



젖소 초유로부터 분리한 Insulin-like Growth Factor-I 분획이 *In Vitro*에서 마우스의 면역 활성화에 미치는 영향

황경아 · 양희진 · 이수원*

성균관대학교 식품생명공학과

Effects of IGF-I Rich Fraction from Bovine Colostral Whey on Immune Activity of Mouse *In Vitro*

Kyung-A Hwang, Hee-Jin Yang, and Soo-Won Lee*

Department of Food Science & Biotechnology, Sungkyunkwan University

Abstract

Insulin-like growth factor-I(IGF-I) rich fraction, which was obtained molecules ranged between 30 and 1 kDa, was fractionated by ultrafiltration from bovine colostrum whey. IGF-I rich fraction was confirmed by SDS-PAGE and western blotting and then the quantity of IGF-I was measured by sandwich ELISA. IGF-I concentration in IGF-I rich fraction was 10 ng/mg proteins. IGF-I rich fraction, standard IGF-I and colostrum whey were treated to murine peritoneal macrophages. And then we experimented that effect of immune activity on macrophage and splenocyte. As a result, in group treated with IGF-I rich fraction 1 µg/mL, production of interleukin-6 and nitric oxide were 9.85 ng and 17.17 µM and production of phagocytosis, tumor necrosis factor-α and H₂O₂ were 78.3, 34.5 and 6% compared to the control group. In splenocyte immune response, B cell and T cell proliferation and NK cell activity were 103, 126 and 22.2% in group treated with IGF-I rich fraction 1 µg/mL to compared to the control, respectively.

Key words : IGF-I, macrophage, splenocyte, immune response

서론

젖소 초유는 분만 직후부터 일주일 이내에 분비되는 물질로서 상유에 비해 영양이 풍부하며 특히 면역과 성장 및 상처 치유인자와 항균인자 등 생체 방어 기능에 중요한 역할을 하는 생리활성인자를 다량 함유하고 있다(Pakkanen and Aalto, 1997). 또한 초유는 신생아의 풍부한 영양 공급원으로서 DNA 합성과 세포 분열 활성을 증가시키며 신생아의 immune system 확립과 그 활성을 촉진하여 gastrointestinal tract에 bacteria 혹은 virus 등의 감염을 막아준다(Wilson, 1997; Schams, 1994).

초유 내 존재하는 생리활성 성분은 대표적으로 immunoglobulin 가운데 IgG와 cytokine으로는 tumor necrosis factor, interleukin-1,-2,-6 등이 있으며 growth factor로는 insulin-like growth factor(IGF-I, II), epidermal growth factor(EGF), transforming growth factor(TGF), platelet-derived growth factor(PDGF)등이 대표적인 milk growth factor(MGF)로 보고되고 있다.(Butler, 1994; Regester *et al.*, 1997).

MGF 가운데 특히, IGF-I 은 polypeptide로서 우유 내 생리활성 기능을 가지는 물질 중 가장 중추적인 성분으로 보고되고 있다(Simmen *et al.*, 1988). IGF-I 의 기능으로는 상처치유 작용 및 세포 분화, 상처 치유와 합성에 관여하며 DNA 합성 및 세포분열 활성을 자극하고, 신생아의 뼈, 근육, 신경조직의 성장 및 발달, 소화관 성장과 성숙, 뇌 성장의 발달에 관여하며 특히 태아와 신생아의 면역 조절 물질로 잘 알려져 있다. 또한 IGF-I 은 생체 내에서 성장 발달뿐만 아니라

* Corresponding author : Soo-Won Lee, Department of Food Science & Biotechnology, Sungkyunkwan University, 300, Chunchun-dong, Jangan-gu, Suwon, Kyunggi-do, Korea. Tel: 82-31-290-7805, Fax:82-31-290-7815, E-mail : leesw@skku.ac.kr

immune system 즉, humoral immune response와 cell mediated immune response을 조절하는 물질이며 특히 immunity와 inflammation의 조절에 중요한 물질로 알려져 있다(Heemskerck *et al.*, 1999).

따라서 본 연구에서는 젖소 초유로부터 IGF-I rich fraction을 분획하고, 분획된 IGF-I rich fraction 및 standard IGF-I 과 whey를 각 농도별로 처리하여 면역 조절 작용에 관여하는 lymphocytes와 macrophage 활성화에 IGF-I rich fraction이 미치는 영향을 실험하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에 사용한 동물은 ICR 마우스(♂, 4주령)로서 (주)오리엔트로부터 구입하였으며, 마우스 식이는 표준사료(Purina Korea)를 공급하였고 1주간 예비사육한 후 실험에 사용하였다. 1주 동안 사육한 후 마우스를 희생시켜 무균 상태에서 macrophage와 splenocyte를 분리하였다.

시료 및 시약

초유는 수원시 소재 축산 농가에서 사육중인 홀스타인으로로부터 분만 후 24시간 이내에 분비된 것을 착유하여 실험에 공시유로 사용하였다.

Standard IGF-I 은 R&D systems(USA)에서 구입하여 사용하였으며, 세포배양에 사용한 RPMI 1640은 Gibco(USA)에서, Fetal bovine serum(FBS)는 Gemini(USA)로부터 구입하였으며 이외 특별한 언급이 없는 한 시약은 Sigma(USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

초유 Whey 및 IGF-I Rich Fraction 분리

Skim milk의 분리는 초유를 5,000 rpm으로 30분간 원심분리하고 지방을 제거시켜 회수하였다. 회수한 skim milk는 1N HCl 용액으로 casein을 침전시켜 원심분리한 후 상등액을 회수함으로써 whey를 분리하였다.

