



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

생활과학석사학위논문

비만마우스에서 식이 비타민 D
보충이 골수 면역세포 구성에 미치는
영향

**The effect of dietary vitamin D supplementation
on subpopulation of bone marrow cells
from diet-induced obese mice**

2018년 2월

서울대학교 대학원

식품영양학과

이 승 언

국 문 초 록

비만마우스에서 식이 비타민 D 보충이 골수 면역세포 구성에 미치는 영향

서울대학교 대학원

식품영양학과

이 승 언

골수는 조혈모세포가 B 세포, 자연살해세포, 대식세포, 수지상세포 등의 면역세포로 분화 (differentiation)하고 성숙 (maturation)되는 중요한 일차면역기관이며, 비타민 D는 이러한 조혈모세포 분화에 영향을 준다고 보고되었다. 한편 비만은 조혈모세포 분화를 림프계열이 아닌 골수계열로 치우치도록 유도하여 불균형적인 분화를 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 비만인 사람들에게서 비타민 D 대사 이상도 관찰되었으며, 비만인 사람에서 혈청 25-hydroxyvitamin D (25-(OH)D) 수준은 낮은 반면 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)₂D)와 parathyroid hormone (PTH) 수준은 높았다고 보고되었다. 1,25-(OH)₂D는 칼슘 항상성 외에도 세포의 분화와 성숙, 면역시스템에도 영향을 주는 것으로 알려져 있어 비만에 의한 비타민 D 대사 조절 이상이 면역 시스템에 영향을 줄 가능성이 있을 것으로 사료된다. 그러나 비만한 개체에서 비타민 D를

보충하였을 때 면역시스템에 미치는 영향, 그 중에서도 대부분의 면역세포가 생성되고 성숙되는 골수에 미치는 영향은 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 경구 비타민 D 보충과 비만 여부에 따른 골수 면역세포 구성 변화를 비교하고자 하였다. 5주령의 C57BL/6N 수컷 마우스를 식이 지방 함량 (10% 또는 45%의 총 지방 함량, CD 또는 HFD)과 비타민 D 수준 (식이 kg당 1,000 IU 또는 10,000IU, DC 또는 DS)에 따라 네 그룹 (CD-DC, CD-DS, HFD-DC, HFD-DS)으로 구분하여 12주 동안 실험식이를 제공하였다. 마우스 희생 후 방사면역측정법으로 혈청의 25-(OH)D와 1,25-(OH)₂D의 농도를 측정하였고, 유세포분석을 이용하여 다음의 골수 면역세포 분포를 분석하였다: B 세포 (CD3⁺CD19⁺), CD4⁺ T 세포 (CD3⁺CD4⁺), CD8⁺ T 세포 (CD3⁺CD8⁺), 조절 T 세포 (CD4⁺Foxp3⁺), NKT 세포 (CD3⁺NK1.1⁺), 대식세포 (CD11b⁺F4/80⁺), 미성숙한 자연살해세포 (CD11b⁺NK1.1⁺), 성숙한 자연살해세포 (CD11b⁺NK1.1⁺). CD4⁺ T 세포의 전사인자와 사이토카인 유전자 (*Tbx21*, *Ifng*, *Gata3*, *Il4*) 및 *Vdr* mRNA 수준은 real-time PCR로 측정하였다. 그 결과 혈중 25-(OH)D 농도는 고지방식이 섭취 여부에 의한 차이는 없었으나 비타민 D 보충군에서 높았다. 1,25-(OH)₂D 농도는 CD-DC군 보다 CD-DS군에서 216.4% 높았으나 HFD군에서는 비타민 D 보충에 의한 차이는 없었다. 또한 고지방식이를 섭취한 경우에는 대조식이를 섭취한 경우보다 1,25-(OH)₂D 농도가 높았으며, HFD-DC군과 HFD-DS군의 1,25-(OH)₂D 농도 모두 CD-DS군의 농도와 9% 이내의 차이를 보였다. 비타민

D 보충이 면역세포 구성에 미치는 효과는 비만 여부에 따라 다르게 나타났다. CD-DC군에 비해 CD-DS군에서 대식세포의 비율이 유의적으로 높았으나 HFD-DC군과 HFD-DS군 사이에는 차이가 없었다. 자연살해세포 비율과 미성숙한 자연살해세포 비율은 HFD-DS군이 HFD-DC군보다 유의적으로 낮았으며, CD-DC군 보다 HFD-DC군에서 낮았다. 즉, 본 연구에서 비타민 D 보충이나 고지방식이 제공은 자연살해세포 비율과 미성숙한 자연살해세포 비율을 낮췄다. B 세포 비율은 비타민 D를 보충한 군에서 유의적으로 낮았고, CD4⁺ T 세포의 비율은 비타민 D 보충군에서 낮은 경향성을 보였으나 ($P=0.06$) 식이지방량의 차이에 의한 영향은 없었다. *Vdr* mRNA 수준은 HFD-DS군이 HFD-DC군보다 유의적으로 높아 비타민 D를 보충한 경우에 *Vdr* mRNA 수준이 높았으나 식이지방량의 차이에 의한 영향은 없었다. 결론적으로 본 연구에서는 대조마우스에서 비타민 D 보충한 경우 대식세포 비율이 높았고, 자연살해세포 비율과 미성숙한 자연살해세포 비율, B 세포 비율, T 세포 비율이 낮았음을 확인하였다. 그러나 비만마우스에서는 대조마우스에서와 달리 비타민 D를 보충한 경우 대식세포 비율이 낮았고, 자연살해세포 비율과 미성숙한 자연살해세포 비율의 감소 정도는 대조마우스에 비해 더 큰 차이를 보였다. 이는 비타민 D의 골수 면역세포 구성에 대한 효과가 비만에 의해 영향을 받음을 시사한다.

주 요 어 : 비타민 D, 비만, 고지방식이, 골수, 대식세포, 자연살해세포

학 번 : 2014-22891

목 차

국 문 초 록.....	i
목 차.....	iv
표 목 차.....	vi
그 립 목 차.....	vii
약 어 목 록.....	viii
I. 서 론.....	1
II. 문 헌 고 찰.....	5
1. 골수의 기능.....	5
2. 비만이 면역세포에 미치는 영향.....	7
3. 비타민 D가 면역세포에 미치는 영향.....	10
4. 비만한 경우 비타민 D 보충이 면역세포에 미치는 영향.....	12
III. 연 구 방 법.....	14
1. 실험설계.....	14
2. 시료 수집.....	18
3. 골수 세포의 분리.....	19
4. 혈청 비타민 D 농도 측정.....	20
5. 골수 세포 FACS 분석.....	21
5.1. 골수 세포 FACS surface staining	
5.2. 골수 세포 FACS intracellular staining	
6. RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR.....	23
6.1. RNA 추출	
6.2. cDNA 합성	

6.3. real-time PCR	
7. 통계분석.....	27
IV. 실험 결과.....	28
1. 체중, 체지방량 변화 및 식이섭취량	28
2. 혈청 비타민 D 농도.....	31
3. 비타민 D와 비만이 골수 내재면역세포 분포에 미치는 영향...	33
4. 비타민 D와 비만이 골수 적응면역세포 분포에 미치는 영향...	36
5. 비타민 D와 비만이 비타민 D 수용체와 CD4 T 세포 관련 유전자발현에 미치는 영향	38
V. 고찰.....	40
VI. 요약.....	46
참 고 문 헌.....	48
Abstract	54

표 목 차

Table 1. Composition of the experimental diets.....	16
Table 2. Primer sequences for real-time PCR.	26
Table 3. Body weight, weight change, dietary intake, white adipose tissue weight and liver weight of mice	30
Table 4. The levels of serum vitamin D.....	32

그림 목차

Figure 1. The Immune cell generation in bone marrow.....	6
Figure 2. Haematopoietic stem cell differentiation in bone marrow of healthy and obese mouse	9
Figure 3. The immunomodulatory effects of vitamin D on immune cells.....	11
Figure 4. The experimental design	17
Figure 5. Proportion of innate immune cells in bone marrow cells	35
Figure 6. Proportion of adaptive immune cells in bone marrow cells	37
Figure 7. mRNA levels of genes related to CD4 T cell cytokine and transcription factor and vitamin D receptor ..	39

약 어 목 록

1,25-(OH)₂D, 1,25-dihydroxyvitamin D

25-(OH)D, 25-hydroxyvitamin D

Abs, antibodies

BM, bone marrow

CD, control diet

FACS, fluorescence-activated cell sorting

Gata3, GATA binding protein3

HFD, high fat diet

IFN- γ , Interferon- γ

Il4, interleukin 4

iNK cell, immature natural killer cell

LSD, least significant difference

mNK cell, mature natural killer cell

NK cell, natural killer cell

Tbx21, T-box 21

Treg, regulatory T cell

VDR, vitamin D receptors

WAT, white adipose tissue

I. 서론

골수에는 백혈구 (leukocyte)와 같은 면역세포의 전구 세포이자 면역기능에서 중요한 역할을 하는 조혈모세포 (hematopoietic stem cells)가 존재한다. 조혈모세포는 골수계열 세포 (적혈구, 혈소판 등)와 림프계열 세포 (B 세포, T 세포, 자연살해세포; Natural killer cell; NK 세포)로 나뉜다. 골수는 면역세포가 생성되는 동시에 분화 (differentiation)되고 성숙 (maturation)되는 장소이다. T 세포의 경우는 예외적으로 흉선에서 최종적으로 성숙된다 (Murphy *et al.* 2007).

비만은 면역시스템에도 영향을 미칠 뿐만 아니라 골수의 조혈모세포 기능에도 부정적인 영향을 준다고 알려져 있다. 고지방식으로 비만을 유도했을 때, 골수의 림프계열 및 골수계열 전구세포 분화는 모두 촉진되었으나 분열 (proliferation)은 억제되어 조혈모세포의 정상적인 기능이 저해된다고 보고된 바 있다 (van den Berg *et al.* 2016). 또한 고지방식으로 비만을 유도한 마우스 모델에서 조혈모세포는 대식세포의 염증반응과 지방조직의 염증성 대식세포 생성을 강화하는 방향으로 분화되어, 지방조직의 염증에 기여하는 방향으로 변화하였다 (Singer *et al.* 2014).

비만마우스에서 관찰되는 높은 혈중 렙틴 농도는 백혈구 및 골수 생성을 촉진한다고 보고되었다. 또한 비만마우스의 경우 골수 내에도

지방이 축적되는데 이러한 골수내 지방 과다는 랩틴 mRNA 발현을 증가시키고, 이는 조혈모세포의 생성뿐만 아니라 분화에도 영향을 미쳐 궁극적으로 조혈모세포의 불균형적인 분화를 유도하여 면역시스템을 손상시키는 것으로 보고되었다 (Trottier *et al.* 2012)(Adler *et al.* 2014).

