



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

ApoB-100 특이 항체에 의한 비만치료의 대사적 특성

Metabolic Characteristics of Obesity Treatment by
ApoB-100 specific Antibody

이 수 연

漢 陽 大 學 校 大 學 院

2009年 2月

碩士學位論文

ApoB-100 특이 항체에 의한 비만치료의 대사적 특성

Metabolic Characteristics of Obesity Treatment by
ApoB-100 specific Antibody

指導教授 金 曉 駿

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出합니다

2009年 2月

漢陽大學校 大學院

生化學科

李 隨 然

이 論文을 이 수 연의 碩士學位 論文으로 認准함.

2009年 2月

審 查 委 員 長 이 영 식 ⑩

審 查 委 員 Bert Binas ⑩

審 查 委 員 김 효 준 ⑩

漢陽大學校 大學院

목 차 (Contents)

그림 목 차 (List of Figures)	iv
표 목 차 (List of Tables)	vi
약 어 표 (List of Abbreviations)	vii
국 문 요 지	viii
I. 서 론	1
II. 실험 재료 및 방법	5
1. 실험재료	5
1.1 실험동물과 사료	5
1.2 유전자 재조합 대장균의 배양과 발현 단백질의 정제 및 백신의 제조	5
1.3 지방의 정량	5
1.4 세포의 배양 및 FACS 분석	5
1.5 단백질 정량 및 항체 정량	6
2. 실험방법	7
2.1 백신의 제조	7
2.1.1 재조합 단백질 B4RB2의 발현	7
2.1.2 B4RB2 단백질의 정제	7
2.1.2.1 정제 buffer의 조성	7
2.1.2.2 B4RB2의 정제과정	7
2.1.3 B4RB2 단백질의 농도 측정 및 백신 제조	8

2.2 백신의 최소투여용량 결정	9
2.2.1 실험동물의 그룹화 및 백신 주사	9
2.2.2 채혈 및 indirect ELISA를 이용한 유도 항체량 측정	9
2.2.2.1 실험동물에서의 채혈 및 혈청 분리	9
2.2.2.2 Indirect ELISA를 이용한 항체 titer 측정.....	9
2.3 백신의 항비만 효능 검증	1 1
2.3.1 실험동물의 그룹화 및 백신 주사	1 1
2.3.2 채혈 및 indirect ELISA를 이용한 항체 titer 측정	1 1
2.3.2.1 실험동물에서의 채혈 및 혈청 분리	1 1
2.3.2.2 Indirect ELISA를 이용한 항체 titer 측정.....	1 1
2.4 지방 농도의 측정	1 4
2.4.1 혈청 내 지방 농도 측정	1 4
2.4.1.1 Total-cholesterol	1 4
2.4.1.2 HDL-cholesterol	1 4
2.4.1.3 LDL-Cholesterol	1 4
2.4.1.4 Triacylglycerol	1 5
2.4.2 Stool 함유 지방 측정	1 5
2.4.2.1 Stool의 채집	1 5
2.4.2.2 Stool에서의 지방 추출	1 5
2.4.2.3 Stool에서의 지방 습식 정량분석	1 6
2.5 대식세포의 VLDL-항체착물 탐식작용 연구	1 7
2.5.1 VLDL 과 VLDL-항체착물의 준비	1 7
2.5.1.1 Human serum에서 VLDL의 분리 및 정량	1 7
2.5.1.2 VLDL과 oxVLDL의 DiI labeling	1 7
2.5.1.3 CuSO ₄ 를 이용한 VLDL의 산화.....	1 7
2.5.1.4 VLDL과 oxVLDL의 항체착물 제작	1 8
2.5.2 대식세포(Raw 264.7 cell)의 배양	1 8
2.5.3 대식세포에의 VLDL-항체착물 처리	1 8

2.5.4 VLDL-항체착물 탐식 여부의 현미경적 측정	1 8
2.5.5 VLDL-항체착물 탐식 여부의 FACS 분석	1 9
III. 결 과	2 1
1. 백신의 최저 투여용량 결정	2 1
1.1 B4RB2 정제 결과	2 1
1.2 백신 dose 별 유도되는 항체의 양 조사	2 4
2. 백신의 체중 증가 억제 효능 입증	2 7
3. 백신의 효능으로 인한 혈청과 stool에서의 지방 함량 변화.....	3 0
3.1 혈청 내 지방함량 변화 측정	3 0
4. VLDL 분리 및 oxidation 확인	3 6
5. VLDL-항체착물이 대식세포의 대사에 미치는 영향	3 8
5.1 현미경을 통한 VLDL-항체착물(VLDL-Ab)의 대식세포로의 탐식여부 조사....	3 8
5.2 FACS 분석을 통한 VLDL-항체착물의 대식세포로의 탐식여부 및 대사에 끼치는 영향 평가	4 0
IV. 결 론	4 3
V. 참고문헌	4 5
Abstract	4 7
감사의 글	4 9

그림 목 차 (List of Figures)

Fig. 1. Schematic of the fate of dietary fats.	3
Fig. 2. Schematic drawing of the binding site for the vaccine-induced antibody.	4
Fig. 3. Elution profile of B4RB2 by His-tag affinity chromatography..	2 2
Fig. 4. Characterization of the purified B4RB2 by 15% SDS-PAGE.....	2 3
Fig. 5. Antibody titers at 15 weeks of age.	2 5
Fig. 6. Weights of ICR mice (measured weekly).	2 6
Fig. 7. Antibody titers after final boosting	2 8
Fig. 8. Body weight increments from 41 to 51 weeks of age.....	2 9
Fig. 9. Total cholesterol concentrations in mouse sera.....	3 1
Fig. 10. HDL-cholesterol amount in anti-serum	3 2
Fig. 11. LDL-cholesterol amount in anti-serum	3 3
Fig. 12. Triacylglycerol amount in anti-serum.	3 4
Fig. 13. 12% SDS-PAGE gel loaded with VLDL and oxVLDL samples.....	3 7
Fig. 14. Oil-red O staining of raw 264.7 cells incubated with VLDL, VLDL-	

Ab, oxVLDL, or oxVLDL-Ab.	3 9
Fig. 15. FACS analysis of the uptake of Dil-labeled VLDL, VLDL-Ab, oxVLDL and oxVLDL-Ab by Raw 264.7 cell.	4 1
Fig. 16. FACS analysis of granule and activity of the cells after treated Dil VLDL, Dil VLDL-ab complex, Dil oxVLDL, and Dil oxVLDL-ab complex.	4 2

표 목 차 (List of Tables)

Table 1. The experimental groups for determination of the minimum injection dose	1 0
Table 2. Experimental groups for determination of the metabolic effect of the vaccine	1 3
Table 3. Experimental groups for the measurement of VLDL and VLDL-ab complex uptakes	2 0
Table 4. Lipid concentrations of ICR mouse sera	3 5

약 어 표 (List of Abbreviations)

Amp : Ampicillin
Apo-B : Apolipoprotein B
BSA : Bovine Serum Albumin
DiI : 1,1'-Diiododecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanineperchlorate
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS : Fluorescence- activated cell sorter
FBS : Fetal Bovine Serum
HDL : High Density Lipoprotein
IDL : Intermediate Density Lipoprotein
IPTG : Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
Kan : Kanamycin
LDL : Low Density Lipoprotein
OPD : o-Phenylenediamine
oxLDL : Oxidized Low Density Lipoprotein
oxVLDL : Oxidized very Low Density Lipoprotein
PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS : Phosphate Buffered Saline
PMSF : Phenylmethanesulphonyl Fluoride
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
TLC : Thin-Layer Chromatography
VLDL : Very Low Density Lipoprotein

국 문 요 지

비만은 대사성 질환으로 그 치료와 예방에 있어 많은 노력과 사회적 비용이 소요되고 있다. 비만이란 음식으로 섭취한 에너지원이 체내에서 소모되고 남는 잉여분이 축적됨으로 발생한다. 특히 지방은 소장에서 흡수되어 chylomicron의 형태로 순환하며 간으로 이동하여 apoB, apoE 등이 결합된 VLDL의 형태로 재구성된다. 혈액내의 VLDL은 lipoprotein lipase에 의해 가수분해되어 IDL, LDL이 되어 말초조직으로 흡수된다.

선행연구에서 ApoB-100의 구조를 모방한 mimetic peptide pB1을 작성하였다. 이 peptide를 실험동물에 면역주사하면 유도되는 anti-pB1 antibody는 LDL이나 VLDL에 있는 apoB와 결합하여 이들의 수용체에 대한 결합을 저해하여 조직으로의 흡수와 축적을 저해하여 비만치료제로서의 기능을 하는 것으로 확인되었다.

본 연구에서 백신으로 유도된 Apo B-100특이 항체가 VLDL의 apoB-100을 인식하여 Lipoprotein-항체 착물(complex)이 되었을 때 나타나는 비만을 억제하는 현상에 대하여 대사적인 특성을 규명하고자 하였다. 첫 번째로 ICR mouse에 B4RB2 백신을 접종하여 비만억제효과가 나타나는 B4RB2의 최소투여 용량을 결정하였으며, 고지방식을 투여하였을 때 혈중 및 stool의 지방농도를 분석하여 지방조직에 축적되지 않은 잉여 지방의 대사경로를 추정하였다. 두 번째로 형광세포분석(FACS)기법을 이용하여 VLDL-항체 착물의 macrophage-uptake에 대한 특성을 *in vitro* 실험으로 검토하였다.

그 결과 최소유효용량은 0.6 mg/kg BW임을 확인하였다. 또한 백신을 50 μ g을 주사한 실험군에서 항체가 유도되기 전 혈청 중의 total-cholesterol의 농도는 185.4 ± 18.7 mg/dL, LDL-cholesterol은 63.1 ± 7.5 mg/dL, HDL-cholesterol은 145.5 ± 0.6 mg/dL, TG는 85.4 ± 37.1 mg/dL에서 항체가 유도된 후 농도는 각각 306.3 ± 28.4 , 109.1 ± 15.7 , 177.6 ± 4.6 , 102.7 ± 41.6 mg/dL로 20~70% 증가하였다. 반면, stool에서의 지방함량은 항체 유도 전 38.0 ± 4.0 μ M/g 에서 36.0 ± 1.0 μ M/g로 큰 차이는 보이지 않았다.

또한 In vitro 실험에서 raw 264.7 cell에 VLDL, VLDL-항체 착물, oxVLDL, oxVLDL-항체착물을 처리한지 24시간이 경과한 후 세포에 탐식된 정도가 control에 비해 45, 300, 150 및 87배로 증가하였으며, 세포의 활성도 역시 1.5, 1.7, 1.2 및 2배로 증가하였다. 48시간이 경과한 후의 세포로 탐식된 정도는 10, 200, 48 및 50배로 24시간에 비해

감소하였으나 세포의 활성은 각각 1.2, 1.8, 1 및 2배로 그대로 유지되고 있음을 알 수 있었다.

LDL 혹은 VLDL을 탐식한 macrophage에 있어서 cholesterol의 처리과정은 동맥경화 발생과 관련하여 많은 연구 보고가 이루어 졌으나 지방산에 대한 연구는 전혀 보고된 바가 없다. 따라서 대식세포 내에서의 유리 지방산 혹은 triacylglycerides에 관한 대사에 관한 연구가 이루어 져야 할 것이다.

이상의 결과로부터 B4RB2의 접종으로 비만을 억제한 경우, 섭취한 잉여의 지방은 HDL에 의한 reverse transport와 같은 경로를 통한 배설 경로를 통해 직접 배출되지는 않으며, 말초 지방조직에의 저장이 저해를 받는 만큼, 혈중 잔존 시간은 항체 결합에 의해 연장되는 것으로 나타났다. 혈관 수송계를 이탈하여 내막(intima)으로 이동한 VLDL은 활성화된 조직의 macrophage에 의해 탐식되며, 이와 같이 지방을 포획한 macrophage는 장시간 granule의 증가를 보여 지속적으로 활성화가 유지되고 있음을 확인하였다.