IGF-I rich fraction 분리는 whey를 Hossner와 Yemm(2000)의 방법을 이용하여 30과 1 kDa의 ultrafiltration cartridge (prep/scale-TFF, Millipore, USA)로 free form의 IGF-I 이 함유되어 있는 IGF-I rich fraction(30~1 kDa)을 분리하였다. 위의 모든 과정은 4℃의 cold room에서 실시하였다.

IGF-I Rich Fraction 분리 확인 및 IGF-I 정량

Ultrafiltration에 의해 얻어진 IGF-I rich fraction(30~1 kDa)은 효과적인 분리 및 분획한 IGF-I rich fraction(30~1 kDa) 내에 IGF-I이 포함되어 있는지를 확인하기 위해 Laemmli

(1970)의 방법으로 SDS-PAGE를 실시하였다.

SDS-PAGE를 마친 gel은 coomassie blue R-250 시약으로 염색한 후 탈색시켜 밴드를 확인하였고, Hossenlopp 등(1986)의 방법에 의해 western blotting을 실시하여 IGF-I의 존재를 확인하였다. 또한 IGF-I rich fraction 내에 함유되어 있는 IGF-I의 정량은 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용하여 측정하였다(Battelli *et al.*, 1999).

복강 Macrophage의 분리 및 배양

복강 macrophage의 분리는 Klimetzek와 Remold(1980)의 방법을 이용하였다. 마우스의 복강으로부터 분리하여 회수한 macrophage를 96-well microplate에 200 μ L/well 분주 시 1×10^5 cells의 농도로 조정하여 실험에 사용하였다.

Splenocyte 분리 및 배양

Splenocyte의 분리 및 배양은 Holsapple 등(1984)의 방법을 수정하여 사용하였다. 분리한 splenocyte는 10mL의 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에 현탁하여 96-well microplate에 200 μ L/well 분주 시 5×10^5 cells의 농도가 되도록 조정하여 실험에 사용하였다.

Interleukin-6(IL-6) 정량

분리한 macrophage는 Ding 등(1988)의 방법에 의해 1×10^5 cells/well의 농도로 분주한 후 IGF-I rich fraction, standard IGF-I 및 colostrum whey를 각 농도별로 첨가하였으며, 양성 대조구는 LPS를 처리하였다. 각 시료를 처리하고 18시간 배양한 후 배양 상등액을 회수하여 상등액 중의 IL-6 양을 sandwich ELISA assay를 사용하여 정량하였다.

Nitric Oxide(NO)의 생성도 측정

Ding 등(1988)과 Green 등(1982)에 의한 Griess 방법에 따라 분리한 macrophage에 각 시료를 농도별로 처리하고 18시간 동안 배양한 후 배양 상등액 중의 nitric oxide 생성 농도를 측정하였다. NO의 생성 농도는 sodium nitrite의 표준곡선을 작성하고 이에 준하여 계산하였다.

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) 생성 측정

Flick과 Grifford(1984)의 방법을 일부 수정하여 TNF- α bioassay를 실시하였다. Macrophage를 1×10^5 cells/well로 분주하고 IGF-I rich fraction, IGF-I 및 colostrum whey를 각 농도별로 처리하고 양성 대조구에는 lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 24시간 배양시킨 후 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액은 TNF- α 에 민감한 L929 cell에 actinomycin D와 함께 넣은 후 L929의 사멸능력으로 TNF- α 의 생성도를 측정하였다.

Phagocytosis 측정

Macrophage의 phagocytosis 측정은 Okimura 등(1986)과 Stossel 등(1973)의 zymosan particle과 NBT(4-nitroblue tetrazolium chloride) reduction 방법을 이용하여 측정하였다.

H₂O₂ 생성도 측정

Macrophage에서 분비된 H₂O₂의 생성량은 Nathan과 Root (1977)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다.

Splenocyte의 증식 효과 측정

분리한 splenocyte는 Landreth 등(1992)의 방법에 의해 5×10⁵ cells/well이 되도록 200 μL씩 분주한 후 48시간 동안 배양하였으며, 세포 증식을 위한 mitogen으로 B cell과 T cell 은 각각 LPS와 concanavalin A(Con A)를 사용하였다.

Natural Killer Cell(NK cell)의 항암작용 측정

NK cell의 활성 측정은 Ortaldo와 Herneman(1984)의 방법에 따라 NK cell에 민감한 YAC-1 cell에 대한 cytotoxicity로 측정하였고, 아래의 식에 의해 산출하였다.

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

통계처리

본 실험의 측정 결과는 SPSS(Ver. 10.0 package program)을 이용하여 통계 처리하였으며, Duncan's multiple range test에 의하여 분석하였고, 유의적 검증은 p<0.01 수준으로 시행하였다.

