

碩士學位論文

原乳 및 乳腺組織내 osteopontin의
同定



姜在允

2005年 12月

原乳 및 乳腺組織내 osteopontin의 同定

指導教授 申 台 均

姜 在 允

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2005 年 10 月

姜在允의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長_____

委 員_____

委 員_____

濟州大學校 大學院

2005年 12月

Abstract

**Identification of osteopontin in milk and in
mammary gland of cow**

Advised by Professor Taekyun Shin

Jaeyoun Kang

 제주대학교 중앙도서관
Department of Veterinary Medicine

Graduate School, Cheju National University, Jeju

690-756, Korea

Abstract :

The importance of milk for the growth and health of newborn offspring is well known. The milk contains immunoglobulin G (Ig G), Ig A, lactoperoxidase, lactoferin, cytokines, and growth factors. Osteopontin (OPN), one of the multifunctional proteins, is secreted by macrophages, T cell, and epithelial cells. Although OPN production in bovine milk was reported, the precise

expression levels in bovine milk have not clarified. The aim of this study was to observe the expression of OPN, in bovine milk during lactation period or bovine mammary glands.

Western blot analysis detected that OPN was expressed in bovine milk whey and mammary glands. The expression level of OPN in colostrum whey was higher than those in early milk and mature milk whey. Immunohistochemistry showed that OPN was detected in the glandular epithelium and epithelial cells of intralobular duct of mammary glands.

These findings suggest that OPN transiently high expressed in colostrum plays a potential role in the immunological development of breast-fed calves.



KEY WORDS : osteopontin, colostrum, mammary glands, milk

목 차

I. 서	론	1
II. 재료 및 방법	3	
III. 결	과	7
IV. 고	찰	15
V. 결	론	18
VI. 참 고 문 헌	19	



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

I. 서 론

우유는 균형된 영양소를 공급하는 완전식품으로 알려져 있을 뿐 아니라, 다양한 면역활성 물질도 포함하고 있다 (Playford 등, 2000). 주요한 우유 단백질 중에는 immunoglobulin G (IgG), IgA, lactoperoxidase, lactoferin 등이 알려져 있다 (Goldman와 Smith 1973; Nam 등, 1997). 또한 우유와 초유에는 interleukin (IL) 1 β , IL-6, IL-10, tumor necrosis factor α , granulocyte-macrophage colony-stimulating factors, epidermal growth factor, transforming growth factor α , vascular endothelial growth factor 등 다양한 cytokines과 growth factor가 함유되어 있다 (Playford 등, 2000). 이와 같은 물질들은 세포의 활성화에 관여할 뿐만 아니라 생체를 보호하는 면역방어 역할을 하는 중요한 인자들이며 우유가 갖는 고영양성의 이유이기도 하다 (Korhonen 등, 2000).

우유 내에는 이상에서 설명한 유효한 성분 외에도 cDNA microarray 등과 같은 첨단기술에 의거하여 새로운 물질이 꾸준히 확인되고 있다. 즉, 사람 모유에서 cytokine과 growth factor 유전자를 cDNA microarray로 분석한 결과 240여개의 유전자가 확인되었는데 그 중에는 이전에 주목받지 못하던 osteopontin (OPN)이 확인되기도 하였다 (Nagatomo 등, 2004).

OPN은 무기물화된 소의 뼈에서 처음으로 발견되었고 Franzen과 Heinegard (1985), 그 후 rat Oidberg 등(1986), human Fisher 등 (1987), mouse, pig, chicken 등에서 분리되었으며 우유에서도

확인된 바 있다 (Sorensen과 Petersen, 1993). 그러나 OPN을 많이 함유하고 있는 소의 원유 및 유선조직 내에서 OPN의 분포와 변화에 관한 연구는 많지 않다.