I. 서론

비만은 체내에 과잉상태인 에너지가 지방으로 축적되어 체지방이 비정상적으로 많아 대사이상이 유발되어 나타나는 현상이며, 그 원인은 신경내분비적 원인, 약물 원인, 활동량 감소, 유전적 질환으로 추정된다.

우리가 섭취하는 지방은 체내 소장에서 흡수되어 chylomicron이란 micell 형태로 배출된다. Chylomicron은 lipase에 의해 분해되며 그 remnant는 간으로 이동하여 VLDL의 형태로 혈관으로 배출된다. 이 VLDL은 lipase에 의해 가수분해되어 TG와 FA를 배출하며 IDL, LDL이 된다. VLDL, IDL 및 LDL은 공통적으로 한 분자당 Apolipoprotein B(ApoB) 한 분자가, 기타 필요에 따라 ApoE, ApoC등과 결합해 있다[1]. 이 Apolipoprotein들은 조직에 존재하는 receptor와 binding site 역할을 하여 조직으로의 흡수를 유도한다 (Fig.1). 섭취한 지방이 에너지로 소모된 후 그 잉여지방이 말초조직에 축적되어 비만이 발생하며, 비만의 판단은 신체질량지수 (BMI, body mass index : 체중(kg)을 신장(m)의 제곱치로 나눈 수치)가 30 kg/m^2 이상인 경우, 혹은 체지방량이 남자의 경우 체중의 25% 이상, 여자의 경우 체중의 30% 이상인 경우이다.

현재까지 비만 치료제들이 개발되고 있으며 이는 식욕억제제, 음식의 흡수억제제, 지방산 생성 억제제, 열생성 촉진제 및 지방분해제 등으로 분류된다. 그러나 이런 치료제들은 부작용들을 가져오는데 예를 들어 식이지방의 흡수저해로 지용성 비타민의 흡수 방해, 안면마비 등이 발생하거나 합병증으로 당뇨병 또는 고혈압 등이 발병하기도 한다. 따라서 현재까지 위장절제술만이 영구적이면서 부작용이 적은 비만치료방법으로 사용되고 있다[3].

선행 연구에서 Apolipoprotein B-100(ApoB-100)의 mimetic peptide를 합성하여 면역주사한 결과 LDL의 ApoB-100와 LDL-receptor와의 결합을 입체적으로 방해하여 지단백의 말초조직으로의 흡수가 저해되어 비만치료제로서 효과가 있음을 입증하였다(Fig. 2). 이는 선행 실험에서 고지방식이를 먹어 비만이 유도된 비만군에 비해 동일한 고지방식이를 먹으며 백신을 주사 맞은

실험군의 무게증가가 억제된 것을 통해 확인하였다 [4-7].

또한 선행 연구에서 LDL과 LDL-항체착물을 대식세포에 처리하여 탐식 여부를 조사한 결과 대식세포로의 탐식은 이루어지나 시간이 지나면 세포 내에서 정상적으로 분해된다는 것이 확인되었다[7].

본 연구에서는 선행연구에 이어 Apo B-100 특이 항체가 지단백-항체착물이 되었을 때 나타나는 비만 억제 현상에 대하여 연구하였다. *In vivo* 실험으로, ICR mouse에 B4RB2 백신을 접종하여 백신의 최저투여 용량을 결정하였으며, 고지방식을 투여하며 항체가 유도 되었을 때의 혈중 및 stool의 지방농도를 분석하여 조직에 축적되지 않은 잉여지방의 대사경로를 예측하였다. 또한 *in vitro* 실험으로, 대식세포로의 VLDL-항체착물의 탐식여부를 FACS와 광학현미경으로 분석하였다.

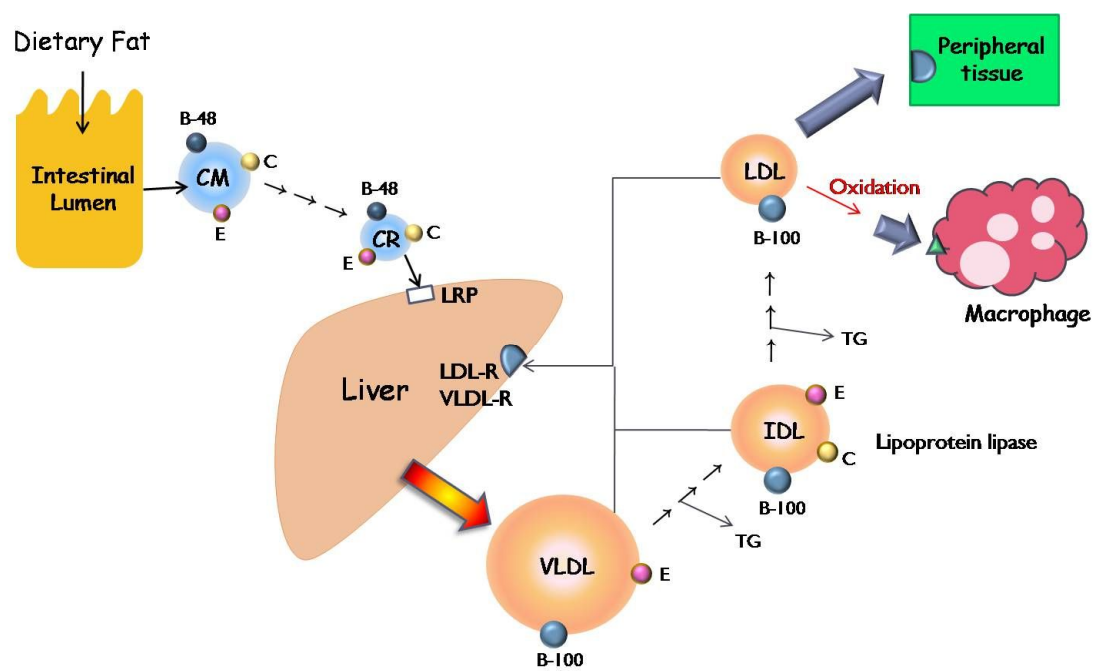


Fig. 1. Schematic of the fate of dietary fats.

CM : Chylomicron, CR : Chylomicron remnant, LRP : LDL-receptor related protein, VLDL-R : VLDL receptor, LDL-R : LDL receptor

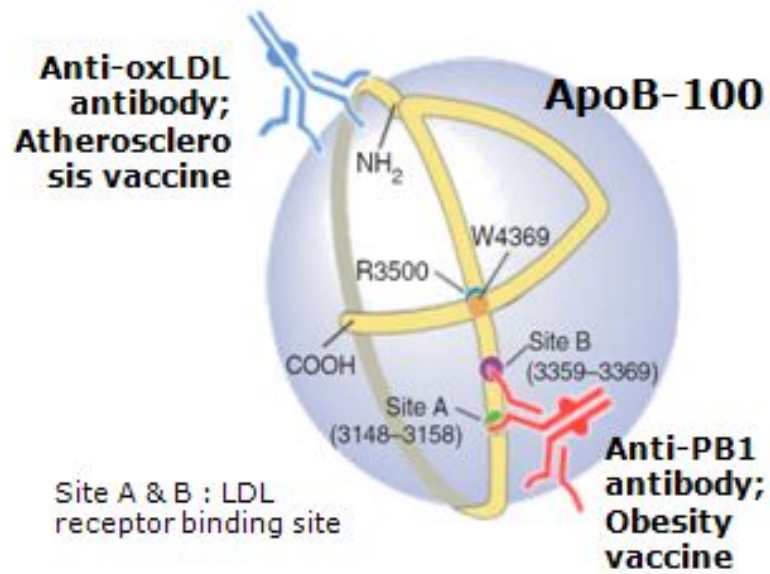


Fig. 2. Schematic drawing of the binding site for the vaccine-induced antibody.

The atherosclerosis vaccine-induced antibody (blue) binds to the N-terminus while the obesity vaccine-induced antibody (red) binds to the C-terminal part of ApoB-100 on LDL.

II. 실험 재료 및 방법

1 실험재료

1.1 실험동물과 사료

*In vivo*에서 백신의 효능을 검증하기 위해 중앙실험동물에서 ICR 7주령(수컷) 20 마리를 구입하여 실험에 사용하였다. 사료는 샘타코에서 구입한 5% 지방이 함유된 것, Researchdiet사의 60% 지방이 함유된 것을 사용하였다.

1.2 유전자 재조합 대장균의 배양과 발현 단백질의 정제 및 백신의 제조

재조합 B4RB2 단백질을 유도하기 위해 M15 cell을 키우는데는 USB사의 LB와 Duchefa사의 IPTG를 사용하였다. 발현된 단백질을 정제하기 위해 Bio-rad사의 Econosystem에 Ni-NTA His-Bind resin(GE Healthcare)을 이용하였다. 정제에 사용한 urea는 Qbiogene 제품을, dialysis에 사용한 MWCO 3,500 membrane은 Spectrum 제품을, 백신제조에서 adjuvant로는 Reheis사의 alumina hydroxide를 이용하였다. Pre-stained protein marker는 Elpis 제품을 사용하였다.

1.3 지방의 정량

혈청의 지방 정량을 위해서 아산제약에서 판매하는 아산 셋트 총 콜레스테롤 측정용 시액(AM 202-K), 중성지방 측정용시액(AM157S-K), 에취디엘 콜레스타제(AM 203-k)와 Randox의 LDL-cholesterol 분석 키트(CH2657)을 사용하였다. Mouse stool에서의 지방 추출을 위해 사용한 EtOH은 HAYMAN 제품을, CHCl₃은 Junsei 제품을, HCl과 MeOH는 Duksan사의 제품을 사용하였고 titration에 사용한 thymol blue는 Sigma 제품을 사용하였다.

1.4 세포의 배양 및 FACS 분석

Macrophage cell line으로서 raw 264.7 cell은 KTCC에서 구입하였으며 DMEM과

FBS는 Welgene사의 것을, Antibiotic-Antimycotic은 Gibco사의 것을 사용하였다. 세포는 SPL사의 100mm dish, Nunc사의 6-well plate에서 배양하였으며 harvest를 위해 nunc사의 rubber policeman을 이용하였다. 세포에 labeling 한 Dil는 Fluka사의 제품을, DMSO에 녹인 Dil를 보관하기 위해 사용한 갈색 tube는 SPL사의 제품을, 세포 내 지방성분 염색을 위해 사용한 isopropanol과 oil-red O는 각각 Junsei와 AMRESCO(Solon, OH)의 제품을, 세포 고정에 사용한 formaldehyde는 DaeJung사의 제품을 사용하였다. FACS 측정과 분석은 FACS Calibur(BD)의 BD Cell Quest 소프트웨어를 이용하였다.

1.5 단백질 정량 및 항체 정량

단백질 정량을 위해 Pierce사의 BCA 정량 kit와 BSA를 사용하였다. 단백질 정량에 사용한 96-well microtiter plate는 SPL사의 것을, 항체 정량에 사용한 96-well immuno plate는 NUNC사의 것을 사용하였다. 항체정량에서의 2nd antibody로 사용한 HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody와 HRP의 substrate인 OPD는 Sigma사의 제품을 사용하였다. 발색반응 후 흡광도의 측정은 BIO TECK사의 synergy HT를 이용하였다.

2 실험방법

2.1 백신의 제조

2.1.1 재조합 단백질 B4RB2의 발현

백신의 제조를 위해 본 연구실에서 구축한 B4RB2/pQE30/M15 균주를 0.1%(v/v) Amp와 Kan(50 mg/ml)이 포함된 LB media 2 l에서 키웠다. 약 2시간 후 600 nm에서 측정한 흡광도가 0.4~0.6에 도달하면 1 M IPTG를 1/1000(v/v) 되도록 넣어 4시간 동안 B4RB2 단백질의 발현을 유도하였다. 재조합 균주를 키운 배지는 8,000rpm에서 20분간 centrifuge를 수행하며 pellet만을 모아 -20℃에 보관하였다.