선행연구에 따르면 비만한 사람은 그렇지 않은 사람에 비해 NK 세포와 세포독성 T 세포의 수가 낮았고, NK 세포 활성 (NK cell activity) 또한 억제되었다 (Adler *et al.* 2014). 게다가, 고지방식으로 비만을 유도한 마우스에서는 자궁 림프절에 존재하는 NK 세포 활성과 수가 대조마우스에 비해 낮았다 (Parker *et al.* 2014). 골수의 B 세포 수 및 B 세포 발달과 관련된 지표의 발현 또한 대조식을 섭취한 군에 비해 고지방식을 섭취한 마우스에서 낮았다 (Adler *et al.* 2014). 한편 비만이 지방조직 내의 B 세포 수를 증가시킨다는 상반된 보고가 있기 때문에 (Ray *et al.* 2016), 비만이 B 세포에 미치는 영향은 조직에 따라 차이가 있는 것으로 보인다

비타민 D는 내재면역과 적응면역 모두에게 영향을 주는 것으로 알려졌다. 비타민 D 수용체 (vitamin D receptors, VDR)는 T 세포와 단핵구, 대식세포와 같은 다양한 면역세포에 존재하기 때문에 비타민 D는 면역세포에 영향을 줄 수 있다 (Veldman *et al.* 2000). 또한 비타민 D는 VDR과 결합하여 핵 안으로 들어가 전사인자로 작용하여 단핵구와 대식세포, 수지상세포, T 세포, B 세포와 같은 면역세포의 성숙과 분열에

영향을 주는 것으로 보고되었다 (Mora *et al.* 2008, Baeke *et al.* 2010, Ross *et al.* 2011). 사람의 말초혈액단핵구를 이용한 *in vitro* 연구에서 비타민 D가 B 세포와 T 세포 증식을 억제하였고 (Lemire *et al.* 1984, Rigby *et al.* 1984), 단핵구와 대식세포의 증식은 촉진한다고 보고되었다 (Bhalla *et al.* 1986). 그러나 대부분의 면역세포가 생성되고 성숙되는 골수 면역세포에 비타민 D가 미치는 영향에 대한 연구는 부족한 실정이다. 한편 *in vitro* 실험에서, 1,25-dihydroxyvitamin D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) 처리에 의해 NK 세포 발달과 NK 세포 사이토카인 생성 능력, NK 세포 활성이 저해되었다는 결과가 있으나 (Weeres *et al.* 2014), NK 세포 활성이 향상되었다는 상반된 연구 결과도 존재한다 (Al-Jaderi and Maghazachi 2013). 기존의 선행연구에서는 대부분 *in vitro* 상으로 비타민 D를 처리하였기 때문에 *in vivo* 상에서 비타민 D가 면역세포에 미치는 영향을 확인한 연구가 필요한 실정이다

비타민 D는 간과 신장에서 각각 25-hydroxyvitamin D ($25-(\text{OH})\text{D}$)와 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$ 로 전환된다. VDR과 결합할 수 있는 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$ 는 칼슘 항상성 유지 외에도 세포의 증식과 분화, 염증, 포도당 항상성에도 관여한다 (Bikle 2009). 정상적인 상태에서 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$ 수준은 parathyroid hormone (PTH), fibroblast growth factor 23 (FGF23), $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$ 에 의해 조절된다 (Jones *et al.* 1998, Shimada *et al.* 2004, Wang *et al.* 2015). 한편 비만인 사람들에서 혈청 $25-(\text{OH})\text{D}$ 농도는 낮은 반면 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$ 의 합성을 촉진하는 PTH와 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$ 의 농도가 높게 나타난 연구도 있으나 (Bell *et al.* 1985, Grethen *et al.* 2011), 혈청 $25-(\text{OH})\text{D}$ 수준과 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$ 수준이

낮게 보고된 연구도 있어 (Parikh *et al.* 2004), 상반된 결과가 존재한다. 하지만 비만한 경우 모두 비정상적인 체내 25-(OH)D와 1,25-(OH)₂D 수준이 관찰되어 비만 모델에서 비타민 D 보충이 혈중 비타민 D 농도에 미치는 영향에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

선행연구에서 비만에 의해 골수의 조혈모세포 분화가 불균형적으로 이루어져 면역시스템을 손상시키며, 비타민 D가 면역세포의 분화와 성숙에 영향을 준다고 보고되었다. 한편 비만에 의한 비타민 D 대사이상이 사람과 동물 모델에서 모두 관찰되었음에도, 비만에서 비타민 D 보충이 비만으로 손상된 면역시스템에 어떤 영향을 미치는 지에 대한 연구는 부족한 실정이다. 또한 고지방식이 제공과 식이를 통한 비타민 D 보충이 면역세포가 생성되고 성숙되는 골수에 미치는 영향에 대해서도 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 고지방식으로 비만을 유도한 마우스 모델에 식이를 통해 비타민 D를 보충하였을 때 골수 면역세포 구성에 미치는 효과를 대조마우스와 비교하여 알아보고자 하였다. 이를 위해 혈청 25-(OH)D와 1,25-(OH)₂D를 측정하여 비타민 D 수준을 확인하였고 골수 면역세포의 분포와 *Vdr*와 CD4 T 세포의 사이토카인 및 전사인자인 *Tbx21*, *Ifng*, *Gata3*, *Il4*의 mRNA 수준을 분석하였다.

II. 문 헌 고 찰

1. 골수의 기능

혈액을 구성하는 적혈구, 혈소판, 백혈구들은 모두 골수의 조혈모세포에서 유래한다 (**Figure 1**). 이 조혈모세포는 골수계열 (myeloid lineage)과 림프계열 (lymphoid lineage)로 구성되어 있다. 골수계열은 대부분 내재면역계의 세포들로 분화되는데, 대식세포, 수지상세포, 비만세포, 과립구 (호중구, 호산구, 호염구)로 분화된다. 림프계열은 내재면역에 속하는 NK 세포와 B 세포, T 세포로 분화된다. 이들 세포는 골수에서 유래하여 T 세포를 제외하고 모두 골수에서 발달하고 성숙한다. T 세포는 골수에서 유래하여 흉선에서 최종적으로 성숙한다 (Murphy *et al.* 2007).

골수를 구성하는 면역세포의 비율은 다음과 같다. 적응면역세포 (B 세포와 T 세포)는 8~20% 존재한다. 구체적으로 T 세포와 B 세포 비율은 5:1이고, $CD3^+$ T 세포는 1-5%, $CD4^+$ T 세포는 1.5%, $CD8^+$ T 세포는 2-2.5%이다. $CD4^+$ T 세포 중 1/3은 조절 T 세포 (regulatory T cell, Treg 세포)이고 골수에서 $CD4^+$ T 세포와 $CD8^+$ T 세포의 비율은 1:2이나, 말초림프구와 혈액에서는 2:1로 존재한다 (Zhao *et al.* 2012).

Immune Cell Generation

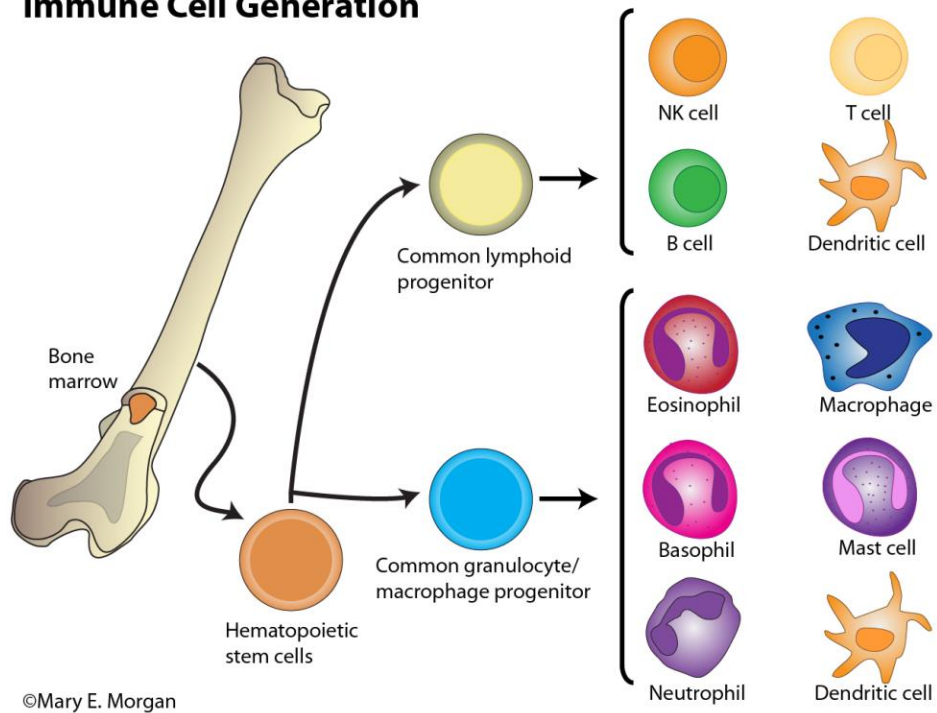


Figure 1. The Immune cell generation in Bone marrow (Morgan 2013)

2. 비만이 면역세포에 미치는 영향

비만은 인슐린 저항성과 제 2형 당뇨병의 주요 인자인 만성적인 염증 상태를 동반한다. 유리지방산 (free fatty acids)은 비만에서 증가되며, 인슐린 저항성과 간과 지방, 근육, 췌장의 염증을 유도한다.

정상적인 지방조직에는 항염증성 M2 유형의 지방조직대식세포 (adipose tissue anti-inflammatory M2-type macrophages, ATM2)와 NK 세포가 주로 존재하며, ATM2가 interleukin-10 (IL-10)을 분비하기 때문에 인슐린에 민감하게 반응할 수 있다. 그러나, 비만한 경우 지방조직에서 지방분해가 유도되어 chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 염증성 인자와 유리지방산이 분비된다. 이는 혈액의 단핵구를 고도의 염증성 M1유형의 대식세포 (adipose tissue pro-inflammatory M2-type macrophages, ATM1)로 분화시킨다. 활성화된 ATM1은 다량의 TNF- α 와 IL-1 β , IL-6, leukotriene B4, 산화 질소 (Nitric oxide, NO) 같은 염증성 물질을 생산한다 (Ray *et al.* 2016). 지방조직의 비정상적인 아디포카인 (adipokine) 분비는 낮은 수준의 만성적인 염증 상태와 인슐린 저항성에 기여하는 것으로 나타났다 (Bremer and Jialal 2013). 한편 **Figure 2**와 같이, 비만일 경우 골수의 조혈모세포에서 림프계와 골수계 전구세포로의 분화가 불균형적으로 발생하게 된다 (Adler *et al.* 2014).

비만은 골수의 지방과다를 초래하고, 이는 물리화학적 연결뿐만 아니라 세포 간의 연약하지만 필수적인 신호 또한 파괴시키는 것으로

알려져 있다. 이러한 파괴는 백혈구 수와 면역능력, 조혈모세포의 증식을 억제하는 결과를 초래한다. 또한 비만은 전신성 지방축적과 관련된 염증 증가와 같은 만성합병증의 위험성을 증가시킨다.

비만이 조혈시스템에 미치는 영향에 대해서는 아직까지 완전히 밝혀지지는 않았으나 노화나 신경성 식욕 부진증 (anorexia)에서 나타나는 골수의 지방과다 상태를 고려했을 때, 비만으로 인해 증가된 지방과다증은 조혈시스템과 면역시스템의 손상을 초래할 수 있음을 시사한다 (Adler *et al.* 2014).

