

선물레나물에서 추출물을 적용한 흰생쥐간장에서 몇가지 면역관련유전자들의 전사수준발현분석

박성철, 김대성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《현대과학기술의 빠른 발전은 기초과학의 성과에 토대하고있으며 과학기술분야에서의 자립성은 기초과학분야에서부터 시작됩니다.》(《김정일선집》 증보판 제10권 485페이지)

최근 선물레나물에 대한 연구가 심화되는 과정에 선물레나물에서 추출물이 흰생쥐의 면역기능을 높인다는것이 밝혀졌다. 그러나 이러한 면역기능높임작용물질을 면역관련유전자들의 전사수준에서 발현분석을 통하여 연구한 자료는 제기된것이 없다.

우리는 선물레나물에서 추출물[1](HPE_{Et})을 적용한 흰생쥐의 간장을 리용하여 역전사 PCR(RT-PCR)법으로 몇가지 면역관련유전자들(*IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-2*, *TNF- α* , *IFN- γ*)의 발현분석을 진행하였다.

재료와 방법

재료 물질량이 20g정도인 흰생쥐를 리용하였다.

흰생쥐를 각각 10마리씩 대조무리와 시험무리로 나누고 대조무리에는 생리적식염수 0.5mL를, 시험무리에는 HPE_{Et}를 물질량 1kg당 0.1g의 량으로 하루에 한번씩 15일동안 경구 주입하였다. 또한 실험마감 4일전에 모든 실험무리들에 5% 양적혈구용액을 복강주사하여 면역시켰다. 5% 양적혈구용액을 주입하기 전(0일), 주입후 2일과 4일에 각각 흰생쥐에서 간장을 100mg씩 취하여 -80℃에서 동결보관하였다.

mRNA분리와 cDNA합성 -80℃에서 동결시킨 시료들을 리용하여 트리졸법으로 mRNA를 분리하였다. 분리한 mRNA의 순도는 자외선흡광광도계(《UV-2450 shimdin》)로 흡수파장 260, 280nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 두오리사슬cDNA는 cDNA합성시약키트(Takara M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit)를 리용하여 합성하였다.[4]

면역관련유전자들의 프라이머설계 대조유전자로서 흰생쥐의 모든 조직에서 같은 량으로 발현되는 *GAPDH*(글리세르알데히드트리킨산데히드로게나제)유전자를 리용하였다. 대조유전자 *GAPDH*를 포함한 면역관련유전자들의 염기배열은 국제유전자은행자료기지(NCBI)에서 검색하여 얻었다. 실험에서 리용한 흰생쥐의 면역관련유전자들의 프라이머는 프라이머설계프로그램 《Primer Premier 5》로 설계하였다. 면역관련유전자무리들의 유전자발현검증에 리용된 프라이머배열과 PCR조건은 표 1과 같다.

RT-PCR분석 실행방법[3]에 준하여 대부분 PCR산물들은 아닐링온도 50~55℃, 순환수 27~30회에서 얻었다.(표 1) RT-PCR산물은 1.2% 아가로스겔전기영동을 진행하여 비교하였다.

표 1. 면역관련유전자발현검증에 이용된 프라이머배열과 PCR조건

흰생쥐유전자 (EST)	프라이머 이름	프라이머배열(5'-3')	PCR산물의 크기/bp	PCR조건 (아닐링 온도, 순환수)
<i>GAPDH</i>	C-F	ATGGTGAAGGTCGGTGTGAACG	495	55°C, 30회
	C-R	GTTGTCATGGATGACCTTGGCC		
<i>TNF-α</i>	TNF α -F	CAGCCTCTTCTCATTCCTGCTTG	325	55°C, 28회
	TNF α -R	GTCTTTGAGATCCATGCCGTTG		
<i>IL-1α</i>	Il α -F	CTCTGAATCAGAAATCCTTC	436	50°C, 28회
	Il α -R	TAGGCTACATGTCAAATTT		
<i>IL-1β</i>	Il β -F	AAAAGATGAAGGGCTGCTTCCA	398	50°C, 28회
	Il β -R	CATGGACAATATCACTTGTGG		
<i>IFN-γ</i>	IFN γ -F	GAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAACT	388	50°C, 28회
	IFN γ -R	ATCAGCAGCGACTCCTTTTCCGCTT		
<i>IL-2</i>	IL2-F	AACAGCGCACCCACTTCAA	442	55°C, 27회
	IL2-R	TTGAGATGATGCTTTGACA		