이 연구에서는 우유 내 유용물질의 확인 차원에서 비유시기별로 원유 내 OPN의 발현을 조사하고 아울러 유선조직 내 OPN의 출현 여부를 다양한 방법으로 확인하고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험재료

원유 내 osteopontin의 양적 분석을 위해 인근 목장에서 3-5년생 홀스타인젓소 15마리에서 원유를 무균 처리된 병에 채취하였다. 젓소의 비유 시기는 출산 후 1일, 15일에서 20일 사이, 1개월에서 2개월 사이, 3개월에서 5개월 사이, 6개월에서 8개월 사이이며, 각 시기 당 3마리의 젓소에서 원유를 채취하였다. 채취한 원유는 Western blot 분석을 위해 -70°C 냉동고에 보관하였다.

유선조직은 인근 도축장에서 도축된 5년생 홀스타인젓소의 유선조직을 채취하여, 분리된 일부 조직은 통상적인 방법에 따라 포르말린에 고정하였고, 일부 조직은 Western blot 분석을 위해 -70°C 냉동고에 보관하였다.

2. Western blot 분석

원유 내 단백질 분석을 위해, 원유를 12,000rpm으로 20분간 원심분리 후 지방층을 제거하여 탈지유를 분리하였다. 분리된 탈지유

를 Protein assay (Bio-rad, USA)를 이용하여 단백질정량을 하였다.

또한, 분리된 유선조직은 leupeptin(0.5 ug/ml), PMSF(1 mM), aprotinin(5 ug/ml)등의 protein inhibitor가 포함된 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 120 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40(polyoxyethylene [9] p-t-octyl phenol)의 buffer에서 완전히 균질화 하였다. 균질화 된 조직을 14,000rpm으로 20분간 원심 분리 하여 상층액을 회수 후 단백질을 정량하였다.

정량된 원유와 유선조직을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동하고, gel 상의 단백질밴드를 다시 nitrocellulose transfer membranes (Schleicher and Schuell, Keene, NH)로 100V에서 2시간 동안 전사시켰다. 단백질이 흡착된 membrane은 Ponceau solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)으로 염색한 후 단백질의 분리양상을 확인 후 immunoblot을 실시하였다.

Osteopontin을 확인하기 위해 monoclonal mouse anti-osteopontin IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) (1:1000 희석)을 1차 항체로 이용하였다. 2차 항체로는 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (1:2000 희석) 로 실온에서 60분간 반응시켰다. 또한 Osteopontin면역반응을 확인한 membrane을 mouse anti-beta-actin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)으로 재면역반응 시켜 원유샘플에서 세포성분의 유무를 확인하였다. 면역반응이

끝난 membrane은 WEST-one Detection solution (iNtRON Biotechnology, Inc., Kyungki-do, Korea)로 1분간 반응시켜, X-ray 필름에 노출시키고, 그 결과를 densitometer(M GS-700 Imaging Densitometer, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA)로 측정하였다. 그리고 Western blot의 결과는 post-hoc Student-Newman-Keuls' procedure for multiple comparisons를 이용하여 유의성을 검정하였다.

3. 조직표본 준비와 조직 검사

포르말린에 고정된 유선조직은 10% 중성 Formalin으로 고정하고 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀에 포맷한 후 5 μ m의 두께로 조직절편을 만들어 H-E염색을 실시하였다.

4. 면역조직화학 염색

유선조직에서 OPN의 분포 및 발현양상을 관찰하기 위해 면역조직화학염색을 실시하였다. 면역조직화학 염색은 파라핀 포매조직을 이용하여 통상적인 avidin-biotin peroxidase 방법을 이용하였다. 먼저 유선 조직에서 파라핀을 제거하고, 내재성 peroxidase를 제거하기 위해 0.3% H₂O₂가 포함된 메탄올에 20분간 반응시켰으며, 각 조직을 비특이적 반응을 방지하기 위해 10% normal horse serum으로 1시간 반응시켰다. 1차 항체로 monoclonal mouse anti-osteopontin IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) (1:400 희석)를 실온에서 1시간 이상 반응시킨 후 biotinylated anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 45분간 반응시켰다. 이어서 avidin-biotin peroxidase complex Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 실온에서 45분간 반응시켰다. 각 단계가 끝나고 PBS(pH 7.4)로 5분간 3회 충분히 세척했으며, 면역반응이 끝난 조직절편은 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB) substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 활용하여 발색시켰다. 그리고 hematoxylin 용액으로 대조염색을 한 후, 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입하여 광학현미경으로 관찰했다.