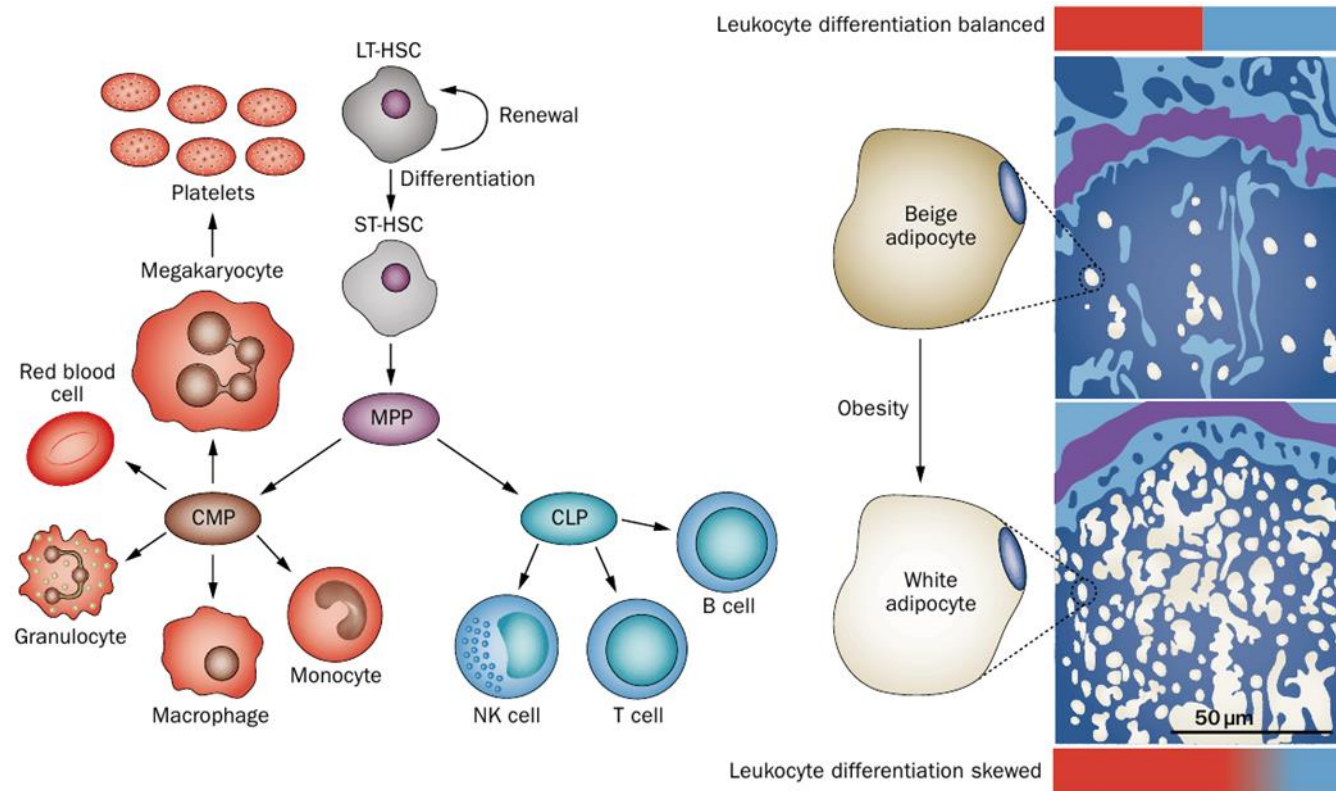


Figure 2. Hematopoietic stem cell differentiation in bone marrow of healthy and obese mouse (Adler *et al.* 2014)

3. 비타민 D가 면역세포에 미치는 영향

체내에서 활성화된 비타민 D는 **Figure 3**에 나타난 바와 같이 VDR과 결합하여 핵 내로 들어가 전사인자 역할을 한다. VDR은 T 세포와 단핵구, 대식세포와 같은 다양한 면역세포에 존재하며 (Veldman *et al.* 2000) 비타민 D는 VDR와 결합하여 단핵구와 대식세포, 수지상세포, T 세포, B 세포와 같은 면역세포의 성숙과 분열에 영향을 주는 것으로 보고되었다 (Mora *et al.* 2008, Baeke *et al.* 2010, Ross *et al.* 2011).

NK 세포에 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 를 처리했을 때 NK 세포 활성이 향상되었다는 보고도 있지만 (Al-Jaderi and Maghazachi 2013), $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 에 의해 NK 세포의 cytotoxicity와 사이토카인생성 능력이 저하되었다는 연구결과도 보고되었다 (Weeres *et al.* 2014). 따라서 비타민 D의 NK 세포에 대한 영향은 아직까지는 일관성 있게 결론을 내리기 어렵다. 또한 비타민 D는 단핵구의 분화와 대식세포의 증식을 촉진하였다 (Bhalla *et al.* 1986, Weeres *et al.* 2014). 한편 비타민 D가 적응면역에 미치는 영향을 살펴보면, Th17과 Th1 사이토카인 생성은 억제하였고 Treg 세포의 활성화와 NKT 세포 기능, Th2 사이토카인 생성은 촉진하였고, B 세포 증식은 억제하였다 (Lemire *et al.* 1984, Rigby *et al.* 1984).

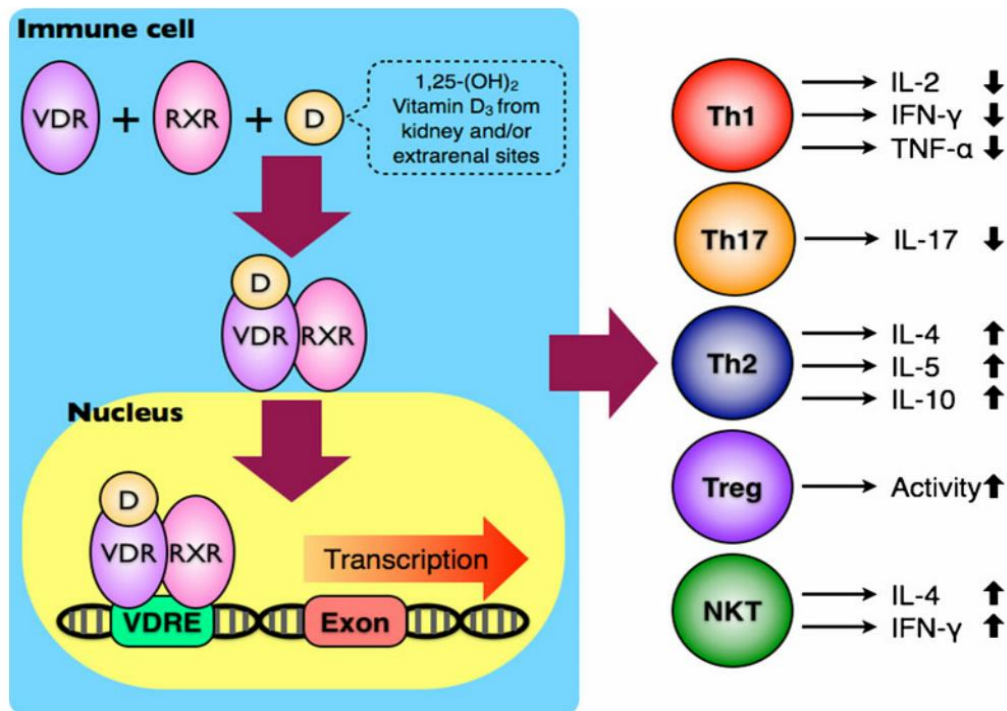


Figure 3. The immunomodulatory effects of vitamin D on immune cells
(Yang *et al.* 2013)

4. 비만한 경우 비타민 D 보충이 면역세포에 미치는 영향

연령 및 거주지역의 위도와 상관없이 비만한 사람에서 비타민 D 부족이 보고되었는데 (Pereira-Santos *et al.* 2015), 비만과 비타민 D 부족의 관계에 대해서는 다음과 같은 기전들이 제시되고 있다. VDR polymorphism으로 에너지 대사가 저하되어 비만을 유도한다는 기전, 비타민 D 부족으로 PTH가 증가하고, 이는 칼슘 유입을 향상시킴으로써 지방세포에서의 지방합성을 촉진하여 체중 증가를 유도한다는 기전, 렙틴 합성에 필수적인 비타민 D 부족에 의해 저하된 렙틴 합성으로 인해 식욕이 촉진되어 비만이 유도된다는 기전들이 제시되었다 (Yao *et al.* 2015). 이는 비만한 사람에서 비타민 D 보충이 필요할 가능성이 있음을 시사한다. 동물실험에서 비타민 D 보충은 지방산 산화와 관련된 유전자 발현을 증가시켜 지방산화와 미토콘드리아 대사의 촉진을 통해 에너지 소비를 높여 체중증가를 억제했다는 결과도 있으나 (Karkeni *et al.* 2015), 비타민 D 보충은 지방합성을 촉진하고 지방의 분해를 억제하여 비만에 기여한다는 결과도 있다. (Zemel *et al.* 2000, Shi *et al.* 2001). 이와 같은 상반된 연구결과들로 인해 비만에 대한 비타민 D의 영향은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 또한 비타민 D는 비만에서 나타나는 만성적인 염증에 영향을 주는 것으로 보고되고 있는데, 고지방식이로 비만을 유도한 마우스에 비타민 D를 보충하는 것은 낮은 수준의

만성적인 염증과 관련된 전염증성 사이토카인과 케모카인 유전자 발현을 감소시키고 대식세포의 지방조직으로의 침윤을 줄였다 (Karkeni *et al.* 2015). 이를 통해 비타민 D는 비만에 의한 만성적인 염증 반응을 줄일 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있다.

III. 연 구 방 법

1. 실험 설계

5주령의 수컷 C57BL/6N 마우스를 중앙실험동물㈜ (Seoul, Korea)에서 구입하여 서울대학교 수의과대학 동물 사육장의 specific pathogen free (SPF) room 에서 사육하였다. 사육장 환경은 온도 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 와 상대 습도 $50 \pm 10\%$ 로 유지하였고, 명암은 12 시간 주기 (light 6:00AM - 6:00PM)로 조절하였다. 실험 동물은 5일 동안의 적응 기간을 거친 후 군 당 평균 체중을 맞추어 네 가지 실험군으로 배정하였다. 네 군은 각각 대조식이군 (Control diet-vitamin D control group, CD-DC $n = 10$), 대조식이 비타민 D 보충군 (Control diet-vitamin D supplemented group, CD-DS, $n = 10$), 고지방식이군 (High fat diet-vitamin D control group, HFD-DC, $n = 10$), 고지방식이 비타민 D 보충군 (high fat diet-vitamin D supplemented group, HFD-DS, $n = 11$)이었다. 실험 식이는 지방 함량 (10% 또는 45% kcal fat, CD 또는 HFD) 및 비타민 D 함량 (1,000 또는 10,000 IU/kg of diet, DC 또는 DS)에 따라 총 4 종류의 제품으로 Dyets, Inc. (Bethlehem, PA, USA)에서 주문 제작하였다 (CD-DC, #103816; CD-DS, #119334; HFD-DC, #103818; HFD-DS, #119333). 실험 식이는 실험 동물에게 제공되기 전까지 4°C 에서 보관하였다. 실험 식이의 조성은 **Table 1** 에 나타내었다.

