

# Lactoferrin의 생리적 기능과 Lactoferricin의 항원결정기

남 명 수 · \*島崎敬一

KIST 생명공학연구소, \*일본 북해도 대학 농학부 축산과학과

## Biological Functions of Lactoferrin and Antigenic Determinants of Lactoferricin

M. S. Nam and K. Shimazaki

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Korea

\*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Japan

### I. 서 론

우유는 모든 식품 중에서 영양성분이 가장 균형 있게 함유되어 있는 “완전식품”으로 알려져 있는데 영양적으로 의의가 있는 성분만이 아니고 다종 다양한 생리활성물질이 포함되어 있다. 초유와 상유에는 면역글로불린 (IgA, IgM, IgG, IgE, IgD)이 있고 또한 비특이적인 기작용 하는 lactoferrin (LF), lysozyme, chemotactic factors 및 bifidus factor 등이 있다.

치즈의 제조과정에서 부산물로 생산되는 유청 또는 현재 상품가치가 없는 초유로부터 생리활성 물질을 추출하여 고부가가치 제품을 제조하는 것은 경제적 측면과 자원의 효율적 이용측면에서 대단히 의의가 크다(Shimazaki, 1989).

Lactoferrin은 human 초유에서의 함량은 6~8mg/ml이다. 이 함량은 정상유에서는 비유가 진행되는 동안 약 2mg/ml 으로 감소된다(Masson과 Heremans, 1971). 또한 bovine 초유에서는 5mg/ml 정도지만 정상유에서는 비유가 진행되는 동안 0.02~0.35 mg/ml 로 급격히 농도가 떨어진다.

Lactoferrin은 여러가지 생리적 기능을 가지고 있는데 유해한 미생물의 감염에 대한 방어작용 (Arnold 등, 1977), 유아의 장내에서의 철분흡수 촉진작용(Nemet와 Simonovits 등, 1985), myelopoiesis의 조절작용(Broxemeyer 등, 1980), 염증반응의 조절작용(Oseas 등, 1981), lymphocytes의 성장촉진효과(Hashizume 등, 1983) neutrophil에 의한 hydroxyl기의 생성(Ambruso와 Johnston, 1981), lysozyme regeneration의 감소 (Anderson과 Tomasi, 1977) 및 macrophage, granulocyte, neutrophil, leukocytes의 조절작용 (Bullen와 Armstrong, 1979) 등이 있으나 LF의 생리적 작용에 대한 중요성과 작용기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았기 때문에 앞으로 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

Lactoferrin의 산업적 이용은 LF의 여러가지 생리적 기능 특히 화학전달물질로서의 기능을 이용한 의약품 또는 항균작용을 이용한 식품산업의 이용 등을 생각할 수 있다. 현재 유아용 분유의 모유화의 일환으로서 LF가 첨가된 제품과 포유기의 송아지 육성을 위한 사료첨가제 등이 상품화 되어 있다. 또한 LF의 fragments에는 각종 생리활성 펩타이드가 검출되는 등 기능성 식품과 의약품 소

재료의 응용이 가능하다. 그 외에 식품가공의 공정으로 천연물이면서 동시에 안정한 첨가제로서 방부효과를 이용할 수 있는 것으로 생각된다. LF를 식품 또는 의약품으로 이용하는 것은 대상이 사람이라면 당연히 사람의 LF를 이용하는 것이 가장 좋으나 지금 당장은 대량으로 사람의 LF를 얻는다는 것은 불가능하나 현재 transgenic bovine 을 이용한 LF 대량생산 연구가 진행되고 있으므로 가까운 장래에 대량 생산이 가능하리라 생각된다.

본 연구는 LF의 생리적 특성에 관한 연구로 bovine colostrum과 human colostrum의 초유에 있는 LF를 정제하여 human monocyte/macrophage를 이용한 LF의 생리활성, LF의 면역증강 효과와 T 세포의 분화에 미치는 LF의 영향, LF가 Jurkat T cell의 IL-2 production에 미치는 영향 그리고 Lactoferricin(Lfcin) 단일클론항체를 이용한 Lfcin 항원결정기 mapping을 연구하여 기능성 식품과 의약품 소재로 이용하기 위한 기초자료를 얻고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시시료

Human milk는 대전소재 S 병원 산부인과에서 30세 미만 산모의 초유를 사용하였고 bovine milk는 국립종축원에서 Holstein 종의 초유를 시료로 사용하였다.

### 2. 실험동물

Inbred mouse인 Balb/c와 C<sub>3</sub>H/HeJ을 생명공학연구소 생물검정연구실에서 분양받아 실험에 이용하였다.

### 3. 초유로부터 LF의 분리정제

CM-Sephadex C-50-120 ion exchange chromatography을 행한 후 SDS-PAGE와 Western

blotting을 하여 정제를 확인하였다.

### 4. Human monocyte/macrophage를 이용한 LF의 생리활성조사

Monocyte/macrophage를 분리하여 Concanavaline A(Con A) 처리군, Con A + LF 처리군, Lipopolysaccharide(LPS) 처리군, LPS + LF 처리군, Phorbol myriste acetate(PMA) 처리군, PMA + LF 처리군, Poakeweed mitogen (PWM) 처리군, PWM + LF 처리군으로 나누어 실험하였다.

### 5. K-562 세포를 이용한 Colony Forming Unit(CFU) Assay

K-562 세포에 LF를 처리하여 배양하고 colony 형성을 관찰하였다.

### 6. LF의 면역증강효과

Balb/C mouse를 saline 처리군, human LF (HLF) 처리군, bovine LF(BLF) 처리군, LPS 처리군으로 나누어 7일간 주사후 vincristin-bovine serum albumin(VCR-BSA)을 주사한 다음, enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)로 VCR-BSA의 항체생산능 측정과 macrophage 수를 측정하였다.

### 7. LF가 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 분화에 미치는 영향

Balb/C mice의 thymocyte로부터 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 세포를 분리하여 LF를 처리하여 24시간 배양 후 세포의 분화를 측정하였다.

### 8. LF가 Jurkat T 세포의 interleukin-2(IL-2) 생산에 미치는 영향

Jurkat 세포를 PMA, OKT3, LF로 자극시킨 후 IL-2 production assay를 Cytotoxic T lym-

phocyte cell line(CTLL) cell로 측정하였다.

### 9. Lactoferricin B(Lfcin B)의 항원결정기 mapping

Lfcin B에 대한 단일클론항체를 제작한 후 Lfcin B를 chemical modification한 다음 단일클론항체와 반응시켜 항원결정기를 mapping 하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 초유로부터 lactoferrin의 분리정제

#### 1) 전기영동

동결건조한 human whey protein을 용해한 후 CM-Sephadex C-50-120 ion exchange chromatography에 흡착시켜 용출된 분획을 280 nm에서 흡광도를 측정한 결과 HLF 가 용출된 분획은 NaCl 350 mM과 500 mM 사이에서 대부분 용출되었다. 이러한 결과는 HLF 가 이온교환체에 대한 친화력과 전하가 있기 때문에 선택적인 용출을 하기 위하여 이온강도나 pH의 조건을 변화시키므로써 가능하다.

Shimazaki(1988)는 젖소의 초유에서 분리한 LF와 cheese whey에서 분리한 LF를 분자량, 항원성 그리고 철결합능 등을 비교하였는데 분자량과 항원성은 차이가 없었고 철결합능은 초유의 LF가 cheese whey의 LF보다 약 30% 정도 높았다고 보고하였다. 또한 Hiroshi 등(1987)은 anti-LF monoclonal antibody를 affinity gel인 Affigel-10에 부착시킨 column을 이용하여 HLF와 BLF를 순도가 각각 98%, 97%가 되도록 정제하였다고 보고하였는데, 본 실험에서 사용한 CM-Sephadex C-50-120 column으로는 어느 정도의 순도로 LF가 정제되어지는가를 전기영동, Western blotting 방법으로 확인하였다.

