

In Vivo에서 젖소 초유 Insulin-like Growth Factor-I 분획이 마우스의 Splenocyte Activity에 미치는 영향

황경아 · 김승일 · 정순희 · 양희진 · 이수원

성균관대학교 식품생명공학과

서 론

Insulin-like growth factor-1은 초유 내에 존재하는 생리활성인자로서 생체내에서 성장과 발달 및 immune system 즉, humoral immune response와 cell mediated immune response 을 조절하는 물질이며 특히 immunity와 inflammation의 조절에 중요한 물질로 알려져있다⁽¹⁾.

이에 본 연구에서는 젖소 초유 IGF-I을 ultrafiltration 30kDa과 1kDa을 사용하여 IGF-I을 분획하고 분획된 IGF-I rich fraction을 마우스에게 2주간 복강 투여하고 이후 해부하여 비장 세포를 회수하여 splenocyte 활성으로 B cell과 T cell 증식과 종양세포에 대한 세포독성을 Natural killer cell 활성을 측정함으로써 면역 활성화에 관하여 실험을 하였다.

재료 및 방법

분만 후 24시간 이내에 착유 한 젖소 초유는 30kDa과 1kDa ultrafiltration membrane를 이용하여 IGF-I rich fraction을 분리하였고⁽²⁾, 분리된 fraction 중의 IGF-I 양은 sandwich ELISA assay를 이용하여 측정하였다⁽³⁾. 실험동물로는 4주령 ICR 마우스를 구입하여 1주일 예 비사육 시킨 후 2주간 복강 투여하고 Holsapple 등⁽⁴⁾의 방법에 의해 Murine splenocyte 분리를 분리하여 실험에 사용하였다.

Splenocyte의 증식효과 측정

분리한 비장세포는 Landreth 등⁽⁵⁾의 방법에 의해 측정하였고, 세포 증식을 위한 mitogen으로 B cell과 T cell은 각각 con A와 LPS를 사용하였다.

Natural killer cell 항암작용 측정

NK cell의 활성측정은 Ortaldo 등⁽⁶⁾의 방법에 따라 natural killer cell에 민감한 YAC-1 cell에 대한 cytotoxicity로서 측정하였고, 세포독성은 아래의 식에 의해 산출하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 - \frac{[(\text{NK cell abs} + \text{YAC-1 abs}) - (\text{NK cell abs})] \times 100}{\text{YAc-1 abs}}$$

결과 및 고찰

초유중에 함유되어 있는 free IGF-I의 분리는 30kDa과 1kDa의 ultrafiltration cartridge를 사용하여 retentate인 30kDa 이상의 성분을 제거하고 free IGF-I을 포함하는 30kDa과 1kDa 사이의 IGF-I rich fraction을 분리해 내었다. 분리된 IGF-I rich fraction 내의 IGF-I은 SDS-PAGE(Fig. 1A)와 Western blotting(Fig. 1B)으로서 IGF-I의 존재를 확인하였고, IGF-I 함량을 ELISA로 정량한 결과 단백질 1mg당 10ng의 IGF-1이 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

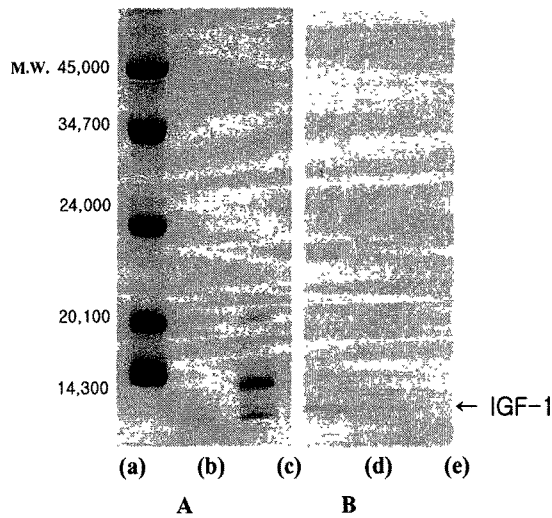


Fig. 1. SDS-PAGE(A) & Western blotting(B) patterns.

(a): Low molecular weight marker, (b): Standard IGF-I, (c): IGF-I rich fraction,
(d): Standard IGF-I, (e): IGF-I rich fraction.

분리한 IGF-I rich fraction이 T cell 증식에 미치는 영향을 실험한 결과 Fig. 2와 같이 IGF-I rf 처리구는 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리구에서 약 33%, 12%, 7%의 증식능력을 보였고 0.001 μg 의 농도에서는 세포증식 효과를 나타내지 못했다. IGF-I 처리구는 1, 0.1, 0.01 및 0.001 μg 의 농도로 복강 투여시 대조구에 비해 100%, 50%, 24% 및 10%의 세포 증식율을 나타내었고, 유청 처리구에서는 1, 0.1, 0.01 및 0.001 μg 의 농도로 투여한 군이 각각 20%, 5%, 8%와 약 3%의 세포 증식율을 나타내었다.