결과 및 고찰

IGF-I Rich Fraction 분리 확인 및 정량

IGF-I rich fraction은 colostrum whey를 30과 1 kDa의 ultrafiltration cartridge로 30 kDa 이상의 성분을 제거하여 분자량 7,649 Da의 free form IGF-I이 포함되도록 분리하였다. 분리한 IGF-I rich fraction은 SDS-PAGE(Fig. 1A)을 실시한 후 western blotting (Fig. 1B)으로 분획 중의 함유된 IGF-I을 확인하였다. 분획한 IGF-I rich fraction을 SDS-PAGE로서 확인한 결과 20 kDa 이하 분자량을 지닌 성분만을 확인하였다. 이러한 결과는 ultrafiltration이 IGF-I rich fraction을 분리하는 과정에서 whey 중 30 kDa 이상의 거대분자를 효과적으로 제거시키는 방법임을 확인할 수 있었다. 본 실험과 유사한 실험을 실시한 Hossner와 Yemm(2000)은 초유를 30 kDa의

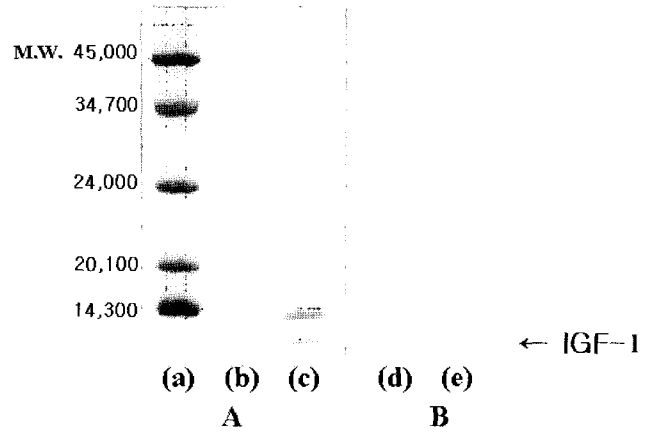


Fig. 1. SDS-PAGE(A) & Western blotting(B) patterns.
(a): Low molecular weight marker, (b): Standard IGF-I, (c): IGF-I rich fraction, (d): Standard IGF-I, (e): IGF-I rich fraction.

membrane으로 diafiltration 처리한 후 회수한 30 kDa 이상의 분획 중에 IGF-I을 함유하는 30 kDa 이하의 성분들이 상당량 확인되었음을 보고하였다. 따라서 본 연구에서 IGF-I을 선택적으로 분리하기 위해서 사용한 ultrafiltration이 Hossner와 Yemm이 처리한 diafiltration보다 효과적으로 IGF-I을 분획하고 IGF-I 농축물을 제조하는데 적합한 방법으로 생각된다.

그리고 IGF-I rich fraction 중에 존재하는 IGF-I 함량을 sandwich ELISA로 측정한 결과, IGF-I rich fraction에는 단백질 1 mg 당 10 ng의 IGF-I을 함유하는 것이 확인되었다.

IL-6의 생성량 측정

마우스 macrophage의 IL-6 생성은 LPS(100 ng/mL) 자극에 의한 양성 대조구는 9.0 ng/mL의 IL-6를 생성하였고 LPS를 자극하지 않은 경우 대조구의 경우는 7.2 ng/mL를 생성하였다(Fig. 2). IGF-I rich fraction 1 μg/mL 자극에 의해서 9.8 ng/mL를 분비하였고 0.1, 0.01, 0.001 μg/mL의 농도로 자극 시에는 각각 8.7, 8.9, 7.0 ng/mL를 분비하였다. IGF-I 1 μg/mL 농도의 자극에 의해서 12 ng/mL를 분비하였고 0.1, 0.01, 0.001 μg/mL로 자극하였을 때 10.9, 8.8, 7.1 ng/mL를 분비하였다. Colostrum whey의 경우 1, 0.1 μg/mL 자극 시 8.9, 9.0 ng/mL를 0.01, 0.001 μg/mL 자극에 의해서는 각각 8.6, 6.7 ng/mL를 분비하였다. 실험 결과 IGF-I rich fraction의 IL-6 분비 유도에 미치는 영향은 1 μg/mL의 최고 농도 처리 시로 나타났으며, standard IGF-I과 유사한 수준의 분비 유도 능력이 있음을 확인하였고, colostrum whey에서는 그 분비 유도 능력이 가장 낮게 나타났다. 본 실험에서 IGF-I rich fraction에 의한 마우스 복강 macrophage로부터 IL-6 생성은 시료의 농도에 의존적이었으며 IGF-I과 colostrum whey도 같은 경향을 나타내었다. 또한 이러한 결과는 IGF-I이

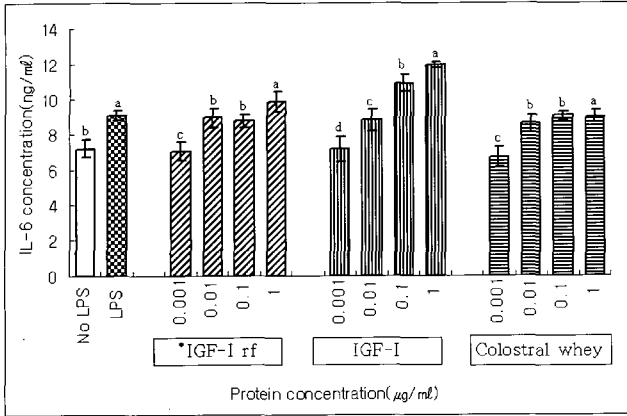


Fig. 2. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostral whey by ultrafiltration on *in-vitro* IL-6 production from murine peritoneal macrophages. Different letters on bars mean significant differences in the same sample at $p < 0.01$. (* IGF-I rf : IGF-I rich fraction).

macrophage의 활성을 증진하여 IL-6의 생성을 증가시킴을 확인한 결과이며 Muraguchi 등(1988)이 보고한 바와 같이 증가된 IL-6는 B 세포의 성숙, T세포의 증식과 IL-2 생성량 증진과 cytotoxic T세포의 유도 등 체액성 면역과 세포 면역 반응에 크게 영향을 미칠 것으로 생각된다.

