

젖소 초유 Insulin-like Growth Factor-I 분획이 *in vivo*에서 Murine Macrophage의 면역 활성화에 미치는 영향

황경아 · 김승일 · 양희진 · 이수원

성균관대학교 식품생명공학과

서 론

젖소 초유는 분만 직후부터 일주일 이내에 분비되어지는 물질로서 상유에 비해 영양이 풍부한 complex biological fluid로 알려져 있다. 초유 내에 함유되어 있는 생리활성 인자, MGF의 분자량은 약 5~25kD 범위이며, 종류로는 insulin-like growth factor(IGF)-I, II, epidermal growth factor(EGF), transforming growth factor(TGF), platelet-derived growth factor(PDGF) 등이 존재한다. 이 가운데 특히 IGF-I은 polypeptide로서 우유 내 생리활성 기능을 가지는 물질 중 가장 중추적인 성분으로 보고되고 있다.⁽¹⁾

IGF-I의 기능으로는 상처치유 작용 및 세포분화, 상처치유와 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. 이에 본 연구에서는 젖소 초유 중의 IGF-I 분획이 *in vivo*에서 murine macrophage의 면역 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

젖소 초유 IGF-I rich fraction의 분리는 분만 후 24시간 이내에 초유를 착유하여 Hossner와 Yemm⁽²⁾의 방법에 의해 분리하였고, 분리한 IGF-I rich fraction내에 함유되어 있는 IGF-I은 Hossenlopp 등⁽³⁾과 Battelli 등⁽⁴⁾의 방법으로 SDS-PAGE와 western blotting으로 확인하였으며, IGF-I의 정량은 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하였다. 실험동물은 4주령 ICR 마우스를 사용하였고, 실험군은 대조군, IGF-I rich fraction 투여군, Standard IGF-I 투여군, whey 투여군으로 나누었고, 2주간 복강 투여한 후 마우스를 희생시켜 실험하였다. Murine macrophage 분리는 Klimetz과 Remold⁽⁵⁾의 방법에 의해 분리하였다.

IL-6 정량

분리한 대식세포는 Ding 등⁽⁶⁾의 방법에 의해 1×10^5 cell/well 로 분주한 후 IGF-I rich fraction과 함께 18시간 배양하여 상등액을 회수한 후 sandwich ELISA assay를 사용하여 정

량 하였다.

NO의 생성도 측정

Ding 등⁽⁶⁾과 Green 등⁽⁷⁾의 방법에 의하여 분리한 대식세포에 각 샘플을 농도별로 처리한 후 배양한 상등액 중의 nitric oxide 생성 농도를 Griess 방법⁽⁸⁾으로 측정하였다.

TNF- α 생성도 측정

Flick 등⁽⁹⁾의 방법을 일부 수정하여 TNF- α bioassay를 실시하였다. 즉 대식세포를 1×10^5 cell/well로 분주한 후 IGF-I rich fraction을 넣고 24시간 배양시킨 다음 상등액을 회수하여 TNF- α 에 민감한 L929 cell에 actinomycin D와 함께 넣은 후 L929의 사멸능력을 측정하였다.

Pagocytosis 측정

Macrophage의 Pagocytosis 측정은 Okimura 등⁽¹⁰⁾과 Stossel 등⁽¹¹⁾의 zymosan particle 방법과 NBT (4-nitroblue tetrazolium chloride) reduction 방법을 이용하여 측정하였다.

H₂O₂ 생성도 측정

대식세포에서 분비된 H₂O₂의 생성량은 Nathan과 Root⁽¹²⁾의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 분리한 대식세포를 1×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양하여 zymosan(1mg/1ml) 50 μ l를 첨가하여 1시간 uptake시킨 후 fresh media 100 μ l와 50 μ l의 phenol red를 넣고 1시간 더 배양하였다. 이후 ELISA microplate reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

젖소 초유중의 IGF-I rich fraction의 분리는 30kDa과 1kDa의 ultrafiltration cartridge를 사용하여 retentate인 30kDa 이상의 성분을 제거하고 free IGF-I을 포함하는 30kDa과 1kDa 사이의 IGF-I rich fraction을 분리하여 SDS-PAGE와 western blotting으로서 IGF-I의 존재를 확인하였다(Fig. 1 A,B). 분획한 IGF-I rich fraction 중의 IGF-I 함량을 ELISA로 정량한 결과, 단백질 1mg당 10ng의 IGF-I이 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

*In vivo*에서 젖소 초유 IGF-I rich fraction이 murine macrophage의 면역활성에 미치는 영향을 실험한 결과는 Fig. 2(IL-6, NO, Phagocytosis, TNF- α , H₂O₂)와 같다.