실험 식이와 3차 증류수는 12주간 자유 급여 (*ad libitum*) 하였다. 식이 섭취량은 일주일에 4회, 체중은 1회 측정하였다. 12주 간의 실험 식이 기간이 완료된 후에는 모든 실험 동물을 12시간 동안 금식 시키고 이산화탄소 과다 흡입 방식을 이용하여 안락사 시켰다. 실험 설계 개요는 **Figure 4**에 도식화 하였다.

동물 실험의 전 과정은 서울대학교 동물 실험 윤리위원회 (Seoul National university Institutional Animal Care and Use Committee; SNU IACUC)의 승인을 받았으며, 규정에 따라 수행되었다 (승인번호: SNU-160329-1).

Table 1. Composition of the experimental diets^a

	CD-DC (10% kcal fat + 1,000 IU/kg of diet)		CD-DS (10% kcal fat + 10,000 IU/kg of diet)		HFD-DC (45% kcal fat + 1,000 IU/kg of diet)		HFD-DS (45% kcal fat + 10,000 IU/kg of diet)	
	(g)	(kcal)	(g)	(kcal)	(g)	(kcal)	(g)	(kcal)
Casein	200	716	200	716	200	716	200	716
L-cystein	3	12	3	12	3	12	3	12
Sucrose	350	1400	350	1400	172.8	691.2	172.8	691.2
Cornstarch	315	1134	315	1134	72.8	262.08	72.8	262.08
Dyetrose	35	133	35	133	100	380	100	380
Soybean oil	45	405	45	405	45	405	45	405
t-BHO	0.009	-	0.009	-	0.009	-	0.009	-
Lard	-	-	-	-	157.5	1417.5	157.5	1417.5
Cellulose	50	-	50	-	50	-	50	-
Mineral Mix ^b	35	16.45	35	16.45	35	16.45	35	16.45
Vitamin Mix ^c	10	39.2	-	-	10	39.2	-	-
Vitamin Mix (No VitD)	-	-	10	39.2	-	-	10	39.2
VitD3 (400,000IU/g)	-	-	0.025	0.1	-	-	0.025	0.1
Choline Bitartrate	2	-	2	-	2	-	2	-
Total (g)	1045.009		1045.034		848.109		848.134	
Kcal/g diet	3.69		3.69		4.64		4.64	

^aResource: Dyets.^b35 grams of mineral mix (Dyets, #20000) provides 5.2 g calcium, 4 g phosphorus, 3.6 g potassium, 1 g sodium, 1.6 g chloride, 0.3 g sulfur, 0.5 g magnesium, 35 mg iron, 6 mg copper, 54 mg manganese, 30 mg zinc, 2 mg chromium, 0.2 mg iodine, 0.1 mg selenium, and 4.2 g sucrose.^c10 grams of vitamin mix (Dyets, #300050) provides 4000 IU vitamin A, 1000 IU vitamin D3, 50 IU vitamin E, 30 mg niacin, 16 mg pantothenic acid, 7 mg vitamin B6, 6 mg vitamin B1, 6 mg vitamin B2, 2 mg folic acid, 0.8 mg menadione, 0.2 mg biotin, 10 µg vitamin B12, and 9.8 g sucrose.

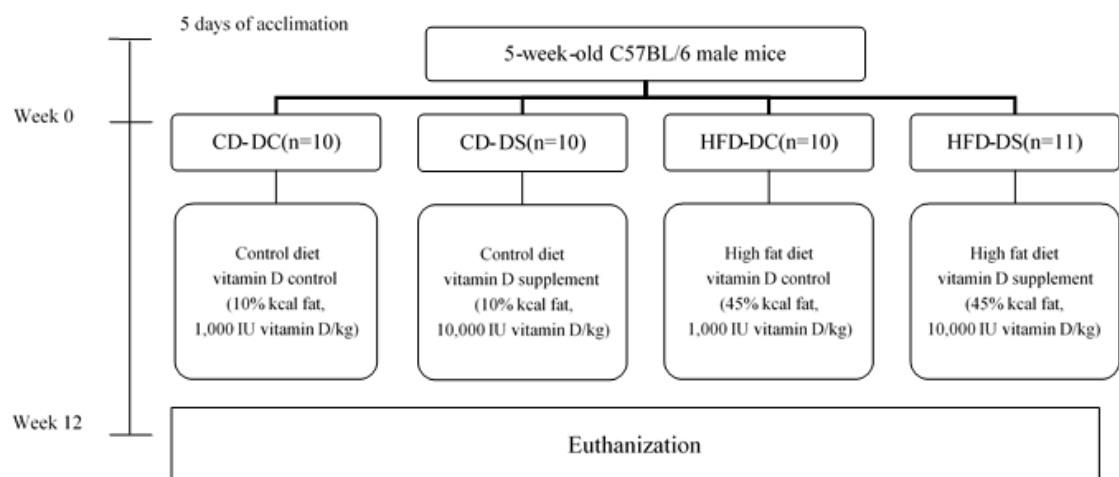


Figure 4. The experimental design

2. 시료 수집

희생 직후 심장에서 채혈하고 간, 백색지방 (신주위지방, 후복강지방, 부고환지방, 피하지방)을 분리하여 무게를 측정하였다. 골수 세포를 분리하기 위해서 대퇴골과 정강뼈는 별도 분리하였다. 혈액은 상온에서 2시간 동안 응고시킨 후 원심분리하여 상층액 (혈청)만 수거하여 분석 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

3. 골수 세포의 분리

골수 분리 시 RPMI-1640 (Lonza, Walkersville, MD, USA)에 penicillin (100 U/mL, GibcoBRL, Grand Island, NY, USA), streptomycin (100 μ g/mL, GibcoBRL), L-glutamine (2 mM, GibcoBRL), 2-mercaptoethanol (50 μ M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 및 2% heat-inactivated FBS (GibcoBRL)를 추가한 배지를 사용하였다.

뒷다리와 등 부분을 70% 에탄올로 소독한 후 탈피하고, 대퇴골과 정강뼈가 손상되지 않도록 근육을 모두 제거하였다. 모든 개체의 뼈를 분리한 뒤 70% 에탄올에 5분 동안 소독하고 배지로 행구어 준비하였다. 멸균된 핀셋과 가위로 뼈의 양 끝을 자른 뒤 배지와 주사기 (26 gauge 바늘 사용)를 이용하여 골수 세포를 뼈로부터 씻어내었다. 분리된 골수를 강하게 파이펫팅 한 후, 1200 rpm의 속도로 실온에서 8분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 세포에서 적혈구를 제거하기 위해 ACK lysing buffer (Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA) 1 mL를 넣고 파이펫팅하여 부유 시킨 후 2분 동안 얼음에서 배양하였다. 35 μ m nylon mesh에 통과시킨 후 washing하였고, trypan blue stain (Gibco)로 60배 희석하여 세포 수를 측정 하였다.

골수 세포 일부는 mRNA분석을 위하여 9000 rpm, 4 °C, 2분 원심분리 한 뒤 펠렛 형태로 -80 °C에 보관하였고, 나머지는 FACS 분석에 사용하였다.

4. 혈청 비타민 D 농도 측정

방사면역측정법 (Radioimmunoassay)을 통하여 혈청 25-(OH)D 와 1,25-(OH)₂D 농도를 제조사에서 제공하는 실험방법에 따라 측정하였다 (25-Hydroxyvitamin D2/D3, #68100E, 1,25(OH)₂-Hydroxyvitamin D2/D3, #65100E, DiaSorin S.p.A., Saluggia, Italy).

5. 골수 세포 FACS 분석

5.1. 골수 세포 FACS surface staining

골수 세포 중 면역 세포의 분포를 확인하기 위해 BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)에서 다음의 항체를 구입하여 surface staining을 하였다: FITC rat anti-mouse CD3 molecular complex, APC rat anti-mouse CD4, PE rat anti-mouse CD8a, PE rat anti-mouse CD19, APC rat anti-CD11b, PE rat anti-mouse F4/80, PE mouse anti-mouse NK-1.1.

각 튜브 당 1×10^6 cells을 넣고 1500 rpm, 4 ° C조건에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 FACS staining buffer (1% FBS와 0.09% sodium azide가 포함된 PBS)에 적정 농도의 항체를 추가하고 vortexing하여 혼합하였다. 차광하여 4 ° C에서 30분 동안 incubation 한 뒤, FACS staining buffer로 washing하였다. 각 튜브에 fixer 용액을 100 μ L씩 분주한 후 차광하여 4 ° C에서 30분 동안 incubation 하였다. 추가 washing 후 1500 rpm, 4 ° C에서 5분 동안 원심분리하였다.

FACS staining buffer로 현탁한 세포를 FACS 튜브로 옮기고, FACS caliber II (BD Biosciences, SA, USA)를 통해 염색 결과를 확인하였다. 이후 데이터를 FlowJo software version 10 (Tree star Inc., Ashland, OR, USA)을 이용하여 분석하였고, B 세포 ($CD3^-CD19^+$)와 $CD4^+$ T 세포 ($CD3^+CD4^+$), $CD8^+$ T 세포 ($CD3^+CD8^+$), NKT 세포 ($CD3^+NK1.1^+$), 대식세포 ($CD11b^+F4/80^+$), immature NK 세포 (iNK 세포, $CD11b^-NK1.1^+$), mature NK 세포 (mNK 세포, $CD11b^+NK1.1^+$) 비율을 측정하였다.

5.2. 골수세포 FACS intracellular staining

골수에 존재하는 Treg 세포 비율을 측정하기 위해 Treg 세포 전사인자 Foxp3를 antibody로 사용하였다 (Foxp3-Alexafluor488, eBioscience, San Diego, CA). 앞에서 언급된 방법으로 CD4-PE surface staining된 세포를 준비한 뒤, 항체가 핵 안으로 들어갈 수 있도록 fix/perm working solution (eBioscience)을 100 μ L씩 분주, vortexing 하고 차광하여 4 °C에서 30분 동안 incubation 하였다. 400 μ L perm buffer (eBioscience)를 넣고 455 rpm, 4 °C에서 4분 동안 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 각 튜브 당 100 μ L의 perm buffer및 Foxp3 antibody 0.25 μ g을 분주한 뒤, 차광하여 4 °C에서 30분 동안 incubation 하였다. 이후 perm buffer로 washing한 뒤, 각 튜브에 fixer를 100 μ L씩 분주하고 차광하여 4 °C에서 15분 동안 incubation 하였다. 1500 rpm, 4 °C에서 5분 원심분리하고 FACS staining buffer으로 재현탁하였다. 이후 FACS caliber II (BD Biosciences)로 염색 결과를 측정하고, FlowJo software version 10 (Tree star Inc.)를 이용해 CD4 및 Foxp3를 모두 발현하는 세포를 Treg 세포 (CD4⁺Foxp3⁺)로 분석하였다.

6. RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR

6.1. RNA 추출

펠렛 상태로 -80°C 에서 보관된 세포에 RNAiso Plus (Takara, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하여 RNA를 추출하였다. RNAiso Plus 용액 1 mL를 넣고 강하게 파이펍팅하고 vortexing하여 균질화 (homogenization)하였다. 상온에서 5분 동안 incubation 한 후 chloroform (Sigma, St. Louis, MO, USA) 200 μL 를 넣고 30초 이상 vortexing하였다. 다시 상온에서 3분간 두었다가 $12,000 \times g$, 4°C 에서 15분간 원심분리 하였다. 분리된 층에서 상층액을 취하여 새로운 e-튜브에 옮겨 담고 500 μL isopropanol (Sigma)을 넣은 후 (20초 동안) vortexing하였다. 이를 상온에서 10분간 두었다가 $12,000 \times g$, 4°C 에서 10분 동안 2회 원심분리하였다. 펠렛이 생긴 것을 확인하고 상층액을 제거한 후 75% 에탄올 1 mL로 washing하였다. 다시 $7,500 \times g$, 4°C 에서 2분간 원심분리하여 에탄올을 제거하고 펠렛을 완전히 건조시켰다. 0.05% DEPC-treated DW를 15 μL 분주하여 펠렛을 녹인 후 nano-Spectrophotometer (NANO-200, BIOAND Co., Gyeonggi, Korea)를 이용하여 260 nm와 280 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도와 순도를 측정하였다. A280 대비 A260값이 1.7 이상인 것을 확인하였다. agarose 전기영동으로 추출된 RNA의 질을 확인하였다.

6.2. cDNA 합성

PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit (Takara)를 사용하여 추출된 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. PCR 튜브에 2 μ g의 RNA, dNTP (10 mM) 1 μ L, oligo dT primer (50 μ M) 1 μ L를 넣고 RNase free DW 로 총 부피가 10 μ L가 되도록 맞춰준 후 spin down하여 RNA: primer mixture를 만들었다. 이를 65 °C와 4 °C에서 각각 5분씩 incubation한 다음, 여기에 5 \times Primescript buffer 4 μ L, RNase inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L, PrimeScript Rtasе (200 U/ μ L) 1 μ L, RNase free DW 4 μ L를 더해 reaction mixture를 만들었다. Spin down하고 vortexing한 후 다시 spin down하여 상온에서 10분간 방치하였다. 2720 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 42 °C에서 50분, 95 °C에서 5분 동안 차례로 반응시켜서 cDNA를 합성하였다.

6.3. Real-time PCR

PCR용 fast 8-tube (Applied Biosystems)에 forward와 reverse primer 각각 0.4 μ L, ROX reference dye (50 \times) 0.4 μ L, SYBR Premix Ex Taq (2 \times) 10 μ L, autoclaved DW 7.8 μ L를 cDNA 10배 희석액 1 μ L와 섞고 spin down한 후, StepOne Real-time PCR system (Applied Biosystems)을 사용하여 반응시켰다. SYBR Premix와 ROX dye (Takara)를 사용하였으며, Primers는 Biomedic사 (Bucheon, Korea)에서 제조한 것을 사용하였다. 각 유전자 별 primer의 염기 서열은 **Table 2**에 나타내었다. 반응 조건은 우선 95 °C에서 5초간 변성 (denaturation)한 후 60 °C에서 30초간 결합 및 신장 (annealing & extension)시키는 조건을 40회 반복하였다. 이후 95 °C에서 15초, 60 °C에서 60초, 95 °C에서 15초간 반응시켜 melt curve를 얻었다. 각 실험은 duplicate하여 평균값을 사용하였으며 Ct 값은 house-keeping 유전자인 *Gapdh* 수준으로 보정하였다. 유전자 수준은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 계산법을 이용하여 CD-DC군 대비 상대정량 하였다.

Table 2. Primer sequences for real-time PCR

Gene	Forward primer(5' -3')	Reverse primer(5' -3')
<i>Gata3</i>	CGCCAGAGAAGAGGATGAAG	GGAAACTCCGTCAGGGCTAC
<i>Ifng</i>	TGGACCTGTGGGTTGTTGAC	GAACTGGCAAAAGGATGGTG
<i>Tbx21</i>	AACTGTGTTCCCGAGGTGTC	GGACCCAACTGTCAACTGCT
<i>Il4</i>	TGTGGTGTCTTCGTTGCTG	GTCATCCTGCTCTTCTTTCTCG
<i>Vdr</i>	GGGATGATGGGTAGGTTG	GGAAGAGGGTAGAGGGCA
<i>Gapdh</i>	GGAGAAACCTGCCAAGTA	AAGAGTGGGAGTTGCTGTTG

Gata3, GATA binding protein3; *Ifng*, interferon gamma; *Tbx21*, T-box 21; *Il4*, interleukin 4; *Vdr*, vitamin D binding receptor; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

7. 통계분석

모든 통계분석은 SPSS 24.0 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 식이 비타민 D보충과 고지방식이 제공에 의한 효과를 분석하기 위해 이원배치분산분석 (Two-way ANOVA)을 수행하였고, Fisher's least significant difference (LSD) test로 사후검정 하였다. 교호작용이 있을 경우 독립표본 t -검정 (Student's t -tests)을 하였다. 통계 검증은 $P < 0.05$ 수준에서 이루어졌으며 모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (mean \pm SEM)로 표기하였다.

IV. 실험 결과

1. 체중, 체지방량 변화 및 식이섭취량

각 군의 0 주, 12 주의 체중과 12주 동안의 하루 평균 식이 섭취량, 하루 평균 열량 섭취량, 하루 평균 비타민 D 섭취량, 체중변화량, 간 무게, 백색지방 무게를 **Table 3**에 나타내었다. 하루 평균 식이 섭취량은 CD-DC 군이 HFD-DC군보다 유의적으로 높았고, CD-DS군의 양이 HFD-DS군의 양보다 유의적으로 높았다. 그러나 지방으로부터 얻는 열량 차이 때문에 하루 평균 열량 섭취량은 HFD-DC군과 HFD-DS군의 열량이 각각 CD-DC군과 CD-DS 군의 열량보다 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$). 12 주차 체중은 고지방식이 제공에 영향을 받아 HFD-DC군과 HFD-DS군의 체중이 각각 CD-DC군과 CD-DS군의 체중보다 유의적으로 높았으나 ($P = 0.001$) 비타민 D 보충에 의한 영향은 없었다. 또한 백색지방무게도 HFD-DC군과 HFD-DS군의 무게가 각각 CD-DC군과 CD-DS군의 무게보다 유의적으로 높았다 ($P < 0.001$). 그러나 12 주차 간 무게는 식이 지방 함량과 비타민 D 보충에 의한 차이가 없었다. 또한 하루 평균 식이 섭취량과 하루 평균 열량 섭취량은 비타민 D를 보충한 군에서 유의적으로 높았고 백색지방무게도 HFD-DS군의 무게가 HFD-DC군의 무게보다 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$). 하루 평균 비타민 D 섭취량은

CD-DS군과 HFD-DS군이 각각 CD-DC군과 HFD-DC군보다 유의적으로 높았으며 ($P < 0.001$), 고지방식이 섭취 여부에 의한 차이는 없었다.

Table 3. Body weight, weight change, dietary intake, white adipose tissue weight and liver weight of mice^{1,2}

	CD		HFD		P-value		
	DC(n=10)	DS(n=10)	DC(n=10)	DS(n=11)	Fat amount	VitD amount	Interaction
Body weight at 0 week (g)	20.3±0.5	20.8±0.3	20.8±0.2	20.7±0.2	0.52	0.42	0.27
Body weight at 12th week (g)	30.3±0.8 ^c	30.4±0.8 ^c	33.9±1.3 ^b	37.2±0.9 ^a	<0.001	0.10	0.13
Weight change (g)	10.0±0.7 ^c	9.5±0.9 ^c	13.1±1.3 ^b	16.5±0.9 ^a	<0.001	0.14	0.06
Average dietary intake for 12 week (g/d)	3.02±0.04 ^a	3.21±0.12 ^a	2.60±0.06 ^b	2.75±0.07 ^b	<0.001	0.04	0.82
Average energy intake for 12 week (kcal/d)	11.1±0.2 ^b	11.8±0.4 ^{bc}	12.1±0.3 ^{ac}	12.8±0.3 ^a	0.01	0.03	0.98
Average vitamin D intake for 12 week (IU/d)	2.89±0.04 ^b	30.7±1.14 ^a	3.07±0.07 ^b	32.48±0.82 ^a	0.18	<0.001	0.27
WAT weight at 12th week (g) ³	2.0±0.3 ^c	2.4±0.2 ^{bc}	3.2±0.5 ^b	4.6±0.5 ^a	<0.001	0.03	0.21
Liver weight at 12th week (g)	1.08±0.04	1.09±0.07	1.13±0.06	1.18±0.08	0.25	0.64	0.74

¹Values are represented as means ± SEM, n = 10 to 11 per group (n = 41)

²Two-way ANOVA was used to determine the effect of fat and vitamin D intake. Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test.

³WAT (White adipose tissue) includes perirenal, intraperitoneal, epididymal, and subcutaneous fat.

CD-DC, 10% kcal fat + 1,000 IU/kg of diet; CD-DS, 10% kcal fat + 10,000 IU/kg of diet;

HFD-DC, 45% kcal fat + 1,000 IU/kg of diet; HFD-DS, 45% kcal fat + 10,000 IU/kg of diet.

2. 혈청 비타민 D 농도

비타민 D 보충과 비만이 혈중 비타민 D 농도에 미치는 영향을 알아보기 위해, 혈청 25-(OH)D와 1,25-(OH)₂D 농도를 측정하였다. 혈청 25-(OH)D 농도는 CD-DC군과 HFD-DC군보다 CD-DS군과 HFD-DS군에서 유의적으로 높았고 (CD군의 경우 61.7%, HFD군의 경우 107% 높았음), 식이 중 지방 함량에 의한 유의적인 차이는 없었다. 혈청 1,25-(OH)₂D 농도는 비타민 D 보충하거나 ($P=0.08$)와 고지방식이를 제공한 경우 ($P=0.08$) 그렇지 않은 군에 비해 높아지는 경향성을 보였다. CD-DC군의 농도는 HFD-DC군의 농도보다 높았고, CD-DS군에서의 농도는 CD-DC군의 경우보다 216.4% 높았으나 HFD군 내에서는 비타민 D보충한 경우에 8.9% 높았고, 이는 CD군 내에서의 비타민 D 보충에 의한 변화에 비해 미미한 수준이었다 (Table 4).

Table 4. The levels of serum vitamin D^{1,2}

	CD		HFD		P-value		
	DC(n=4)	DS(n=5)	DC(n=4)	DS(n=4)	Fat amount	VitD amount	Interaction
Serum_25-(OH)D (ng/ml)	29.9±1.6 ^a	20.8±0.3 ^b	20.8±0.2 ^a	20.7±0.2 ^b	0.85	<0.001	0.21
Serum_1,25-(OH)2D3 (pg/ml)	44.1±17.5	139.6±26	138.5±28.6	150.9±35.9	0.08	0.08	0.16

¹Values are represented as means ± SEM, n = 4 to 5 per group.

²Two-way ANOVA was used to determine the effect of fat and vitamin D intake. Different superscripts indicate significant difference ($P<0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test.

CD-DC, 10% kcal fat +1,000 IU/kg of diet; CD-DS, 10% kcal fat +10,000 IU/kg of diet; HFD-DC, 45% kcal fat +1,000 IU/kg of diet; HFD-DS, 45% kcal fat +10,000 IU/kg of diet.