결과 및 론의

흰생쥐의 간장에서 mRNA분리 흰생쥐의 간장에서 mRNA를 분리하여 그 농도를 결정하였다.(표 2)

표 2에서 보는바와 같이 모든 시료에서 mRNA가 정확히 분리되었을뿐만아니라 A_{260}/A_{280} 값이 1.78~2.03사이에 있으므로 비교적 순도가 높다는것을 알수 있다. 일반적으로 A_{260}/A_{280} 값이 1.8이하이면 단백질이 남아있다는것이고 2.0이상이면 RNA가 분해되었다는것을 보여준다.

프라이머설계의 정확성확인 흰생쥐에서 면

표 2. 흰생쥐의 간장에서 분리해낸 mRNA의 농도

양적혈구주입 후 경과날자/d	구분	mRNA농도 /(ng· μ L ⁻¹)	A_{260}/A_{280}
0	대조구	1 343.9	1.83
	시험구	1 578.3	2.03
2	대조구	1 148.2	1.99
	시험구	1 975.7	1.92
4	대조구	2 541.8	1.78
	시험구	2 271.6	1.96

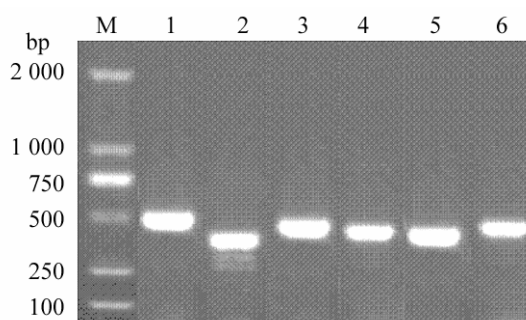


그림 1. PCR에 의한 목적DNA단편들의 전기영동상

M은 100bp DNA크기표식자(《TAKARA》),

1 - *GAPDH*(495bp), 2 - *TNF- α* (325bp),

3 - *IL-1 α* (436bp), 4 - *IL-1 β* (398bp),

5 - *IFN- γ* (388bp), 6 - *IL-2*(442bp)

역과정에 참가하는 몇가지 유전자들인 *TNF- α* , *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IFN- γ* , *IL-2*와 *GAPDH*대조유전자의 염기배열을 찾은 후 RT-PCR를 위한 프라이머를 설계하였다.(표 1) 설계된 프라이머와 시험무리 흰생쥐의 간장시료를 리용한 PCR를 진행하여 프라이머설계의 정확성을 확인하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 대조유전자 *GAPDH*는 495bp, *TNF- α* 유전자는 325bp, *IL-1 α* 유전자는 436bp, *IL-1 β* 유전자는 398bp, *IFN- γ* 유전자는 388bp, *IL-2*유전자는 442bp근방의 크기를 가졌다.

이로부터 우리는 면역관련유전자무리들의

프라이머가 정확히 설계되었다고 인정하였다.

면역관련유전자무리들의 RT-PCR결과 HPE_{Et}적용후 흰생쥐의 간장조직에 들어있는 면역관련 유전자무리들의 RT-PCR분석을 진행하였다.(그림 2)