IL-6는 대조군 처리한 murine macrophage가 4.9ng의 IL-6를 분비하였고, IGF-I rich fraction 1 μ g 투여군은 7.3ng/ml, IGF-I 1 μ g 투여군은 8.5ng/ml 및 유청 1 μ g 투여군은 6.5ng/ml의 IL-6를 생산하였다. IGF-I rich fraction, IGF-I 및 whey를 1 μ g의 농도로 마우스에게 복강 투여하였을 때 peritoneal macrophage에서 분비되는 NO의 양은 각각 10.7 μ M, 13 μ M 및 6.38 μ M으로 측정되었다. *In vivo*에서 phagocytosis는 IGF-I rich fraction, IGF-I

그리고 whey 1 μ g 농도로 복강투여 한 결과 대조구에 비해서 IGF-I rich fraction이 65%, IGF-I이 51%, 그리고 유청은 34%로 phagocytosis를 증진시켰다. 대식세포가 생성하는 TNF- α 는 항암효과에 영향을 중요한 인자로 알려져 있으며 대식세포 배양 상등액 중의 생성된 TNF- α 양은 L929세포의 증식 저해율로 측정된 결과 IGF-I rich fraction 1 μ g 복강 투여군은 대조구와 대비하여 30%, IGF-I 은 약 34% 그리고 whey는 20%의 L929 cell lysis를 나타내었다. murine macrophage로부터 TNF- α 의 분비 능력도 NO의 생산량과 비슷한 경향을 나타내었으며, whey에 비해 IGF-I rich fraction이나 IGF-I이 macrophage를 더욱 활성화시켜 TNF- α 의 분비 능력이 높게 나타났다.

Murine peritoneal macrophage의 H₂O₂ 생산은 각 시료 1 μ g 복강투여에 의해서 IGF-I rich fraction, IGF-I 및 whey는 대조구에 비해서 6%, 22% 그리고 4%의 H₂O₂를 더 많이 생산하였다. 본 실험에서 이와 같은 결과는 IGF-I rich fraction과 IGF-I은 macrophage를 활성화하여 과산화수소의 생산을 증진하는 것으로 확인되었고, 따라서 IGF-I rich fraction과 IGF-I은 생체내의 항균 작용 및 면역력을 증강시킬 수 있을 것으로 판단된다.

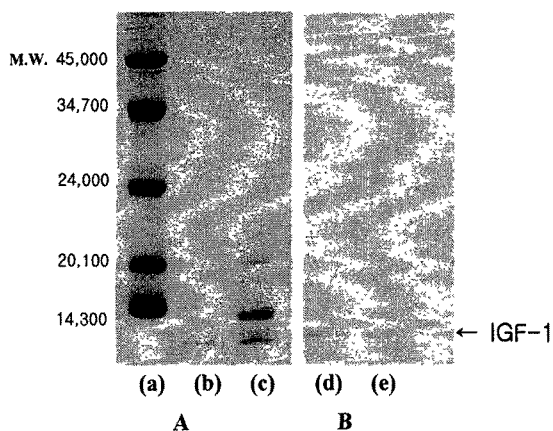


Fig. 1. SDS-PAGE(A) & Western blotting(B) patterns.