Ⅲ. 결 과

1. 유선의 조직학적 구조

홀스타인 젖소의 유선을 조직학적으로 관찰한 결과 많은 수의 샘소엽이 결합조직사이에 관찰되었다 (Fig. 1A). 샘소엽 부위를 고배율로 관찰한 결과 샘포들이 관찰되었으며 일부 샘포 내에는 분비물이 관찰되었다 (Fig. 2B). 샘포사이에는 분비도관들도 관찰되었다. 실험에 이용한 유선 조직은 조직학적 소견상 병변이 없는 것을 이용하였다.



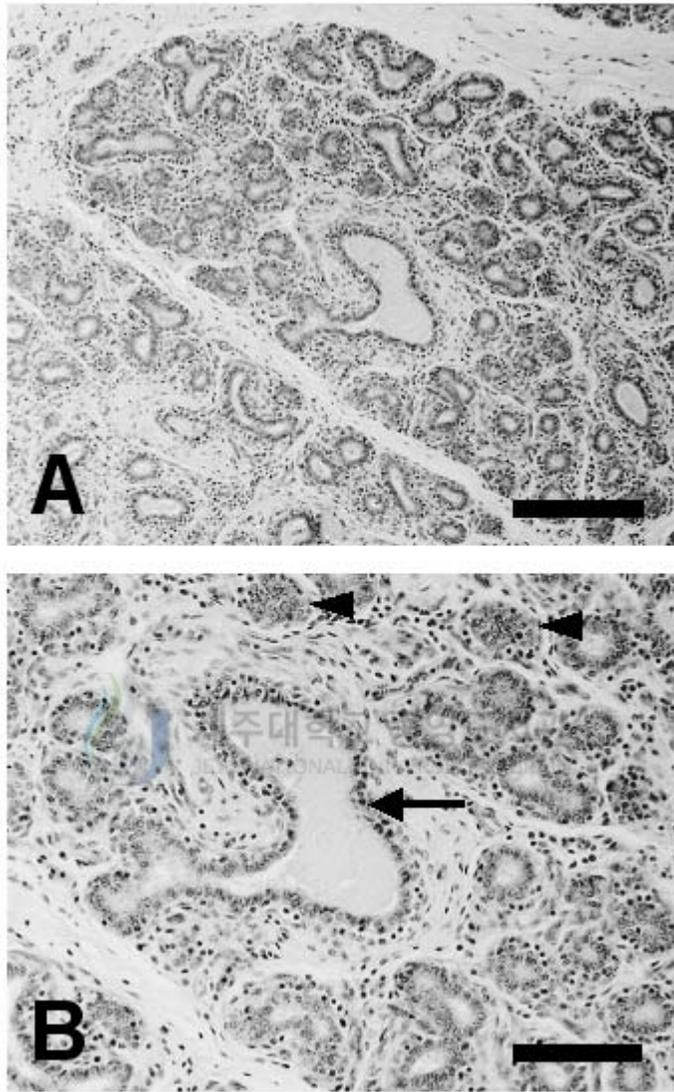


Figure 1. Histological findings of a cow mammary glands (A and B). There are gland lobules with alveoli (B, arrowheads) and large irregular intralobular duct (B, arrow). Hematoxylin and eosin staining. Scale bars: in A, 200 μm ; in B, 100 μm .

2. 원유 및 유선조직내 osteopontin의 검출

홀스타인 젖소의 원유 및 건유기의 유선조직에서 osteopontin을 확인하기 위하여 Western blotting을 실시하였다. osteopontin은 원유와 유선조직에서 면역반응을 보였으며, 분자량은 약 60kDa (50kDa와 93kDa 사이) 정도로 나타났다(Fig. 2B). 아울러 유선조직에서도 osteopontin이 관찰되었다 (Fig. 2B, mammary gland). 원유 내 세포성분의 유무 및 로딩한 량의 차이를 확인하기 위하여 osteopontin항체를 반응시킨 membrane을 β -actin 항체로 반응시킨 결과 원유 내에서는 β -actin의 면역반응이 관찰되지 않았으며 유선조직에서만 나타났다 (Fig. 2B).