NO 생성량 측정

각 시료를 1 µg/mL 농도로 자극하였을 때 마우스 복강 macrophage에서 분비되는 NO의 생성량은 IGF-I rich fraction 이 17.1 µM, IGF-I은 18.8 µM 그리고 colostral whey는 11.6 µM이었다(Fig. 3). IGF-I rich fraction, IGF-I 및 whey를 동일한 농도로 자극하였을 때 macrophage의 NO 분비 능력은

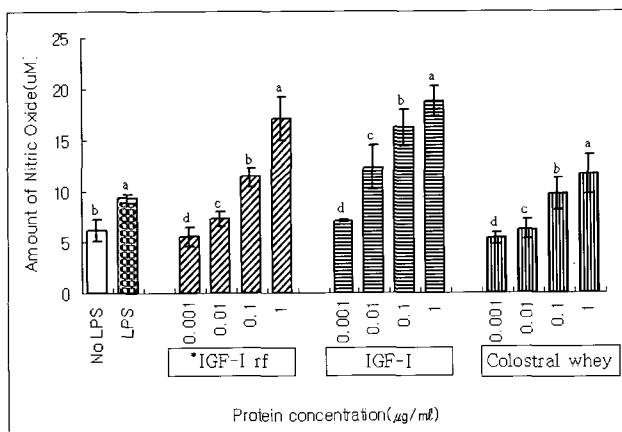


Fig. 3. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostral whey by ultrafiltration on *in-vitro* NO production from murine peritoneal macrophages. Different letters on bars mean significant differences in the same sample at $p < 0.01$. (* IGF-I rf : IGF-I rich fraction).

IL-6와 마찬가지로 IGF-I이 가장 높았으나 IGF-I rich fraction도 IGF-I과 유사한 수준의 분비 능력을 보였으며 colostral whey에서 가장 낮게 나타났다. Keller 등(1990)의 연구에서 NO가 활성화된 macrophage에서 생산되는 대사산물이라는 보고와 본 실험 결과를 비교해 볼 때 IGF-I rich fraction이 colostral whey보다 더 많은 NO 생성량을 나타내는 것은 colostral whey로부터 분획한 IGF-I rich fraction은 여러 종류의 생리활성인자 가운데 macrophage의 활성화에 영향력 있는 물질임을 뒷받침하는 결과라고 생각된다. 또한 최근 NO는 췌장에서 인슐린 분비를 조절하여 당뇨 예방에 관여하는 등 생체의 거의 모든 활동에 관여한다는 보고 (Kashyap *et al.*, 2005)와 superoxide의 형성을 억제하는 기능에 관한 연구의 관심이 높다. 이것은 IGF-I이 insulin과 유사한 기능을 가진다는 점에 착안하면 일맥상통하는 부분이며, 또한 IGF-I이 superoxide의 형성을 억제하면 조직의 손상을 줄이는데 이용할 수 있으므로 노화 예방에도 이용되어질 수 있다. 이에 본 실험에서 젖소 초유로부터 분획한 IGF-I rich fraction이 *in vitro*에서 IGF-I과 유사한 NO 분비유도 능력을 가지고 있음을 확인함과 동시에 위에서 보고된 노화 방지 및 superoxide의 형성 억제 등에 영향을 끼칠 수 있을 것으로 생각된다.

TNF-α 생성량 측정

TNF-α의 생성 능력은 L929 cell lysis로 나타내었으며 결과는 Fig. 4 와 같다. 대조구에 대비하여 LPS로 자극한 양성 대조구는 45.4%, IGF-I rich fraction, IGF-I 및 colostral whey 1 µg/mL 처리구는 34.5, 40.5와 26.5%의 L929 cell lysis를 보였으며 IGF-I rich fraction과 IGF-I은 양성 대조구와 유

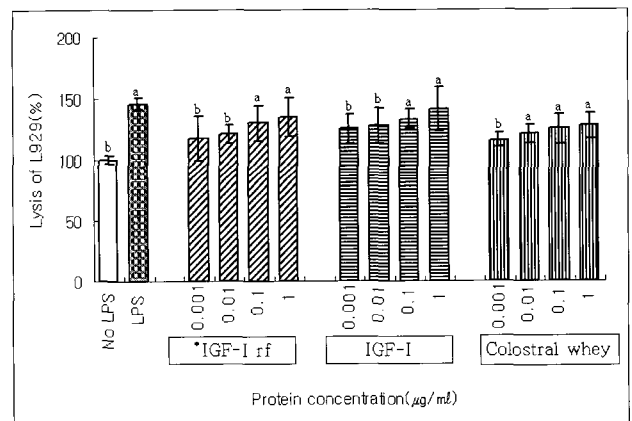


Fig. 4. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostral whey by ultrafiltration on *in-vitro* TNF-α production from murine peritoneal macrophages. Different letters on bars mean significant differences in the same sample at $p < 0.01$. (* IGF-I rf : IGF-I rich fraction)