SDS-PAGE를 수행한 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 단일 band를 보임으로써 비교적 순수하게 정제된 것을 알



Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified human lactoferrin.

1. Standard molecular weight marker.
2. human whey protein.
3. CM-Sephadex peak- I.
4. CM-Sephadex peak- II.

수 있었다. 이 단일 band가 HLF인지를 확인하기 위하여 항원항체반응을 이용한 Western blotting을 행하였다.

#### 2) Western blotting

미정제된 단백질에서 특정 단백질을 항체에 의해 검출하기 위하여 사용하는 방법이 Western blotting이다. 이 방법의 가장 큰 장점은 고감도로서 항체에 따라서는 1 ng 정도의 항원물질도 검출할 수 있다고 알려져 있다. Western blotting을 수행한 결과는 Fig. 2와 같다. 119~132번 사이에서 분리된 모든 분획의 HLF은 anti-rabbit HLF IgG 항체와 반응하여 nitrocellulose paper 위에 82KDa의 단일 band로 확인됨으로 HLF가 효율적으로 정제되었음을 알 수 있었다. BLF도 HLF와 같은 방법으로 정제하여 실험에 사용하였다.

### 2. K-562 세포를 이용한 Colony Forming Unit (CFU) Assay

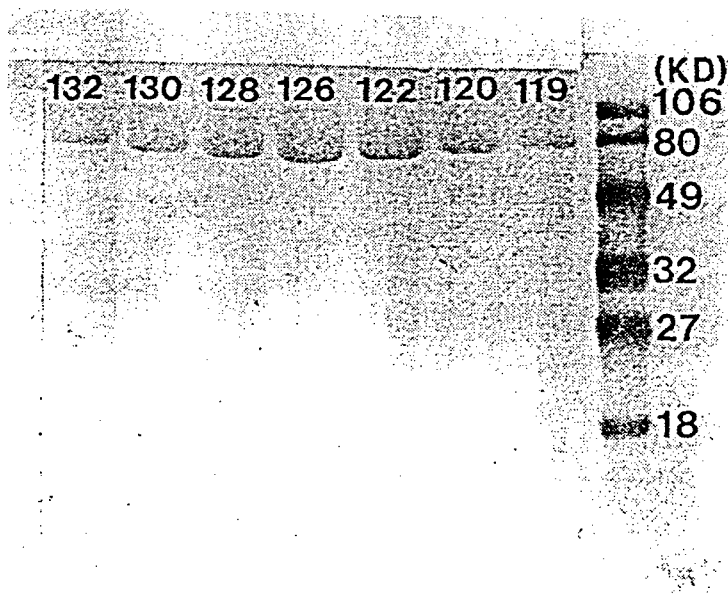


Fig. 2. Western blotting comparison of the eluted fractions from CM-Sephadex column chromatography. Each number corresponds to the number of fractions.

Chronic myelogenous leukemia 환자중 IL-1의 양이 높은 환자들에게 IL-1 저해제를 이용하여 치유가 가능한가를 알기 위하여 human chronic myelogenous leukemia (CML) 세포주인 K562를 이용하여 colony forming 분석을 행하였다. GM-CSF와 IL-1 $\beta$ 를 첨가한 다음 LF에 의하여 colony의 형성이 저해되는가를 관찰하였는데 결과는 Fig. 3과 같다. BLF가 10  $\mu$ l, 30  $\mu$ l 일 때는 colony 형성이 각각 30%, 35% 정도 저해되었고, HLF는 10  $\mu$ l 일 때는 거의 영향이 없었으며, 30  $\mu$ l 일 때는 약 30% 정도의 colony 형성이 저해되었다. 이와 같은 *in vitro* 실험결과는 임상에서 급성 또는 만성 백혈병 환자에게 적용할 수 있는 하나의 기준으로 사용될 수 있을 것이다. 골수성 백혈구(granulocyte) 생산의 조절은 feedback regulators의 복잡하고 중복된 작용에 의하여 조절되며 (Quesenberry, 1986; Robinson 등, 1975) granulocyte stem cell의 증식과 성숙에 가장 중요한 자극제는 colony-stimulating factor(CSF)이다.

LF는 *in vitro*에서 lymphocyte와 monocyte에 의하여 생산되는 CSF를 저해하며 (Bagby 등, 1981; Broxmeyer 등, 1978), 또한 granulopoiesis를 저해하는데, 이러한 과정은 cytokine에 의하여 조절되어지며 LF가 면역반응의 modulating의 공통요인으로 작용하는 것으로 생각된다 (Crouch 등, 1992).

### 3. 단핵구와 대식세포를 이용한 lactoferrin의 IL-1 생성억제

정상인의 혈액에서 단핵구와 대식세포를 분리하여 PWM, Con A, PMA, LPS 등의 자극원으로 세포를 자극하여 IL-1을 유도한 다음 BLF와 HLF의 생리활성을 조사한 결과는 Fig. 4와 Fig. 5에 나타난 바와 같다.

자극원에 의하여 IL-1이 유도된 배양액으로 C<sub>3</sub>H/HeJ mouse thymocyte의 <sup>3</sup>H-thymidine incorporation 실험을 한 결과, 여러가지 자극원 중

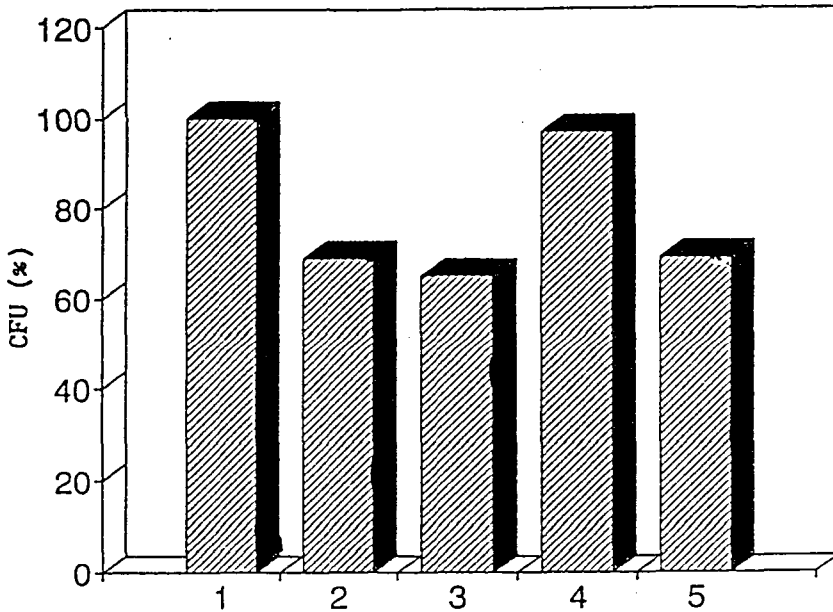


Fig. 3. Inhibition effect of BLF and HLF on the growth of K562 cells.

- 1: GM-CSF + IL-1
- 2: GM-CSF + IL-1 + BLF (10 µg/ml)
- 3: GM-CSF + IL-1 + BLF (30 µg/ml)
- 4: GM-CSF + IL-1 + HLF (10 µg/ml)
- 5: GM-CSF + IL-1 + HLF (30 µg/ml)

에서 대조군(media)에 비하여 PWM으로 자극한 배양액에서는 cpm 값이 33,300으로 가장 높게 나타났는데, PWM으로 자극한 다음 BLF와 HLF를 처리한 배양액에서는 BLF가 28,300이고 HLF는 30,230으로 나타났다. 즉 PWM 단독 처리구에 비하여 BLF는 15% 정도 HLF는 10% 정도의 IL-1 생성을 억제하였다.

