

## 고양이 말초혈액 탐식세포의 탐식능에 있어서 계란백유래물질의 효과

양만표<sup>1</sup> · 김기홍  
충북대학교 수의과대학

### Effect of Egg White Derivatives on Phagocytic Response of Feline Peripheral Blood Phagocytes

Mhan-pyo Yang<sup>1</sup> and Ki-hong Kim

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea

**ABSTRACT :** The immunostimulating effects of egg white derivatives (EWD) on the phagocytic response of feline peripheral blood polymorphonuclear cells (PMN) as well as mononuclear cells (MNC) were examined. The phagocytic activity was analyzed by a flow cytometry system. The EWD showed directly an enhanced effect on the phagocytic response of MNC but not PMN. The phagocytic activity of MNC was enhanced by culture supernatant from MNC and PMN treated with EWD, respectively. Similarly, the phagocytic activity of PMN was enhanced by culture supernatant from MNC but not PMN treated with EWD. It was, therefore, indicated that the enhanced phagocytic activity of feline PMN could be mainly mediated by humoral factor(s) released from MNC treated with EWD. These results suggested that EWD could enhance the phagocytosis of feline peripheral blood phagocytes.

**Key words :** cat, egg white derivatives, mononuclear cells, polymorphonuclear cells, phagocytosis

## 서 론

유약동물과 노령동물에서 면역증강제를 사용하여 생체내 방어기능을 담당하는 백혈구의 기능을 증강시키는 것은 감염성 질병에 대해 저항성을 증가시키는 것으로서 염증성 질병이나 면역기능저하 동물에 있어서 합병증 유발을 예방하는데 매우 중요하다<sup>5,6,7,15</sup>. 이러한 문제들의 해결을 위해 면역증강제에 대한 연구가 수행되어져 왔으며<sup>12</sup>, 여러가지 물질이 면역을 증강시키는 물질로 제안되어져 왔다. 그러나 생물활성물질 및 비특이적 면역증강제의 지속적 사용이나 남용은 항생제의 경우와 마찬가지로 홍선의 비대나 내분비기능 장애 등 다른 부작용을 초래하거나 잔류하는 결점을 안고 있다<sup>3,4</sup>. 그래서 이러한 면역증강제의 부작용들을 최소화하기 위해 식품유래 물질중에서 면역기능을 강화시키는 물질의 연구가 이루어졌다.

계란백유래물질(egg white derivatives; EWD)은 ovoalbumin(54%), conalbumin(12%), ovomucoid(11%), flavoprotein(0.8%), ficin-papain inhibitor(0.05%), ovomucin(3.5%), ovoglycoprotein(1.0%), ovomacroglobulin(0.5%), ovoglobulin G<sub>2</sub>(4%) 그리고 ovoglobulin G<sub>3</sub>(4%)와 같은 11가지의 당단백으로 구성된 물질이다<sup>9</sup>. 또한 개에 있어서 EWD는 말초혈액 탐식세포의 유주성과 탐식능을 증강시킬 수 있는 물질로 밝혀졌다<sup>10</sup>. 그리고 여러동물에서 비특이적인 면역을 증강시키는 효과가 있다고 보고되었다<sup>8</sup>. 최근의 보고에 의하면 계란백에서 유래된 몇 가지 물질이 마우스<sup>2</sup>, 돼지<sup>1</sup>, 소<sup>11</sup>, 송어<sup>16</sup>의 연구에서 각종 세균 감염증(*Escherichia coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*)에 현저한 예방 및 치료 효과를 보이면서 부작용이 없는 것으로 나타났다. 무지개 송어에 계란백유래물질을 경구적으로 투여한 경우에는<sup>16</sup> 호중구의 *Staphylococcus aureus*에 대한 살균작용이 증가하였다.

따라서 본 연구의 목적은 다른 동물에 비해 면역저하로 인하여 감염성 질병이 잦은 고양이에 있어서 다형핵백혈구 및 단구세포를 포함한 말초혈액탐식세

“이 논문은 1995년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음”

<sup>1</sup>Corresponding author.

포의 탐식작용에 대해 EWD의 면역증강효과를 검토하는데 있다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

의관상 임상증상이 없는 18개월령의 건강한 Oriental short hair종의 고양이 10마리(암컷 6마리, 거세한 수컷 4마리)를 실온( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ )에서 낮(14시간)과 밤(10시간)의 리듬을 유지하고, kennel에서 개별 사육하였다. 사료는 pellet 사료(Fildmaster, Purina Korea, Seoul, Korea)를 급여하였다.