사한 TNF- α 생성 능력을 가지는 것을 확인하였다. Tumor necrosis factor는 염증 및 암 등의 질환에서 면역능이나 대사 조절에 중요한 역할을 담당하며 NO와 함께 macrophage가 활성을 가질 때 분비하는 내인성 매개인자로 알려져 있다 (Riches *et al.*, 1996). Hagiwara 등(2000)은 초유 내 존재하는 cytokine은 TNF- α 및 IL-1, IL-6가 있으며 이들 cytokine은 비유기에 따라 상당한 양의 차이를 보였는데 그 농도가 초유에서 현저히 높았다고 보고하였으며 본 실험에서도 일치하는 경향을 보였다. 또한 Hagiwara 등(2000)은 colostrum whey가 마우스 macrophage를 자극하여 TNF- α 분비 유도 능력을 지닌다고 보고한 결과와 마찬가지로 본 실험의 결과에서도 colostrum whey가 macrophage를 자극하여 TNF- α 분비 유도 능력을 나타내었으며 뿐만 아니라 colostrum whey로부터 분획한 IGF-I rich fraction이 colostrum whey보다 높은 TNF- α 분비 유도 능력을 가짐으로써 IGF-I rich fraction의 높은 면역 활성 능력을 확인할 수 있었다.

Phagocytosis 측정

마우스 복강 macrophage의 phagocytosis에 대한 효과는 Fig. 5와 같다. 각 시료를 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 결과 양성 대조구에 대비하여 IGF-I rich fraction은 78.3%, IGF-I이 103.6%, 그리고 colostrum whey은 62.8%로 phagocytosis를 증진하였고, IGF-I이 가장 높게 나타났으며 IL-6와 NO의 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 이와 같이 IGF-I보다 더 높은 phagocytosis를 나타낸 것은 IGF-I 자체가 마우스 복강 macrophage를 자극하여 탐식작용을 나타낸 결과이며 또한 분획한 IGF-I rich fraction은 분획 중에 IGF-I과 다른 일부 포

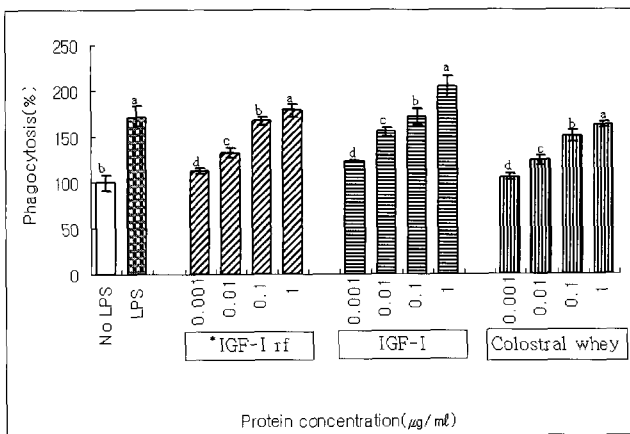


Fig. 5. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on *in-vitro* phagocytosis of murine peritoneal macrophage. Different letters on bars mean significant differences in the same sample at $p < 0.01$. (* IGF-I rf : IGF-I rich fraction).

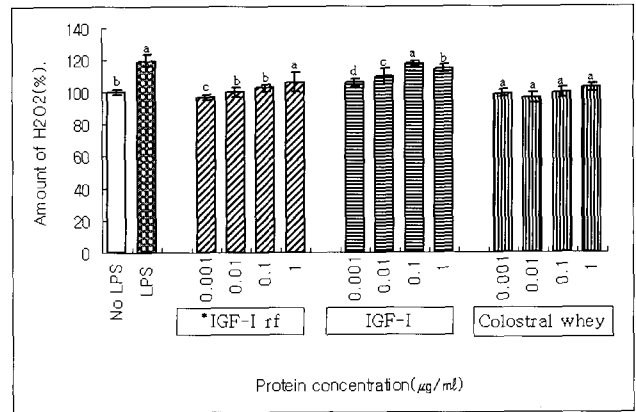


Fig. 6. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on *in-vitro* hydrogen peroxide of murine peritoneal macrophage. Different letters on bars mean significant differences in the same sample at $p < 0.01$. (* IGF-I rf : IGF-I rich fraction).

함되어 있는 생리 활성 물질과의 상승 효과에서 비롯된 결과로서 생각된다.

H₂O₂ 생성도 측정

IGF-I rich fraction이 마우스 복강 macrophage의 과산화수소 생성에 미치는 영향에 대한 결과는 Fig. 6과 같다. IGF-I rich fraction의 마우스 복강 macrophage에 의한 과산화수소의 생성은 IGF-I rich fraction의 경우 1, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 대조구보다 각각 6, 2% 더 많이 생성하였고, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서는 거의 효과가 없는 것으로 나타났다. IGF-I은 1~0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 대조구에 비해서 15, 18, 9 및 6%의 과산화수소 생성 증가를 나타내었으며, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 LPS 처리구와 거의 유사한 수준으로 과산화수소를 생성하였다. Colostrum whey는 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리구에서 대조구에 비해 2%의 과산화수소 생성량 증가를 나타내었으나, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서는 과산화수소의 생성에 거의 영향을 주지 못했다. 과산화수소는 활성화된 macrophage에서 생성되는 대사산물로서 독성 산소에서 유래되어 비 특이적인 생체 방어기작으로서 감염된 세포들을 죽이는 독성이 있는 물질이다. 본 실험에서 IGF-I rich fraction과 IGF-I은 macrophage를 활성화하여 과산화수소의 생성을 증진하는 것으로 확인됨에 따라 IGF-I rich fraction과 IGF-I은 생체 내의 항균 작용 및 면역력을 증강시킬 수 있을 것으로 생각된다.

