

## ***In Vitro*내 유선조직에의 인위적인 온도 및 유방염 발생 미생물에 의한 환경스트레스 유기와 Adenosine, IGF-I 및 Prolactin에 의한 성장조절작용**

정석근\* · 장병배\* · 이창수\*\* · 박춘근 · 홍병주 · 여인서  
강원대학교 축산대학 동물자원연구소

### **Artificial Induction of Environmental Mammary Stress by Temperature and Micro-organism Causing Mastitis and Modulation of Mammary Growth by Adenosine, IGF-I and Prolactin *In Vitro***

Jeong, S. G\*, B. B. Jang\*, C. S. Lee\*\*, C. K. Park, B. J. Hong and I. S. Yuh

Institute of Animal Resources, Kangwon National University, Chuncheon, Korea 200-701

#### **SUMMARY**

Recent evidence indicates that growth factors modulate responses of mammary epithelial cells to environmental stress. The objective of this study was to examine the cellular and biochemical responses of mammary tissue to environmental stress caused by artificial mastitis. For experimental approach, toxins of most mastitis causing organisms (*Staph. aureus* or *Strep. agalactiae*) and heat stress (42°C) were artificially exposed to mammary tissue. Effects of these environmental stresses on cell growth, cell death and heat shock protein synthesis were examined.

Lactating mammary tissues were cultured under basal medium (DMEM) supplemented with insulin (10 µg/ml) and aldosterone (1 µg/ml). All treatment groups in heat stress at 42°C incubation significantly decreased DNA synthesis rates in comparison with those at 39°C (P < 0.05), however, these decreased DNA synthesis rates were recovered by addition of adenosine (10 µM) and IGF-I (10 ng/ml). Similar results were obtained when tissue growth rates were measured by DNA content/tissue. *Strep. agalactiae* toxin did not significantly decreased DNA content/tissue in comparison with no treatment of bacterial toxin with or without heat stress, however, tended to decrease DNA contents/tissue without heat stress. In the fluorography analysis, heat stress (42°C incubation) slightly increased <sup>35</sup>S-methionine labelled 70kd protein synthesis.

These results indicate that environmental stress caused by artificial mastitis slightly decreased mammary growth or mammary size, however, these results could be recovered by addition of adenosine and IGF-I.

(key words : environmental stress, mammary tissue, bacterial toxin, heat stress, mammary growth, adenosine, IGF-I, prolactin)

본 논문은 한국과학재단 핵심전문 연구과제 연구비에 의해 수행되었음.

\* 농촌진흥청 축산기술연구소, 수원

\*\* 건국대학교 자연과학대학 생화학과 충주캠퍼스

## I. 서 론

유선조직의 성장은 성호르몬인 estrogen 및 progesterone 이외에 유선조직내 자가분비작용(autocrine) 또는 근접분비(paracrine) 작용에 의하여 분비된 인자들에 의하여 성장이 촉진되는 것으로 밝혀졌다(Imagawa 등, 1990). 특히 유선상피세포의 증식작용을 가져오는 성장 인자들로는 EGF(Brown 등, 1989; Okamoto와 Oka, 1984; Sheffield와 Welch, 1987; 여 등, 1993; 여, 1995), IGF-I(Baumrucker와 Stemberger, 1989; Ethier 등, 1987), bFGF(Oka 등, 1991), TGF- $\alpha$ (Oka 등, 1991) 등이 있으며, 최근에는 purine nucleoside인 adenosine이 유선조직의 성장을 가져오는 인자로 보고되었다(Yuh와 Sheffield, 1991; 여 등, 1992). 이들 대부분의 성장인자들은 여러 종류의 조직들에 대하여 성장은 물론 괴사 또는 상처로부터 손실된 조직을 빠른 시간 내에 정상조직으로 회복시키는 기능을 담당하고 있다. 이와 같은 사실은 유선발달에 관여하는 성장인자들이 여러 종류의 병원성 미생물에 의하여 괴사된 유선조직을 빠른 시간내에 정상조직으로 회복시킬 수 있는 사실을 나타내 주며, 유방염에 대한 방어기능을 일부 제공할 수 있음을 나타내 준다.

고온에 의하여 유기되는 단백질(heat shock proteins)은 조직내에서 박테리아 감염시 매우 중요한 반응을 나타내 주고 있는데(Morimoto 등, 1990; Young 등, 1990). 특히 바이러스나 세포내 병원독소가 heat shock 단백질을 유기시키는 것으로 나타났다. 지금까지 여러 성장인자들과 heat shock 단백질 합성 또는 이들 유전인자 발현에 관한 연구는 극히 적었는데, Ting 등(1989)은 고농도의 insulin을 간세포에 첨가시킨 결과 heat shock(70kd) 단백질이 합성되는 결과를 보고하였다. 또한 Sheffield와 Kotolski(1991)는 생쥐의 유선상피세포에 EGF를 첨가시켰을 경우 heat shock 단백질 합성을 증가시켰다고 보고하였다.