### 실험약물

EWD(Eisai Co., Ltd. Tokyo, Japan)는 계란을 *Saccharomyces cerevisiae*로 발효한 후, cation column chromatography를 이용하여 saccharose와 lysozyme, avidin을 제거하였다. 그리고  $56^\circ\text{C}$ 에서 분무건조의 과정을 거쳐서 제조된 물질이다<sup>8</sup>.

### 세포분리

헤파린 처리된 주사기를 이용하여 경정맥에서 채혈한 혈액을 pH 7.6의 phosphate buffered saline(PBS)으로 1:1 희석한 후, 동량의 Ficoll-hypaque(비중, 1.077; Pharmacia, Japan)에 중층하였다. 실온에서  $400 \times g$ 로 45분간 원심분리하여 PBS와 혈장이 혼합된 층과 Ficoll-hypaque층 사이의 세포를 회수하여 1% bovine serum albumin(BSA; Sigma, MO, USA)이 함유된 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  Tris-base buffer(pH 7.6)에 5분간 처리한 세포를 PBS로 3회 세척하여 단핵구세포(mononuclear cells; MNC)로 사용하였다. 다형핵백혈구(polymorphonuclear cells; PMN)의 분리는 Ficoll-hypaque층 아래의 적혈구와 PMN이 혼합된 층을 1.5% dextran(분자량, 200,000; Wako, Osaka, Japan)이 함유된 PBS 10 ml을 처리하여 1시간 정치 후 부유되는 세포를 회수하여,  $400 \times g$ 로 5분간 원심분리를 하였다. 남아있는 적혈구는 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  Tris-base buffer(pH 7.6)로 5분간 처리한 후 PBS로 3회 세척하여 회수한 세포를 PMN으로 탐식능 실험에 제공하였다. PMN은 cytospin 원심 후 Wright-Giemsa 염색으로 확인한 결과 95% 이상이 호중구로 나타났다. Cell viability는 trypan blue exclusion test를 통해 검사한 결과 항상 96% 이상이었다. 제조된 PMN과 MNC는 2 mM L-glutamine과 5% fetal bovine serum(FBS; Gibco, MD, USA) 그리고 gentamicin이 ml당 0.02 mg 함유

된 RPMI-1640(Sigma, MO, USA)에 현탁시켜 세포의 수를 ml당  $2 \times 10^6$ 개가 되도록 희석하였다.

### 배양상층액의 제조

$5 \times 10^6$  cells/ml로 제조된 PMN 및 MNC 현탁액을 24-multiwell plate(Falcon 3047, Becton Dickson Labware, NJ, USA)의 각 well에 1 ml씩 첨가하였다. 다음은 EWD를 PBS로 희석하여 농도가 2 mg/ml로 제조하여  $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가한 후,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 24시간 배양하였다. 배양상층액은  $5,000 \times g$ 로 30분간 원심한 후 직경이  $0.45 \mu\text{m}$ 인 filter에 통과시켜 여과하였다. 제조된 배양상층액은 실험에 사용하기 전까지  $-70^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다.

### 탐식능 측정

$2 \times 10^6$  cells/ml로 제조된 PMN 및 MNC 현탁액을 24-multiwell plate의 각 well에 넣은 후 EWD 또는 EWD를 처리한 PMN 및 MNC 배양상층액을 첨가하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 11시간 배양하였다. 그 후  $1 \times 10^9$  particles/ml로 제조된 FITC-labelled latex(latex beads;  $2.0 \mu\text{m}$ ; Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA)를  $20 \mu\text{l}$  첨가하여 1시간 더 배양하였다. 배양한 세포를 회수하여  $2,000 \times g$ 의 속도로 1분간 원심한 후 3 mM EDTA-2Na(Wako Pure Chemical Industries, LTD, Tokyo, Japan)가 함유된 PBS로 3회 세척하였다. 10,000개의 세포중 latex bead를 탐식한 세포를 flow cytometry(FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA)로 분석하였다<sup>12,14</sup>.