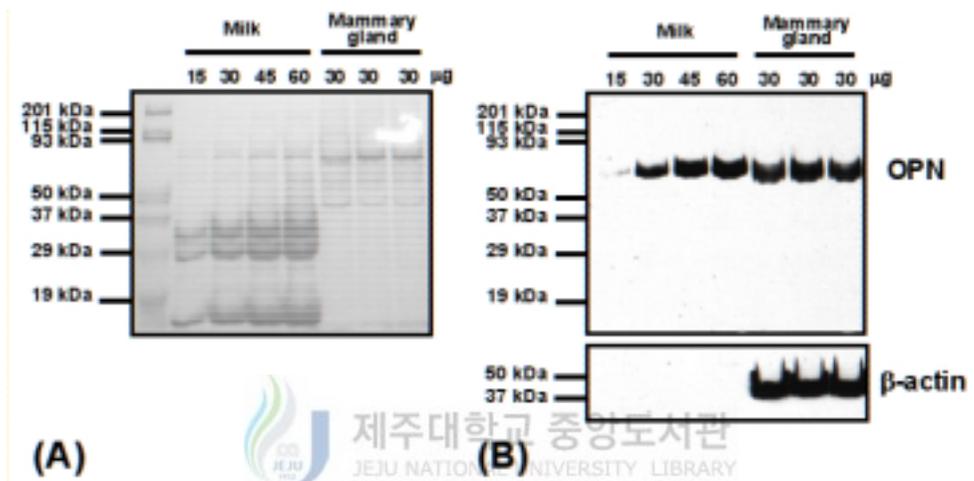


Figure 2. Western blot analysis for osteopontin (OPN) in the bovine milk and mammary glands. (A) Protein component of milk and mammary glands in 10 % SDS-PAGE. Ponceau solution staining. Left lane indicates molecular weight standard. (B) A representative photograph of Western blot analysis of OPN and β -actin.

3. 원유의 비유시기별 osteopontin의 양적 비교

우선 membrane을 Ponceau 염색하여 모든 비유기 원유의 단백질이 동량인 것을 확인하였다 (Fig. 3A). osteopontin은 모든 비유기의 원유에서 관찰되었으며 그 분자량은 약 60 kDa(50kDa와 93kDa 사이에서 관찰) 이었다 (Fig. 3B). osteopontin의 면역반응을 densitometer로 측정한 결과 출산 후 1일의 원유 (초유) (Fig. 3B, colostrum) (Density osteopontin ratio/mm² value [mean±SE], 43.830 ± 4.605)에서 아주 강한 반응을 나타내었으며, 출산 후 15일에서 20일사이의 원유 (Fig. 3B, Early milk) (5.020 ± 1.881)에서 OPN은 초유보다 의미있는 감소를 보였다 (*, p<0.0001). 그 후 다른 시기의 원유, 즉 출산 후 1개월에서 2개월 사이의 원유 (Fig. 3C, Mature milk (a)) (3.637 ± 2.137), 출산 후 3개월에서 5개월 사이의 원유 (Fig. 3C, Mature milk (b)) (3.337 ± 0.995), 그리고 출산 후 6개월에서 8개월 사이의 원유 (Fig. 3C, Mature milk (c)) (1.880 ± 0.8056)에서 OPN은 초유보다 유의성있게 감소된 것으로 나타났다 (*, p<0.0001).