본 연구는 유방염 발생시 유선조직내에서 발생할 수 있는 heat stress 및 병원성 독소작용이 유선조직 또는 유선상피세포의 증식에 미치는 효과를 검토하고, heat stress 발생시 발생할 수 있는 heat shock 단백

질의 분자생물학적인 역할을 밝히는데 기초자료를 얻고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 유선조직 채취 및 배양

본 실험에 이용된 젖소의 유선조직은 강원도 횡성 도축장에서 구입하였다. 도살직후 경산인 젖소의 유방을 제거한 다음 실험실로 운송하여 유방 표면을 소독한 후 절개하였으며, 가능한 신선한 유선조직을 채취하였다. 채취한 유선조직은 2×2×2mm의 크기로 절절한 다음, 20개씩 6 well 배양 접시(Corning Glass Works, Corning, NY, USA)에 분주하여 배양하였다.

유선조직 배양을 위하여 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Chem. Co., Mo, USA) 배양액에 insulin(I, 10 $\mu$ g/ml)과 aldosterone(A, 1 $\mu$ g/ml)을 첨가하여 기초배양액으로 이용하였다. Heat stress 및 독소반응에 대한 호르몬 및 성장인자의 효과를 검토하기 위하여 adenosine(100 $\mu$ M), IGF-I(10ng/ml) 및 prolactin(100ng/ml)(적정 농도는 본 실험실에서 유선발달의 최대 반응농도임을 확인하였음)을 첨가하였다. 배양조건은 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>-95% air 상태인 배양기를 이용하였으며, 인위적인 heat stress를 가하기 위하여 동일 조건의 42 $^{\circ}$ C 배양기를 이용하였다. 실험목적에 따른 IGF-I(UBI, NY, USA) adenoine, prolactin 및 *Strep. agalactiae*와 *Staph. aureus*(ATCC, Maryland, USA) 독소처리는 heat stress유기와 동시에 하였다. 그밖의 호르몬 및 화학물질은 Sigma Chemical Co., Mo, USA에서 구입하여 이용하였다.

### 2. Heat stress

젖소의 유선조직을 앞에서 제시한 기초 배양액에서 배양하였으며, heat stress를 주기전 24시간 동안은 39 $^{\circ}$ C의 5% CO<sub>2</sub>-95% air 배양기에서 배양하였으며, 24시간 후, 42 $^{\circ}$ C로 설정된 배양기로 전이시켜 실험목적에 따라 2시간, 2일 또는 6일간 배양하였으며 유선조직의 DNA합성과 DNA 함량 정도를 측정하였다.

### 3. 박테리아 독소

유방염의 발병원중 가장 발병율이 높은 박테리아인 *Strep. agalactiae*와 *Staph. aureus*를 선정하였으며, 박테리아 증식작용을 위하여, *Strep. agalactiae*는 Rabbit blood agar 배지를, *Staph. aureus*는 Trypticase soy agar를 각각 이용하여 증식시켰다. ATCC회사 추천에 따른 기본배지에서 각각 배양증식시키고  $1 \times 10^7$ cfu/ml를 세포분쇄기(cell disruptor)를 이용하여 분쇄시켰다. 박테리아를 배양시킨 배양액과 분쇄물들을  $2\mu\text{m}$  필터를 이용하여 여과시킨 후, 박테리아 독소가 함유된 여과액을 젖소의 유선조직에 첨가하여 앞의 연구내용에 따른 박테리아 독소반응을 검토한다. 독소반응에 따른 조사항목으로는 유선 조직의 DNA 합성을 및 DNA함량 측정, heat shock 단백질유기 등이었다.

#### 4. 조직의 DNA 합성측정(DNA synthesis)

위의 실험방법에 의하여 처리된 유선조직을 2일간 배양시킨 후  $^3\text{H}$ -thymidine( $1\mu\text{Ci/ml}$ , Amersham Co., Illinois, USA)을 첨가하여 12시간 배양시켰다. 유선조직을 Tris buffer(50mM, pH 7.4)로 세척한 후, 조직균질기(tissue homogenizer)로 10% Trichloroacetic acid(TCA)하에서 조직을 균질화 시켰다. 균질화된 용액을 원심분리(1,000×g, 40분)시킨 후, 침전물은 methanol-chloroform(2:1, vol/vol), ethanol과 ether 등으로 지방을 추출 제거시켰으며, liquid scintillation counter로 침전물의 radioactivity를 측정하였다.

#### 5. DNA 함량 측정

DNA 합성측정 방법에서 제시한 바와 같이 조직을 6일동안 처리 배양한 후, 조직균질기와 10% TCA 용액을 이용하여 조직내 DNA를 추출하였으며, Burton(1956) 방법에 의하여 조직내에 함유되어 있는 DNA 함량을 측정하였다.