2.1.2 B4RB2 단백질의 정제

2.1.2.1 정제 buffer의 조성

Sonication buffer는 20 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Na-phosphate이며 binding buffer의 조성은 20 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Na-phosphate, 8 M urea이며 washing buffer는 50 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Na-phosphate, 8 M urea이며 elution buffer는 250 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Na-phosphate, 8 M urea로 만들어 이용하였다.

2.1.2.2 B4RB2의 정제과정

2.1.1에서 얻은 pellet 1 g당 sonication buffer 5 ml의 비율로 resuspension을 수행하였다. Cell을 lysis 시키기 위해 1분 간격으로 30초씩 총 20분간 sonication 하였다. 4℃에서 9,000 rpm으로 20분간 centrifuge 후 상층액은 따로 보관하고 pellet은 binding buffer로

resuspension 후 sonication을 2~3 cycle 더 수행하였다.

B4RB2 단백질에는 histidine이 tagging되어 있어 이를 이용하여 Ni-NTA resin으로 affinity chromatography를 수행하였다. 우선 binding buffer로 zero를 설정 후 sonication이 끝난 solution을 흘려주었다. 그 후 binding buffer로 다시 zero를 맞추고 washing buffer로 resin에 non-specific binding 단백질을 제거한 후 elution buffer를 흘려 resin에 결합되어 있는 B4RB2를 용출하였다.

Elution된 B4RB2는 buffer의 8 M urea 때문에 denature 상태를 유지하고 있으며 백신으로 사용하기 위해서 urea 및 정제 buffer에 사용된 물질들을 dialysis로 제거하였다. 이 때, urea를 급히 제거하게 되면 denature 되었던 B4RB2가 aggregation 될 수 있으므로 urea의 농도를 2 M씩 단계적으로 감소시키며 MWCO 3,500 membrane을 이용하여 PBS 1 ℓ 로 4시간씩 dialysis 하였다.

2.1.3 B4RB2 단백질의 농도 측정 및 백신 제조

B4RB2는 BCA 정량법으로 농도를 측정하였다. Standard인 BSA는 농도가 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 $\frac{1}{2}$ serial dilution하여 사용하였다. B4RB2와 BSA standard는 정량 plate well당 25 μL 씩 loading하며 BCA 정량 kit의 solution A:B = 50:10이 되도록 섞은 후 well 당 200 μL 씩 loading 하였다. Plate는 호일로 싼 후 37°C에서 30분간 반응시키며 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정량한 단백질의 농도가 0.5 mg/mL 이 되도록 4%(v/v) alumina hydroxide와 PBS로 백신을 제조하였다.

2.2 백신의 최소투여용량 결정

2.2.1 실험동물의 그룹화 및 백신 주사

ICR mouse 7주령 수컷 20마리의 체중을 측정한 후 그룹별 평균무게가 약 32 g이 되도록 3마리씩 7그룹으로 분류하였다. 그 후 복강주사로 primary injection 후 2주 간격으로 총 4회 boosting을 실시하였다. 체중 측정 및 식이 배식은 격일로 주3회 수행하였다(Table 1).

2.2.2 채혈 및 indirect ELISA를 이용한 유도 항체량 측정

2.2.2.1 실험동물에서의 채혈 및 혈청 분리

채혈은 priming 시기부터 매주 eye bleeding으로 수행하였다. 얻은 혈액은 실온에 한 시간 정도 두어 혈병 형성이 확인되면 3,000 rpm에서 15분간 centrifuge하며 상층액인 혈청만을 분리 후 -20℃에서 보관하였다.

2.2.2.2 Indirect ELISA를 이용한 항체 titer 측정

Immuno plate의 well당 B4(1 mg/ml) 0.1 μ g이 coating buffer 100 μ l에 들어가도록 섞어 100 μ l씩 loading하고 4℃에서 overnight incubation 후 well당 washing buffer 300 μ l로 washing을 3 회 수행하였다. 그 후 blocking solution을 well당 300 μ l씩 넣고 37℃에서 두 시간 incubation 후 washing을 3 회 수행하였다. 그 후 흡광도가 0.5가 되도록 dilution fold를 계산하여 항혈청을 PBS-T로 dilution한 후 well당 100 μ l씩 loading하여 37℃에서 1 시간 incubation 하였다. 그 후 washing을 3 회 수행하고 anti-mouse IgG antibody를 PBS-T로 1/10,000 dilution 후 well당 100 μ l씩 loading하여 37℃에서 1 시간 incubation 하였다. 3회 반복 washing 후 OPD solution을 넣고 호일로 싼 후 37℃에서 10분간 반응시켜 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 1. The experimental groups for determination of the minimum injection dose

Group	Number	Injection	Diet
A	3	4% alumina hydroxide with PBS 100 $\mu\ell$	Normal diet (5% kcal fat)
B	6	B4RB2 vaccine 5 $\mu\text{g}/100 \mu\ell$	
C	6	B4RB2 vaccine 20 $\mu\text{g}/100 \mu\ell$	
D	2	B4RB2 vaccine 50 $\mu\text{g}/100 \mu\ell$	
E	3	B4RB2 vaccine 100 $\mu\text{g}/100 \mu\ell$	

2.3 백신의 항비만 효능 검증

2.3.1 실험동물의 그룹화 및 백신 주사

백신의 최저투여 용량 결정 후 체중이 증가하여 자연스럽게 비만이 유도 되었으며 항체 titer는 낮은 mouse를 3 마리를 선별하여 obesity group으로 재편성하였다. 또한 백신그룹은 최저용량인 20 μ g과 50 μ g 두 군으로 나누어 총 4 개의 그룹으로 구성하고 41주령 때 B4RB2 백신 boosting을 수행하였다. 또한 이 시점부터는 normal group을 제외한 모든 mouse의 식이를 60% kcal fat diet으로 바꾸어주었다(Table 2).

2.3.2 채혈 및 indirect ELISA를 이용한 항체 titer 측정

2.3.2.1 실험동물에서의 채혈 및 혈청 분리

Boosting을 시행 전인 40주부터 격주로 eye breeding으로 채혈하였다. 얻은 혈액은 실온에 한 시간 정도 두어 혈병 형성이 확인되면 3,000 rpm에서 15분간 centrifuge하며 상층액인 혈청만을 분리 후 -20℃에서 보관하였다.

2.3.2.2 Indirect ELISA를 이용한 항체 titer 측정

Immuno plate의 well당 B4(1 mg/ml) 0.1 μ g이 coating buffer 100 μ l에 들어가도록 섞어 100 μ l씩 loading하고 4℃에서 overnight incubation 후 well당 washing buffer 300 μ l로 washing을 3 회 수행하였다. 그 후 blocking solution을 well당 300 μ l씩 넣고 37℃에서 두 시간 incubation 후 washing을 3 회 수행하였다. 그 후 흡광도가 0.5가 되도록 dilution fold를 계산하여 항혈청을 PBS-T로 dilution한 후 well당 100 μ l씩 loading하여 37℃에서 1 시간 incubation 하였다. 그 후 washing을 3 회 수행하고 anti-mouse IgG antibody를 PBS-T로 1/10,000 dilution 후

well당 100 μ l씩 loading하여 37℃에서 1 시간 incubation 하였다. 3 회 반복 washing 후 OPD solution을 넣고 호일로 싼 후 37℃에서 10분간 반응시켜 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 2. Experimental groups for determination of the metabolic effect of the vaccine

Group(n)	Injection	Diet
Normal(3)	4% alumina hydroxide with PBS 100 $\mu\ell$	Normal
Obesity(3)	4% alumina hydroxide with PBS 100 $\mu\ell$	HFD
Vaccine A(2)	B4RB2 vaccine 20 μg /100 $\mu\ell$	HFD
Vaccine B(2)	B4RB2 vaccine 50 μg /100 $\mu\ell$	HFD

The normal diet includes 5% kcal fat. The HFD (high fat diet) includes 60% kcal fat.

2.4 지방 농도의 측정

2.4.1 혈청 내 지방 농도 측정

2.4.1.1 Total-cholesterol

Microtiter plate에 혈청 2 μl 와 효소시액 300 μl 를 넣고 plate를 호일로 차광시켜 37°C에서 5분간 반응 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 아산셋트 총콜레스테롤 측정용 시액 kit에 들어있는 콜레스테롤 표준용액(300 mg/dl)을 이용하며 혈청 내 total-cholesterol 양은 $\frac{\text{sample 흡광도}}{\text{standard 흡광도}} \times 300$ 으로 계산하였다.

2.4.1.2 HDL-cholesterol

혈청 6 μl 와 아산셋트 에취디엘 콜레스타제 kit의 침전시액 6 μl 를 1.5 ml tube에 넣어 잘 섞어준 후 상온에서 10분간 방치한 뒤 3,000 rpm 에서 10분간 centrifuge를 수행하였다. 이는 침전시액에 포함되어있는 인팅스텐산과 마그네슘 양이온이 apoB를 가지고 있는 LDL을 침전시키기 위함이다. 그 후 상층액 5 μl 를 취해 microtiter plate에 loading 하고 효소시액 150 μl 를 넣은 후 37°C에서 5분간 반응시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 kit에 들어있는 HDL 표준시액 (50 mg/dl)을 이용하며 혈청 내 HDL-cholesterol양은 $\frac{\text{sample 흡광도}}{\text{standard 흡광도}} \times 50 \times 2$ 로 계산하였다.

2.4.1.3 LDL-Cholesterol

혈청 2 μl 와 kit의 reagent 1 200 μl 를 1.5 ml tube에 넣어 잘 섞어준 후 상온에서 10분간 방치하였다. 이는 serum 내 chylomicron, VLDL-cholesterol, HDL-cholesterol을 제거하고 LDL-cholesterol만 측정하기

위함이다. 그 후 3,000 rpm 에서 10분간 centrifuge를 수행하여 상층액만 microtiter plate에 loading하고 reagent 2 100 μ l를 loading 후 37℃에서 10분간 반응하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 RANDOX LDL-Cholesterol kit의 LDL calibrator (122 mg/dl)를 이용하였으며 혈청 내 LDL-cholesterol 양은 $\frac{\text{sample 흡광도}}{\text{standard 흡광도}} \times 122$ 로 계산하였다.

2.4.1.4 Triacylglycerol

Microtiter plate에 혈청 2 μ l와 효소시액 300 μ l를 넣고 plate를 호일로 씌운 후 37℃에서 5분간 반응하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 아산셋트 중성지방 측정용 시액 kit에 들어있는 중성지방(300 mg/dl)을 이용하였으며 혈청 내 TG양은 $\frac{\text{sample 흡광도}}{\text{standard 흡광도}} \times 300$ 으로 계산하였다.

2.4.2 Stool 함유 지방 측정

2.4.2.1 Stool의 채집

Stool은 boosting 전인 40주부터 격주, 개체별로 채집하였다. 채집한 stool은 2 ml tube에 담아 -70℃에서 보관하였다.

2.4.2.2 Stool에서의 지방 추출

Stool 0.5 g씩 무게를 재어 homogenize tube에 넣고 1.1 ml water, 0.1 ml HCl을 넣은 후 1 분간 homogenize, 1 ml methanol 더해 넣고 1 분간 homogenize, 2 ml chloroform 더해 넣고 2 분간 homogenize를 순차적으로 수행하였다. 이 solution을 10 ml cap tube에 옮긴 후 0.2 ml water와 1 ml methanol로 tube를 washing 하여 cap tube에 담았다. 이 때 mixture의

총 부피비율은 chloroform : methanol : water = 1:1:0.90이 된다. Tube를 10분간 vortexing 후 1,000 rpm에서 10분간 centrifuge 후 지방이 포함된 맨 아래층(chloroform층)을 스포이트로 분리해 유리병이 옮겨 담았다. 그 후 water bath에서 유리병을 데우며 질소 가스로 chloroform을 증발시킨 후 유리병 벽면에 묻은 지방은 ethanol 2 ml에 녹여 2 ml tube에 옮겨 담고 13,000 rpm 에서 1분간 centrifuge로 상층액만 모아 4℃에서 보관하였다.