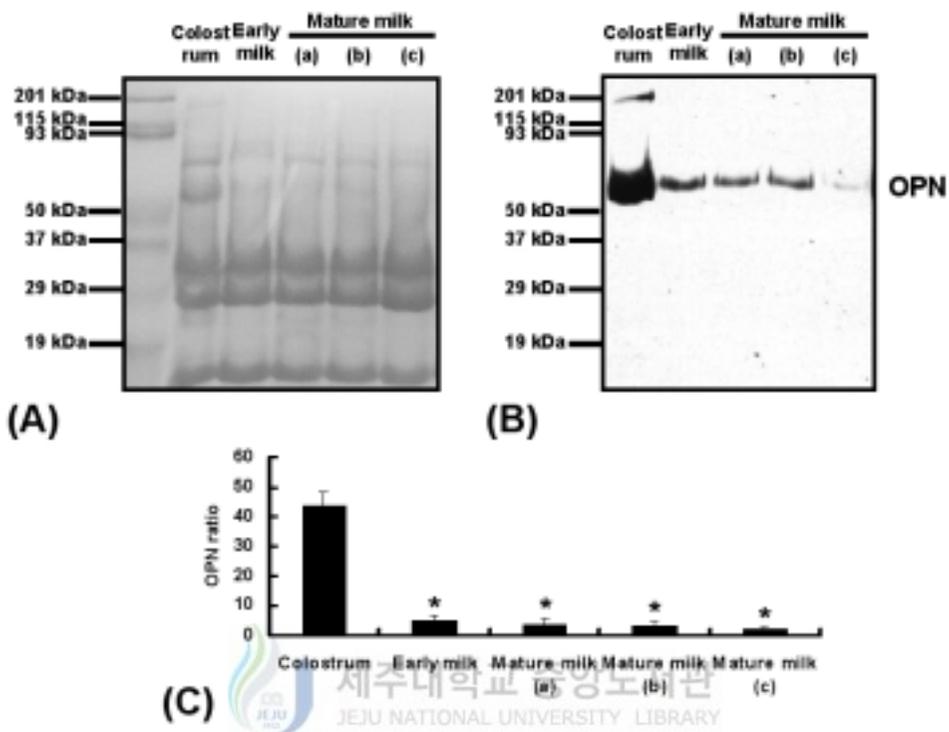


Figure 3. Western blot analysis for osteopontin (OPN) in the bovine milk during the lactation period. (A) Ponceau staining shows that loading protein is similar in all lanes in 10 % SDS-PAGE. Left lane indicates molecular weight standard. (B) A representative photograph of Western blot analysis of OPN. (C) A semiquantitative analysis of OPN in the milk during the lactation period. Data were obtained from three different experiments and are shown as mean \pm S.E.

4. 유선조직에서 osteopontin의 면역조직화학적 염색

유선조직에서 osteopontin의 면역조직화학 염색 반응은 주로 샘포내 상피세포에서 관찰되었으며 일부 샘포 내 분비물에서도 양성 반응을 보였다 (Fig. 4A). 그리고 소엽 내 도관 상피세포 및 함유물에서 osteopontin의 면역반응을 관찰할 수 있었으나 소엽속결합조직 내에서의 osteopontin의 염색 반응은 거의 관찰 되지 않았다 (Fig. 4B).