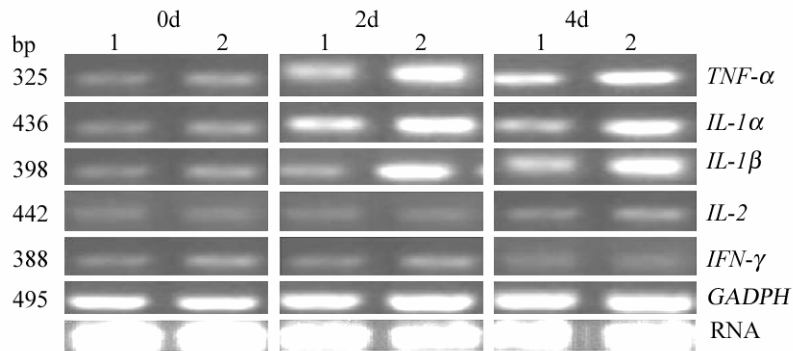


그림 2. HPE_{Et}적용후 흰생쥐의 간장조직에서 면역관련 유전자무리들의 RT-PCR전기영동상
1—대조, 2—시험

그림 2에서 보는바와 같이 흰생쥐의 간장조직에서 대조유전자 *GAPDH*의 발현은 대조 무리와 시험무리에서 차이가 없이 나타났지만 면역과정에 참가하는 몇가지 유전자들의 발현에서는 변화가 있었다. 특히 *TNF-α*유전자는 0일에는 전사수준에서 유전자발현량이 적었지만 2일부터는 대조무리와 시험무리에서 차이가 있었다. 2일에 *TNF-α*유전자의 발현은 대조 무리에서 0일의 발현수준보다 약간 높아지고 시험무리에서도 유전자발현량이 현저하게 높아졌다. 4일에는 2일에 비하여 대조무리와 시험무리에서 유전자의 발현수준차이가 없었다. 우리가 연구한 유전자들가운데서 *TNF-α*유전자의 발현변화가 제일 뚜렷하였다.

다음으로 *IL-1α*와 *IL-1β*유전자는 다 같이 0일에는 전사수준에서 유전자발현량이 매우 적었지만 2일부터는 대조구와 시험구에서 차이가 나타났다. 2일과 4일에 *IL-1α*와 *IL-1β*유전자의 발현은 대조에서 0일의 발현수준보다 약간 높아지고 시험구에서도 유전자발현량이 약간 높아졌다. 4일에 *IL-1α*와 *IL-1β*유전자의 발현은 2일에 비하여 차이가 없었다. *IL-1α*와 *IL-1β* 유전자는 *TNF-α*유전자 다음으로 그 발현변화가 뚜렷하였다.

이러한 실험결과들은 선물레나물알콜추출물에 의하여 쿠페르세포(간장대탐식구)가 활성화되었다는것을 의미한다.

조사된 유전자들가운데서 *IL-2*와 *IFN-γ*유전자는 0일에는 대조와 시험구에서 다 같이 전사수준에서 유전자발현량이 적었고 2일과 4일에도 대조와 시험구에서 발현증가가 명백히 나타나지 않았다. *IFN-γ*의 발현이 대조와 차이가 없으므로 T세포에 의한 대탐식구의 활성화[2]가 아니라 선물레나물알콜추출물의 작용으로 대탐식구활성화가 강화된것으로 볼수 있다.

맺 는 말

HPE_{Et}는 흰생쥐의 쿠페르세포의 *TNF-α*와 *IL-1α*, *IL-1β*유전자발현수준을 높여 활성화에 직접적인 영향을 미친다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보 생명과학, 65, 2, 3, 주체108(2019).
- [2] Yutaka Furukawa et al.; Jpn. Circul. J., 10, 775, 1999.
- [3] Tsunetake Motai et al.; Chem. Pharm. Bull., 61, 6, 618, 2013.
- [4] Kazunori Hamamura et al.; Cellular Signalling, 27, 828, 2015.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Expression Analysis in the Transcription Level of Some Immune-Related Genes in the Liver of Mice Taken with Ethanol Extract of *Hypericum perforatum*

Pak Song Chol, Kim Tae Song

Ethanol extract(HPE_{Et}) of *Hypericum perforatum*, increasing expression of *TNF- α* , *IL-1 α* and *IL-1 β* genes in the Kupffer's cells within mice liver, influences directly on the activation of the Kupffer's cells.

Key words: *Hypericum perforatum*, immune-related genes, Kupffer's cells