2.4.2.3 Stool에서의 지방 흡식 정량분석

SPL 15 ml tube에 지방을 녹인 ethanol 1 ml과 absolute ethanol 2 ml을 첨가한 후 titration solution(0.01% thymol blue + 90% EtOH) 0.5 ml을 첨가하였다. 이 solution들이 잘 섞이도록 질소 봄베의 관과 pasteur pipet을 연결하여 질소가 tube 내에서 기포를 형성하도록 설치하였다. 적정용 0.01 N NaOH 용액은 피펫에 채운 후 한 방울씩 떨어지도록 속도 조절 후 지시약의 색이 적색에서 황색과 녹색을 거쳐 청색이 되는 과정에서 황녹색을 띄는 시점의 NaOH의 양을 기록하여 당량점을 적정하였다.

2.5 대식세포의 VLDL-항체착물 탐식작용 연구

2.5.1 VLDL 과 VLDL-항체착물의 준비

2.5.1.1 Human serum에서 VLDL의 분리 및 정량

Human serum을 상온에서 녹인 후 혈청 97 ml당 4% EDTA, 1.5% PMSF, 5% NaN_3 를 각각 1 ml씩 첨가하여 100 ml을 만든다. 이 혼합액을 40,000 rpm, 4°C에서 24 시간 동안 초원심분리 후 상층액을 회수하여 PBS 1 l에서 4시간씩 3번 dialysis를 수행하였다.

VLDL에는 Apolipoprotein인 ApoB와 ApoE가 lipid와 covalent 결합을 하고 있는데 이를 이용하여 BCA 법으로 단백질 정량값을 VLDL 농도로 간주하여 VLDL을 정량 하였다. Standard는 BSA를 사용하였고 VLDL은 PBS로 $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ dilution 후 BCA 정량 kit을 이용해서 정량 하였다.

2.5.1.2 VLDL과 oxVLDL의 Dil labeling

VLDL-항체착물에 형광물질인 Dil를 결합시켜 FACS를 통해 대식세포 내로 탐식되었는지의 여부를 분석하였다. Dil는 농도가 3 mg/ml이 되도록 DMSO에 녹인 후 빛이 투과하지 않는 갈색 1.5 ml tube에 넣어 상온에서 보관하였다. VLDL 1 mg당 Dil 100 μg 이 되도록 계산하여 넣어주고 빛이 투과되지 않도록 호일로 싸 후 37°C에서 16시간 동안 three dimensional shaker에서 반응시켰다. 반응 후 4°C, 40,000rpm에서 24시간 동안 초원심분리를 수행하였다. 그 후 상층액을 0.9% NaCl, 0.01% EDTA가 포함된 PBS 2 l에서 overnight dialysis하였다.

2.5.1.3 CuSO_4 를 이용한 VLDL의 산화

Dil-labeled VLDL에 CuSO_4 의 농도가 50 μM 이 되도록 넣은 후 37°C에서 24시간 동안 반응하여 oxidation 시켰다. 그 후 EDTA 농도가 0.25 mM이 되도록 넣어 oxidation반응을 종료시키고 PBS 1 l로 4시간씩 3번

dialysis 하였다.

2.5.1.4 VLDL과 oxVLDL의 항체착물 제작

Anti-ApoB antibody는 C57BL/6 mouse에 B4T를 주사하여 얻은 antibody(0.6 mg/ml)를 이용하였다. VLDL과 antibody의 양은 1:1의 비율이 되도록 넣어 37℃에서 1시간 동안 반응하였다.

2.5.2 대식세포(Raw 264.7 cell)의 배양

Raw 264.7 cell은 murine macrophage-like cell line이며 10% FBS와 1% AA가 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. Incubator는 37℃, 5% CO₂의 조건을 유지시켰으며 배지 1 ml당 세포 1 x 10⁵개가 되도록 분주하여 100 mm dish에서 약 이틀간 배양 후 세포가 dish 바닥의 90% 이상 채워지면 계대 배양하였다.

2.5.3 대식세포에의 VLDL-항체착물 처리

Raw 264.7 cell 1 x 10⁵ 개를 6-well plate의 well당 배지 3 ml과 넣은 후 16시간 동안 incubator에서 키워 세포를 안정화시켰다. 그 후 VLDL, oxVLDL, VLDL-항체착물, oxVLDL-항체착물을 각각 well당 50 µg씩 처리하였다.

2.5.4 VLDL-항체착물 탐식 여부의 현미경적 측정

Well당 1 ml PBS로 washing을 2 번 해준 후 3% formaldehyde 1 ml을 넣고 15분간 실온에 두어 fixing을 하였다. 그 후 washing을 2 번 해주고 well당 oil-red O staining solution 0.5 ml을 넣어 15분간 실온에서 staining 시켰다. 그리고 PBS로 washing을 2 번 한 후 광학현미경으로 세포의 모양 변화를 관찰하였다.

2.5.5 VLDL-항체착물 탐식 여부의 FACS 분석

Well당 1 ml PBS로 washing을 2 번 하고 1 ml PBS를 넣은 후 rubber policeman(scraper)로 cell을 긁어내었다. 그 후 1.5 ml tube에 넣고 3,000 rpm에서 5분간 centrifuge 한 후 tube 당 1 ml 3% formaldehyde를 넣고 15분간 실온에 두어 fixing 하고 다시 centrifuge를 돌려 formaldehyde를 제거하고 PBS로 washing을 2 번 하였다. 그 후 FACS용 tube에 옮겨 담고 세포에 labeling 시킨 DiI의 형광을 이용해 FACS 분석을 하였다.

Table 3. Experimental groups for the measurement of VLDL and VLDL-ab complex uptakes

Group	Treatment
Control	Raw 264.7 cells
Experiment 1	Raw 264.7 cells + VLDL 50 μ g
Experiment 2	Raw 264.7 cells + VLDL-ab complex 50 μ g
Experiment 3	Raw 264.7 cells + oxVLDL 50 μ g
Experiment 4	Raw 264.7 cells + oxVLDL-ab complex 50 μ g

III. 결 과

1. 백신의 최저 투여용량 결정

1.1 B4RB2 정제 결과

재조합 단백질 B4RB2를 M15 cell에서 얻은 후 his-tag과 Ni-NTA resin의 affinity를 이용해 chromatography를 수행하였다(Fig. 3). Binding buffer를 흘려 baseline을 설정한 후 (A) sample을 흘려주어 흡광도가 증가함에 따라 그래프의 peak가 상승함을 확인하였다 (B). Sample loading 시 waste로 나오는 용액에는 미처 붙지 못한 단백질이 존재할 가능성이 있으므로 따로 모아 2번 반복하여 resin에 흘려주었으며 그 후 binding buffer로 다시 baseline을 설정하였다. 그 후 washing buffer를 흘려주어 non-specific하게 결합한 단백질을 제거하였으며 (C) elution buffer를 흘려주어 원하는 단백질을 용출하였다 (D).

첫 sonication 후의 상층액, binding전, binding 후, elution sample을 15% SDS-PAGE gel에 걸어 확인한 결과 (Fig. 4) 첫 sonication 후의 상층액(A)에서는 21kDa의 B4RB2 band를 확인할 수 없었으며 binding 전, 후(B,C)를 비교해 보면 band의 두께가 얇아짐을 보아 resin에 B4RB2가 binding 하였음을 알 수 있었다. 또한 elution(D)에서 21kDa의 진한 band로 B4RB2가 정제되었음을 확인하였다.

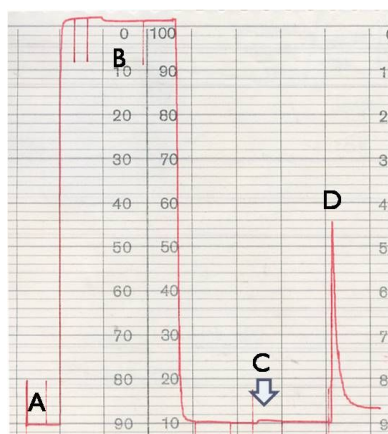


Fig. 3. Elution profile of B4RB2 by His-tag affinity chromatography.

A: Baseline setting with binding buffer, B: sample loading peak, C: washing peak, D: elution peak. Purification was performed with an Econosystem column (2R = 2.5 cm, resin h = 5 cm) from Bio-Rad.

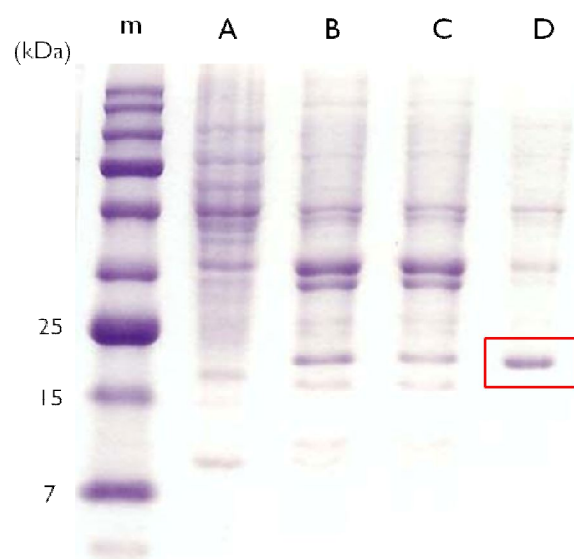


Fig. 4. Characterization of the purified B4RB2 by 15% SDS-PAGE

M: pre-stained protein marker 4 $\mu\ell$, A: supernatant after first sonication, B: before binding, C: after binding, D: elution

1.2 백신 dose 별 유도되는 항체의 양 조사

ICR 7주령 수컷 mouse에 그룹별로 B4RB2 백신을 2주 간격으로 총 4회 주사하였다 (Table 1). 또한 매주 채혈하여 indirect ELISA로 OD값이 0.5인 항체 titer를 살펴본 결과 15주령 때 모든 그룹에서 가장 높은 titer가 나타났다. 항체 titer는 adjuvant만 주사한 A group에서는 나타나지 않았으며 백신 5 μ g을 주사한 B group과 20 μ g을 주사한 C group에서는 dose-dependent한 항체 titer의 증가를 볼 수 있었다. 반면, 50, 100 μ g을 주사한 D, E group은 주사량의 2배 차이에 비해 유도된 항체의 최대량이 비슷한 수치를 나타내었다(Fig. 5).

또한 Fig. 6에서 그룹별 평균 무게를 볼 수 있는데, 항체의 최대량이 유도된 15주부터 25주까지의 증가 추세를 살펴보면 그래프의 기울기가 완만해지는 것을 알 수 있었다. 그리고 25주 이후부터는 다시 기울기가 증가하는 양상을 보였다.

본 실험에서는 모든 group의 먹이가 5% fat의 normal diet로 백신의 접종 여부와 상관없이 그룹간의 무게차이가 크게 두드러지지는 않았다. 그러나 무게증가 추세에서, 유도된 항체가 체중 증가를 억제함을 알 수 있었다. 또한 백신의 최저투여용량은 20 μ g이라는 것을 결정할 수 있었다.