3. 비타민 D와 비만이 골수 내재면역세포 분포에

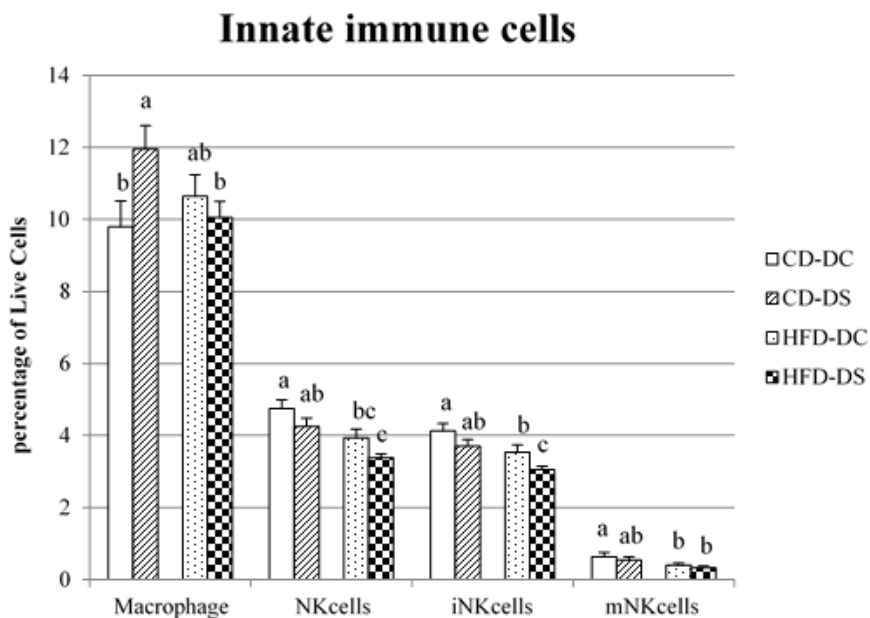
미치는 영향

비타민 D 보충과 식이 중 지방 함량이 내재면역에 미치는 영향을 알아보기 위해 골수의 내재면역세포 분포를 분석하였다. 또한 NK 세포의 성숙도를 측정하기 위해 성숙지표인 CD11b를 확인하였다. 대식세포에 대한 비타민 D의 보충 효과는 CD군과 HFD군에서 다르게 나타났다 ($P < 0.05$). 대식세포 비율은 CD군에서는 비타민 D를 보충한 경우에 22.2% 높았으나, HFD군에서는 비타민 D 보충군과 대조군 간에 유의적인 차이가 없었다. 또한 CD-DS군의 경우에 비해 HFD-DS군의 대식세포비율이 15.9% 낮았다.

비타민 D 보충과 고지방식이 섭취는 NK 세포 및 iNK 세포 비율에 유의한 영향을 미쳤다. NK 세포 비율은 비타민 D 보충하거나 ($P < 0.05$) 고지방식이를 제공한 경우 ($P < 0.05$) 그렇지 않은 군에 비해 유의적으로 낮았다. 비타민 D를 보충한 경우 NK 세포 비율이 낮아졌으며 각각 CD-DC군보다 CD-DS군에서 10.2% ($P = 0.09$), HFD-DC군의 경우에 비해 HFD-DS군에서 13.7% 낮은 경향을 보였다 ($P = 0.06$). 고지방식이 섭취가 NK 세포 비율에 미치는 영향을 비교해 보면, NK 세포 비율은 CD-DC군보다 HFD-DC군에서 17.2% ($P < 0.05$), CD-DS군보다 HFD-DS군에서 20.4% 낮았다 ($P < 0.05$). iNK 세포 비율은 전체적으로 DC군보다 DS군에서 ($P < 0.05$), CD군보다 HFD군에서 낮았다 ($P < 0.05$). NK 세포 비율에 대한

비타민 D 효과를 비교해보면, iNK 세포 비율이 HFD-DS군에서는 HFD-DC군보다 14.1% 낮았으나 ($P = 0.05$), CD군에서는 유의적인 차이가 없었다. 그리고 iNK 세포 비율은 CD-DC군보다 HFD-DC군에서 14.3% ($P < 0.05$), CD-DS군보다 HFD-DS군에서 17.7% 낮았다 ($P < 0.05$).

mNK 세포 비율은 고지방식을 섭취한 경우에 유의적으로 낮았으며 ($P < 0.05$), 비타민 D 보충에 의한 차이는 없었다. 고지방식을 섭취할 경우 mNK 세포 비율이 대조식을 섭취한 경우보다 낮은 결과는 iNK 세포에서도 나타났다. HFD-DC군의 mNK 세포 비율은 CD-DC군의 경우보다 13.8% 낮았고, HFD-DS군의 mNK 세포 비율은 CD-DS군의 비율보다 낮은 경향성을 나타냈다 (**Figure 5**).



<i>P</i> -value	Macrophage	NK cells	iNK cells	mNK cells
Fat amount	0.385	<0.001	0.001	0.008
Vitamin D supplementation	0.196	0.013	0.013	0.330
Interaction	0.027	0.911	0.854	0.906

Figure 5. Proportion of innate immune cells in bone marrow cells

Values are represented as means \pm SEM, $n = 9$ to 11 per group. Means with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test.

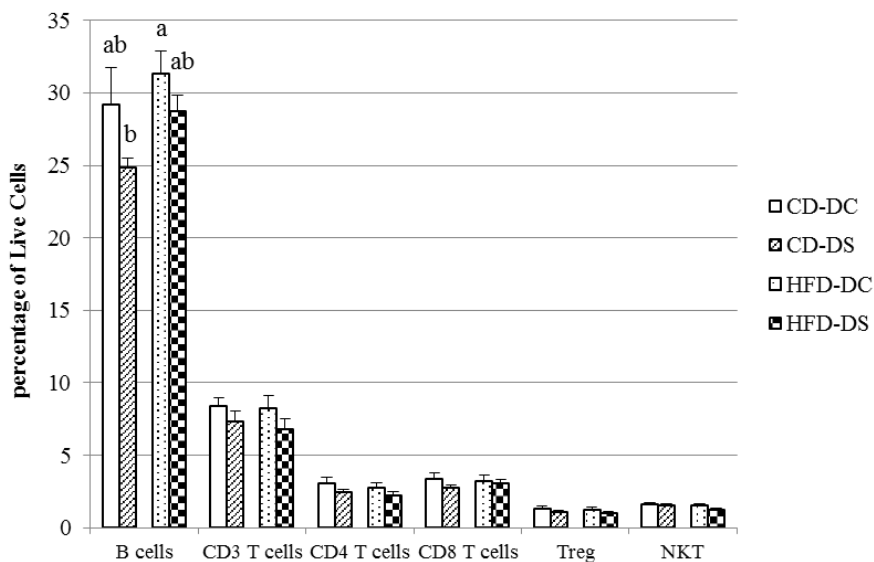
CD-DC, 10% kcal fat +1,000 IU/kg of diet; CD-DS, 10% kcal fat +10,000 IU/kg of diet; HFD-DC, 45% kcal fat +1,000 IU/kg of diet; HFD-DS, 45% kcal fat +10,000 IU/kg of diet.

4. 비타민 D와 비만이 골수 적응면역세포 분포에 미치는 영향

B 세포의 비율은 비타민 D를 보충한 경우 낮았는데, CD-DC군보다 CD-DS군이 15.0% ($P = 0.06$), HFD-DC군보다 HFD-DS군이 8.4% 낮았다 ($P < 0.05$). B 세포 비율은 고지방식을 섭취했을 때 높은 경향이 있었다 ($P = 0.06$).

CD4⁺ T 세포 비율은 비타민 D를 보충한 경우 낮은 경향을 보였으나 ($P = 0.06$), 고지방식이 섭취 여부에 의한 차이는 없었다. CD8⁺ T 세포와 Treg 세포, NKT 세포 비율에서는 비타민 D 보충 및 식이 지방 함량에 의한 영향이 관찰되지 않았다 (**Figure 6**)

Adaptive immune cells



<i>P</i> -value	B cells	CD3 ⁺ T	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	Treg	NKT
Fat amount	0.062	0.645	0.345	0.813	0.570	0.228
Vitamin D supplementation	0.030	0.100	0.056	0.207	0.148	0.178
Interaction	0.576	0.777	0.857	0.526	0.991	0.504

Figure 6. Proportion of adaptive cells in bone marrow cells

Values are represented as means \pm SEM, n = 8 to 11 per group. Means with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test.

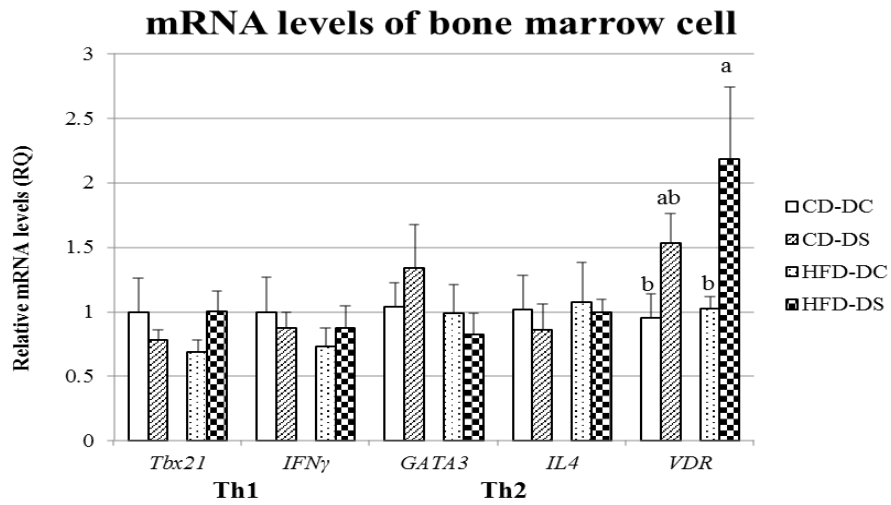
CD-DC, 10% kcal fat +1,000 IU/kg of diet; CD-DS, 10% kcal fat +10,000 IU/kg of diet; HFD-DC, 45% kcal fat +1,000 IU/kg of diet; HFD-DS, 45% kcal fat +10,000 IU/kg of diet.

5. 비타민 D와 비만이 비타민 D 수용체와

CD4 T 세포 관련 유전자발현에 미치는 영향

비타민 D 와 비만이 CD4⁺ T 세포와 관련된 전사인자 (transcription factor) 및 사이토카인 (cytokine) 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 전체 골수 세포에서 *Gata3*, *Ifng*, *Tbx21*, *Il4* 유전자 수준을 측정하였다. 해당 지표들은 CD4⁺ T 세포 중 선행연구에서 비타민 D에 영향을 받는다고 알려진 T helper 1 (Th1) 세포와 T helper 2 (Th2) 세포의 전사인자와 사이토카인 중에서 선택하였다. 또한 *Vdr* 유전자 발현을 측정하여 비타민 D 보충과 비만이 비타민 D target 유전자 발현에 미치는 영향을 간접적으로 확인하였다.