Concanavaline A로 자극한 배양액에서는 cpm 값이 29,913이고, Con A에 BLF와 HLF를 처리한 배양액에서는 BLF가 20,128이고, HLF는 25,530으로 나타났으며 Con A 단독 처리구에 비하여 IL-1의 생성억제는 BLF가 33%, HLF는 15% 정도 나타났다. PMA로 자극한 배양액에서는 cpm 값이 21,232이고, PMA에 BLF와 HLF를 처리한 배양액에서는 BLF가 14,115이고, HLF는 16,635

로 나타났는데, LPS 단독처리구에 비하여 IL-1의 생성억제는 BLF가 33%, HLF는 22% 정도였다. LPS로 자극한 배양액에서는 cpm 값이 17,000이고, LPS에 BLF와 HLF를 처리한 배양액에서는 BLF가 11,000이고, HLF는 16,217로 나타났는데, IL-1의 생성억제는 BLF가 35%, HLF는 5% 정도였다.

이러한 결과는 단핵구와 대식세포가 LF에 대한 특이적인 수용체를 가지고 있기 때문에 LF와 결합(VanSnick와 Masson, 1976)하여 세포내로 신호를 전달하여 cytokine의 활성을 저해하는 것으로 생각되는데 이것은 LF가 면역반응의 modulator로 작용한다(Crouch 등, 1992)는 보고와 일치하는 것으로 생각된다.

또한 LF는 mononuclear cell(MNC)에서 방출

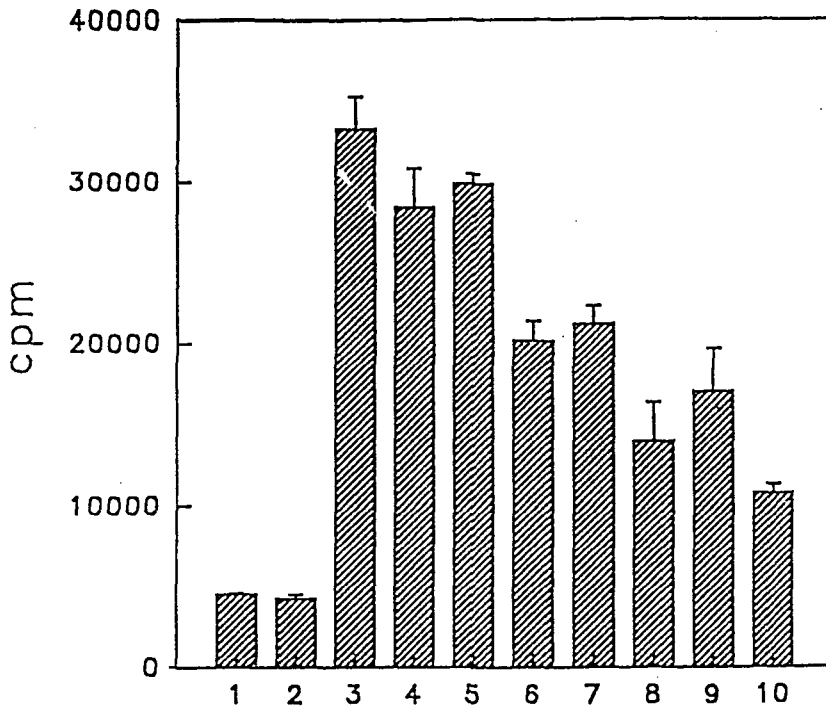


Fig. 4. Effects of BLF on IL-1 production by monocytes/ macrophages treated with various mitogens.

- |                            |                  |
|----------------------------|------------------|
| 1: Media                   | 6: Con A + BLF   |
| 2: BLF(10 <sup>-5</sup> M) | 7: PMA(10 μg/ml) |
| 3: PWM(10 μg/ml)           | 8: PMA + BLF     |
| 4: PWM + BLF               | 9: LPS(10 μg/ml) |
| 5: Con A(10 μg/ml)         | 10: LPS + BLF    |

되는 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF)와 IL-2도 억제한다고 보고하였다 (Crouch 등, 1992). 혈장에서 발견되는 LF의 유일한 공급원은 neutrophil로 체내에서 순환하는 neutrophil의 수와 혈장내 LF의 수준은 상호간 밀접한 관계가 있다(Baynes 등, 1986).

#### 4. Lactoferrin의 면역증강효과

##### 1) ELISA에 의한 항체의 역가측정

항체를 생성하는 능력을 가진 세포는 B 세포로서 전 세포의 약 10~15%를 차지한다. 이 세포는 혈액과 임파선 및 비장에 주로 분포되어 있으며,

항원의 자극과 T 세포의 도움으로 더욱 분화하여 성숙된 B 세포로 되고 결국에는 항체를 분비하는 형질세포로 변한다. 항체생성능력의 측정은 실험동물에 항원을 주사하여 유도된 면역반응을 주사한 항원에 대한 혈청내 면역글로불린의 역가로 나타낸다.

Lactoferrin이 hapten인 VCR-BSA 항체생성을 유도한 결과는 Fig. 6에 나타나 있다. 생리식염수 투여군(대조군)은 VCR-BSA 항체가 거의 생성되지 않는데 비하여 BLF와 HLF 투여군에서는 VCR-BSA 항체생성이 증가하였으며, 특히 BLF를 투여한 군에서는 양성대조군으로 사용한 LPS 투여군의 수준까지 VCR-BSA 항체역가가 증가함

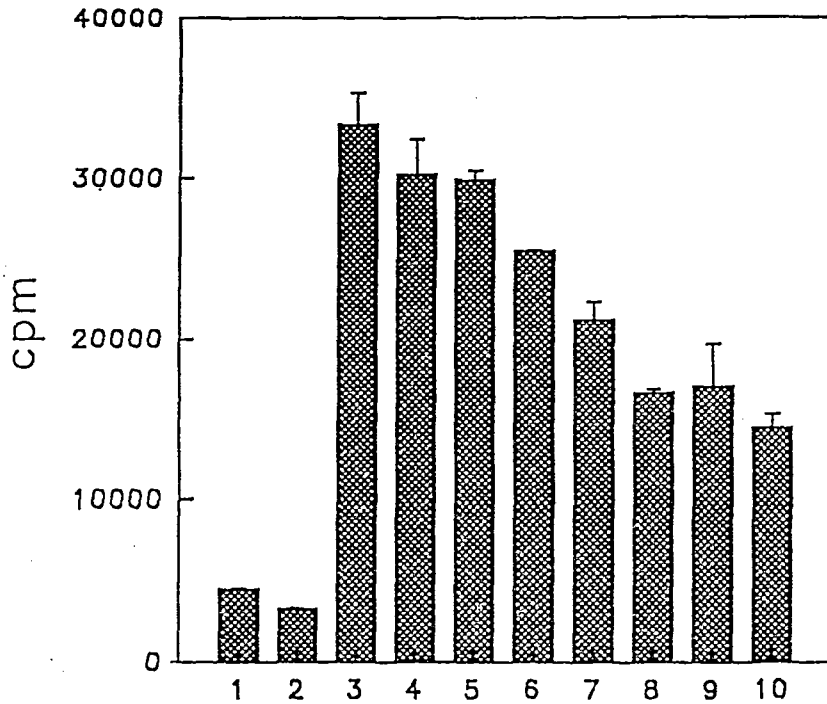


Fig. 5. Effects of HLF on IL-1 production by monocytes/ macrophages treated with various mitogens.

- |                            |                  |
|----------------------------|------------------|
| 1: Media                   | 6: Con A + HLF   |
| 2: HLF(10 <sup>-5</sup> M) | 7: PMA(10 μg/ml) |
| 3: PWM(10 μg/ml)           | 8: PMA + HLF     |
| 4: PWM + HLF               | 9: LPS(10 μg/ml) |
| 5: Con A(10 μg/ml)         | 10: LPS + HLF    |

을 알 수 있었다.