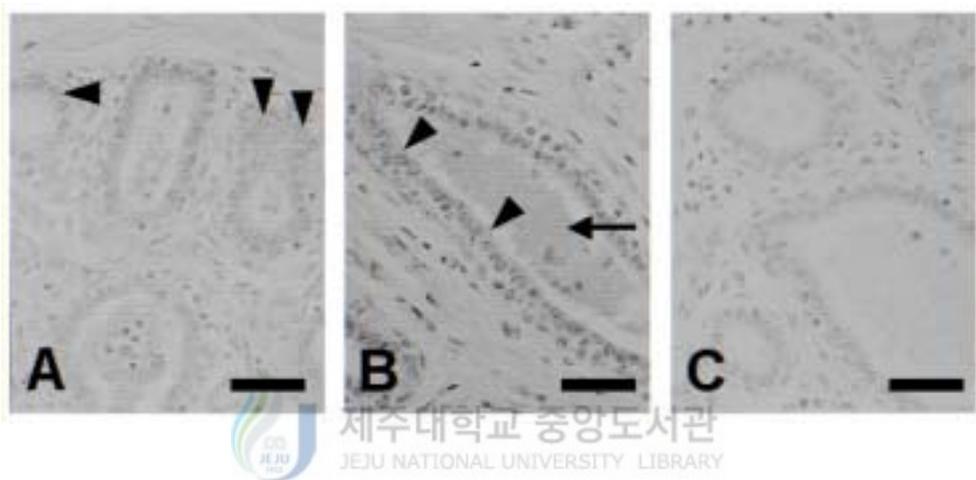


Figure 4. Immunohistochemical localization of osteopontin (OPN) in the bovine mammary glands. OPN was detected in the glandular epithelium (A, arrowheads) and in epithelial cells of intralobular duct (B, arrowheads). OPN was immunostained in the milk (B, arrow). No specific reaction product is seen in sections incubated with non-immune sera (C). A-C: Counterstained with hematoxylin. Scale bars = 40 μ m.

IV. 고 찰

OPN은 처음 뼈에서 발견된 이래 여러 조직, 특히 여러 부위의 상피세포에서 발견되고 있다. 이 실험에서는 원유 내에서 OPN이 있는지를 조사 하였던 바 원유에서 osteopontin이 있음을 확인하였다.

유즙 내 OPN의 확인은 소 (Sorensen과 Petersen 1993) 및 사람 (Nagatomo 등 2004)에서 알려져 왔으나, 이 논문에서는 비유 시기 별로 OPN의 차이를 처음으로 확인하였다. 즉 비유시기별로 조사한 결과 초유에서 가장 많았고 시간이 경과함에 따라 다소 감소하였으나 비유기간 중 지속적으로 OPN이 관찰되었다.

초유에서 OPN이 많은 이유는 잘 알려져 있지 않으나 osteopontin의 발현을 촉진할 수 있는 인자중 하나인 vitamin D (Xie 등 2001) 와 관련성이 있을 것으로 추정하고 있다. 초유에서 vitamin D가 mature milk 보다 더 많이 존재하는 것으로 알려져 있으며 (Kunz 등 1984) 이들 vitamin D가 유선조직 내 OPN의 생산을 촉진할 수 있을 것으로 생각된다.

OPN의 주된 관찰부위는 결합조직섬유 또는 세포내로 알려져 있다 (Xie 등 2001). OPN의 발현 세포를 조사한 결과 유선조직의 샘포 상피세포에서 관찰되었으며 아울러 원유로부터 분리된 세포를 염색한 결과 이들 세포에서도 OPN 양성세포가 확인되었다. 즉 우유 내 OPN은 상피세포에서 분비되었거나 또는 원유 내에 포함된

세포성분(macrophage 또는 상피세포)등에서 분비된 것으로 생각된다.

OPN은 다양한 기능을 가지는 단백질로 알려져 있다. 면역세포인 macrophages, T cells, epithelial cell등은 외부의 자극을 받을 경우 OPN을 생산 분비하며 세포매개성 면역반응을 유도하고, 염증세포 이동에도 관여하기도 한다 (Giachelli 등, 1998). 아울러 OPN은 세포 독성을 가지는 nitric oxide를 억제함으로써 항염증 작용에도 관여하는 것으로 알려지고 있다 (Scott 등, 1998). 이와 같은 기능을 유추하여 볼 때 우유 중 포함된 OPN은 장내에서 이와 같은 면역반응에 관여할 수 있을 것으로 판단된다.

OPN의 기능을 확인하기 위해 OPN knockout mice에 rotavirus를 감염시킨 결과 wildtype에 비해 현저히 장염이 심하였다고 한다 (Rollo 등, 2005). 즉 우유 내 OPN은 섭취 후 곧 소장 및 대장 점막과 접촉하는 것을 고려할 때 이들은 장내 병원체의 점막 접촉을 제어하는 기능을 할 수 있을 것으로 생각된다. 이 실험에서 비유시기별로 차이가 있을 뿐 만 아니라 초유에서 OPN이 많은 점은 면역기능이 불완전한 신생동물의 장기능 활성화에 도움을 줄 것으로 생각된다. 즉 우유는 다양한 영양분 이외에도 OPN과 같은 면역조절 물질이 포함되어 있는 점은 우유의 영양성을 더욱 높여주는 것으로 판단된다.