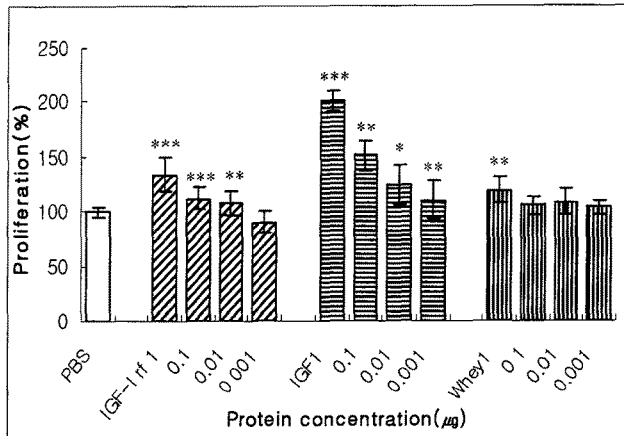


Fig. 2. The effect of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey on *in-vivo* proliferation of splenocytes stimulated with Concanavalin A.

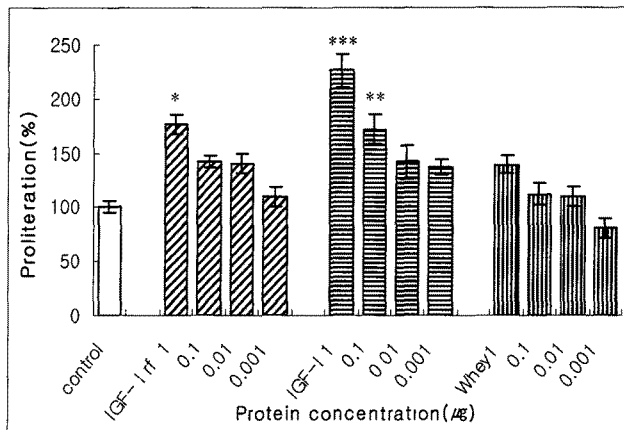


Fig. 3. The effect of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey on *in-vivo* proliferation of splenocytes stimulated with LPS.

B cell 증식효과는 1, 0.1 및 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조구에 비해 IGF-I rich fraction은 각각 76%, 42%의 세포증식 효과를 보였으며 0.01, 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 각각 40%와 10%의 증식율을 나타내었다(Fig. 3).

Natural killer cell의 항암작용은 1 μg 의 농도로 복강 투여한 군에서 IGF-I rf은 약 42.3%의 세포독성을 보였고, IGF-I은 55.43%, whey는 30.44%의 세포독성을 나타내었다. 또한 *in vivo*에서 IGF-I rich fraction과 IGF-I은 YAC-1 cell lysis에 대해 농도의존적인 경향을 보였다(Fig. 4).

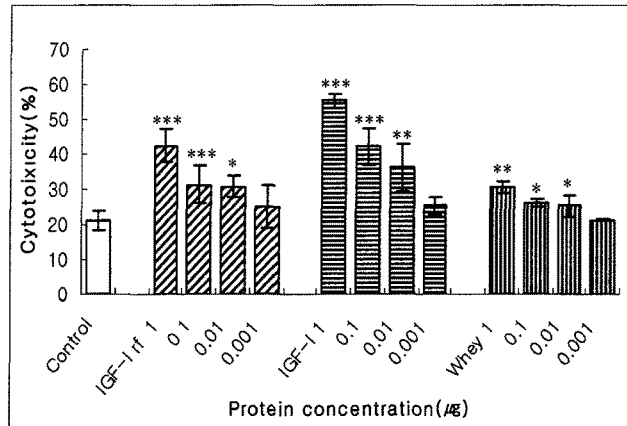


Fig. 4. The effect of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey on the *in-vivo* NK cell activity from mouse splenocyte.

요 약

젖소 초유중에 함유된 IGF-I 은 30kDa와 1kDa ultrafiltration(UF) membrane을 이용하여 IGF-I rich fraction을 효과적으로 분리하였으며 분획내의 IGF-I은 SDS-PAGE와 Western blot으로 확인하였다. 분획한 IGF-I rich fraction이 murine splenocyte의 면역 활성화에 미치는 영향을 실험한 결과 1µg 투여군의 경우 대조구에 대비하여 Bcell과 T cell의 증식능력은 각각 33%와 76%의 증식능력을 보였고, natural killer cell의 항암 능력은 42.3%의 세포 독성을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Heemskerk, V. H. et al. (1999) *Cytokine & Growth Factor Reviews.*, 10(1), 5.
2. Hossner, K. L. and Yemm, R. S. (2000) *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 32(3), 161.
3. Hossenlopp, P. et al. (1986) *Anal. Biochem.*, 154(1), 138.
4. Holsapple, M. P. et al. (1984) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 229(2), 493.
5. Landreth, K. S. et al. (1992) *Blood.*, 80(50), 1207.
6. Ortaldo, J. and Hernerman, R. B. (1984) *Annu. Rev. Immunol.*, 2, 359.