Lactoferrin이 leukocyte를 성숙시키고 B lymphocyte의 분화를 촉진시키며 (Broxmeyer, 1989), 이는 macrophage와 monocyte의 세포표면에 LF에 대한 특이적인 수용체가 존재하여 이들 세포의 증식분화를 촉진한다는 보고 (VanSnick와 Masson, 1976)와 더불어 본 실험결과로도 LF가 adjuvant 효과 즉 항체형성을 증가시키는 작용을 가지고 있다는 것을 알 수 있다. 한편 Zimecki 등(1991)은 체액성 면역반응을 plaque forming cell의 수로서 측정하였는데 HLF를 Balb/c mouse의 복강내에 투여한 결과 casein 보다 약 3배 정도 면역증가 작용이 있음을 보고하였다.

## 2) Macrophage 수 측정

Macrophage는 antigen presenting cell로 단백질과 같은 soluble form으로 침입한 항원을 세포내로 끌어들이어 작은 polypeptide 조각으로 분해시켜 MHC (major histocompatibility complex) 분자와 함께 세포표면으로 보내어 T 세포로 하여금 그 항원을 인식하게 함으로써 그 항원에 대한 면역반응을 유도하여 항체를 만들도록 한다. Macrophage의 이런 기능은 외부로부터의 자극에 의하여 활성화 되었을 때 더욱 그 기능을 발휘하게 되며 이러한 외부 자극은 lymphokine이나 endotoxin 등에 의하여 이루어진다 (Kuby, 1992).

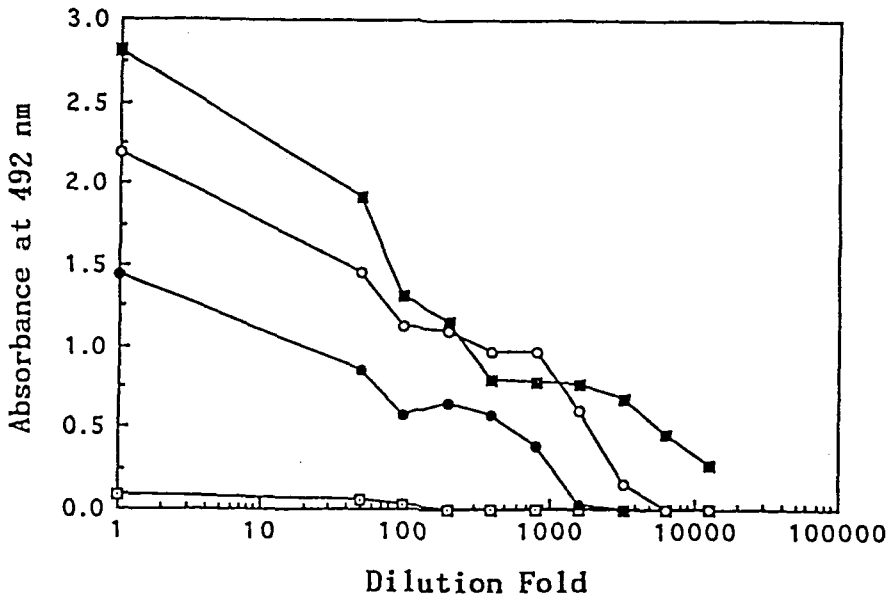


Fig. 6. Effects of saline, BLF, HLF and LPS on the antibody production in Balb/ c mouse immunized with VCR-BSA. Antibody production to VCR-BSA was measured by ELISA with subsequent serial dilutions of antisera.

□ : Saline  
○ : BLF  
● : HLF  
■ : LPS

항체의 Fc region과 결합하는 수용체를 가지고 있는 macrophage는 일반적으로 활성화되면 phagocytosis 기능이 향진되며 세포의 크기가 증가하고 여러가지 세포 분비물이 증가하게 되는데, LF에 의한 macrophage의 활성화와 lysozyme의 활성을 조사하기 위하여 LF 투여 후 Balb/c mouse의 복강내에서 macrophage를 회수하여 측정하였다. 실험 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 대조군에 비해서 HLF는 약 3배, BLF는 약 4배 정도 macrophage 수가 증가함을 알 수 있었다.

이러한 결과는 macrophage 및 monocyte가 LF에 대한 특이적인 수용체가 존재하여, 이 수용체가 LF와 결합하여 이물질들을 탐식하고 살균작용을 활성화 시킨다는 보고(VanSnick와 Masson, 1976; Bennet와 Davis, 1981; Steinman 등, 1982; Birgens 등, 1983)를 뒷받침하여 주는 것으

로 생각된다.

### 5. Lactoferrin이 T 세포 성숙에 미치는 영향

Lactoferrin이 T cell의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 세포를 Balb/c의 흉선세포로부터 분리하여 실험을 수행하였다. 분리된 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 세포를 BLF 처리군과 HLF 처리군으로 나누어 24시간 배양한 다음 flow cytometer로 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 세포의 분화를 측정하였다.

Fig. 8은 LF를 처리하지 않고 24 시간 배양 후 flow cytometer로 세포를 측정된 것으로 대조군인 peak 1과 비교하여 보면, J1j. 10 배양액을 처리한 peak 2는 T 세포 항체이므로 J1j. 10 배양액과 반응을 하여 fluorescence intensity가 증가하



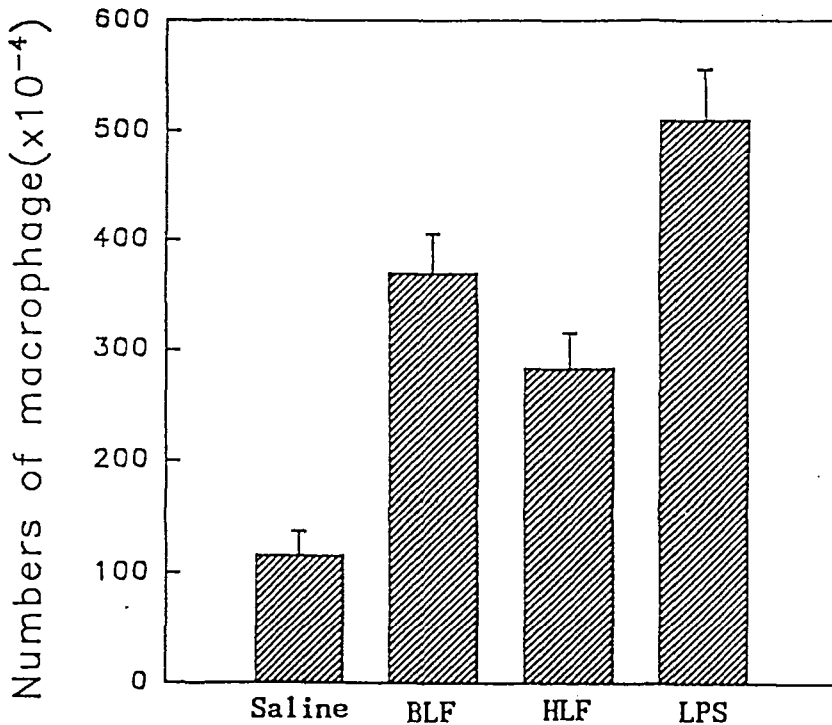


Fig. 7. Effects of saline, BLF, HLF and LPS on the macrophage numbers in Balb/ c mouse. The numbers of macrophage were counted by hemocytometer.