유선조직에서 OPN의 역할은 아직 명확히 규명된 바 많지 않지만 OPN knockout mice의 경우 유선발육의 장애가 있는 것으로 보아 OPN은 유선조직 분화에 필수적인 물질일 것으로 알려지고

있다 (Nemir 등, 2000). 아울러 OPN의 세포 접착기능은 유방암 조직의 전이에도 깊이 관여하는 것으로 알려지고 있다 (Standal 등, 2004). 즉 유선에서 생성된 OPN은 우유 내에 포함되어 다양한 생리활성 기능을 갖지만 조직 내에서 비정상적으로 분화된 유선세포에 작용할 경우 전이를 촉진할 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 젖소의 원유에서는 전 비유시기에 걸쳐 OPN이 포함되어 있으며, 특히 초유에 OPN이 더 많이 존재하는 점은 신생동물의 장내 면역력 획득에 OPN이 중요한 인자로 작용할 것으로 생각되었다.



V. 결 론

우유 내 다양한 생리활성을 가지는 OPN의 유무를 소의 원유와 유선조직에서 다양한 방법으로 조사하였다. 그 결과 OPN은 원유와 유선조직에서 확인되었다. 비유시기별 원유에서 OPN의 발현을 비교한 결과, 초유에서 OPN의 발현이 다른 시기의 원유보다 높게 나타났다. 면역조직화학 결과 유선조직에서 OPN은 주로 샘포세포와 도관상피세포에서 양성반응을 보였다. 또한, 원유 중 포함된 세포성분 (macrophage 또는 상피세포)에서도 OPN이 강하게 발현된 점으로 보아 이들 세포들이 OPN의 주된 분비세포로 생각되었다. 아울러 OPN의 기능을 고려할 때 원유 내에 존재하는 OPN은 장 점막 보호 및 감염체로부터 생체를 보호하는 역할을 할 것으로 생각되었다.

VI. 참고 문헌

- Fisher, L.W., Hawkins, G.R., Tuross, N. and Termine, J.D. 1987. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J. Biol. Chem.* 262, 9702-9708.
- Franzen, A. and Heinegard, D. 1985. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem. J.* 232, 715-724.
- Giachelli, C.M., Lombardi, D., Johnson, R.J., Murry, C.E. and Almeida M. 1998. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am. J. Pathol.* 152, 353-358.
- Goldman, A.S. and Smith, C.W. 1973. Host resistance factors in human milk. *J. Pediatr.* 82, 1082-1090.
- Korhonen, H., Marnila, P. and Gill, H.S. 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. *Br. J. Nutr.* 84,

Suppl 1:S75-80.

Kunz, C., Niesen, M., von Lilienfeld-Toal, H. and Burmeister, W. 1984. Vitamin D, 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D in cow's milk, infant formulas and breast milk during different stages of lactation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 54, 141-148.

Nagatomo, T., Ohga, S., Takada, H., Nomura, A., Hikino, S., Imura, M., Ohshima, K. and Hara, T. 2004. Microarray analysis of human milk cells: persistent high expression of osteopontin during the lactation period. *Clin. Exp. Immunol.* 138, 47-53.

Nemir, M., Bhattacharyya, D., Li, X., Singh, K., Mukherjee, A.B. and Mukherjee, B.B. 2000. Targeted inhibition of osteopontin expression in the mammary gland causes abnormal morphogenesis and lactation deficiency. *J. Biol. Chem.* 275, 969-976.

Oldberg, A., Franzen, A. and Heinegard, D. 1986. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U. S. A. 83, 8819-8823.

Playford, R.J., Macdonald, C.E. and Johnson, W.S. 2000. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 5-14.