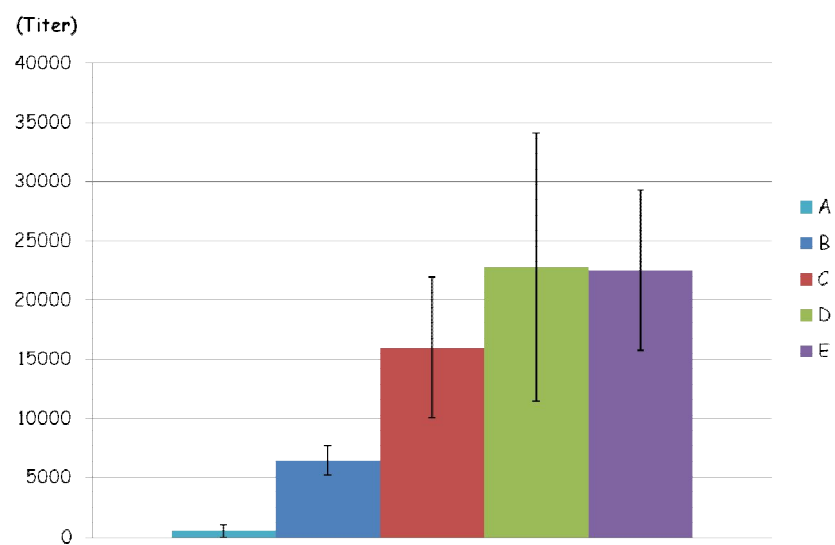


Fig. 5. Antibody titers at 15 weeks of age.

Antibodies were induced by a total of 4 injections of a, no vaccine; B, B4RB2 5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$; C, B4RB2 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$; D, B4RB2 50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$; E, B4RB2 100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$.

Titers at earlier time points were lower (result not shown).

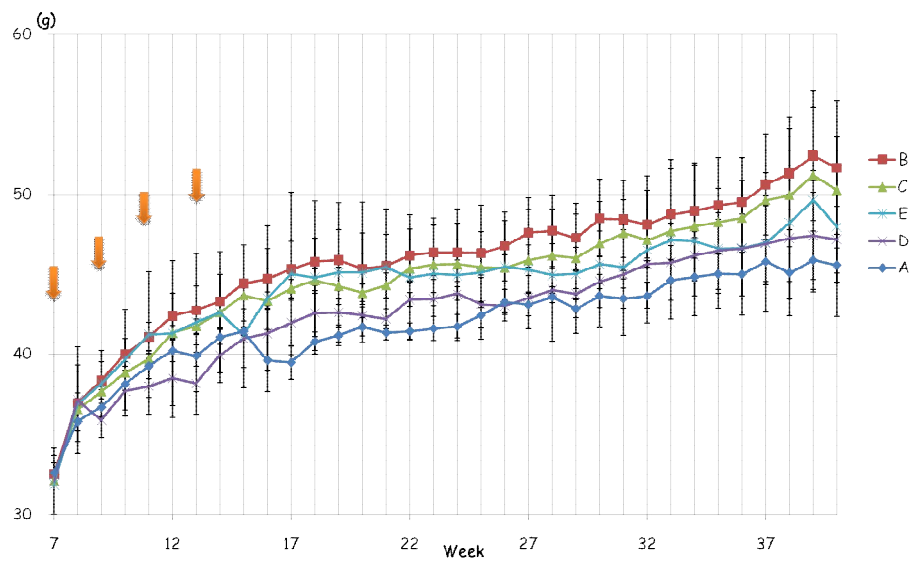


Fig. 6. Weights of ICR mice (measured weekly).

A: no vaccine, B: vaccine (5 μg)-injected group, C: vaccine (20 μg)-injected group, D: vaccine (50 μg)-injected group, E: vaccine (100 μg) injected group. All groups were fed 5% fat normal diet. Arrows indicate the boosting week.

2. 백신의 체중 증가 억제 효능 입증

Final boosting 후 2주 간격으로 채혈하여 indirect ELISA로 항체 titer를 분석하였다. Boosting 3주 후 항체 titer가 최고치에 도달하며 B4RB2 vaccine을 50 μ g 주사한 vaccine B group는 Fig. 5에서의 (D) 또는 (E) 그룹의 최고치보다 더 많이 boosting 됨을 볼 수 있었다. 또한 20 μ g 주사한 vaccine A group은 Fig. 5의 (C) 그룹과 비슷하게 항체 titer가 20,000까지 boosting 되었으며 adjuvant와 PBS만 주사한 obesity group은 5,000 이하의 titer값을 보였다.

Fig. 8에서 final boosting 후 mouse weight 증가량을 살펴보면 normal group은 체중의 변화가 거의 없는 것에 비해 obesity group과 vaccine A group은 무게가 평균적으로 약 2~6 g 증가하였고 vaccine B group은 오히려 감소하는 모습을 보였다. 이를 통해 체내에서 유도 된 ApoB 특이 항체는 체중 증가를 억제함을 확인할 수 있었다.

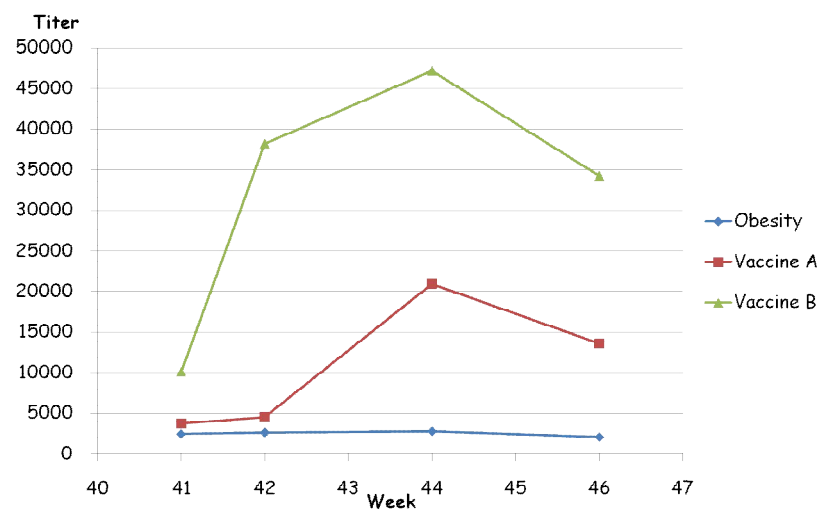


Fig. 7. Antibody titers after final boosting

Diamonds: obesity control group (HFD-fed, adjuvant-injected), squares: HFD plus vaccine A (20 μ g), triangles: HFD plus vaccine B (50 μ g). Final boosting was at week 41.

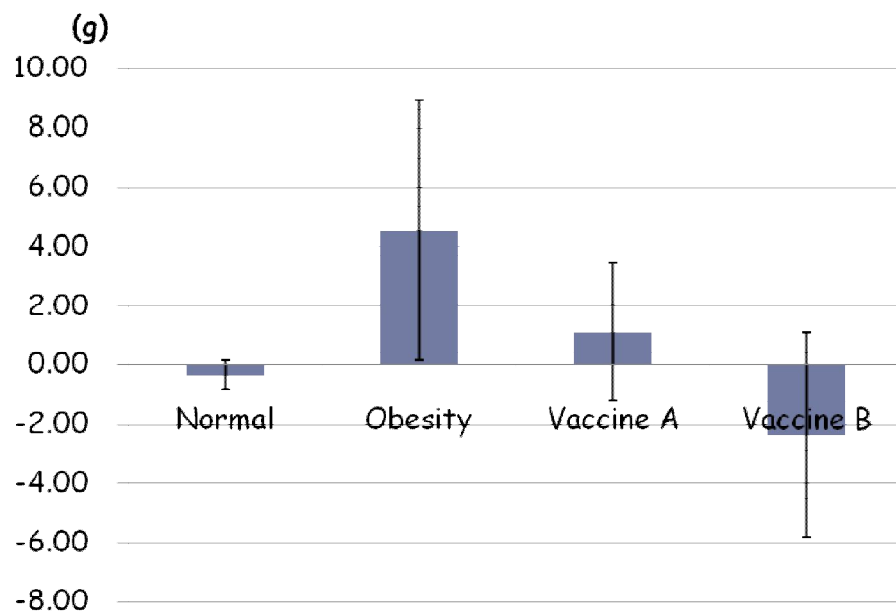


Fig. 8. Body weight increments from 41 to 51 weeks of age.

“Normal” , normal diet, no vaccine. “Obesity” , HFD, no vaccine.

“Vaccine A” , HFD, B4RB2 20 μ g. “Vaccine B” , HFD, B4RB2 50 μ g.

The body weights in the vaccine group increased less or even decreased, compared to the obesity control group.

3. 백신의 효능으로 인한 혈청과 stool에서의 지방 함량 변화

3.1 혈청 내 지방함량 변화 측정

Final boosting 후 격주로 채혈하여 얻은 항혈청에서 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, TG의 양을 측정하였다. Final boosting 전인 40주령에서는 vaccine group의 혈중 total cholesterol 양이 normal group과 비슷하거나 적었지만 44주 이후부터 normal group보다 증가함을 알 수 있었다(Fig. 9). HDL-cholesterol의 양은 주별 10~50 mg/dl의 차이는 있으나 그룹별 패턴이 동일하여 많은 변화가 없음을 알 수 있었다 (Fig. 10). LDL-cholesterol의 경우 antibody titer가 높아지는 44주 때 vaccine B group의 양이 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 11). TG의 양은 특이적으로 46주 때 vaccine B group의 양이 증가하지만 48주에서 다시 감소하였다 (Fig. 12).

Table 4에서 boosting 전인 40주와 항체 titer가 가장 높았던 44주의 각각의 농도를 수치로 살펴보면 normal group을 제외한 모든 실험군에서 지방함량이 높아진 것을 확인할 수 있었다. Obesity group의 지방함량의 증가는 41주에서 boosting과 함께 식이를 60% fat diet로 변경하여 이에 적응하는 과정이라 여겨지며 vaccine group에서는 obesity group이 증가하는 양보다 더 많이 증가함을 확인할 수 있었다. 이를 통해 백신의 면역접종으로 유도된 apoB 특이 항체는 지방의 혈액 내 잔존하는 기간을 오래 지속시킴을 예상할 수 있었다.

본 실험에서 실험군의 그룹별 개체수가 3마리였으며, 따라서 오차가 클 것이 예상되나 혈액 내 잔존하는 lipid 양의 변화 추이를 살펴보는 데에 의의를 두었으며 신뢰도를 높이기 위해 추후 개체수를 증가시켜 실험을 반복해보아야 할 것이다.

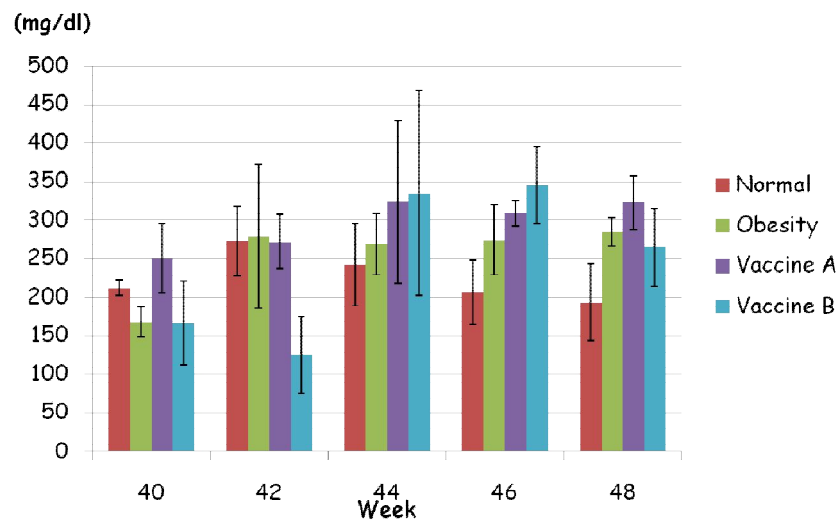


Fig. 9. Total cholesterol concentrations in mouse sera.