였고 peak 3과 peak 4는 CD4<sup>+</sup> 항체인 G.K. 1.5.3 배양액과 CD8<sup>+</sup> 항체인 3.168 배양액을 처리한 것으로 대조군인 peak 1과 비슷한 fluorescence intensity를 나타내고 있는데, 이는 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 세포가 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>로 증식분화가 거의 되지 않은 것을 보여주고 있다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 대조군인 peak 1과 비교하여 보면 J1j. 10 배양액을 처리한 peak 2는 T 세포 항체이므로 J1j. 10 배양액과 반응을 하여 fluorescence intensity가 증가하였고, peak 3은 CD<sup>+</sup> 항체인 G.K. 1.5.3 배양액을 처리한 것으로 역시 fluorescence intensity가 증가한 반면, CD8<sup>+</sup> 항체인 3.168 배양액을 처리한 peak 4는 대조군인 peak 1과 비슷한 fluorescence intensity를 나타내었다. 이러한 결과는 BLF가 T 세포의 한 종류인 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 세포 중

CD4<sup>-</sup> 세포에만 영향을 미쳐서 CD4<sup>+</sup> 세포로 증식분화 되었음을 알 수 있었다. Fig. 10는 HLF를 처리하여 24시간 배양 후 flow cytometer로 측정한 것으로 대조군인 peak 1과 비교하여 보면, J1j. 10 배양액을 처리한 peak 2는 T 세포 항체이므로 J1j. 10 배양액과 반응을 하여 fluorescence intensity가 증가하였고 peak 3과 peak 4는 CD4<sup>+</sup> 항체인 G.K. 1.5.3 배양액과 CD8<sup>+</sup> 항체인 3.168 배양액을 처리한 것으로 fluorescence intensity가 증가하였는데, 이는 처리한 HLF에 의해 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 세포가 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>로 증식분화되었음을 보여준다.

6. Lactoferrin이 Jurkat T cell의 IL-2 production에 미치는 영향

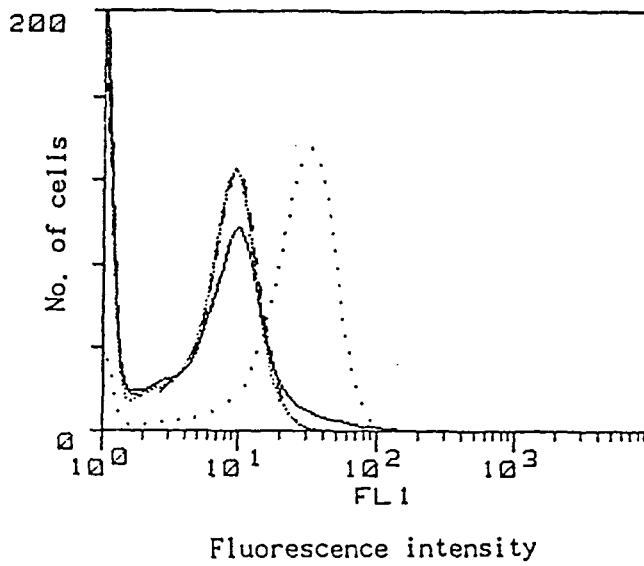


Fig. 8. Measurement of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> antigen to CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> thymocytes after 24 hours culture media.

- |                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| 1. Normal rat serum               | 3. G.K. 1.5.3 (anti-CD4 <sup>+</sup> antibody) |
| 2. J1j. 10 (anti-T cell antibody) | 4. 3.168 (anti-CD8 <sup>+</sup> antibody)      |

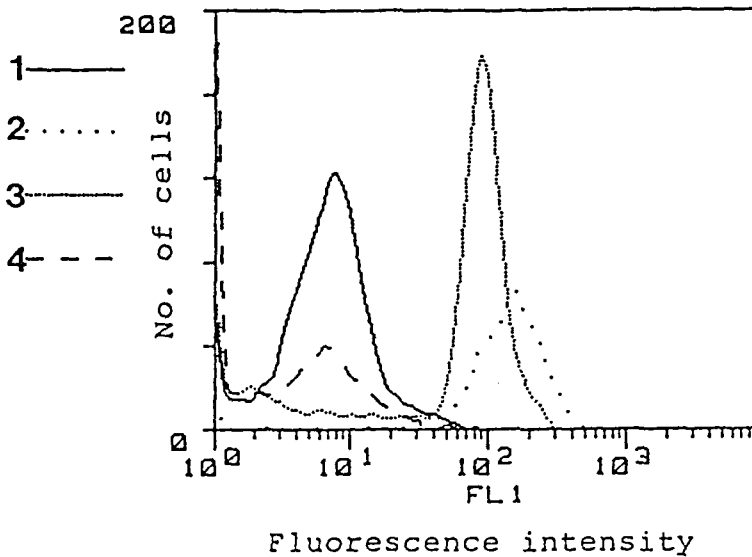


Fig. 9. Measurement of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> antigen to CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> thymocytes after 24 hours culture with BLF.

- |                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| 1. Normal rat serum               | 3. G.K. 1.5.3 (anti-CD4 <sup>+</sup> antibody) |
| 2. J1j. 10 (anti-T cell antibody) | 4. 3.168 (anti-CD8 <sup>+</sup> antibody)      |

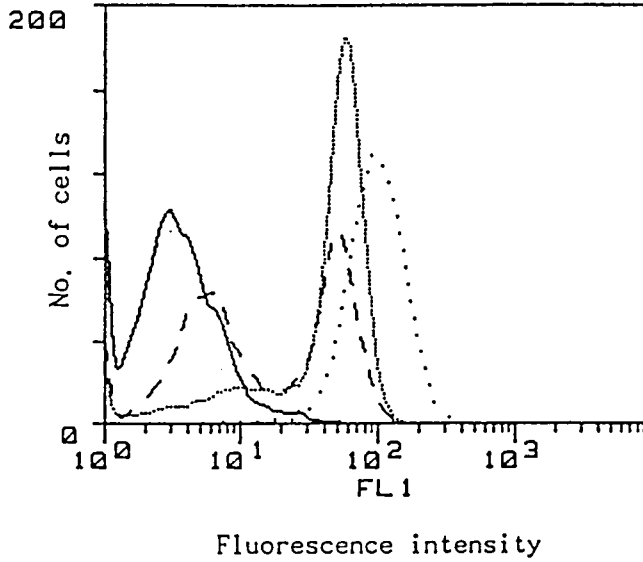


Fig. 10. Measurement of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> antigen to CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> thymocytes after 24 hours culture with HLF.

- |                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| 1. Normal rat serum               | 3. G.K. 1.5.3 (anti-CD4 <sup>+</sup> antibody) |
| 2. J1j. 10 (anti-T cell antibody) | 4. 3.168 (anti-CD8 <sup>+</sup> antibody)      |

Lactoferrin이 T cell의 분화를 유도하는 결과로 미루어 보아 T cell growth factor로 알려진 IL-2의 생성에 의한 것으로 생각되어 LF가 T cell의 IL-2 production에 미치는 영향을 알아보았다. IL-2는 T cell의 growth factor로 알려졌는데, 133 개의 아미노산으로 구성된 분자량 15.5KD의 당단백질로 (Taniguchi 등, 1983) T 세포 또는 일부 B 세포의 세포막에 존재하는 IL-2 수용체와 반응하여 T 세포의 증식 및 다른 killer 세포의 활성을 유도하는 기능을 갖고 있다.