Splenocyte의 Activity 측정

Fig. 7은 IGF-I rich fraction, IGF-I 및 colostrum whey가 *in vitro*에서 B cell 증식에 미치는 영향을 실험한 결과이다.

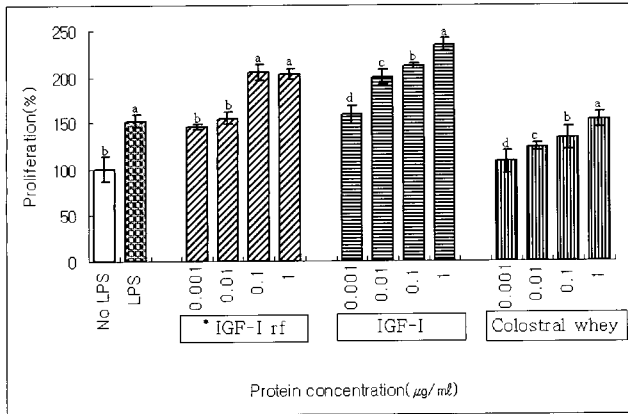


Fig. 7. The effect of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey on *in-vitro* proliferation of splenocytes stimulated with LPS. Different letters on bars mean significant differences in the same sample at $p < 0.01$. (* IGF-I rf : IGF-I rich fraction).

IGF-I rich fraction을 1, 0.1 및 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 자극 시 B cell 증식 효과는 대조구에 대비해 각각 103, 105 및 55%의 증식 능력을 보였고, 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 46%의 세포 증식 효과를 나타내었다. 또한 IGF-I 처리구는 1, 0.1, 0.01 및 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 자극한 결과 각각 135, 112, 99 및 58%의 세포 증식율을 나타내었고, colostral whey 처리구에서는 1, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 결과 각각 52, 33%의 세포 증식율을, 0.01, 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 23, 8%의 세포 증식율로 대조구보다 높게 나타났다. 그러나 colostral whey 처리구는 1~0.001 $\mu\text{g/mL}$ 의 모든 농도에서 LPS 처리한 양성 대조구보다 낮은 세포 증식 효과를 나타냄으로써 colostral whey에서 분획한 IGF-I rich fraction은 splenocyte의 활성화에 효과를 지니는 성분임을 확인할 수 있는 결과이다.

IGF-I rich fraction이 T cell 증식에 미치는 영향을 실험한 결과는 Fig. 8과 같다. 분리한 macrophage에 IGF-I rich fraction 1, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처리구는 대조구에 비해 126, 65%의 T cell 증식 효과를 보였으며 0.01, 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 32, 18%의 증식율을 나타내었다. IGF-I 처리구는 1, 0.1, 0.01 및 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 대조구보다 128, 87, 55 및 36%의 높은 결과를 나타내었고, colostral whey도 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리구에서는 64%의 T cell 증식 효과를 보였다. 이와 같은 결과를 양성 대조구와 비교해 보면 IGF-I rich fraction과 IGF-I 처리구는 1, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 colostral whey는 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 처리구에서 양성 대조구보다 높은 결과를 나타내었다.

Landreth 등(1992)의 실험결과에 의하면 IGF-I은 B lymphocyte의 증식을 촉진한다고 보고하였으며, 또한 Clark 등 (1993)은 IGF-I은 thymus, spleen, lymphocyte, lymph node에서 lymphocyte의 수를 증가시키고 IGF-I을 처리함으로써 T lymphocyte $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 와 B lymphocyte의 수를 증가시켰고

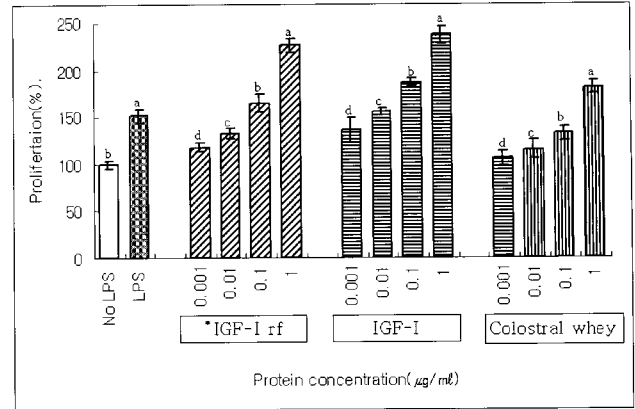


Fig. 8. The effect of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey on *in-vitro* proliferation of splenocytes stimulated with Concanavalin A. Different letters on bars mean significant differences in the same sample at $p < 0.01$. (* IGF-I rf : IGF-I rich fraction).

immunoglobulin 합성을 촉진한다고 보고하였는데 이러한 연구결과들은 본 실험에서 얻은 결과와 일치하는 것을 알 수 있었다.