Total cholesterol amounts were analyzed with a kit (Asan, Inc). “Normal” , normal diet, no vaccine. “Obesity” , HFD, no vaccine. “Vaccine A” , HFD plus B4RB2 20 μ g. “Vaccine B” , HFD plus B4RB2 50 μ g. Final boosting was at 41 weeks of age.

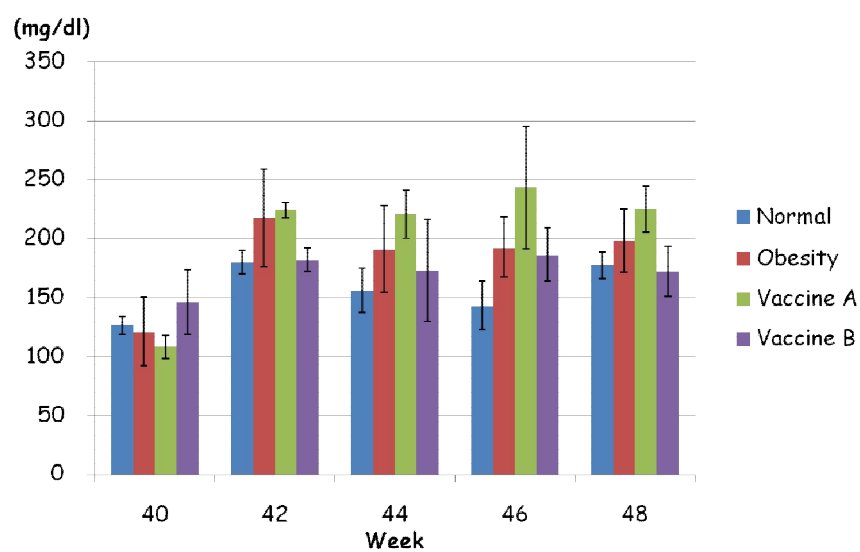


Fig. 10. HDL-cholesterol amount in anti-serum

HDL-cholesterol amounts were analyzed with a kit (Asan, Inc). “Normal” , normal diet, no vaccine. “Obesity” , HFD, no vaccine. “Vaccine A” , HFD plus B4RB2 20 μ g.

“Vaccine B” , HFD plus B4RB2 50 μ g. Final boosting was at 41 weeks of age.

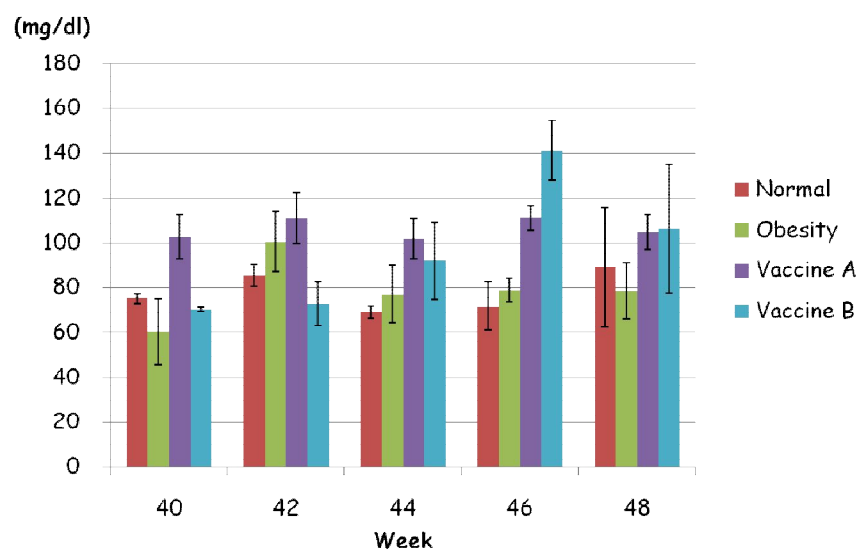


Fig. 11. LDL-cholesterol amount in anti-serum

LDL-cholesterol amount amounts were analyzed with a kit (Randox, Inc). “Normal” , normal diet, no vaccine.

“Obesity” , HFD, no vaccine. “Vaccine A” , HFD plus B4RB2 20 μ g. “Vaccine B” , HFD plus B4RB2 50 μ g. Final boosting was at 41 weeks of age.

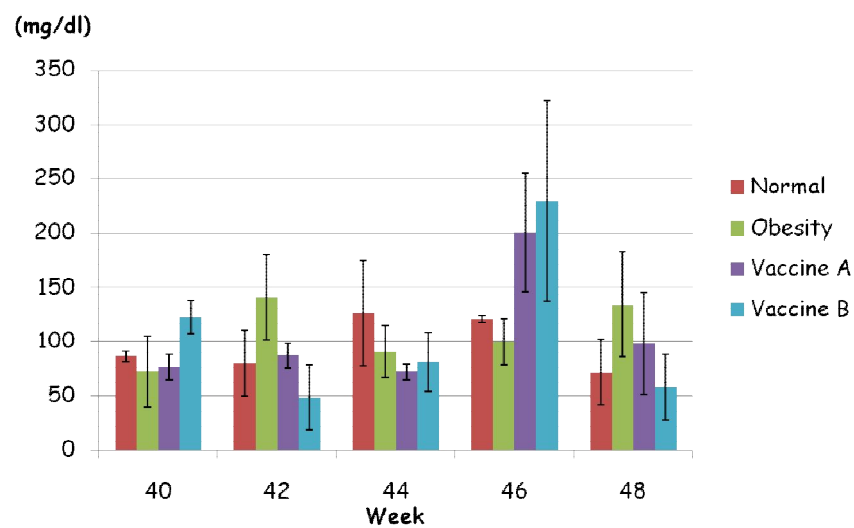


Fig. 12. Triacylglycerol amount in anti-serum.

TG amounts were analyzed with a kit (Asan, Inc). “Normal” , normal diet, no vaccine.

“Obesity” , HFD, no vaccine. “Vaccine A” , HFD plus B4RB2 20 μ g. “Vaccine B” , HFD plus B4RB2 50 μ g. Final boosting was at 41 weeks of age.

Table 4 Lipid concentrations of ICR mouse sera

		Normal		Obesity		Vaccine A		Vaccine B	
Week of age		40	44	40	44	40	44	40	44
Serum	Total-CHO (mg/dl)	212.0 ± 10.0	242.5 ± 53.0	167.8 ± 19.9	268.8 ± 39.5	250.4 ± 45.7	323.7 ± 105.5	166.7 ± 54.1	335.0 ± 133.1
	LDL-CHO (mg/dl)	75.3 ± 2.3	69.1 ± 2.7	60.3 ± 14.6	77.2 ± 12.8	102.8 ± 10.0	102.0 ± 9.2	70.6 ± 0.9	92.1 ± 17.4
	HDL-CHO (mg/dl)	126.4 ± 7.7	155.8 ± 18.9	120.9 ± 29.3	191.2 ± 36.5	108.1 ± 10.0	220.7 ± 20.3	146.1 ± 27.2	173.0 ± 43.2
	TG (mg/dl)	86.0 ± 4.8	126.0 ± 48.5	72.2 ± 32.7	90.8 ± 24.0	76.0 ± 11.3	71.9 ± 6.9	122.5 ± 15.2	81.2 ± 26.7

4. VLDL 분리 및 oxidation 확인

Human serum을 ultracentrifuge 후 상층액을 분리하여 12% SDS-PAGE에서 VLDL 분리가 잘 수행되었는지 확인하였다. Running origin에 남아있는 band는 513 kDa 인 VLDL에 결합되어있는 ApoB-100이며 oxidation 후 ApoB-100 band가 사라지는 것으로 산화된 것을 확인 할 수 있었다[13, 14].

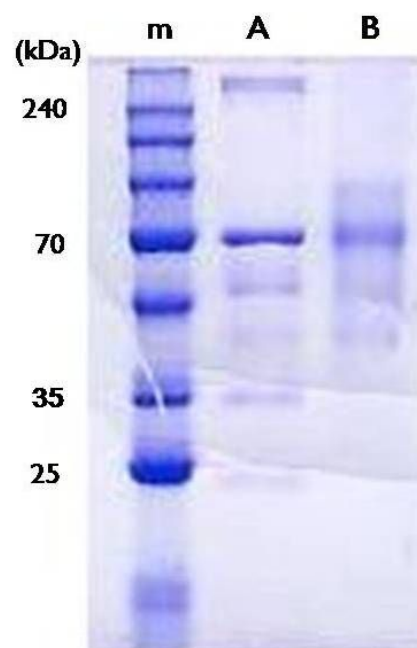


Fig. 13. 12% SDS-PAGE gel loaded with VLDL and oxVLDL samples.

M: Pre-stained protein marker 4 $\mu\ell$,

A: VLDL 5 μg , B: oxVLDL 5 μg .

5. VLDL-항체착물이 대식세포의 대사에 미치는 영향

5.1 현미경을 통한 VLDL-항체착물(VLDL-Ab)의 대식세포로의 탐식여부 조사

Raw 264.7 cell에 VLDL, VLDL-Ab, oxVLDL, oxVLDL-Ab를 각각 50 μ g씩 처리한 후 24시간 incubation 하여(Fig. 15, I) 세포의 morphology 변화를 관찰하였다. 또한 지방을 특이적으로 염색하는 oil-red O staining을 통해 세포 내부에 지방이 어느 정도 탐식되어 있는지 알아보았다.

아무것도 처리하지 않은 Fig. 15, I - A에 비해 나머지 실험군의 세포들은 크기가 조금씩 커지고 둥근 모양이 뾰족한 모습으로 바뀌었으며 oil-red O staining이 되어 cell 내부가 붉게 물들었음을 알 수 있었다. 이를 통해 처리해주었던 VLDL과 VLDL-Ab, oxVLDL과 oxVLDL-Ab가 모두 raw cell에 uptake 되었음을 알 수 있었다.

24시간 incubation후 배지를 새로 갈아주고 다시 24시간 incubation을 하여 총 48시간 배양한 Fig. 15, II에서는, 아무것도 처리하지 않은 A와 나머지 실험군의 세포들의 모양을 비교해 볼 때 A의 모양과 흡사하게 둥근 형태였으며 그 크기 또한 A와 비슷하였다. 항체복합체를 처리하였던 (C)나 (E)에서는 세포 내부에 granule이 쌓이고 그 크기가 커져 결국은 죽어버리는 형태의 cell들이 관찰되기도 하였으나 전체에 비해 그 빈도가 많지 않았다.

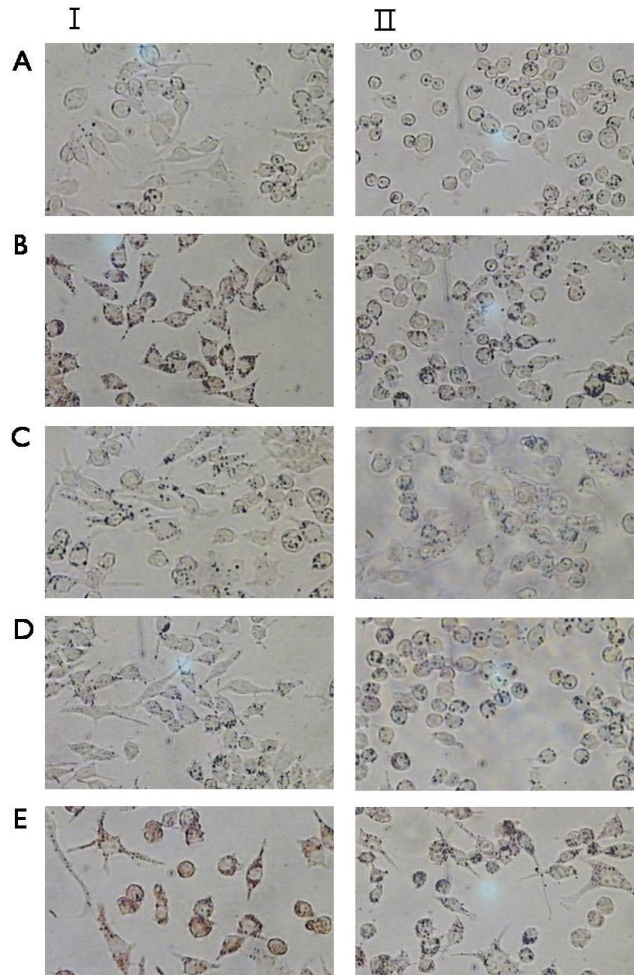


Fig. 14. Oil-red O staining of raw 264.7 cells incubated with VLDL, VLDL-Ab, oxVLDL, or oxVLDL-Ab.