#### 6. 단백질 전기영동 및 fluorography

실험실에서  $2 \times 2 \times 2\text{mm}$ 의 크기로 편박한 유선조직을 6 well 배양접시에서 무처리, IGF-I, adenosine 및 prolactin을 첨가시키고,  $39^\circ\text{C}$  및  $42^\circ\text{C}$ 에서 3일간 배양하였으며 heat shock 단백질합성은 heat stress 개시시  $^{35}\text{S}$ -methionine을 각 처리구에 2시간 동안 첨

가 배양시켜 단백질 합성시  $^{35}\text{S}$ -methionine이 heat shock 단백질에 삽입되는 원리를 이용하였다. 합성된 heat shock 단백질은 단백질 전기영동(12%, SDS-PAGE)방법에 의하여 단백질을 분리하여 Coomassie Brilliant Blue R250으로 염색하였으며, 단백질 합성시  $^{35}\text{S}$ -methionine이 삽입된 단백질은 fluorography에 의하여 표지하였다. 간략히, SDS-PAGE에 의하여 분리된 단백질 겔을 건조시킨 후, Kodak XAR-5 film과 함께 intensifying screen cassette에 넣고  $-70^\circ\text{C}$ 에서 10일간 노출시켰다. 10일 후, film을 건조시킨 후 developer, fixer 용액에 각각 5분, 30초 동안 담근 후 건조시켰으며, 이들 방법은 Laemmli 방법(1970)을 수정 보완한 Hames(1990) 방법에 따라 실시하였다. 처리에 따른 합성단백질의 유형 및 heat shock 단백질합성 정도는 Digital Imaging & Analysis Systems(Alpha Innotech Corp., CA, USA)을 이용하여 분석하였다.

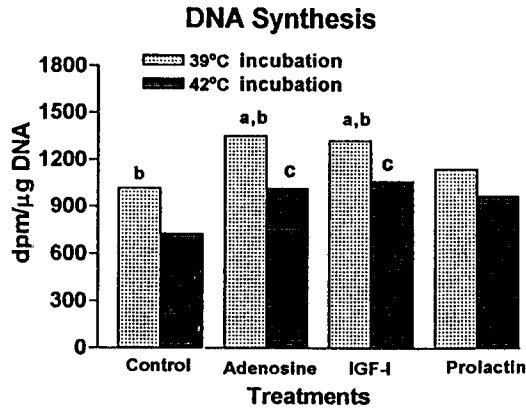
#### 7. 통계분석

본 연구의 실험자료분석은 PC-SAS package를 이용하였고, 완전임의 배치법의 ANOVA로 통계분석하였으며, 각 처리간 비교는 pre-planned comparison에 의하여 비교 분석하였으며, 각 실험마다 3반복 이상을 실시하였다.

### III. 결과 및 고찰

유방염 발생 호르몬과의 상호관계에 관여하여서는 근래에 많은 관심거리가 되고 있다. 동물의 유선의 성장과 발달은 성호르몬 이외에 유선조직내의 자기분비 또는 근접분비 작용에 의하여 분비되는 각종 인자들에 의하여 조절이 되며, 특히 유방염 발생시 유선조직내에 발생될 수 있는 고온 및 조직의 괴사작용을 회복시킬 수 있는 기능을 담당하고 있다.

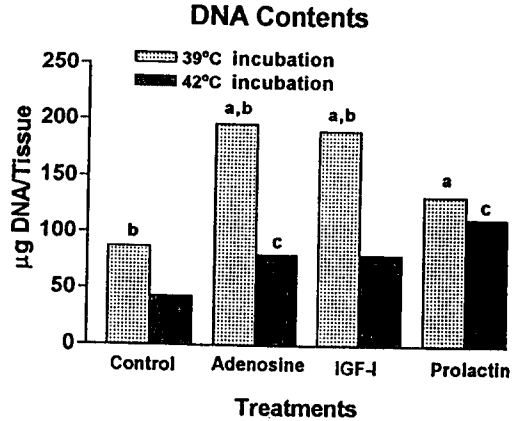
Fig. 1은 젖소의 환경스트레스인 온도의 변화가 젖소 유선조직의 성장에 미치는 효과를 나타낸 것이다. 젖소의 정상 체온을 나타내 주는 온도인  $39^\circ\text{C}$ 에서, 무처리구의 DNA합성 정도는  $1,016 \text{ dpm}/\mu\text{g DNA}$  이었으며 유선조직에 adenosine( $100\mu\text{M}$ ), IGF-I( $10\text{ng/ml}$ ) 및 prolactin( $100\text{ng/ml}$ )을 각각 첨가하였을시 유선조직의 DNA합성 정도는 1,352, 1,324 및



**Fig. 1.** Effect of heat stress(42°C) on DNA synthesis of bovine mammary tissue in the presence or absence of various mitogens(control; no treatments, adenosine; 100μM, IGF-I; 10ng/ml, prolactin; 100ng/ml). a=treatments at 39°C greater than no treatment at the same temperature(P<0.05), b=39°C greater than at 42°C within the same treatment(P<0.05), c=treatments at 42°C greater than no treatment at the same temperature(P<0.05).