Rollo, E.E., Hempson, S.J., Bansal, A., Tsao, E., Habib, I., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Mackow, E.R. and Shaw, R.D. 2005. The cytokine osteopontin modulates the severity of rotavirus diarrhea. *J. Virol.* 79, 3509-3516.

Sorensen, E.S. and Petersen, T.E. 1993. Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. *J. Dairy Res.* 60, 189-197.

Scott, J.A., Weir, M.L., Wilson, S.M., Xuan, J.W., Chambers, A.F. and McCormack, D.G. 1998. Osteopontin inhibits inducible nitric oxide synthase activity in rat vascular tissue. *Am. J. Physiol.* 275, H2258-2265.

Standal, T., Borset and M., Sundan, A. 2004. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling.

Exp. Oncol. 26, 179-184.

Xie, Y., Sakatsume, M., Nishi, S., Narita, I., Arakawa, M. and Gejyo, F. 2001. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int.* 60, 1645-1655.



감 사 의 글

막연히 시작한 실험 기간동안 원유와 유선조직에서 원하는 물질이 확인 되었을 때는 경이롭기까지 했습니다. 분명 새로운 경험이었습니다. 부족한 저에게 끊임없는 조언을 아끼지 않으신 신태균 교수님, 학문적 소양뿐만 아니라 인생의 선배로서, 결혼생활 선배로서 존경합니다. 사모님께도 진심으로 감사드립니다. 이 조그마한 결실이 헛되지 않도록 노력 하겠습니다.

미흡한 저의 논문을 정성껏 다듬어 주시고, 성심으로 심사해주신 임윤규 교수님과 이용덕 교수님께도 감사드립니다. 제가 부족하지만 어엿한 수의사가 되기까지 수의학의 학문을 넓혀주시고, 끊임없는 조언과 격려를 해주신 김승호 교수님, 고 양기천 교수님, 김희석 교수님, 이두식 교수님, 박전홍 교수님, 배종희 교수님, 이경갑 교수님, 우호춘 교수님, 정종태 교수님, 손원근 교수님께도 감사드립니다.

원유 샘플을 흔쾌히 제공 해주신 하귀목장의 강산옥 사장님, 하이디목장의 김형언 사장님, 아울러 도축장에 근무하면서 아낌없는 도움을 준 대학 동기인 김황룡 수의사, 내 논문 실험을 자기 일처럼 지성으로 도와준 희철에게 감사의 마음을 전합니다. 그리고 우리 실험실 최고의 멤버들 박민수 원장님, 안희숙 원장님, 승준, 재광, 철이, 창중, 미정, 종철, 광협, 경숙, 도현, 승담, 기현, 달수, 지영, 정태, 진우, 태기, 지성, 찬우 모두에게도 고맙다는 인사를 전합니다.

회사에서 많은 이해와 격려를 아끼지 않으신 주식회사 제주우유 홍영철 대표이사님과 같은 실험실에서 아무내색 않고 맡은바 임무에 최선을 다하고 논문을 다듬어준 유자영 선생에게도 이제야 고마운 마음을 전합니다.

항상 옆에서 지켜봐 주시고 든든한 힘이 되어주신 어머니, 아버지, 장인어른, 장모님께도 깊이 감사드립니다. 주위에서 따뜻한 마음으로 지켜봐주시는 고모님, 매형, 누나, 형, 형수님, 승환아빠, 홍림, 보윤, 규선 사랑스런 우리 조카들 승호, 승봉, 승홍, 승미, 승환, 유환에게도 그간 전하지 못했던 사랑의 마음을 전합니다.

언제나 나의 든든한 힘이 되어주고 많은 시간, 함께 고생해준 사랑하는 나의 아내 경자, 오랜 시간 할머니 집에서 많이 참아준 우리 재롱둥이 두 아들 승택, 승협 또한, 엄마 뱃속에서 건강하게 잘 자라주는 우리 복덩이에게도 사랑한다는 말과 함께 이 작은 결실을 전합니다.

모든 분들이 오랫동안 행복하고 건강했으면 좋겠습니다.

2005년 12월

강 재 윤