Raw 264.7 cells (1×10^5 /well) were stabilized for 16 hr, and then incubated for another 24 hr without further treatment (A), with VLDL 50 μg /well(B), VLDL-Ab 50 μg /well(C), oxVLDL 50 μg /well(D), or oxVLDL-Ab 50 μg /well(E) for 24 hr(I). Thereafter media were changed(3 ml), and the incubation was continued for an additional 24 hr(II).

5.2 FACS 분석을 통한 VLDL-항체착물의 대식세포로의 탐식여부 및 대사에 끼치는 영향 평가

Raw 264.7 cell에 Dil가 labeling 된 VLDL, VLDL-Ab, oxVLDL, oxVLDL-Ab를 각각 50 μ g씩 처리하고 난 후 24시간 동안 incubation한 cell을 모아 FACS로 분석하였다. Fig. 15에서 fluorescence intensity를 측정하였는데 이는 VLDL에 labeling한 Dil가 세포내로 탐식되어 인식되는 것을 의미한다. 24시간 incubation한 경우(I), fluorescence intensity peak가 control인 A에 비해 오른쪽으로 이동한 것을 보아 VLDL, VLDL-Ab, oxVLDL, OxVLDL-Ab 모두 탐식 되었음을 알 수 있었다. 또한 배지를 갈아주어 48시간을 incubation한 경우(II), control을 제외한 다른 모든 그룹에서 24시간 때의 peak 위치보다 왼쪽으로 이동한 것을 보아 cell 내부의 intensity가 줄어들었다는 것을 알 수 있었다. 이는 VLDL과 oxVLDL을 잡아먹었던 세포들이 그 대사적 활성이 유지되어 새로운 딸세포를 만들어, 형광물질을 탐식하지 않은 세포의 수가 늘어난 것으로 생각된다.

Fig. 16에서는 SSC를 측정하여 세포 내부의 gralue의 변화 및 세포의 활성화를 알 수 있는데, 24시간 incubation한 (I)의 경우는 oxVLDL을 처리한 (D)를 제외하고 오른쪽으로 늘어진 모양의 peak를 띄는 것을 보아 . 이는 모두 uptake 된 후 대식세포 내의 granule이 증가하였으며 이는 대사가 활발함을 의미한다. 또한 native form보다 항체가 결합된 경우, 항체가 대식세포의 면역반응을 더 자극하여 세포의 활성이 더욱 증가됨을 알 수 있었다. 24시간 더 incubation한 (II)에서, VLDL과 oxVLDL의 peak의 모양은 control(A)와 유사함에 비해 항체착물을 처리한 경우 (C & E) peak의 모양이 더욱 오른쪽으로 늘어지는 형태가 되었다. 이는 항체착물을 처리 한 경우 대식세포의 활성이 더 오래 지속됨을 의미한다.

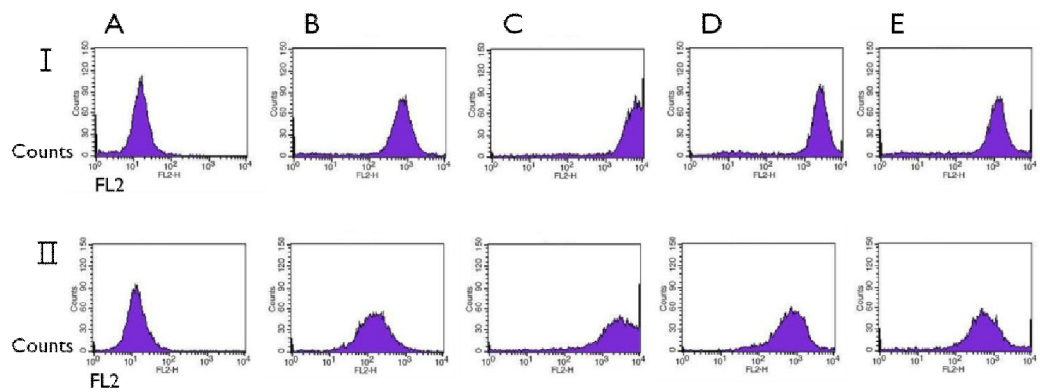


Fig. 15. FACS analysis of the uptake of Dil-labeled VLDL, VLDL-Ab, oxVLDL and oxVLDL-Ab by Raw 264.7 cell.

Raw 264.7 cells (1×10^5 /well) were stabilized for 16 hr, and then incubated for another 24 hr without further treatment (A), with VLDL 50 μ g/well(B), VLDL-Ab 50 μ g/well(C), oxVLDL 50 μ g/well(D), or oxVLDL-Ab 50 μ g/well(E) for 24 hr(I). Thereafter media were changed(3 ml), and the incubation was continued for an additional 24 hr(II).

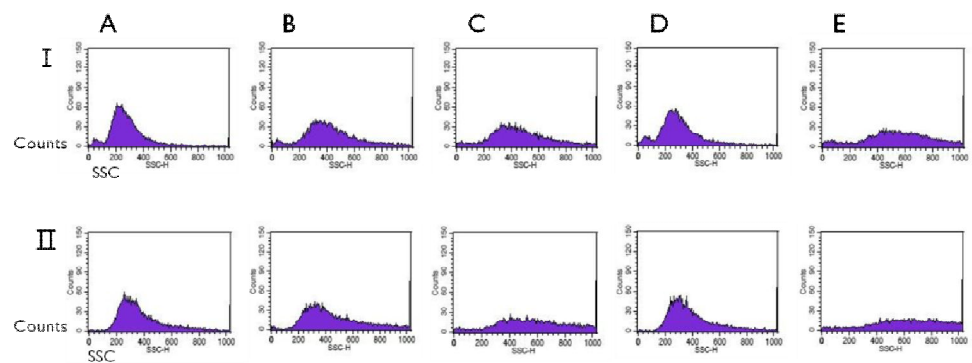


Fig. 16. FACS analysis of granule and activity of the cells after treated DiI VLDL, DiI VLDL-ab complex, DiI oxVLDL, and DiI oxVLDL-ab complex.

Raw 264.7 cells (1×10^5 /well) were stabilized for 16 hr, and then incubated for another 24 hr without further treatment (A), with VLDL 50 $\mu\text{g}/\text{well}$ (B), VLDL-Ab 50 $\mu\text{g}/\text{well}$ (C), oxVLDL 50 $\mu\text{g}/\text{well}$ (D), or oxVLDL-Ab 50 $\mu\text{g}/\text{well}$ (E) for 24 hr(I). Thereafter media were changed(3 ml), and the incubation was continued for an additional 24 hr(II).

IV. 결 론

비만은 대사적 질병으로 그 치료에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. 사회가 현대화될수록 생활습관의 변화에 의해 그 발병빈도가 증가하고 있으며 고열량 음식을 섭취함에 비해 그 소모가 제대로 이루어지지 않아 잉여분이 체내에 축적됨으로 비만이 발생한다. 또한 비만으로 인해 또 다른 대사질환이 함께 발생하므로 그 치료와 예방에 많은 노력이 이루어지고 있다.

우리의 선행연구에서 비만의 치료제로 사용하고자 LDL에 있는 apoB-100의 mimetic peptide를 제작하였으며 이 peptide를 실험동물에 면역 주사하면 anti-ApoB antibody가 생성되어 LDL이나 VLDL의 ApoB와 말초조직에 존재하는 receptor와의 결합을 저해하여 흡수가 이루어지지 않았다. 따라서 실험동물의 체중증가가 억제되는 현상을 볼 수 있었으며 이는 선행연구뿐 아니라 본 연구에서도 밝힌바 있다.

음식으로 섭취한 지방은 간에서 ApoB와 ApoE를 합성하여 내부에 cholesterol ester로 구성되어 있는 VLDL을 배출한다. 이 VLDL이 lipoprotein lipase에 의해 분해되어 LDL이 되며 ApoB-100의 c-terminal 말단에 LDL receptor와 binding하는 site가 있어 말초조직으로의 ApoB-mediated endocytosis가 이루어진다[14]. ApoE는 lipoprotein이 간으로 재흡수 되는 것을 돕고 특히 동맥경화가 일어난 macrophage foam cell에서의 cholesterol의 efflux를 자극하여 면역염증반응을 조절하는 것으로 알려져 있다[15].

본 연구에서는 ApoB-100 특이 항체를 백신의 면역 접종으로 유도한 후 VLDL의 ApoB-100를 인식하여 VLDL-항체 착물이 되었을 때 나타나는 대사적인 특성을 알아보려고 하였다. 이를 위해 *in vivo* 상에서 ICR mouse에 B4RB2 백신을 면역 접종하여 비만억제효능이 나타나는 최저투여용량을 결정 하였으며, ApoB-100 특이 항체가 유도된 후 혈중 및 stool에서의 지방함량을 조사하여 잉여지방의 대사적 경로를 알아보려고 하였다. 그 결과 최저유효용량은 0.6 mg/kg BW 임을 알 수 있었으며 항체가 유도된 후 혈액에서의 지방은 잔존하는 시간이 지속되었으며 결과에 나타내진 않았으나 stool에서의 지방 함량은 변화가 없음을 확인하였다.

또한 *in vitro* 상에서 VLDL-항체착물이 대식세포의 탐식여부를 FACS와 광학현미경을 통해 알아보았다. Raw 264.7 세포에 VLDL, VLDL-Ab, oxVLDL, oxVLDL-Ab를 처리하고 24시간 incubation 하였을 때, 모든 세포 내 형광수치는 증가하였고 크기는 변화가 없었으며 granule이 증가함을 알 수 있었다. 이는 VLDL, VLDL-Ab, oxVLDL, oxVLDL-Ab 모두 대식세포로 탐식되어짐을 의미하며 대식세포의 활성이 증가함을 의미한다. 또한 새로운 배양액으로 교체 후 24 시간 더 incubation한 결과, 새로운 딸세포들의 생성으로 형광수치는 감소하였고 granule의 활성은 변화가 없었으나 VLDL-Ab, oxVLDL-Ab에서는 증가함을 알 수 있었다. 이는 VLDL-항체착물의 처리가 대식세포의 대사에 영향을 주지 않았으며 항체착물을 처리한 경우 대식세포의 대사를 활성화 시키며 세포 내에서 분해되는데 시간이 길어짐을 알 수 있었다.

이상의 결과로 B4RB2 백신의 면역 접종 후 섭취한 잉여 지방은 말초조직으로의 축적을 저해받고 혈중에서 잔존하는 시간이 연장되는 것으로 나타났다. 이는 lipoproteins이 활성산소 등으로 인해 변형되거나 또는 혈관 내막으로 이동하여 대식세포에 탐식 될 가능성이 증가함을 의미한다. 이와 같이 탐식이 이루어질 경우 대식세포는 장시간 granule의 증가를 보여 지속적으로 활성화가 유지되고 있음을 확인하였다.

