 촉진시키는 mitogen임.

ConA (concanavalin A) : 콩에서 추출한 단백질로 T세포의 증식을 촉진시키는 mitogen임.

NO (nitric oxide) : 아르지닌(L-arginine)으로부터 생성되는 산화질소로서 세포 내 염증 반응을 매개함.

PGE₂ (prostaglandin E₂) : 염증을 매개하는 물질로 혈관 확장, 부종, 발열 등을 매개함.

iNOS (inducible nitric oxide synthase) : 외부자극이나 염증성 사이토카인등에 의해 자극 시 세포에서 발현이 증가하며 NO를 합성해 염증반응을 매개함.

COX-2 (cyclooxygenase) : arachidonic acid를 PGE2로 전환시키는 효소로 염증반응을 매개함.

Th1 cytokine (pro-inflammatory cytokine) : 면역세포 중 보조 T 세포1 (Th1)에서 분비하는 사이토카인으로 염증 반응을 활성화 시켜 염증성 사이토카인이라 칭함. IL-6, IFN- γ , TNF- α 등이 있음.

Th2 cytokine (anti-inflammatory cytokine) : 면역세포 중 보조 T 세포2 (Th2)에서 분비하는 사이토카인으로 염증성 사이토카인을 조절하여 항염증 사이토카인이라 칭함. IL-5, IL-10, IL-4, IL-2 등이 있음.

MAPK (mitogen-activated protein kinase) : 세포 증식, 분화, 생존과 사멸 등을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절하는 신호전달 체계임. ERK, JNK, p38을 포함함.

ERK (extracellular signal-regulated kinase) : 세포의 증식 또는 분화를 조절하는 세포의 신호조절 인산화 효소로 염증 반응에 관련된 세포 내 신호전달계에 중요한 역할을 함.

JNK (c-Jun NH2-protein kinase) : LPS와 염증성 사이토카인과 같은 염증 자극에 반응하는 세포에 의해 활성화되고 염증반응 및 세포 사멸을 매개함.

p38 : 세포 내 염증관련 신호전달 단백질 중 하나로 활성화 되면 세포사멸을 유도하고 염증을 일으키는 것으로 알려져 있음.

β -actin : 세포 골격을 이루는 기본적인 액틴 중에 하나 세포의 온전성 및 단백질 변성을 알아보기 위한 대조군 단백질로 사용됨.

BALB/c : 주로 면역 실험에 이용되는 연구용 생쥐임.

HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol) : 고밀도지단백콜레스테롤이라 하며, 고밀도 지단백질과 콜레스테롤이 결합한 상태로 저밀도지단백콜레스테롤을 간으로 이송하여 낮추는 역할을 함.

LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol) : 저밀도 지단백 콜레스테롤이라 하며, 저밀도 지단백질과 콜레스테롤이 결합한 상태로 혈관 벽에 쌓여 혈액의 흐름을 방해하고 동맥경화를 유발할 수 있음.

TC (total cholesterol) : 총 콜레스테롤이라 하며, 혈청에 포함된 콜레스테롤의 총량으로 대장염 유발 시 마우스 혈액에서 증가한다고 알려져 있음.

TG (triglyceride) : 중성 지방이라 하며, 혈중 중성지방은 식사로부터 들어오는 지방이나 간에서 합성되는 지방이 혈액 속에 있는 형태로, 혈중 지방 중 가장 많은 비중을 차지함. 혈중 중성지방은 혈관 건강에 나쁜 콜레스테롤(LDL-콜레스테롤)의 생성을 돕고, 좋은 콜레스테롤(HDL-콜레스테롤)의 분해를 촉진함.

***Bifidobacterium* spp.** : 호기성 그람양성균으로 대장을 구성하는 주요 균총 중에 하나이며 감염예방과 정상 효과를 가진다고 알려져 있음.

***Clostridium* spp.** : 내열성 포자를 생성하는 그람 양성간균으로 장내에서 대장의 점막을 손상시켜 대장염을 유발시킨다고 알려져 있음.

***Lactobacillus* spp.** : 유산균으로 장내환경을 안정화 시키고 유해균을 억제시키는 것으로 알려져 있음.

Bacteroidetes : 박테로이데테스문으로 장내 미생물 군집의 대다수를 차지하는 그람음성균임.

Firmicutes : 퍼미큐티스문으로 장내 미생물 군집의 대다수를 차지하는 그람양성균임.

CD4+ T cell : 보조 T 세포로서 B 세포, 수지상세포, 대식세포 등과 상호작용함으로써 다른 면역 세포들을 활성화 시키고 조절하는 역할을 함.

CD8+ T cell : 세포독성 T 세포로서 바이러스 등에 감염된 세포나 종양 세포를 파괴함.

DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene) : 아토피 피부염 피부염을 유발하는 화학물질로 실험동물의 피부에 도포 시 실험동물 체내에 과민반응이 일어나 아토피 피부염을 유발함.

Sensitization : 아토피 피부염과 같은 과민 반응을 실험동물에서 유발 시 높은 농도의 DNCB를 도포하여 자극을 주는 단계임.

Challenge : 아토피 피부염과 같은 과민 반응을 실험동물에서 유발 시 낮은 농도의 DNCB를 지속적으로 도포하여 만성단계를 유발하는 과정임.

IgE (immunoglobulin E) : 항체 단백질의 하나로 비만세포와 친화성을 가짐. IgE와 알레르겐이 반응하면 염증반응을 일으키며 알레르기와 같은 과민반응 시 혈액 내에 증가하는 것으로 알려져 있음.

Mast cell : 비만세포로 과립을 많이 함유하고 있으며, 과립에는 히스타민 세로토닌 등 면역과 관련된 단백질을 함유하고 있음. 과립이 방출되며 알레르기 반응을 유발하기도 함.

※ '본 보고서에 대한 지적재산권은 한우자조금관리위원회에 있으며, 본 연구결과 및 내용의 일부 또는 전부를 인용하는 경우에는 한우자조금관리위원회 자료를 인용하였음을 반드시 명기해야 함.' '이러한 내용을 명기한 경우에만 사전 승인 없이 무상으로 인용할 수 있음.'