1,143 dpm/μg DNA이었으며, adenosine이나 IGF-I을 유선조직에 첨가할시 39°C의 무처리구에 비교하여 유의하게 유선조직의 DNA합성 정도를 증가시켰다(P<0.05). 젖소의 유선조직을 42°C에서 배양한 무처리구는 39°C에서 배양한 무처리구에 비교하여 유선조직의 DNA합성율이 감소되는 경향을 보였다(P<0.1). 42°C에서 배양한 구에 adenosine 혹은 IGF-I을 첨가할 시 동일 온도내에서 무처리구에 비교하여 유의하게 유선조직의 DNA합성 정도를 증가시켰다(P<0.05).

Fig. 2에서, 42°C에서 유선조직을 배양시킨 구의 DNA합량은 44.0μg DNA/tissue로 39°C에서 배양시킨 구(90.0μg DNA/tissue)보다 DNA합량이 적은 경향을 보였는데(P<0.1), 이와 같은 현상은 42°C의 heat stress에 의하여 유선조직의 성장이 중지되었거나, 조직내 세포들의 치사작용에 의하여 기인된 것으로 사료된다. 39°C에서 유선조직을 배양하였을시 무



**Fig. 2.** DNA contents of bovine mammary tissue that were incubated under condition of heat stress(42°C) or normal(39°C) in the presence of adenosine(100μM), prolactin(100ng/ml) or IGF-I(10ng/ml). a=treatments at 39°C greater than no treatment at the same temperature(P<0.05), b=39°C greater than at 42°C within the same treatment(P<0.05), c=treatments at 42°C greater than no treatment at the same temperature(P<0.05).

note: DNA/tissue=DNA contents in 20 pieces of 2×2×2mm mammary tissues.

처리구(90μg DNA/tissue)에 비교하여 adenosine(10μM), IGF-I(10ng/ml) 및 prolactin(100ng/ml) 처리구에서 각각 200.5, 194.0 및 134.5μg DNA/tissue를 보였으며, 유의하게 DNA합량을 증가시키는 것으로 나타났다(P<0.05). 착유중인 젖소의 유선조직은 우유합성을 위하여 분화된 조직으로, 유선의 성장이 중지되어 있거나 완만하게 성장하는데(Tucker, 1987), 본 실험에서 adenosine, IGF-I 및 prolactin 투여에 의하여 DNA합성 또는 DNA합량이 대조구에 비하여 증가하였던 이유는, 본 실험에서 이용된 유선조직이 경산우 젖소의 유선조직이었지만, 성장을 위한 미분화조직의 함량이 많았던데서 기인된 결과로 사료되며, 또한 성장인자 또는 호르몬 투여에 의하여 조직의 피사작용을 억제시키는 데서 기인된 것으로 사료된다. 42°C를 처리한 구에서는 adenosine 및

IGF-I을 첨가할시 유선조직의 성장을 가져오는 경향을 보였으며, prolactin구에서는 39℃의 무처리구에 비교하여 통계적인 유의성은 없었으나 42℃의 무처리구에 비교하여 유선조직의 크기가 큰 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 유선조직이 prolactin 처리에 의한 조직의 크기의 증대에서 기인되었다기 보다는 조직의 괴사 정도를 감소시킨 데서 기인된 것으로 사료된다.

유방염을 발생시키는 병원성 미생물중 *Staph. aureus*, *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae* 및 *Strep. uberis*는 총 유방염 발생 중 95% 이상의 경우를 나타내 주는 박테리아인데(Philpot, 1984), 본 연구에서는 *Staph. aureus*와 *Strep. agalactiae* 이 두가지 박테리아를 이용하여 박테리아 독소작용에 의한 조직내 환경스트레스 반응을 검토하였다. Fig. 3은 heat stress (42℃)와 유방염 병원성 박테리아인 *Strep. agalactiae*