*Gata3*와 *Ifng*, *Tbx21*, *Il4* mRNA 수준에는 비타민 D 보충과 고지방식이 섭취 여부에 따른 유의적인 차이가 없었다 (Figure 7). *Vdr* mRNA 수준은 비타민 D를 보충했을 때 유의하게 높았으나 ($P < 0.05$), 식이 중 지방량에 의한 차이는 없었다. HFD-DS군의 *Vdr* 수준이 HFD-DC군의 수준보다 유의적으로 높았으나 CD-DS군과 CD-DC군 간에 유의적인 차이는 없었다.



<i>P</i> -value	<i>Tbx21</i>	<i>Ifnγ</i>	<i>Gata3</i>	<i>Il4</i>	<i>Vdr</i>
Fat amount	0.747	0.446	0.275	0.630	0.352
Vitamin D supplementation	0.759	0.970	0.714	0.604	0.024
Interaction	0.094	0.445	0.301	0.894	0.382

Figure 7. Bone marrow cell mRNA levels involved in CD4 T cell cytokine and transcription factor and vitamin D receptor

Values are represented as means \pm SEM, n = 8 to 11 per group. Means with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test.

CD-DC, 10% kcal fat +1,000 IU/kg of diet; CD-DS, 10% kcal fat +10,000 IU/kg of diet; HFD-DC, 45% kcal fat +1,000 IU/kg of diet; HFD-DS, 45% kcal fat +10,000 IU/kg of diet.

V. 고 찰

본 연구에서는 식이 중 비타민 D 보충이 골수 면역세포 구성에 미치는 영향은 비만 여부에 따라 다르다는 것을 확인하였다. 식이를 통해 비타민 D를 보충한 경우 1,25-(OH)₂D 농도와 *Vdr* 수준이 높아졌으나, 비만 여부에 따라 정도의 차이가 있었다. 대조마우스와 비만마우스 모두에서 비타민 D 경구 보충에 의해 골수 내의 면역세포의 비율에 변화가 있었으나, 골수의 대식세포와 NK 세포, iNK 세포에서는 비만 여부에 따라 비타민 D 보충 효과가 각각 다르게 나타났다.

본 연구결과에 따르면 혈청 25-(OH)D 농도는 비타민 D 보충에 의해서만 유의적으로 높았고, 혈청 1,25-(OH)₂D 농도는 비타민 D를 보충하거나 고지방식을 제공한 경우 높은 경향성을 보였다. 1,25-(OH)₂D는 VDR과 결합하여 비타민 D를 활성화시키는 효소인 1-hydroxylase를 억제하고 비타민 D를 불활성화시키는 효소인 24-hydroxylase를 촉진시키기 때문에 1,25-(OH)₂D 수준은 일정하게 조절된다 (Chow *et al.* 2013, Wang *et al.* 2015) 이로 인해 본 연구 결과에서도 비타민 D를 보충함에 따라 혈청 25-(OH)D 농도는 유의적으로 높아졌으나, 혈청 1,25-(OH)₂D 농도는 항상성 조절 기전으로 인해 유의한 차이가 발생하지 않은 것으로 사료된다. 또한 비만한 경우 1,25-(OH)₂D 농도는 신장 내의 1,25-(OH)₂D 생성을 촉진시키는 호르몬인 PTH분비가 증가됨에 따라

1,25-(OH)₂D 농도가 높다고 보고된 바 있으며 (Bell *et al.* 1985), 본 연구에서도 비만에 의해 1,25-(OH)₂D 농도가 높아지는 것을 확인하였다. 한편 비만마우스의 1,25-(OH)₂D 농도는 비타민 D 보충에 의해 차이 나지 않았다. 이는 비만과 비타민 D 보충은 각각은 혈중 비타민 D 수준을 향상시키지만 비만에 의한 혈중 1,25-(OH)₂D 농도 상승 효과가 크기 때문에 두 요인이 함께 존재하더라도 그 이상의 유의적인 효과가 나타나지 않았기 때문으로 사료된다.

본 연구에서 대조마우스의 대식세포 비율은 비타민 D 보충군에서 높았으나 비만마우스에서는 이러한 비타민 D의 보충 효과가 관찰되지 않았다. 1,25(OH)₂D는 대식세포의 화학 주성 (chemotactic response)과 식균작용을 향상시키고 cathelicidin과 같은 항균성 단백질 생산을 증가시켜 대식세포의 살균 능력을 촉진한다고 보고되었다 (Mora *et al.* 2008, Baeke *et al.* 2010). 본 연구에서도 대조마우스에서는 식이 비타민 D 보충에 의해 대식세포 비율이 높아졌는데, 이러한 변화는 대식세포의 살균 능력을 향상시키는 결과로 이어질 가능성을 보여준다. 비만은 면역 시스템에 영향을 주는 주요한 인자로, 비만한 경우 염증성 유리지방산이 방출되고 혈액의 단핵구가 지방조직으로 이동하여 고도의 염증성 대식세포로의 전환이 촉진된다고 보고된 바 있다 (Ray *et al.* 2016). 본 연구에서는 염증성 대식세포와 항염증성 대식세포를 구분하여 측정하지 않았고 지방조직의 대식세포 분포를 분석하지 않았기 때문에 이에 관한 후속연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서 혈청 1,25(OH)₂D

농도에 대한 식이 비타민 D 보충의 효과가 대조마우스에 비해 비만마우스에서 미미하였기 때문에 비만마우스에서 대식세포 비율에 대한 비타민 D 보충 효과가 유의적으로 나타나지 않은 것으로 사료된다.

고지방식이로 비만을 유도한 마우스에서, 골수의 B 세포 비율과 B 세포 분화와 관련된 유전자의 mRNA 발현이 감소하였다는 연구가 있으나 (Adler *et al.* 2014), 비만마우스에서 내장지방조직에 B 세포 축적으로 염증반응이 촉진되었다는 상반된 연구도 존재한다 (Shaikh *et al.* 2015, Ray *et al.* 2016). 본 연구에서 고지방식이를 섭취한 경우 골수의 B 세포 비율이 높아지는 경향성을 나타냈고, 이는 비만에 의해 유도된 높은 B 세포 비율이 비만에서 나타나는 만성적인 염증 반응에 기여할 가능성이 있음을 시사한다. 또한 본 연구의 결과에 따르면 비타민 D 보충에 의해 골수 내 B 세포 비율이 전체적으로 억제되었다. 면역 반응을 조절할 수 있고, 자가항체생산에도 영향을 줄 수 있다고 알려진 1,25-(OH)₂D는 사람의 B 세포 증식을 억제하고 아포토시스 (apoptosis, 세포자살)를 유도한다고 알려져 있다 (Chen *et al.* 2007). 한편 다발성 경화증, 제 1 형 당뇨병 및 전신성 홍반성 루푸스와 같은 B 세포 매개 자가면역질환 환자에서 비타민 D 부족/결핍 증상이 높게 나타났다 (Yang *et al.* 2013). 따라서 B 세포 비율 증가에 따른 비만마우스의 만성적인 염증이 비타민 D 보충에 의한 B 세포 비율 조절 효과로 인해 개선될 가능성이 있으며, B 세포 매개 자가면역질환에서 비타민 D 보충의 긍정적인 영향을 고려해 볼 수 있다. 기존의 선행 연구들은

비만마우스에 비타민 D 를 *in vitro*로 처리한 연구가 대부분이고 비만마우스에서 식이 비타민 D 보충이 B 세포가 생성되고 성숙하는 골수에 미치는 영향에 대한 연구는 부족한 상황이다. 본 연구에서는 식이를 통해 비타민 D를 보충하였고 대조마우스와 동일하게 비만마우스에서도 비타민 D에 의해 골수의 B 세포 비율이 억제된다는 것을 확인하였다. 이는 골수에서 비만에 의해 높아진 B 세포 비율이 식이 비타민 D 보충을 통해 대조마우스의 수준과 비슷하게 회복될 가능성이 있음을 시사한다.

본 연구에서 $CD4^+$ T 세포 비율은 비타민 D 보충에 의해 전반적으로 낮았고 $CD8^+$ T 세포와 Treg 세포, NKT 세포 비율은 비타민 D 보충과 고지방식이 섭취에 유의적인 영향을 받지 않았다. 그러나 골수에서 $CD4^+$ T 세포와 $CD8^+$ T 세포, Treg 세포, NKT 세포의 비율이 5% 미만이기 때문에 비타민 D와 고지방식이에 의한 영향을 발견하지 못하였을 가능성이 있다. 따라서 후속연구에서는 $CD4^+$ T 세포와 $CD8^+$ T 세포, Treg 세포를 FACS로 sorting하여 분석한다면 각각 면역세포 특이적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 NK세포 비율은 대조마우스보다 비만마우스에서 더 낮았고, 식이 비타민 D 보충에 의해서도 낮아졌다. Laue *et al.* (2015)의 연구에서 비만한 사람의 경우 그렇지 않은 사람에 비해 NK 세포 수가 더 낮게 존재한다고 보고되었다. 또한 비만한 사람에서 NK 세포와 세포

독성 T 세포 비율이 더 낮았으며, NK 세포 능력 저해되었다는 연구 결과가 있다 (Lynch *et al.* 2009). 즉, 비만한 경우 NK 세포 기능에 이상이 있다는 결과를 본 연구를 통해 마우스 모델에서 확인하였다. 한편 본 연구 결과에서는 비타민 D를 보충한 경우에도 NK 세포의 비율이 낮아졌기 때문에 비만한 경우에 비타민 D 보충에 의하여 NK 세포 기능에 부정적인 영향이 발생할 가능성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 선행연구에 따르면 *in vitro* 상의 1,25-(OH)₂D는 NK 세포 기능 (세포 독성 및 사이토카인 생성)을 저해하였다(Weeres *et al.* 2014). 본 연구에서는 이러한 비타민 D에 의한 NK 세포 비율 억제 효과가 *in vivo* 상의 비타민 D 보충에 의해서도 발생하며 비만 여부와 관계없이 나타남을 확인하였다.

결론적으로, 본 연구에서는 고지방식으로 비만을 유도한 마우스에서 골수 면역세포 구성에 미치는 식이 비타민 D 보충 효과를 살펴보았다. 식이를 통해 비타민 D를 보충한 경우 비만 여부에 상관없이 골수의 B 세포 비율은 높았고 NK 세포의 비율은 낮았으나 대식세포 비율은 비타민 D를 보충한 경우 대조마우스에서만 높았다. 이는 골수 면역세포 구성에 미치는 비타민 D의 효과가 비만에 의해서 영향을 받았음을 시사하였다.

VI. 요약

본 연구에서는 고지방식으로 비만을 유도한 마우스에서 비타민 D 보충이 골수의 면역세포 구성에 미치는 영향을 탐구하였다. 이를 위해 5주령의 C57BL/6N 수컷 마우스를 CD-DC군과 CD-DS군, HFD-DC군, HFD-DS군으로 나누어 12주 동안 실험식이를 공급하였다. 방사면역측정법으로 혈청의 25-(OH)D와 1,25-(OH)₂D의 농도를 측정하였고 유세포분석을 이용하여 골수에서 B 세포 (CD3⁺CD19⁺)와 CD4⁺ T 세포 (CD3⁺CD4⁺), CD8⁺ T 세포 (CD3⁺CD8⁺), Treg 세포 (CD4⁺Foxp3⁺), NKT (CD3⁺NK1.1⁺), 대식세포 (CD11b⁺F4/80⁺), iNK세포 (CD11b⁺NK1.1⁺), mNK세포 (CD11b⁺NK1.1⁺)의 비율을 비교하였다. CD4⁺ T 세포의 전사인자와 사이토카인 유전자 (*Tbx21*, *Ifng*, *Gata3*, *Il4*)와 *Vdr* mRNA 수준을 quantitative real-time PCR 방법으로 측정하였다.