### 통계처리

결과는 평균  $\pm$  표준오차로 표시하였고, 통계분석은 Student's *t*-test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 고양이 PMN 및 MNC의 탐식능에 있어서 EWD의 직접효과

EWD를 첨가하여 12시간 배양한 PMN에 있어서의 탐식활성은 EWD 첨가농도의 증가에 관계없이 뚜렷한 탐식활성의 증가는 나타나지 않았다. EWD를 첨가하여 배양한 MNC에 있어서의 탐식활성은 EWD의 첨가농도가 증가할수록 대조군에 비해 유의한( $p < 0.01$ ) 탐식활성의 증강이 나타났으며, EWD 농도  $50 \mu\text{g/ml}$ 에서 최대의 탐식활성 증강이 관찰되었다(Table 1). 그리고 이상의 농도에서는 탐식활성의

증강이 감소하는 경향을 나타내었다.

**고양이 PMN 및 MNC의 탐식능에 있어서 EWD 첨가 PMN 배양상층액의 효과**

EWD 첨가 PMN 배양상층액을 PMN과 12시간 배양하여 회수한 PMN의 탐식활성을 측정된 결과, 대조군 보다 뚜렷한 탐식활성의 증가는 나타나지 않았다(Table 2). PMN 배양상층액을 MNC에 처리하였을 때는 PMN 배양상층액의 첨가농도가 증가함에 따라 대조군에 비해 유의한( $p < 0.01$ ) 탐식활성의 증강이 나타났으며, PMN 배양상층액의 농도 25%(희석비율 1/4)에서 현저한 탐식활성이 관찰되었다.

**고양이 PMN 및 MNC의 탐식능에 있어서 EWD 첨가 MNC 배양상층액의 효과**

EWD 첨가 MNC 배양상층액을 PMN 및 MNC에 처리하여 탐식활성을 측정된 결과, PMN에 있어서 MNC 배양상층액의 첨가농도가 증가함에 따라 대조군에 비해 유의한( $p < 0.01$ ) 탐식활성의 증강이 나타났으며, MNC 배양상층액 농도 50%(희석비율 1/2)에

서 현저한 탐식활성의 증강이 관찰되었다. 그리고 그 이상의 농도에서는 탐식활성의 증강이 감소하는 경향을 나타냈다. MNC 배양상층액을 MNC에 첨가하여 탐식활성을 측정된 결과에서도 MNC 배양상층액의 첨가농도가 증가함에 따라 대조군에 비해 유의한( $p < 0.01$ ) 탐식활성의 증강이 나타났다(Table 3). 그리고 MNC 배양상층액 농도 50%와 100%를 첨가한 경우 현저한 탐식활성의 증강이 관찰되었다.

**고 찰**

본 연구는 EWD가 *in vitro*에서 고양이 말초혈액 탐식세포의 탐식능에 있어서 면역증강 효과가 있음을 입증하였다. EWD로 배양한 MNC 배양상층액은 95%가 호중구로 구성된 고양이 PMN의 탐식활성을 증강시켰지만, PMN 배양상층액은 PMN의 탐식활성을 증강시키지 못했다. 그러나 EWD로 배양한 MNC 및 PMN 배양상층액은 MNC의 탐식활성을 증강시켰다. EWD의 직접처리에 의해서는 MNC의 탐식활성은 증강되었지만, PMN의 탐식활성은 증강되지 않았

**Table 1.** Effect of EWD on phagocytic response of feline PMN and MNC

	Concentration of EWD ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	0	25	50	100	200
PMN	16.85 $\pm$ 0.55	16.08 $\pm$ 1.35	16.41 $\pm$ 1.78	16.09 $\pm$ 1.39	15.94 $\pm$ 1.26
MNC	23.81 $\pm$ 0.11	30.02 $\pm$ 0.91*	38.62 $\pm$ 1.22*	31.69 $\pm$ 0.45*	30.65 $\pm$ 1.17*

The values represent mean $\pm$ SEM (n=5).

\* $p < 0.01$ , compared to control.

**Table 2.** Phagocytic response of feline PMN and MNC to culture supernatant from PMN treated with EWD

	Dilution ratio of culture supernatant				
	0	1/8	1/4	1/2	1
PMN	16.54 $\pm$ 1.43	16.36 $\pm$ 2.37	17.77 $\pm$ 1.09	17.71 $\pm$ 2.68	16.14 $\pm$ 1.32
MNC	24.59 $\pm$ 1.77	33.24 $\pm$ 1.64*	44.71 $\pm$ 1.05*	34.41 $\pm$ 1.18*	34.71 $\pm$ 2.26*

The values represent mean $\pm$ SEM (n=5).