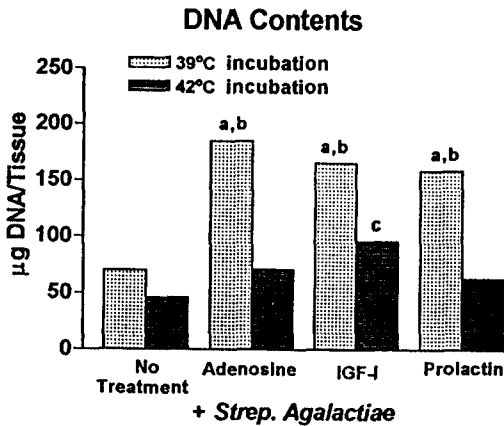


Fig. 3. DNA contents of bovine mammary tissue that were incubated under condition of heat stress(42℃) or normal(39℃) in the presence of adenosine(100µM), prolactin(100ng/ml) or IGF-I(10NG/ml). All treatment groups were incubated with *Strep. agalactiae* toxin. a=treatments at 39℃ greater than no treatment at the same temperature(P<0.05), b=39℃ greater than at 42℃ within the same treatment(P<0.05), c=treatments at 42℃ greater than no treatment at the same temperature(P<0.05).

의 독소를 병행으로 처리한 후 유선조직의 성장 정도를 나타낸 것으로, Fig. 2의 *Strep. agalactiae*를 처리하지 않은 구보다 각 처리구에 있어서 낮은 성장정도를 보이는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었는데, 이와 같은 현상은 *Strep. agalactiae*의 독소작용이 비생리적이었거나 독소의 농도가 낮았던데서 기인하였을 가능성도 배제할 수 없다.

Fig. 4는 heat stress(42℃)와 유방염 병원성 박테리아인 *Staph. aureus*의 독소를 처리한 유선조직의 성장 정도를 나타낸 것으로 Fig. 2의 *Staph. aureus*를 처리하지 않은 구보다 각 처리구에 있어서 낮은 성장정도를 보이는 경향을 보였으며 Fig. 3의 *Strep. agalactiae*에 의한 독소작용 정도와 유사한 경향을 보였다. *Strep. agalactiae*나 *Staph. aureus* 모두 유방에 감염되면 조직에 깊숙이 침입하여 독소를 분비시키는 미생물로, 앞에서 언급한 바와 같이 본 연구에서 이용된 독소

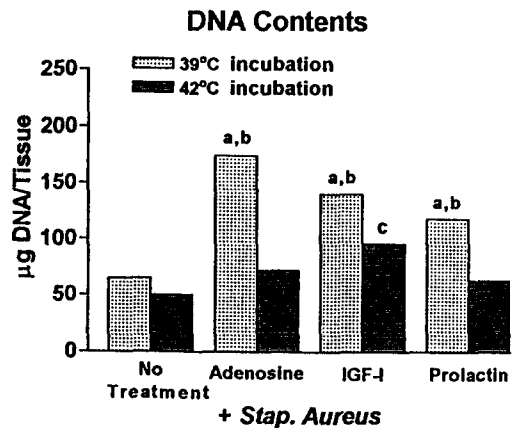


Fig. 4. DNA contents of bovine mammary tissue that were incubated under condition of heat stress(42℃) or normal(39℃) in the presence of adenosine(100µM), prolactin(100ng/ml) or IGF-I(10ng/ml). All treatment groups were incubated with *Staph. aureus* toxin. a = treatments at 39℃ greater than no treatment at the same temperature(P<0.05), b=39℃ greater than at 42℃ within the same treatment(P<0.05), c=treatments at 42℃ greater than no treatment at the same temperature(P<0.05).

는 인위적으로 추출하여 투여된 것으로, 생리적인 상태에서의 독소작용에 관한 연구의 필요성이 요구된다.

Fig. 5는 39℃ 및 42℃에서 유선조직을 배양시켰을 때 heat shock 단백질(70kd)의 발현 정도를 나타내 주는 것으로 heat stress(42℃)를 가했을시 유의하게 70kd 단백질의 발현 정도를 증가시키는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ).

Fig. 6은 heat stress(42℃)와 유방염 병원성 박테리아인 *Strep. agalactiae* 및 *Staph. aureus*의 독소를 병행으로 처리한 후 유선조직내에서 합성되어지는 단백질들의 유형을 단백질 전기영동 방법에 의하여 분리한 것으로, Fig. 6의 A)에서 42℃에서 처리한 대부분의 구는 39℃에서 처리한 구보다 70kd 단백질의 발현 정도가 높게 나타났으며, *Staph. aureus*의 독소를 처리한 Fig. 6의 B)에서도 유사한 결과를 나타내 주었다. 조직에 고온에 의한 스트레스, 금속성 독성물질에 의한 감염, 바이러스 및 박테리아 독소에 의한 감염 및 그밖의 외적인 스트레스를 가할시 heat shock 단백질의 함량이 특히 증가하며, 특히 heat shock 단백질 중 70kd 단백질이 가장 많이 발현되는 것으로 보고되었다(Kroeger와 Morimoto, 1995; Neri 등, 1995). 또