Jurkat T cell에 OKT-3, PMA, LF 등을 처리하여 배양하고 그 배양액을 CTLL assay로 IL-2 생성을 측정하였다. Fig. 11과 Fig. 12는 각각 BLF와 HLF를 Jurkat T cell에 반응하여 IL-2를 생성한 결과를 측정한 것으로, PMA (50 ng) 처리군에서는 cpm 값이 2230, PMA (50 ng) +OKT3 (10  $\mu$ l) 처리군에서는 cpm 값이 4158, PMA (50 ng)+OKT3 (50  $\mu$ l) 처리군에서는 7151, BLF 단독 처리군에서는 cpm 값이 2322인데 비하여, PMA (50  $\mu$ g)+OKT3 (10  $\mu$ l)+BLF

(10  $\mu$ g) 처리군에서는 cpm 값이 9585로 가장 높았고, PMA (50 ng)+OKT3 (50  $\mu$ l)+BLF (50  $\mu$ g) 처리군에서는 cpm 값이 5601로 낮아졌음을 알 수 있다. 한편 HLF 단독처리군에서는 cpm 값이 2539인데 비하여, PMA (50 ng)+OKT3(10  $\mu$ l)+HLF (10  $\mu$ g) 처리군에서는 cpm 값이 8927로 역시 가장 높았고, PMA (50 ng)+OKT3 (50  $\mu$ l)+HLF (50 ug) 처리군에서는 cpm 값이 6133으로 낮아졌음을 알 수 있다. 이런 결과로 보아 LF 단독으로는 IL-2를 거의 생성하지 않지만 자극원인 PMA와 OKT3, 그리고 LF을 함께 처리하여 자극하면 이들 상호간의 신호전달에 의한 상승효과로 T cell의 growth factor인 IL-2를 생성하므로 이것이 T cell의 분화에 영향을 미치는 것으로 생각되어진다.

### 7. Lactoferricin B(Lfcin B)의 항원결정기 mapping

일반적으로 잘 알려진 LF의 항원작용보다 수십

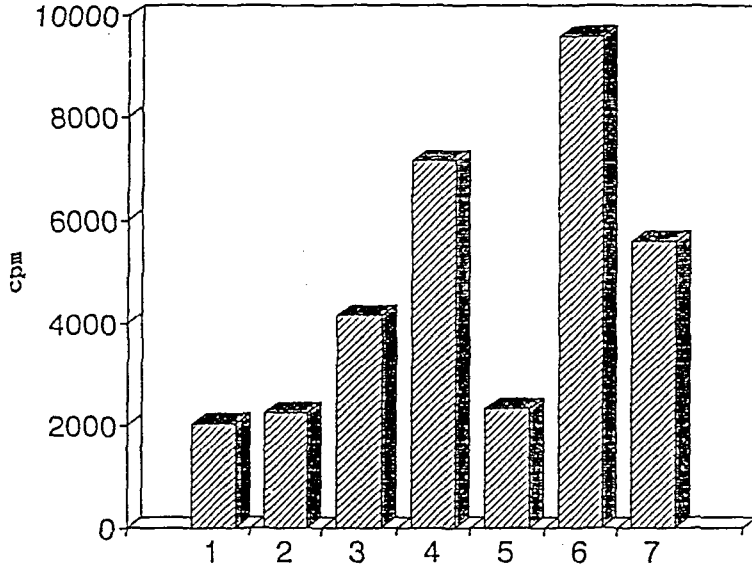


Fig. 11. IL-2 production assay on activated Jurkat cells after 48 hours culture with BLF.

- |                                    |   |
|------------------------------------|---|
| 1: Jurkat cells sup.               | 5: BLF (50 ng)  |
| 2: PMA (50 ng)                     | 6: PMA (50 ng) + OKT3 (10 $\mu$ l) + BLF (10 $\mu$ g) |
| 3: PMA (50 ng) + OKT3 (10 $\mu$ l) | 7: PMA (50 ng) + OKT3 (50 $\mu$ l) + BLF (50 $\mu$ g) |
| 4: PMA (50 ng) + OKT3 (50 $\mu$ l) |   |

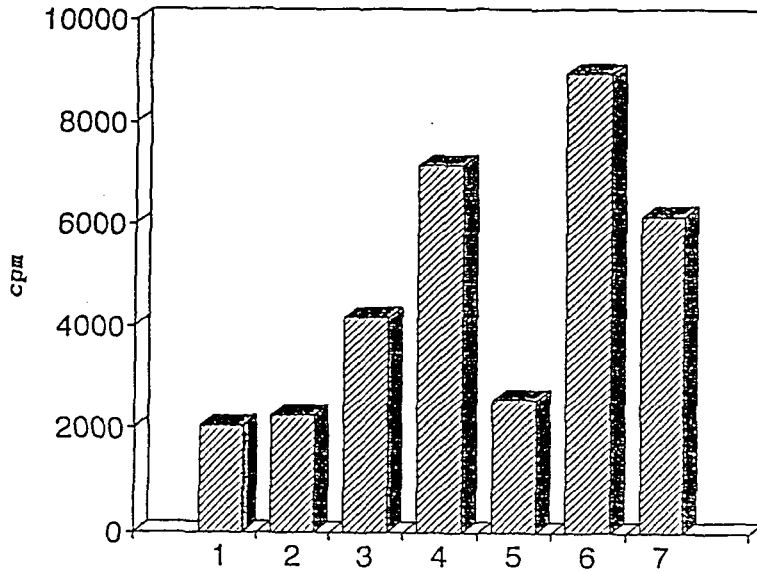


Fig. 12. IL-2 production assay on activated Jurkat cells after 48 hours culture with HLF.

- |  |   |
|--|---|
| 1: Jurkat cells sup. /well               | 5: BLF (50 $\mu$ g) /well                                   |
| 2: PMA (50 ng) /well                     | 6: PMA (50 ng) + OKT3 (10 $\mu$ l) + HLF (10 $\mu$ g) /well |
| 3: PMA (50 ng) + OKT3 (10 $\mu$ l) /well | 7: PMA (50 ng) + OKT3 (50 $\mu$ l) + HLF (50 $\mu$ g) /well |
| 4: PMA (50 ng) + OKT3 (50 $\mu$ l) /well |   |

배의 항원작용이 높은 LF의 fragments 중 bovine의 fragment를 Lfcin B라 부르고, human의 fragment를 Lfcin H라고 한다. Bovine LF는 17번 아미노산부터 41번 아미노산까지가 Lfcin B이고 human LF는 1번 아미노산부터 47번 아미노산까지가 Lfcin H이다. Lfcin B의 항원결정기를 mapping 하는 것은 LF와 Lfcin B의 생리적 기능과 그들의 구조적 conformation 사이의 관계를 밝히고, Lfcin B에 특이적인 단일클론항체는 Lfcin B의 생리적 특성을 밝히는 데 유용한 실험도구이다.

Lfcin의 단일클론항체를 제작하여 limit dilution 방법으로 5개의 클론을 선택하여 항체생산을 측정 한 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 2개의 클론에서 IgG1의 항체를 생산하는 것을 확인하였다. 이 두 종류의 항체를 이용하여 항원결정기 mapping 실험에 이용하였다. Lfcin B의 항원결정기를 mapping하기 위해서 Lfcin B를 2개의 fragments로 나누어서 Lfcin B 항체와 반응시켜 이 두 fragments 중 어느 fragment와 반응하는지를 알아보기 위하여 Lfcin B의 disulfide bond 결합을 절단하기 위해서 pyridylethylation 후, Fig. 13에서 보는 바와 같이 reverse-phase HPLC에 의해 2개의 Fraction을 얻었다. Disulfide bond를 절단 후 cyanogenbromide를 처리하여 Lfcin B의 methionine 잔기 부분을 절단한 결과, Fig. 14에서 보는 바와 같이 3개의 작은 peak를 얻었다. 이 3개의 peak를 각각 농축하여 ELISA 방법으로 Lfcin 항원항체 반응을 측정하였다. 이 결과 peak

3만이 Lfcin 항체와 반응하였다. 이 결과는 두 가지 가능성을 생각할 수 있다. 하나는 Lfcin epitope이 2개의 fragments로 분리되어진 부분일 가능성이 있는데, 만약 이 부분이 epitope이라면 methionine 부분을 중심으로 2개의 fragments로 분리되었기 때문에 항원성을 잃어서 항체와 반응하지 않는다. 또 하나는 epitope이 N-terminal 측 methionine 잔기에 매우 가까이 있어서 CNBr의 처리결과 형성된 peptidyl homoserine lactone이 항체의 결합을 방해하는 것으로 생각할 수 있다.