\* $p < 0.01$ , compared to control.

**Table 3.** Phagocytic response of feline PMN and MNC to culture supernatant from MNC treated with EWD

	Dilution ratio of culture supernatant				
	0	1/8	1/4	1/2	1
PMN	17.54 $\pm$ 1.28	25.78 $\pm$ 1.51*	29.71 $\pm$ 1.41*	41.48 $\pm$ 1.47*	32.70 $\pm$ 1.76*
MNC	28.88 $\pm$ 1.07	31.91 $\pm$ 1.22*	32.44 $\pm$ 1.26*	46.48 $\pm$ 1.63*	38.43 $\pm$ 3.49*

The values represent mean $\pm$ SEM (n=5).

\* $p < 0.01$ , compared to control.

다. 이와 같은 결과는 EWD가 직접적으로 PMN에는 반응하지 않으나 MNC를 활성화시켜 이것으로부터 액상물질을 분비시켜, 이러한 액상물질에 의해 PMN의 탐식활성이 증강된 것으로 사료되었다. Hirota 등<sup>9</sup>와 Nakagawa 등<sup>11</sup>에 의하면 개와 송아지의 말초혈액 탐식세포의 탐식활성에 있어서도 EWD의 면역증강 효과가 보고되었는데, PMN과 MNC의 탐식활성의 증가는 EWD의 첨가농도에 비례하는 것으로 나타났다. 또한 *in vitro*에서 EWD는 농도 200 µg/ml에서 최대의 탐식활성 증강효과를 보이고, 12시간 정도 배양하였을 때 탐식활성 증강정도가 가장 높게 나타났으며, 그것의 작용은 본연구의 결과와 비슷하게 활성화된 MNC에서 액상인자가 생산되어 일어나는 것으로 제안되었다<sup>9</sup>.

EWD를 구성하고 있는 11가지 단백질을 개의 MNC에 첨가하여 배양한 MNC 배양상층액으로 PMN의 탐식활성을 측정하였을 때, 탐식활성을 증강시킨 분획은 conalbumin, flavoprotein 그리고 ficin-papain inhibitor 이었다<sup>9</sup>. 이들 중 flavoprotein과 ficin-papain inhibitor는 EWD를 첨가한 것보다 높은 탐식활성을 보였다. 그러나 PMN의 유주활성은 ovomucoid와 ovoinhibitor로 배양한 MNC 상층액에서 증강되었다<sup>9</sup>. 이와같이 EWD의 단백질분획들 중 탐식활성과 유주활성을 증강시키는 물질이 다른 것으로 보아 PMN의 탐식활성과 유주활성에 작용하는 액상물질이 서로 다른 물질인 것으로 판단되었다. 또한 인삼 saponin을 고양이 PMN 및 MNC에 처리하였을 때도, EWD와 유사한 면역증강 효과가 나타났다<sup>13</sup>. 이상의 결과로부터 EWD는 고양이 말초혈액탐식세포의 탐식능을 비특이적으로 증강시킬수 있는 면역증강제로서, 유약 동물이나 면역기능저하 동물에 있어서 면역증강 목적으로 사료에 첨가할 수 있으며 또한 항생물질과의 병용투여로 질병의 치료에 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

고양이 말초혈액 다형핵백혈구(PMN) 및 단핵구세포(MNC)의 탐식능에 있어서 계단백유래물질(EWD)의 면역증강효과를 검토하였다. 탐식능 측정은 flow cytometry를 이용하였다. EWD를 PMN에 직접 처리하였을 때는 탐식반응이 없었다. EWD를 첨가하여 배양한 PMN 배양상층액을 PMN 및 MNC에 처리하였을 때는 PMN에서는 무처리 대조세포와 비교했을 때 탐식능이 증가하지 않았으나 MNC에서는 증강을

보였다. EWD를 MNC에 직접 처리하였을 때도 MNC의 탐식능이 증강되었다. EWD를 첨가하여 배양한 MNC 배양상층액을 MNC 및 PMN에 처리하였을 경우에는 모두 명료한 탐식증강 효과가 나타났다. 특히 PMN의 탐식활성은 EWD로 배양한 PMN 배양상층액에서는 없었으나, MNC 배양상층액에서만 현저한 탐식증강 효과를 보여 EWD가 MNC에 작용하여 활성화된 MNC로부터 분리되는 액상물질에 의해 PMN의 탐식활성이 증강된 것으로 사료되었다. 이상의 결과로부터 EWD는 고양이 말초혈액 탐식세포의 탐식능을 증강시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다.