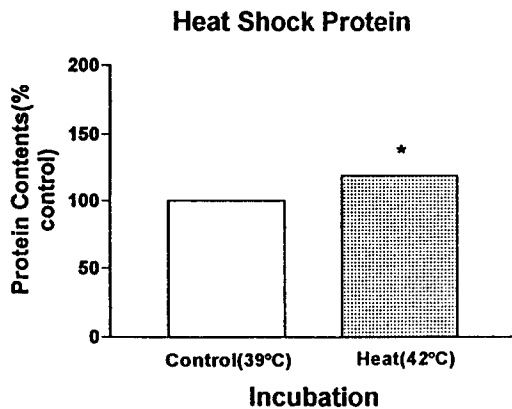


Fig. 5. Analysis of heat shock protein(70kd) synthesis by SDS-PAGE. Bovine tissues were cultured at 39℃ or 42℃ for 3 days, and the relative protein contents were inferred by densitometric analysis of Coomassie Brilliant Blue R250 stained protein band(70kd). \*: significantly different than control( $P < 0.05$ ).

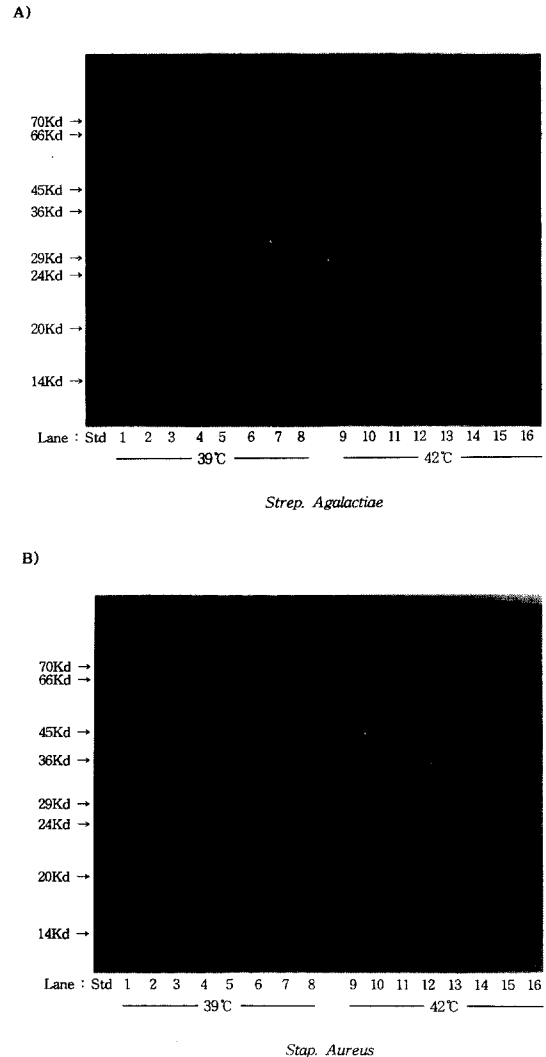


Fig. 6. SDS-PAGE patterns at 39℃- or 42℃-treated bovine mammary tissue under *Strep. agalactiae* or *Staph. aureus* toxin treatments. 50 $\mu$ g of tissue protein was loaded to each lane. A) Lane std; molecular weight standard, Lane 1; no treatment(control), Lane 2; prolactin, Lane 3; adenosine, Lane 4; IGF-I, Lane 5; *strep. agalactiae* only, Lane 6; prolactin, Lane 7; adenosine, Lane 8; IGF-I, Lane 9; no treatment(control), Lane 10; prolactin, Lane 11; adenosine, Lane 12; IGF-I, Lane 13; *strep. agalactiae* only,

Lane 14; prolactin, Lane 15; adenosine, Lane 16; IGF-I. B) Lane std; molecular weight standard, Lane 1; no treatment(control), Lane 2; prolactin, Lane 3; adenosine, Lane 4; IGF-I, Lane 5; *staph. aureus* only, Lane 6; prolactin, Lane 7; adenosine, Lane 8; IGF-I, Lane 9; no treatment(control), Lane 10; prolactin, Lane 11; adenosine, Lane 12; IGF-I, Lane 13; *staph. aureus* only, Lane 14; prolactin, Lane 15; adenosine, Lane 16; IGF-I.

note; prolactin(100ng/ml), adenosine(100 $\mu$ M), IGF-I(10ng/ml)

한 이들 heat shock 단백질들이 환경 스트레스에 의한 세포 또는 조직의 치사작용을 억제하려는 반응을 나타내는 것으로 보고하였다(Kroeger과 Morimoto, 1995; Lindquist, 1986; Lindquist와 Craig, 1988; Morimoto 등, 1994). 39 $^{\circ}$ C 및 42 $^{\circ}$ C 처리구에서 adenosine, IGF-I 및 prolactin 처리에 의한 heat shock 단백질 합성변화에는 큰 차이를 볼 수 없었는데, 이들 인자들이 heat stress 및 박테리아 독소에 의한 조직의 성장을 감소를 완화시키거나, 조직의 성장을 증가시킨 현상이 heat shock 단백질 합성과는 독립적이었는지에 관하여서는 좀더 자세한 연구의 필요성이 요구된다.