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

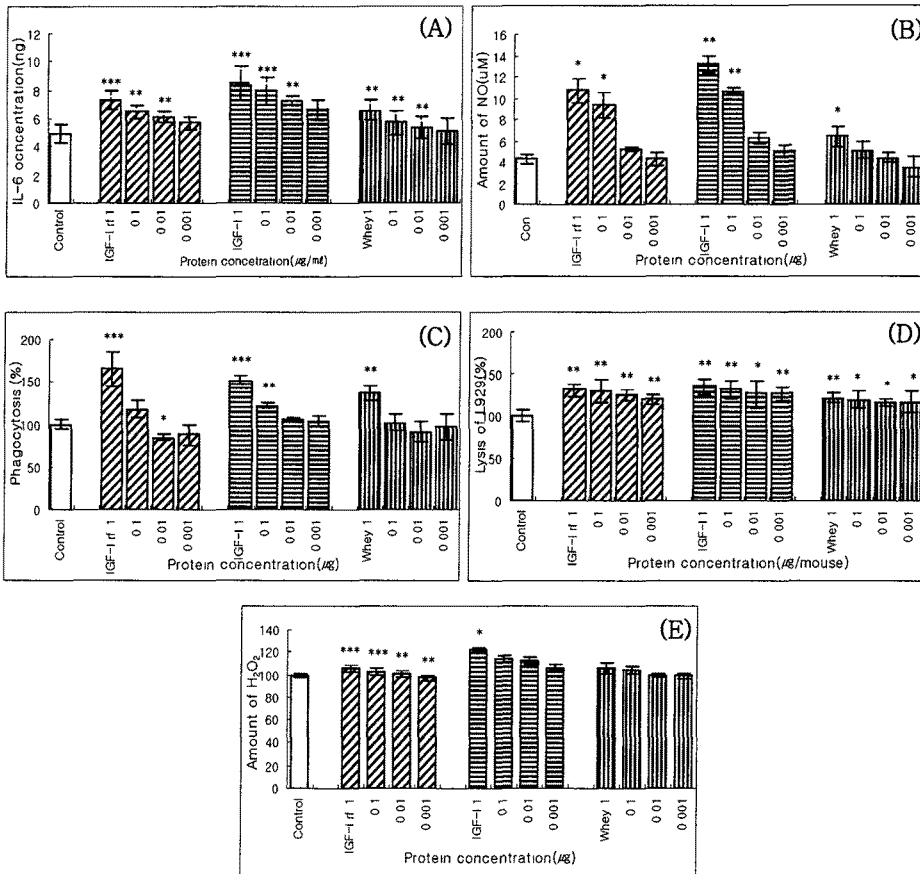


Fig. 2. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on *in-vivo* IL-6(A), NO(B), phagocytosis(C), TNF- α (D) and H₂O₂(E) production from murine peritoneal macrophages.

*** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$.

요 약

젖소 초유 중에 함유된 IGF-I rich fraction을 30kDa와 1kDa ultrafiltration(UF) membrane을 이용하여 효과적으로 분리하였으며 분획내의 IGF-I은 SDS-PAGE와 Western blot으로 확인하였다.

분획한 IGF-I rich fraction이 murine macrophage의 면역 활성에 미치는 영향을 실험한 결과 1 μ g 투여군의 경우 IL-6는 7.3ng/ml, NO는 10.7 μ M을 생성하였고 Phagocytosis는 대조구 대비하여 65% 증진시켰다. TNF- α 의 분비량은 L929세포의 증식 저해율로 측정된 결과 대조구에 대비하여 30% 더 높은 저해율을 나타내었고, H₂O₂는 대조구에 대비하여 6% 더 높은 과산화수소를 생산하였다.

참 고 문 헌

1. Simmen, F. A. et al. (1988) *Dev. Biol.*, 130, 16.
2. Hossner, K. L. and Yemm, A. S. (2000) *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 32(3), 161.
3. Hossenlopp, P. et al. (1986) *Anal. Biochem.*, 154(1), 138.
4. Battelli, M. G. et al. (1999) *Clin. Chim. Acta.*, 281, 147.
5. Klimetzek, V. et al. (1980) *Cell Immunol.*, 53(2), 257.
6. Ding, A. H. et al. (1988) *J. Immunol.*, 141(7), 2407.
7. Green, L. C. et al. (1982) *Anal. Biochem.*, 126(1), 131.
8. Keller, R. et al. (1990) *Cancer Res.*, 50, 1421.
9. Flick, D. A. and Grifford, G. E. (1984) *J. Immunol.*, 68, 167.
10. Okimura, T. et al. (1986) *Jpn. J. Pharmacol.*, 41(2), 229.
11. Stossel, T. P. (1973) *Blood.*, 42(1), 121.
12. Nathan, C. F. and Root, R. K. (1977) *J. Exp. Med.*, 146(6), 1648.