Natural Killer(NK) Cell의 항암 효과 측정

NK cell의 활성화는 YAC-1 cell을 target cell로 하였으며 YAC-1 cell에 대한 세포 독성율을 측정함으로써 NK cell 활성화에 미치는 영향으로 나타내었다(Fig. 9). 그 결과 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 IGF-I rich fraction은 22.2%, IGF-I은 27.7%, colostral whey는 YAC-1 cell에 대해 15.21%의 세포 독성을 나타내었다. 또한 IGF-I rich fraction과 IGF-I은 1~0.001 $\mu\text{g/mL}$ 의 모든 농도에서 대조구보다 높은 세포 독성을 보였으나, colostral whey의 경우 1, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서만 대조구 비례 높은 효과를 나타내었으며 이들의 YAC-1 cell lysis에 대한

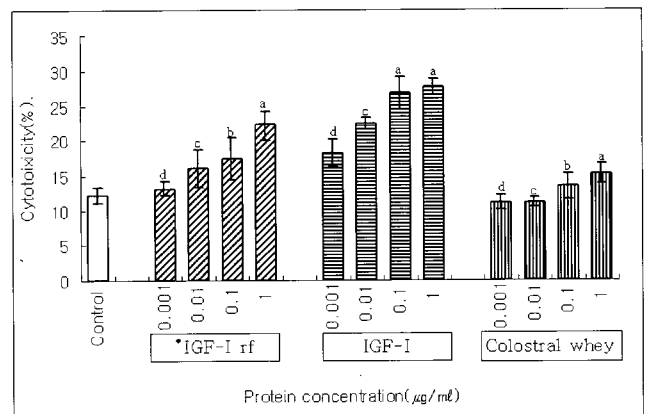


Fig. 9. The effect of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey on the *in-vitro* NK-cell activity of mouse splenocyte. Different letters on bars mean significant differences in the same sample at $p < 0.01$. (* IGF-I rf : IGF-I rich fraction).

결과는 모두 농도 의존적인 경향으로 나타났다.

NK cell은 특이한 암세포에 대한 T세포 용해작용 기전을 밝히기 위한 종양 면역의 연구 중에 발견되었고(Ortaldo and Hemerman, 1984; Trinchieri, 1989), natural killer cell-mediated responses는 viruses와 여러 형태의 tumor에 대한 방어 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 바이러스 감염 초기 단계에서 바이러스에 감염된 세포를 제거하는 기능을 가지며 미생물 감염을 방지하는 기능도 있어 암세포를 사멸시킬 뿐만 아니라 바이러스 감염 시 초기 방어단계에 작용하여 바이러스에 감염된 세포의 제거에 높은 효과를 나타낸다. 또한 세포 내의 monocyte에 잠복하는 세균에도 autologous monocyte를 lysis시키고 진균의 감염 시에도 직접 작용하지는 않지만 neutrophil을 활성화시키고 순환시킬 수 있는 cytokine을 분비하는 등 숙주 방어 기전에 중요한 역할을 하므로 NK 세포가 손상을 입으면 암이나 감염에 노출되기 쉬운 것으로 알려져 왔다.

따라서 본 연구에서 얻어진 결과는 colostrum whey로부터 분리한 IGF-I rich fraction이 splenocyte의 활성화에 상당한 영향력을 가짐을 확인하였으며 또한 숙주의 면역 활성화에 중대한 역할을 기여할 수 있는 물질임을 알 수 있는 결과이다.

요 약

젖소 초유 whey 내에 존재하는 IGF-I을 분리하기 위하여 ultrafiltration을 사용하여 30과 1 kDa 사이의 IGF-I rich fraction을 분획하였다. 분획한 IGF-I rich fraction내에 IGF-I의 존재 여부는 SDS-PAGE와 western blotting으로 확인하였고, sandwich ELISA로써 분획 내 IGF-I을 정량하였다. 그 결과 IGF-I은 단백질 mg당 10 ng으로 측정되었다. 분획한 IGF-I rich fraction을 마우스 복강 macrophage의 면역 활성화에 미치는 영향 즉, IL-6, NO, TNF- α , Phagocytosis, H₂O₂의 분비 유도 및 생성량을 측정하였고, splenocyte의 면역 활성화으로는 splenocyte의 증식 효과와 natural killer cell의 항암작용을 측정하였다. 실험 결과 IGF-I rich fraction 1 μ g/mL 투여군에서 IL-6의 생성량은 9.85 ng, NO의 생성량은 17.1 μ M, phagocytosis는 양성 대조군에 대비하여 78.3%의 탐식작용을 나타내었고 TNF- α 와 H₂O₂의 생성량은 대조군에 대비하여 각각 34.5 및 6% 더 많은 양을 생산하였다. Splenocyte 면역 활성화에 미치는 영향으로 T cell 과 B cell 증식은 대조군에 대비하여 각각 36 및 76%로 더 높은 증식 효과를 나타내었고, NK cell의 활성화는 대조군보다 55.4%의 높은 활성을 보였다.