V. 참고문헌

1. Hastly, V.S.a.A.H., *The role of lipolysis in mediation the proinflammatory effects of very low density lipoproteins in mouse peritoneal macrophage*. Journal of lipid research, 2006. **47**: p. 1406-1415.
2. Henness S, P.C., *Orlistat : a review of its use in the management of obesity*. Drugs, 2006. **66**(12): p. 1625-56.
3. Cooke D, B.S., *The obesity pipeline: current strategies in the development of anti-obesity drugs* Nat Rev Drug Discov., 2006. **5**(11): p. 919-31.
4. 공수강, *ApoE 유전자 적중 마우스에서 B4T 비만백신 접종이 동맥경화 발증에 미치는 영향 평가*. 한양대학원 2007.
5. 정해중, *Apolipoprotein B-100에 대한 모조펩타이드의 항비만 백신 효과*. 한양대학원, 1999.
6. 이진일, *T cell 에피토프의 융합에 의한 면역원성 증강 비만 백신의 개발*. 한양대학원, 2004.
7. 최문경, *비만 백신에 의한 대식세포의 native LDL의 탐식 작용에 대한 연구*. 한양대학원, 2008.
8. Dole, V.P., *A Relation between Non-esterified Fatty Acids in Plasma and the Metabolism of Glucose*. J Clin Invest, 1956. **35**: p. 150-154.
9. Paik Tai-Hong, K.H.-J., *Lipoprotein Lipase의 활성화에 미치는 인삼 Saponin의 영향*. 한국유화학회지, 1985. **2**(1): p. 77-81.
10. Sandra H. Gianturco, S.A.B., David P. Via, and William A. Bradley, *The b-VLDL receptor pathway of murine P388D1 macrophage*. Journal of lipid research, 1986. **27**: p. 412-420.
11. Ying-Hue Lee, S.-Y.C., Rudolf J. Wiesner, and Yi-Feng Huang, *Simple flow cytometric method used to assess lipid accumulation in fat cells*. Journal of lipid research, 2004. **45**: p. 1162-1167.
12. Kenny, Z.L.B.a.M., *Improved Nonradioactive Method for Routine Clinical Analysis for Long- and Medium- Chain stool lipids*. Clin. Chem, 1982. **28**(5): p. 1211-1214.
13. Stephane Perrey, S.I., et al, *The LDL receptor is the major pathway for b-VLDL uptake by mouse peritoneal macrophages*. Atherosclerosis, 2001. **154**: p. 51-60.

14. Mick C. Jong, W.L.H., et al, *Oxidized VLDL Induces Less Triglyceride Accumulation in J774 Macrophage Than Native VLDL Due to an Impaired Extracellular Lipolysis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**: p. 144-151.
15. Glass, A.C.L.a.C.K., *The Macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention*. Nature Medicine, 2002. **8**: p. 1235-1242.
16. Witztum, C.K.G.a.J.L., *Atherosclerosis : The Road Ahead*. Cell, 2001. **104**: p. 503-516.
17. Tsimikas S, W.J., *The role of oxidized phospholipids in mediating lipoprotein(a) atherogenicity*. Curr Opin Lipidol, 2008. **19**(4): p. 369-77.
18. Sjogren P, F.G., et al, *High plasma concentrations of autoantibodies against native peptide 210 of apoB-100 are related to less coronary atherosclerosis and lower risk of myocardial infarction*. Eur Heart J., 2008. **29**(18): p. 2218-26.
19. Olofsson SO, B.J., *Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis*. J Intern Med, 2005. **258**(5): p. 395-410.
20. Kirsty Greenow, N.J.P., Dipak P. Ramji, *The Key role of apolipoprotein E in atherosclerosis*. J Mol Med, 2005. **83**: p. 329-342.
21. Takahashi K, T.M., Sakashita N, *Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals*. Med Electrom Microsc., 2002. **35**(4): p. 179-203.

Abstract

Metabolic Characteristics of Obesity Treatment by ApoB-100 specific Antibody

Soo Yeon Lee

Dept. of Molecular & Life Sciences

The Graduate School

Hanyang University

Obesity is a pathologic expansion of body fat depots due to a chronic surplus of dietary lipids and carbohydrates. Obesity is a major risk factor in the development of diabetes and cardiovascular disease, and its prevalence is increasing in many countries including Korea. So far, an effective preventive or therapeutic strategy suitable for the average obesity patient has remained elusive. It is therefore of great interest that our laboratory recently developed an immunological anti-obesity approach that, based on our preclinical studies in mice, appears promising. In this approach, control mice are fed ad libitum a high-fat diet (HFD) that leads to obesity, while experimental mice receive a combination of the diet and a vaccination with a peptide (pB1) that mimics an epitope of the C-terminal part of Apo-lipoprotein B-100 (ApoB-100). Our laboratory found that vaccination with pB1 or its optimized antigenic form, B4RB2, raises antibodies that bind to native Apo B-100 of Very Low Density Lipoprotein (VLDL) and Low Density Lipoprotein (LDL) particles, inhibits the uptake of dietary lipids by peripheral tissues, and prevents obesity. Although we do not yet fully understand how the anti Apo B-100 antibodies affect body weight, it is well known that Apo B-100-containing lipoproteins (VLDL, IDL, LDL) play a central role in the circulation and final deposition of lipids.

In the present study, I investigated the effects of B4RB2 on selected lipid-

metabolic and immunological parameters in an attempt to further optimize and understand our anti-obesity approach. Firstly, I determined minimal dosage of B4RB2 vaccine that is required for the vaccine to keep ICR mice from being obsessed. Secondly, I traced the fate of VLDL lipids in blood and stools. Thirdly, I used FACS analysis to compare the uptake of VLDL-antibody complexes with that of VLDL and LDL by macrophages in vitro.

It was found that the minimal effective injection dosage of B4RB2 was 0.6 mg/kg body weight, or 20ug/mouse for preventing of body weight increment. Before vaccination, serum concentrations were 185.4 ± 18.7 mg/dl for total-cholesterol, 63.1 ± 7.5 mg/dl for LDL-CHO, 145.5 ± 0.6 mg/dl for HDL-CHO, and 85.4 ± 37.1 mg/dl for TG. After vaccination with 50 μ g, these concentrations increased by 20~70% to 306.3 ± 28.4 , 109.1 ± 15.7 , 177.6 ± 4.6 and 102.7 ± 41.6 mg/dl, respectively. In contrast, the lipid content of stool was unchanged (38.0 ± 4.0 uM/g to 36.0 ± 1.0 uM/g).

Compared to control incubations for 24 hr, endocytosis of VLDL, VLDL-Ab, oxVLDL, and oxVLDL-Ab was increased about 45, 300, 150, and 87 fold, respectively, and the level of activation was also increased as 1.5, 1.7, 1.2, 2 folds. After 24 hr more, endocytosis levels decreased slightly to 10, 200, 48, 50 fold, but the activation levels were maintained.

Previously, cholesterol treatment pathway of endocytosis of LDL or VLDL was studied in connection with genesis of atherosclerosis, however, there was no studied about fatty acid. So, the research about metabolic pathway in macrophages of free fatty acid or triacylglycerides should be accomplished.

In conclusion, following vaccination with B4RB2, excessive dietary fat was not directly eliminated through the intestines, but its absorption by peripheral tissues was inhibited. These results suggest that VLDL that moved into the intima were endocytosed by macrophages, and lipid-accumulated macrophage maintained the activity continuously.

감사의 글

대학원 생활의 끝은 아마도 이 논문을 제본해서 손에 쥐게 되어야 체감할 것 같습니다. 학석사 과정으로 3학기 만에 석사과정을 끝내는 것이 지금 돌이켜보면 너무 짧아 못내 아쉽습니다. 훗날 공부의 필요성을 다시 느끼게 된다면 그때는 돌이켜보아도 만족할 만큼의 열정을 투자하고 싶습니다.

항상 물심양면으로 마음 써주시고 지도해주신 김효준 교수님, 감사합니다. 교수님의 중간대사론 수업과 면역학 수업은 잊지 못할 것 같습니다. 생화학의 기초를 닦아주신 조기승 명예교수님, 항상 존경합니다. 다가가기 어려울 것 같으나 늘 먼저 말 걸어주시는 이영식교수님, 감사합니다. 늘 유쾌하시고 전공세미나 때 흥미로운 질문을 많이 던져서 새로운 자극을 주시는 채영규교수님, 감사합니다. 저를 분자생물학과로 오게 만든 결정적인 역할을 하신 정일엽교수님, 일반생물학 수업을 어찌 잊겠습니까, 감사합니다. 선배님이자 정말 본받고 싶은 황승용교수님, 서혜명교수님, 따뜻한 지도에 감사합니다. 학부때나 대학원때 수업을 한번도 듣지 못해 아쉬운 안성훈교수님, 감사합니다. Dr. Binas, thank you for supervision my graduation thesis. 학교에서 받은 가르침대로 사회에 나가 열심히 하는 모습 보여드리겠습니다.

연구실에서 불임성 없는 후배 데리고 실험 가르치느라 고생하신 희중언니, 용구오빠, 동규오빠, 졸업한 한나언니, 문경(정순)언니, 현중오빠, 늘 도와주셔서 감사했습니다. 그리고 재희, 형진오빠, 성수오빠, 건강관리 늘 잘하구 좋은 실험결과 내서 졸업하길 바래요~ 분자방 병수오빠, 태기오빠, 진현언니, 신경방 우리언니, 영길오빠, 3층에서 부대끼며 얼굴 자주 봤는데 못보면 많이 생각날 것 같아요. 유전체방 맹준호쌤, 다시 한번 결혼 축하 드립니다. 승용오빠, 유리, 남은 1년 열심히! 파이팅입니다. 프로테옴방 지현오빠, 오빠 분명 박사과정 잘 할거예요! 문규오빠, 미나, 석사과정 잘 마무리하시길 바래요. 세포방 송오빠 졸업 축하하고 박사과정 파이팅이에요~ 재현오빠 수많은 음료들과 고민상담 감사합니다, 포닥 좋은 곳으로 꼭! 가시길 기도 할게요.

무엇보다 석사과정을 끝내기까지 가장 큰 힘이 된 울 엄마, 아빠, 제 석사학위는 사실 부모님의 것입니다. 멀리 떨어져있지만 늘 마음 써주시고 힘들지 않도록 도와주신 것 정말 감사합니다, 사랑합니다. 울 오라방, 어여 취업해서 장가가시오, ㅋㅋ. 오빠의 졸업도 축하해! 진주에 계신 작은집, 김해에 계신 큰고모네, 인도에 계신 작은고모네, 공부

한다고 여지껏 받기만 했던 것들 이제는 하나씩 돌려드리는 딸, 조카가 되겠습니다.

사랑하는 교회사람들, 내 찡얼이를 다 들어주고 함께 기도해준 미류, 소용~ 정말 고마워요. 동질감 최고 수은자매, 자매님 때문에 2008년을 건뎠습니다. 2009년에, 가까운 곳에 있는 떨어져있든 우린 항상 서로를 위해 서 있는 사람들입니다. 사랑하는 이훈수형제님 가정, 김성배형제님 가정, 박준엽형제님 가정, 장국주형제님 가정, 강창렬형제님 가정, 장원석형제님 가정... 그 외 수많은 가정들을 이 지면에서 어찌 다 언급할 수 있을까요. 열린 가정으로 계셔주어 감사하며 그 기도와 목양에 정말 감사합니다. 본을 따라 살기 원합니다.

Rise up, my love, my beautiful one,
And come away, for behold, the winter is past,
The rain is over and gone.
Flowers appear on the earth,
The time of singing has come,
And the voice of the turtle dove is heard in our land.
My beloved is mine,
And I am His,
He who feeds His flocks among the lilies.
'Til the day breaks,
And the shadows flee away,
Come my beloved, come my beloved!
Rise up, my love, my beautiful one
And come away, for behold, the winter is past,
The rain is over and gone.

2008. 12. 31
한 해를 마무리하며