Lfcin B epitope을 mapping하기 위하여 Lfcin B의 tryptophan과 methionin 주위를 중심으로 Fig. 15에서 보는 바와 같이 50 종류의 peptide를 합성하여 lfcin B 단일클론항체와 반응을 시켰다. 이 결과 positive 반응은 1, 2, 9, 10, 11, 18, 19, 20, 28, 29, 30, 31, 32, 39, 40, 41, 42번이었다. 단일클론항체에 의해 인식되어진 각 peptides의 공통 sequence는 "QWR"이었다. Fig. 16에서 나타난 바와 같이 Lfcin B의 항원결정기는 "QWR"로 확인되었다.

Crystallographic 연구로부터 Lfcin sequence는 protein molecule이 folding 되어진 바깥부분에 나타났고, 미생물 표면을 목표 부위로 하는 상호작용에 이용이 가능하다. Native LF는 Lfcin B의 단일클론항체와는 cross reaction이 없었다. 이것은 Lfcin B의 epitope site을 함유하고 있는 아미노산잔기중 적어도 몇 개가 표면으로부터 숨겨져 있을 가능성이 있다고 생각한다. Lfcin B 항체는 LF와 Lfcin B가 섞여있을 경우, Lfcin B를 특

Table 1. Identification of monoclonal antibody subclass by ELISA

Clone No.	Ig subclass				
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM
1-2	+	-	-	-	-
4-2	-	-	-	-	-
4-3	-	-	-	-	-
4-4	-	-	-	-	-
5-4	+	-	-	-	-

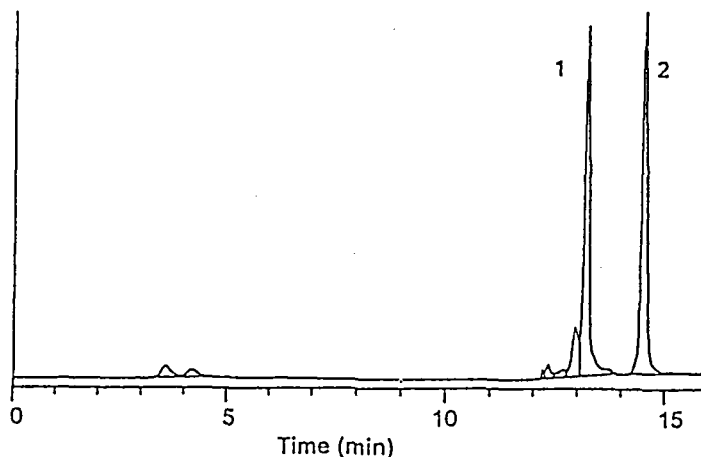


Fig. 13. Separation of pyridylethylated lactoferricin<sup>®</sup> B (peak 1) and intact lactoferricin<sup>®</sup> B (peak 2). The column used was TSKgel ODS-80Ts and detection was at 210 nm.

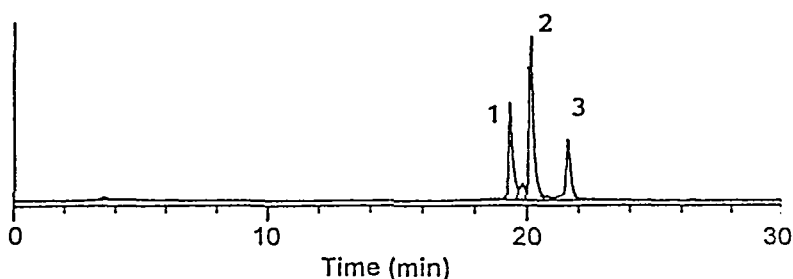
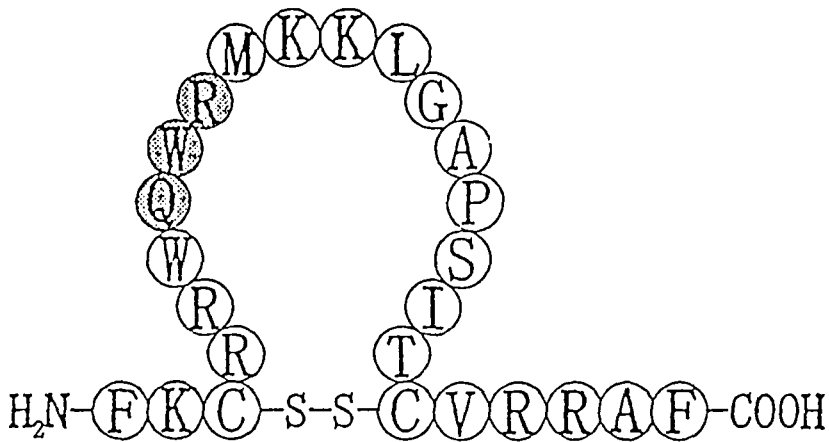


Fig. 14. Separation of the pyridylethylated lactoferricin<sup>®</sup> B (peak 3) and its fragments (peak 1 and 2) after cyanogen bromide treatment. The column used was TSKgel ODS-120T and detection was at 210 nm.

1 <u>WQWR</u>	14 MKKLG	26 KLGAPS	39 <u>KCRRQWR</u>
2 <u>QWRM</u>	15 KKLGA	27 LGAPSI	40 <u>CRRQWRM</u>
3 <u>WRMK</u>	16 KLGAP	28 <u>CRRWQWR</u>	41 <u>RRWQWRMKK</u>
4 <u>RMKK</u>	17 LGAPS	29 <u>RRWQWRM</u>	42 <u>RWQWRMKK</u>
5 <u>MKKL</u>	18 <u>RRWQWR</u>	30 <u>RWQWRMK</u>	43 <u>WQWRMKKL</u>
6 <u>KKLG</u>	19 <u>RWQWRM</u>	31 <u>WQWRMKK</u>	44 <u>QWRMKKLG</u>
7 <u>KLGA</u>	20 <u>WQWRMK</u>	32 <u>QWRMKKL</u>	45 <u>WRMKKLGA</u>
8 <u>LGAP</u>	21 <u>QWRMKK</u>	33 <u>WRMKKLG</u>	46 <u>RMKKLGA</u>
9 <u>RWQWR</u>	22 <u>WRMKKL</u>	34 <u>RMKKLGA</u>	47 <u>MKKLGAPS</u>
10 <u>WQWRM</u>	23 <u>RMKKLG</u>	35 <u>MKKLGAP</u>	48 <u>KKLGAPSI</u>
11 <u>QWRMK</u>	24 <u>MKKLGA</u>	36 <u>KKLGAPS</u>	49 <u>KLGAPSIT</u>
12 <u>WRMKK</u>	25 <u>KKLGAP</u>	37 <u>KLGAPSI</u>	50 <u>LGAPSITC</u>
13 <u>RMKKL</u>		38 <u>LGAPSIT</u>	

Fig. 15. Reactivity of anti-lactoferricin<sup>®</sup> B mAb against synthetic peptides prepared by SPOTs<sup>™</sup>. Bold letters indicate that positive reactivity was observed (21, 43 and 44 were weakly positive). A common sequence in peptides reactive with the mAb is underlined.



## *lactoferricin<sup>®</sup> B*

Fig. 16. A fragment corresponding to the 17-41 amino acids of bovine lactoferrin. The black portions represent segment of the lactoferricin epitope.

이하에 찾는데 유용한 기구로 이용할 수 있다. 앞으로 Lfcin B에 대한 생리적 특성을 *in vivo*와 *in vitro*에서 많은 연구가 이루어질 것으로 기대한다.