본 실험중 heat stress에 의하여 야기되는 단백질의 합성정도를 좀더 자세히 분리하기 위하여  $^{35}$ S-methionine을 첨가한 후, SDS-PAGE에 의하여 단백질을 분리하였으며 fluorography를 실시한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Heat stress(42 $^{\circ}$ C)를 가하였을시 정상 온도(39 $^{\circ}$ C)에서 배양하였을 때보다 70kd 단백질의 합성정도를 증가시키는 경향치를 볼 수 있었으나 ( $P < 0.1$ ), 39 $^{\circ}$ C 또는 42 $^{\circ}$ C 내에서는 무처리구에 비교하여 호르몬 및 성장인자의 처리가 70kd heat shock 단백질에  $^{35}$ S-methionine의 incorporation 정도를 증가시키는데 유의한 차이는 없었다.

#### IV. 요약

본 연구의 목적은 유방염 발생시 일어날 수 있는 유선조직에의 환경스트레스가 유선조직의 성장 및 heat

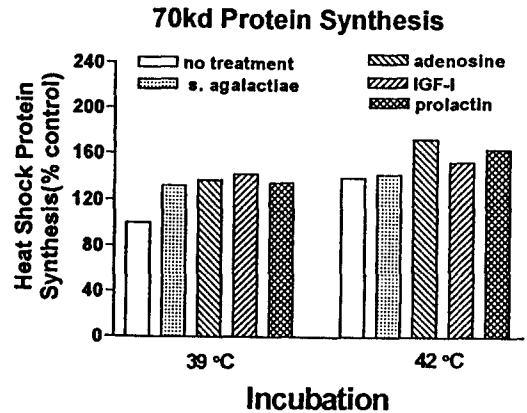


Fig. 7. Fluorographic analysis of heat shock protein(70kd) synthesis. All treatment groups were incubated with *Staph. aureus* toxin at 39 $^{\circ}$ C and 42 $^{\circ}$ C in the presence of adenosine(100 $\mu$ M), prolactin(100 ng/ml) or IGF-I(10ng/ml).  $^{35}$ S-methionine was incorporated into heat shock protein during the two hour heat shock period. There were no statistical differences between groups at 39 $^{\circ}$ C and at 42 $^{\circ}$ C incubation.

shock 단백질 합성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 실시하였다. 본 연구를 수행하기 위하여 정상온도(39 $^{\circ}$ C)와 heat stress(42 $^{\circ}$ C)에 *Strep. agalactiae*, *Staph. aureus*의 독소를 첨가한 후, 조직의 성장 또는 heat shock 단백질합성 현상을 측정하였으며, adenosine, IGF-I 및 prolactin 첨가시 조직의 회복작용을 검토하였다. 비유중인 젖소의 유선조직을 채취한 후, 세절하여 DMEM에 insulin(10 $\mu$ g/ml)과 aldosterone(1 $\mu$ g/ml)을 첨가한 기초배양액에 배양하였다. 42 $^{\circ}$ C의 heat stress를 가한 그룹에서는 정상 온도인 39 $^{\circ}$ C의 그룹에 비하여 DNA합성율을 유의하게 감소시켰으나( $P < 0.05$ ), adenosine(10 $\mu$ M) 및 IGF-I(10 ng/ml) 첨가에 의하여 DNA합성율이 증가하는 것으로 나타났다. 유선조직의 성장정도를 DNA함량/tissue로 나타낸 실험에서도 DNA합성 정도를 측정할 경우와 유사한 결과를 가져왔다. *Strep. agalactiae*와 *Staph. aureus*의 독소를 첨가한 구에서는 heat stress(42 $^{\circ}$ C)의 유무에 관계없이 DNA 함량/tissue에는

유의한 차이를 보이지 않았으나, 감소하는 경향을 보였다. SDS-PAGE 전기영동 및 fluorography 분석에서, heat stress를 가할시 <sup>35</sup>S-methionine이 삽입된 70kd 단백질의 합성을 증가시켰는데, 이는 heat stress가 70kd heat stress 단백질 family의 합성을 증가시키는 것으로 생각된다.