## 참 고 문 헌

1. Araki S, Kimura M, Suzuki M, Fujimoto M. Effect of active egg white product on neutrophil function in weaning piglet. J Vet Med Sci 1992; 55: 899-900.
2. Araki S, Suzuki M, Fujimoto M. Enhanced resistance to bacterial infections in mice by oral administration of an active egg white product. J Vet Med Sci 1992; 54: 1055-1056.
3. Baehner RL. Disorder of leukocytes leading to recurrent infection. Ped Clin North Am 1972; 19: 935-937.
4. Briggs RE, Kehrli M, Frank GH. Effects of infection with parainfluenza-3 virus and infectious bovine rhinotracheitis virus on neutrophil functions in calves. Am J Vet Res 1988; 49: 682-684.
5. Chang HR, Grau GE, Pecher JC. Role of TNF and IL-1 in infection with *Toxoplasma gondii*. Immunology 1990; 69: 33-37.
6. Chong KT. Prophylactic administration of interleukin-2 protects mice from lethal challenge with gram-negative bacteria. Immun 1987; 55: 668-673.
7. Czuprynski CJ, Brown JF. Recombinant murine interleukin-1 $\alpha$  enhancement of nonspecific anti-bacterial resistance. Infect Immune 1987; 55: 2031-2065.
8. Hirota Y, Yang MP, Araki S, Mohamed A, Matsumoto Y, Onodera T, Sugii S, Akiyama K. Immunostimulating activities of chicken egg white derivatives (EWD) are recombinant bovine interferon alpha 1 (rBoINF  $\alpha$  1) in dogs and cattle. Bull Soc Fr Jpn Sci Vet 1995; 6(2): 58-67.
9. Hirota Y, Yang MP, Araki S, Yoshihara K, Furusawa S, Yasuda M, Mohamed A, Matsumoto Y, Onodera T. Enhancing effects of chicken egg white derivatives on the phagocytic response in the dog. J Vet Med Sci 1995; 57(5): 825-829.
10. Hirota Y, Yang MP, Ohta Y, Araki S, Matsumoto Y, Kang CB, Mohamed A, Yoshihara K, Furusawa S, Suzuki K, Onodera T, Akiyama K, Sugii S.

- Usefulness of egg white derivatives (EWD) and recombinant bovine interferon alpha 1 (rBoINF  $\alpha$ 1) in veterinary medicine. In vaccines in agriculture: Immunological application to animal health and production. Melbourne: CSIRO press. 1994: 57-63.
11. Nakagawa J, Osame S, Ichijyo S, Araki S, Kimura M. Effects of active egg white product on neutrophil function in calves. *J Vet Med Sci* 1993; 52(2): 259-263.
  12. Ozaki Y, Ohashi T, Minami A, Nakamura S. Enhanced resistance of mice to bacterial infection induced by recombinant human interleukin-1 $\alpha$ . *Infect Immune* 1987; 55: 1436-1440.
  13. Park SE, Yun YW, Yang MP. Effect of ginseng saponins on phagocytosis of feline peripheral blood phagocytes. *Korean J Vet Clin Med* 1998; 15(1): 116-123.
  14. Roth JA, Abruzzini AF, Frank DE. Influence of recombinant human interleukin 2 administration on lymphocyte and neutrophil function in clinically normal and dexamethazone-treated cattle. *Am J Vet Res* 1990; 51: 546-549.
  15. Uchida A, Klein E. Activation of human bloodlymphocytes and monocytes by the streptococcal preparation OK432. *Immunol Lett* 1985; 10: 177-181.
  16. Yoshida T, Sakai M, Kitao T, Khlil SM, Araki S, Saitoh R, Ineno T, Inglis V. Immunomodulatory effects of the fermented products of chicken egg, EF203, on rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 1993; 109: 207-214.