본 연구는 사람과 소의 초유에 존재하는 LF를 정제하여 IL-1의 활성화에 미치는 영향, 면역증강효과와 T 세포의 분화에 미치는 영향 등의 생리적 특성을 연구하였고, Lfcin B의 항원결정기를 mapping 하였다. 결론적으로 LF는 여러가지 면역조절기능이 있는 IL-1 및 IL-2와 작용하여 인체를 방어하는 면역체계에 기여하는 것으로 생각되어 기능성 식품 및 의약품의 소재로 이용 가능성이 있는 것으로 사료된다. 금후 이러한 생리적 특성에 미치는 정확한 신호전달 기전을 밝히는 연구가 더욱 필요하리라 생각된다.

### IV. 요약

1. CM-Sephadex C-50-120 column을 사용하여 HLF를 효과적으로 정제하였다. CM-Sephadex 50-120 column chromatography를 수행

한 결과, HLF는 NaCl 350 mM-500 mM 사이에서 용출되었으며, 용출된 분획을 SDS-PAGE를 수행해서 단일 band를 확인하였다. Anti-HLF antibody를 이용한 Western blotting 결과 nitrocellulose paper 상에 단일 band가 나타나므로 HLF가 효과적으로 정제되었다는 것을 알 수 있었다.

2. Con A, PWM, PWA, LPS 등의 자극원으로 단핵구와 대식세포를 자극한 다음 BLF를 처리한 배양액을 IL-1 bioassay한 결과는 Con A 33%, PMA 33%, PWM 15%, LPS 35% 이고, HLF로 처리하여 IL-1 bioassay를 한 결과는 Con A 15%, PMA 22%, PWM 10%, LPS 5%로 감소된 것으로 나타났다.
3. K-562 세포를 이용한 colony forming assay에서 BLF가 10 g/ml일 때는 30%, 30 g/ml일 때는 35%, HLF는 10 g/ml일 때는 5%, 30 g/ml일 때는 30%의 저해를 나타냈다.
4. Lactoferrin의 면역증강효과를 알아보기 위하여 hapten인 VCR-BSA를 투여한 후, 생성

되는 항체생성능력을 ELISA로 비교하였다. 그 결과 HLF 및 BLF 투여군에서 대조군에 비하여 adjuvant 효과를 관찰할 수 있었다. 또한 이때 macrophage 수는 대조군에 비하여 HLF와 BLF를 투여한 군이 증가됨을 알 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 LF는 macrophage를 활성화 시켜서 항체 생성능력을 증가시키는 효과가 있음을 관찰할 수 있었다.

5. Balb/c mouse의 thymus로부터 분리한 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 세포를 BLF로 처리하여 24 시간 배양한 후 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 세포의 분화를 측정한 결과, CD4<sup>-</sup>를 CD4<sup>+</sup>로 분화하였다. 그리고 HLF로 처리하여 24 시간 배양 후 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 세포의 분화를 측정한 결과, CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>를 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>로 분화하였다.
6. Lactoferrin이 T cell의 IL-2 production에 미치는 영향은 PMA 처리군, PMA+OKT3 처리군, LF 단독 처리군 보다 PMA+OKT3+LF를 처리한 군이 IL-2 생성에 영향을 미쳤다.
7. Lfcin B의 단일크론항체에 의해 인식되어지는 Lfcin B의 항원결정기는 "QWR"로 밝혀졌다.

## V. 인용문헌

1. Ambruso, D. R. and R. B. Johnston, 1981. Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions and an enzymatic generating system. *J. Clin. Invest.* 67:352-355.
2. Anderson, W. L. and T. B. Tomasi. 1977. Stimulation of reduced lysozyme regeneration by transferrin and lactoferrin. *Arch. Biochem. Biophys.* 182:705-709.
3. Arnold, R. R., M. F. Cole and J. R. McGhee. 1977. A bacteriocidal effect for human lactoferrin. *Science.* 197:263-265.
4. Bagby, G. C., V. D. Riga, R. M. Bennett, A. A. Vandenbark and H. S. Garewal. 1981. Interaction of lactoferrin, monocyte, and T-lymphocyte subsets in the regulation of steady state granulopoiesis *in vitro*. *J. Clin. Invest* 68:56.
5. Baynes, R. D., W. R. Bezwoda, Q. Khan and M. Mansoor. 1986. Relationship of plasma lactoferrin content to neutrophil regeneration and bone marrow infusion. *Scand. J. Haematol.* 37:353.
6. Bennet, R. M. and J. D. Davis. 1981. Lactoferrin binding to human peripheral blood cells. An interaction with a B-enriched population of adherent mononuclear cells. *J. Immunology.* 127:126-127.
7. Birgens, H. S., N. E. Hansen, H. Karle and L. O. Kristensen. 1983. Receptor binding of lactoferrin by human monocyte. *Br. J. Haematol.* 54:383-391.
8. Broxmeyer, H. E., A. Smithyman, R. R. Eger, P. A. Meyers and M. DeSoursa. 1978. Identification of lactoferrin as the granulocyte-derived inhibitory of colony-stimulating activity production. *J. Exp. Med.* 148:1052-1067.
9. Broxmeyer, H. E., M. De Sousa, A. Smithyman, P. Ralph, J. Aamilton, J. Kurland and Bognack. 1980. Specificity and modulation of the action of lactoferrin, a negative feedback regulator of myelopoiesis. *Blood* 55:324-333.
10. Broxmeyer, H. E. 1989. Iron in Immunity, Cancer and Inflammation, Edited by M. DeSousa and J. M. Brock, John Wiley & Sons Ltd. New York, PP. 199-221.
11. Bullen, J. J. and J. A. Armstrong. 1979. The role of lactoferrin in the bacteriocidal function of polymorphonuclear leucocyte. *Immunology* 36:781-784.
12. Crouch, S. P. M., K. J. Slater and J. Fle-



- tcher. 1992. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood* 80:235-240.
13. Hashizume, S., K. Kuroda and M. Murakami. 1983. Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphatic cells lines in serum-free medium. *Biochim. Biophys. Acta* 763:377-382.
  14. Hiroshi, K., S. Hiroshi, I. D. Shun and S. Yukio. One-step isolation of lactoferrin using immobilized monoclonal antibodies. *J. Dairy Sci.* 70:752-757.
  15. Kuby, J. 1992. *Immunology*. W. H. Freeman and Company. New York, pp. 225-227.
  16. Masson, P. L. and J. F. Heremans. 1971. Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B:119-129.
  17. Nemet, K. and I. Simonovits. 1985. The biological role of lactoferrin. *Haematol.* 18:3-1222.
  18. Oseas, R., H. H. Yang, R. L. Baehner and L. A. Boxer. 1981. Lactoferrin: A promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *Blood*. 57:939-945.
  19. Quesenberry, P. J. 1986. Synergistic hematopoietic growth factors. *Int. J. Cell Cloning*. 4:3-15.
  20. Robinson, W. A. and A. Mangalik. 1975. The kinetics and regulation of granulopoiesis. *Semin. Hematol.* 12:7-25.
  21. Shimazaki, K. I. 1988. Comparison of structure and iron binding capacity of lactoferrin obtained from colostrum and cheese whey. *Japanese J. of Dairy and Food Science.* 37. (40):A137.
  22. Shimazaki, K. I. 1989. Separation and utilization of bovine lactoferrin. *Japanese J. of Dairy and a Food Science.* 38. (6):A277.
  23. Taniguchi, T., H. Matsui, T. Fujita, C. Takaoka and N. Kashima. 1983. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature.* 302:305-310.
  24. VanSnick, W. L. and P. L. Masson. 1976. The binding of lactoferrin to mouse peritoneal cells. *J. Exp. Med.* 144:1568-1580.
  25. Zimecki, M., T. Mazurier, M. Machnicki, Z. Wiczorek, J. Montreuil and G. Spik. 1991. Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> murine thymocytes. *Immunology Letters.* 30: 119-123.