## V. 인용문헌

1. Baumrucker, C. R. and H. B. Stemberger. 1989. Insulin and insulin-like growth factor-I stimulate DNA synthesis in bovine mammary tissue *in vitro*. J. Anim. Sci. 67:3503-3516.
2. Brown, C. F., C. T. Teng, B. T. Pentecost, and R. P. DiAugustine. 1989. Epidermal growth factor precursor in mouse lactating mammary gland alveolar cells. Mol. Endocrinol., 3:1077-1083.
3. Burton, K. A. 1956. Study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62:315-323.
4. Ethier, S. P., A. Kulda, and K. C. Cundiff. 1987. Influence of hormone and growth factor interactions on the proliferative potential of normal rat mammary epithelial cells *in vitro*. J. Cell. Physiol. 132:161-178.
5. Hames, B. D. 1990. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Gel Electrophoresis of Proteins. ed. Hames, B. D. and D. Rickwood. Oxford University Press.
6. Imagawa, W., G. M. Bandyopadhyay, and S. Nandi. 1990. Regulation of mammary epithelial cell growth in mice and rats. Endo. Rev. 11:494-523.
7. Kroeger, P. E. and R. Morimoto. 1995. The heat shock transcriptional response In: Inducible gene expression -Environmental stress and nutrients vol. 1, P. A. Baeuerle eds. Birkhauser, Boston.
8. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature(Lond.)227:680.
9. Lindquist, S. 1986. The Heat-Shock response. Ann. Rev. Biochem. 55: 1151-1191.
10. Lindquist, S., E. A. Craig. 1988. The heat shock proteins. Ann. Rev. Genet. 22:631-677.
11. Miller, A. D., T. Curran and I. M. Verma. 1984. c-fos protein can induce cellular transformation: A novel mechanism of activation of a cellular oncogene. Cell 36:51-60.
12. Morimoto, R. I., D. A. Jurivich, P. E. Kroeger, S. K. Mathur, S. P. Murphy, A. Nakai, K. Sage, K. Abravaya, L. Sistonen. 1994. The regulation of heat shock gene expression by a family of heat shock factors. In: The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. Morimoto A.I., Tissieres A., Georgopoulos C. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
13. Morimoto, R. I., A. Tislers, and C. Gerorgopoulos. 1990. The stress response, function of the proteins, and perspectives. In: Stress Proteins in Biology and Medicine, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 1-36.
14. Neri, L. M., B. M. Riederer, R. A. Marugg, S. Capitani, and A. M. Martelli. 1995. Analysis by confocal microscopy of the behavior of heat shock protein 70 within the nucleus and of a nuclear matrix polypeptide during prolonged heat shock response in HeLa cells. Exp. Cell Res. 221:301-310.
15. Oka, T., M. Yoshimura, S. Lavandero, K. Wada, and Y. Ohba. 1991. Control of growth and differentiation of the mammary gland by growth factors. J. Dairy Sci. 74:2788-2800.
16. Okamoto, S., and T. Oka. 1984. Evidence for physiological function of epidermal growth factor: Pregestational sialoadenectomy of mice decreases milk production and increases



- es offspring mortality during lactation period. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6059-6063.
17. Philpot, W. N. 1984. Mastitis management. 2nd ed. Babson Bros. Co., Oak Brook, USA. p5.
  18. Sheffield, L. G., and L. C. Kotolski. 1991. Epidermal growth factor alters heat shock response of mammary epithelial cells. FASEB meetin(abstract):p250.
  19. Sheffield, L. G., and C. W. Welsch. 1987. Influence of submandibular salivary glands on hormone responsiveness of mouse mammary glands. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 186:368-377.
  20. Ting, L-P, C-L. Tu, and C-K Chou. 1989. Insulin-induced expression of human heat shock protein gene hsp70. J. Biol. Chem. 264: 3404-3408.
  21. Tucker, H. A. 1987. Quantitative estimates of mammary growth during various physiological states: A review. J. Dairy Sci. 70: 1958-1966.
  22. Young, D. B., A. Mehlert, and D. F. Smith. 1990. Stress proteins and infectious disease. In: Stress proteins in Biology and Medicine, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 131-165.
  23. Yuh, I. S., and L. G. Sheffield 1991. Effect of adenosine or adenosine analogs on mouse mammary growth. J. Dairy Sci. (Supplement 1) 74.
  24. 여인서, 박춘근, 홍병주. 1992. 생쥐의 유선발달에 있어서 Elvax 40P Implant를 이용한 서방형 Adenosine의 역할. 한국가축번식학회지 16(4):387-397.
  25. 여인서, 박춘근, 홍병주. 1993. 유선발달에 있어서 cAMP, EGF, IGF-I 및 단백질 인산화 작용의 역할. I. EGF, IGF-I 및 Photoreactive Cyclic AMP가 유선상피세포의 DNA합성에 미치는 효과. 한국가축번식학회지 17(1):49-56.
  26. 여인서. 1995. 유선발달에 있어서 cAMP, EGF, IGF-I 단백질 인산화 작용의 역할. II. EGF, IGF-I 및 Photoreactive Cyclic AMP의 상호 작용과 인산화작용. 한국가축번식학회지 19(2):95-104.
- (접수일자:1997. 10. 16. /채택일자:1997. 11. 17.)