감사의 글

본 연구는 2001년 농림부 첨단기술개발사업과제(과제번호: 0020439-100)의 지원에 의하여 이루어진 것이며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Battelli, M. G., Abbondanza, A., Musiani, S., Buonamici, L., Stocchi, P., Tazzari, P. L., Gramantieri, L., and Stirpe, F. (1999) Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). *Clin. Chim. Acta.* **281**, 147-158.
- Butler, J. E. (1994) Passive immunity and immunoglobulin diversity. In Proceedings of the IDF seminar: Indigenous antimicrobial agents of milk-recent developments. Brussels: International Dairy Federation. 14-50.
- Clark, R., Strasser, J., McCabe, S., Robbins, K., and Jardieu, P. (1993) Insulin-like growth factor-I stimulation of lymphopoiesis. *J. Clin. Invest.* **92**, 540-548.
- Ding, A. H., Nathan, C. F., and Stuehr, D. J. 1988. Release of reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophage. Composition of activating cytokines and evidences for independent production. *J. Immunol.* **141**, 2407-2412.
- Flick, D. A. and Grifford, G. E. (1984) Comparison of *in vitro* cell cytotoxic assay for tumor necrosis factor. *J. Immunol. Methods.* **68**, 167-175.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.
- Hagiwara, K., Kataoka, S., Yamanaka, H., Kirisawa, R., and Iwai, H. (2000) Detection of cytokines in bovine colostrum. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **76**, 183-90.
- Heemskerk, M. H., Hooijberg, E., Ruizendaal, J. J., van der Weide, M. M., Kueter, E., Bakker, A. Q., Schumacher, T. N., and Spits, H. (1999) Enrichment of an antigen-specific T cell response by retrovirally transduced human dendritic cells. *Cell. Immunol.* **195**, 10-17.
- Holsapple, M. P., Tucker, A. N., McNerney, P. J., and White, K. L. Jr. (1984) Effects of N-nitroso-dimethylamine on humoral immunity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **229**, 493-500.
- Hossenlopp, P., Seurin, D., Segovia-Quinson, B., Hardouin, S., and Binoux, M. (1986) Analysis of serum insulin-like growth factor binding protein using western

- blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. *Anal. Biochem.* **154**, 138-143.
11. Hossner, K. L. and Yemm, R. S. (2000) Improved recovery of insulin-like growth factors(IGFs) from bovine colostrum using alkaline diafiltration. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **32**, 161-166.
 12. Kashyap, S. R., Roman, L. J., Lamont, J., Masters, B. S., Bajaj, M., Suraamornkul, S., Belfort, R., Berria, R., Kellogg, D. L. Jr., Liu, Y., and DeFronzo, R. A. (2005) Insulin resistance is associated with impaired nitric oxide synthase activity in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 1100-1105.
 13. Keller, R., Geiges, M., and Keist, R. (1990) L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates as mediators of tumor cell killing by activated macrophages. *Cancer Res.* **50**, 1421-1425.
 14. Klimetzek, V. and Remold, H. G. (1980) The murine bone marrow macrophage, a sensitive indicator cell for murine migration inhibitory factor and a new method for their harvest. *Cell. Immunol.* **53**, 257-266.
 15. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
 16. Landreth, K. S., Narayanan, R., and Dorshkind, K. (1992) Insulin-like growth factor-I regulates pro-B cell differentiation. *Blood.* **80**, 1207-1212.
 17. Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K., and Kishimoto, T. (1988) The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.* **167**, 332-344.
 18. Nathan, C. F. and Root, R. K. (1977) Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: dependence on sequential activation and triggering. *J. Exp. Med.* **146**, 1648-1662.
 19. Okimura, T., Ogawa, M., and Yamauchi, T. (1986) Stress and immune responses. III. Effect of restraint stress on delayed type hypersensitivity(DTH) response, natural killer(NK) activity and phagocytosis in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **41**, 229-235.
 20. Ortaldo, J. R. and HERNERMAN, R. B. (1984) Heterogeneity of natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 359-394.
 21. Pakkanen, R. and Aalto, J. 1997. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *Int. Dairy J.* **7**, 285-297.
 22. Riches, D. W., Chan, E. D., and Winston, B. W. (1996) TNF-alpha-induced regulation and signalling in macrophages. *Immunobiology.* **195**, 477-90.
 23. Regester, G. O., Smithers, G. W., Mitchell, I. R., McIntosh, G. H., and Dionysius, D. A. (1997) Bioactive factors in milk: Natural and induced. In: Milk composition, production and biotechnology. Welch, R. A. S., Burns, D. J. W., Davis, S. R., Popay, A. I., and Prosser, C. G. (eds.), CAB International. NY, pp. 119-132.
 24. Schams, D. (1994) Growth factors in milk. *Endocr. Regul.* **28**, 3-8.
 25. Simmen, F. A., Simmen, R. C. M., and Reihhart, G. (1988) Maternal and neonatal somatomedin-C/insulin-like growth factor-I(IGF-I) and IGF binding proteins during early lactation in the pig. *Dev. Biol.* **130**, 16-27.
 26. Stossel, T. P. (1973) Evaluation of opsonic and leukocyte function with a spectrophotometric test in patients with infection and with phagocytic disorders. *Blood.* **42**, 121-130.
 27. Trinchieri, G. (1989) Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* **47**, 187-376.
 28. Wilson, J. (1997) Immune system breakthrough: Colostrum. *J. Longevity Res.* **3**, 7-10.

(2005. 6. 1. 접수 ; 2006. 2. 21. 채택)