- 1) 혈중 비타민 D 농도 중, 25-(OH)D 농도는 비타민 D 보충에 의해 유의적으로 높았으나, 식이 중 지방 함량에 의해서는 유의적인 차이가 없었고 혈청 1,25-(OH)₂D 농도는 비타민 D를 보충하거나 고지방식이를 제공한 경우 높은 경향성을 나타냈다

- 2) 내재면역세포 중 대식세포 비율은 대조마우스에서만 비타민 D를 보충하였을 때 유의적으로 높았으나 비만마우스에서는 비타민 D 보충에 의한 차이가 없었다.
- 3) 내재면역세포 중 NK 세포 비율과 iNK 세포 비율 모두 비타민 D를 보충하거나 고지방식을 섭취한 경우 유의적으로 낮은 비율 나타냈다. mNK 세포 비율은 고지방식이 섭취한 경우 유의적으로 낮은 비율 나타냈다.
- 4) 적응면역세포 중 B 세포 비율은 비타민 D 보충에 의해 유의적으로 낮았고, 고지방식을 섭취한 경우 높은 경향성을 나타냈다.
- 5) 적응면역세포 중 $CD4^+$ T 세포는 비타민 D 보충에 의해 낮은 경향성을 보였다.
- 6) *Vdr*의 mRNA 수준은 비타민 D를 보충한 경우 유의적으로 높았으나 식이 중 지방 함량에 의한 영향은 받지 않았다.

위 결과를 통해 혈중 비타민 D 농도 및 골수 면역세포의 *Vdr* 발현, 골수 면역세포 구성에 대한 비타민 D의 보충 효과는 비만 여부에 따라 정도의 차이가 있음을 확인하였다.

참 고 문 헌

- Adler BJ, Green DE, Pagnotti GM, Chan ME and Rubin CT. High fat diet rapidly suppresses B lymphopoiesis by disrupting the supportive capacity of the bone marrow niche. PLoS One 9(3): e90639. 2014.
- Adler BJ, Kaushansky K and Rubin CT. Obesity-driven disruption of haematopoiesis and the bone marrow niche. Nat Rev Endocrinol 10(12): 737-748. 2014.
- Al-Jaderi Z and Maghazachi AA. Effects of vitamin D3, calcipotriol and FTY720 on the expression of surface molecules and cytolytic activities of human natural killer cells and dendritic cells. Toxins (Basel) 5(11): 1932-1947. 2013.
- Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C and Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. Curr Opin Pharmacol 10(4): 482-496. 2010.
- Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ and Shaw S. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects. J Clin Invest 76(1): 370-373. 1985.
- Bhalla AK, Amento EP and Krane SM. Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human lymphocytes and monocyte/macrophages: inhibition of interleukin-2 and augmentation of interleukin-1 production. Cell Immunol 98(2): 311-322. 1986.
- Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. J Clin Endocrinol Metab 94(1): 26-34. 2009.
- Bremer AA and Jialal I. Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome. J Obes 2013: 393192. 2013.

- Campfield LA and Smith FJ. Overview: neurobiology of OB protein (leptin). *Proc Nutr Soc* 57(3): 429-440. 1998.
- Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S and Lipsky PE. Modulatory Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on Human B Cell Differentiation. *J Immunol* 179(3): 1634-1647. 2007.
- Chow EC, Quach HP, Vieth R and Pang KS. Temporal changes in tissue 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, vitamin D receptor target genes, and calcium and PTH levels after 1,25(OH)₂D₃ treatment in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304(9): E977-989. 2013.
- Flier JS. Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab* 83(5): 1407-1413. 1998.
- Grethen E, McClintock R, Gupta CE, Jones R, Cacucci BM, Diaz D, Fulford AD, Perkins SM, Considine RV and Peacock M. Vitamin D and hyperparathyroidism in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 96(5): 1320-1326. 2011.
- Jones G, Strugnell SA and DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78(4): 1193-1231. 1998.
- Karkeni E, Marcotorchino J, Tourniaire F, Astier J, Peiretti F, Darmon P and Landrier JF. Vitamin D limits chemokine expression in adipocytes and macrophage migration in vitro and in male mice. *Endocrinology* 156(5): 1782-1793. 2015.
- Laharrague P, Oppert JM, Brousset P, Charlet JP, Campfield A, Fontanilles AM, Guy-Grand B, Corberand JX, Penicaud L and Casteilla L. High concentration of leptin stimulates myeloid differentiation from human bone marrow CD34+

- progenitors: potential involvement in leukocytosis of obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24(9): 1212-1216. 2000.
- Laue T, Wrann CD, Hoffmann-Castendiek B, Pietsch D, Hubner L and Kielstein H. Altered NK cell function in obese healthy humans. *BMC Obes* 2: 1. 2015.
- Lemire JM, Adams JS, Sakai R and Jordan SC. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 74(2): 657-661. 1984.
- Lynch LA, O'Connell JM, Kwasnik AK, Cawood TJ, O'Farrelly C and O'Shea DB. Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patient? *Obesity (Silver Spring)* 17(3): 601-605. 2009.
- Mora JR, Iwata M and von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol* 8(9): 685-698. 2008.
- Morgan ME. *Basic Immunology*. Retrieved 12.14, 2017. 2013).
- Murphy KM, Travers P and Walport M (2007). *Janeway's immunobiology*. New York, Garland Science.
- Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, Freedman RJ, Semega-Janneh M, Reynolds J and Yanovski JA. The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* 89(3): 1196-1199. 2004.
- Parker VJ, Solano ME, Arck PC and Douglas AJ. Diet-induced obesity may affect the uterine immune environment in early-mid pregnancy, reducing NK-cell activity and potentially compromising uterine vascularization. *Int J Obes (Lond)* 38(6): 766-774. 2014.

- Pereira-Santos M, Costa PR, Assis AM, Santos CA and Santos DB. Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 16(4): 341-349. 2015.
- Ray I, Mahata SK and De RK. Obesity: An Immunometabolic Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7: 157. 2016.
- Rigby WF, Stacy T and Fanger MW. Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *J Clin Invest* 74(4): 1451-1455. 1984.
- Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, Gallagher JC, Gallo RL, Jones G, Kovacs CS, Mayne ST, Rosen CJ and Shapses SA. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 96(1): 53-58. 2011.
- Shaikh SR, Haas KM, Beck MA and Teague H. The effects of diet-induced obesity on B cell function. *Clin Exp Immunol* 179(1): 90-99. 2015.
- Shi H, Dirienzo D and Zemel MB. Effects of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted aP2-agouti transgenic mice. *Faseb j* 15(2): 291-293. 2001.
- Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S and Yamashita T. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 19(3): 429-435. 2004.
- Singer K, DelProposto J, Morris DL, Zamarron B, Mergian T, Maley N, Cho KW, Geletka L, Subbaiah P, Muir L, Martinez-Santibanez G and Lumeng CN. Diet-

- induced obesity promotes myelopoiesis in hematopoietic stem cells. *Mol Metab* 3(6): 664-675. 2014.
- Tritos NA and Mantzoros CS. Leptin: its role in obesity and beyond. *Diabetologia* 40(12): 1371-1379. 1997.
- Trottier MD, Naaz A, Li Y and Fraker PJ. Enhancement of hematopoiesis and lymphopoiesis in diet-induced obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(20): 7622-7629. 2012.
- van den Berg SM, Seijkens TT, Kusters PJ, Beckers L, den Toom M, Smeets E, Levels J, de Winther MP and Lutgens E. Diet-induced obesity in mice diminishes hematopoietic stem and progenitor cells in the bone marrow. *FASEB J* 30(5): 1779-1788. 2016.
- Veldman CM, Cantorna MT and DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 374(2): 334-338. 2000.
- Wang Y, Zhu J and DeLuca HF. The vitamin D receptor in the proximal renal tubule is a key regulator of serum 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308(3): E201-205. 2015.
- Weeres MA, Robien K, Ahn YO, Neulen ML, Bergerson R, Miller JS and Verneris MR. The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on in vitro human NK cell development from hematopoietic stem cells. *J Immunol* 193(7): 3456-3462. 2014.
- Yang CY, Leung PS, Adamopoulos IE and Gershwin ME. The implication of vitamin D and autoimmunity: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 45(2): 217-226. 2013.

- Yao Y, Zhu L, He L, Duan Y, Liang W, Nie Z, Jin Y, Wu X and Fang Y. A meta-analysis of the relationship between vitamin D deficiency and obesity. *Int J Clin Exp Med* 8(9): 14977-14984. 2015.
- Zemel MB, Shi H, Greer B, Dirienzo D and Zemel PC. Regulation of adiposity by dietary calcium. *Faseb j* 14(9): 1132-1138. 2000.
- Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, Wang G and Zou W. Bone marrow and the control of immunity. *Cell Mol Immunol* 9(1): 11-19. 2012.

Abstract

The effect of dietary vitamin D supplementation on subpopulation of bone marrow cells from diet-induced obese

SeungEun Lee

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Bone marrow (BM) is important for production and maturation of immune cells. Vitamin D and obesity have been shown to affect innate and adaptive immunity. Contradictory results regarding vitamin D and subpopulation of BM have been reported with *in vitro* studies, but little is known about this *in vivo*. We examined the effects of dietary vitamin D supplementation on the subpopulation of BM in normal and obese mice. C57BL/6N male mice were fed control or high fat diets (10% or 45% kcal fat: CD or HFD) containing vitamin D (1,000 or 10,000 IU/kg of diet: DC or DS) for 12 wk. Serum 25-(OH)D and 1,25-(OH)₂D level were evaluated through radioimmunoassay. BM was isolated from femurs and tibiae. The population of immune cells was analyzed by Fluorescence-activated cell sorting (B cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, regulatory T cells, NKT cells, Macrophage, immature NK cells (iNK), mature NK cells (mNK)). mRNA expression of *Tbx21*, *Ifng*, *Gata3*, *Il4*, and *Vdr* was determined by real-time PCR. Concentration of serum 1,25-(OH)₂D tended to be higher in DS groups and higher in HFD groups. The percentage of macrophage

was higher in CD-DS group than CD-DC group, but not in HFD groups. The percentage of NK and iNK was lower in HFD groups than CD groups. Dietary vitamin D supplementation resulted in lower percentage of NK, iNK, and B cells. The HFD groups tended to have higher percentage of B cells compared with CD groups. The percentage of CD4⁺ T cells tended to be lower by vitamin D supplementation, but there was no significant effect of dietary fat amount. The expression of *Vdr* was significantly higher in DS groups than DC groups, whereas there was no significant difference regarding fat amount. In conclusions, dietary vitamin D supplementation affected serum vitamin D concentration, *Vdr* expression in BM, and subpopulation of BM depending on the adiposity. These results suggest that the effect of dietary vitamin D supplementation on murine BM composition might be influenced by obesity.

Keywords: dietary vitamin D supplementation; obesity, high fat diet; bone marrow; macrophage, natural killer cell

Student Number: 2014-22891