

랫드의 호중구 탐식능에 있어서 계란백유래물질의 효과

김기홍 · 나기정 · 양만표¹
충북대학교 수의과대학

Effects of Chicken Egg White Derivatives on Neutrophil Phagocytosis in the Rats

Ki-hong Kim, Ki-jeong Na and Mhan-pyo Yang¹
College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University,
Cheongju 361-763, Korea

ABSTRACT : Effects of chicken egg white derivatives (EWD and EF-203) on the changes of blood cells and the neutrophil phagocytic activity were examined in the rats. Rats were administered orally with either EWD (200 mg/kg) or EF-203 (200 mg/kg) for 3 days. Thereafter, the changes of blood cell values (RBC, WBC, platelets, PCV, differential count of neutrophils) and the phagocytic activity of neutrophils were evaluated for 7 days. The numbers of WBC and the differential count of neutrophils of rats administered with either EWD or EF-203 were significantly increased ($p < 0.05$ to 0.01) when compared to those of control rats receiving saline alone. In addition, the phagocytic activity of neutrophils was remarkably augmented ($p < 0.01$) by administration of either EWD or EF-203, suggesting that these egg white derivatives have an immunostimulating potent. And the numbers of platelets were also remarkably enhanced ($p < 0.01$) by administration of either EWD or EF-203, indicating that these substances also have a stimulating effect of platelets. However, there was no change in the values of RBC and PCV regardless of administration of either EWD or EF-203. These results suggested that chicken egg white derivatives including EWD and EF-203 induce the increase of platelets and the enhancement of nonspecific immunity on neutrophils.

Key words : chicken egg white derivatives, neutrophils, phagocytosis, rats

서 론

동물에 있어서 탐식세포의 면역기능 강화나 각종 감염에 대한 예방 및 치료 대책의 일환으로 면역증강제의 사용에 기대가 높다^{1,2}. 정상상태에서 비특이적인 면역기능의 활성화는 다수의 병원성 미생물에 대한 방어능을 향상시키고¹⁰, 감염상태에 있는 동물에서 이 기능의 활성화는 치료요법에 있어서 보조적인 역할을 수행하게 한다¹⁵.

유약동물이나 노령동물에 있어서 항생제 내성균의 출현^{4,6,7}, 주위환경으로부터의 스트레스, 한정된 예방접종, 병원성 바이러스의 변이 등 여러 요인들로부터 동물을 효과적으로 방어하는 데는 어려움이 따른다. 그러므로 이 시기에는 특이적인 면역의 증강도 중요

하지만 비특이적인 면역의 기능을 높은 수준으로 유지하는 것도 요구된다^{12,13,19}. 유약동물과 노령동물에서 면역증강제를^{12,13,19} 사용하여 생체내 방어기능을 담당하는 백혈구의 수와 기능을 증강시키는 것은 감염성 질병에 대해 저항성을 증가시키는 것으로서 염증성 질병이나 면역기능저하 동물에 있어서 합병증 유발을 예방하는데 매우 중요하다^{4,6,7}. 특히 호중구는 감염의 초기단계에서 탐식작용을 통해 병원성 미생물에 대한 생체내 방어에 중요한 역할을 수행하는 세포이다^{15,20}.

계란백유래물질(EWD)과 계란백유래 면역활성 펩티드(EF-203)는 계란의 난백성분중 lysozyme과 biotin 결핍증을 유발하는 avidine을 제거한 것으로⁹ 말초혈액 탐식세포의 유주성과 탐식능을 자극하는 것으로 제안되어져 왔다¹⁰. 또한 여러동물에서 여러가지 비특이적인 면역을 증강시키는 효과가 나타났다^{1,2,8,12,21}.

따라서 본 연구의 목적은 환축에 적용시키기에 앞

¹Corresponding author.

서 실험동물인 랫드에서 EWD 또는 EF-203의 말초혈액 혈구세포의 변화와 말초혈액 호중구의 탐식능 증강효과를 알아보는 데 있다.

재료 및 방법

실험동물

5주령 암컷 Sprague-Dawley 랫드(대한 실험동물센터)를 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 밤과 낮의 주기를 유지하고, 물과 사료는 자유급식시켜 실험에 사용하였다.

실험설계

실험동물을 무처치대조군, EWD(Eisai Co., Ltd., Tokyo, Japan) 투여군, EF-203(Eisai Co., Ltd., Tokyo, Japan) 투여군으로 분류하여 각 8마리씩을 실험에 사용하였다. 계난백유래물질(EWD 또는 EF-203) 투여군은 200 mg/kg의 용량으로 3일간 위 카테타를 이용하여 경구 투여하였고, 무처치대조군은 동일한 방법으로 동량의 생리식염수를 경구 투여하였다. 채혈은 투약전(실험 0일째), 실험 2, 5, 7, 10일째에 경정맥에서 실시하였다.

혈구세포

Ether 마취하에 경정맥으로부터 채취된 주사기를 이용하여 혈액을 2 ml 채혈한 후 30분 이내에 적혈구(RBC), 백혈구(WBC), 적혈구용적(PCV), 혈소판(Platelet) 수를 자동혈구측정기(Celltac α nihon koden, Japan)를 이용하여 측정하였다. 백혈구 감별계산은 혈액도말표본을 Wright-Giemsa 염색을 한 후에 광학현미경 400배의 배율에서 관찰하여 백혈구중 호중구의 상대적 수치를 계산하였다.

호중구의 탐식능 측정

혈액을 pH 7.6의 phosphate-buffered saline (PBS)로 1:1 희석한 후 동량의 Ficoll-hypaque(specific gravity, 1.077; Pharmacia, Japan)에 중층 한 다음 실온에서 $400 \times g$ 로 45분간 비중차 원심분리하여 말초혈액 다형핵백혈구(PMN)를 분리하였다. 분리한 PMN은 cytopsin 원심후 Wright-Giemsa 염색을 하여 관찰한 결과 호중구가 95% 이상을 차지하였다. 따라서 이하에서는 본 세포를 호중구로 기술하였으며, 호중구를 5% fetal calf serum(FCS, Gibco, MD, USA), 2 mM L-glutamine, 0.02 mg/ml gentamicin이 포함된 RPMI-1640(Sigma, USA)으로 희석하여 세포수를 2×10^4 cell/ml로 조정하였다. 세포를 24-multiwell plate(Falcon 3047,

Becton Dickinson Labware, NJ, USA)에 첨가하여 37°C , 5% CO_2 조건에서 2시간 배양을 한 후, 1×10^9 particles/ml로 제조한 FITC-labelled latex bead(latex beads; $2.0\mu\text{m}$; Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA)를 넣어서 1시간 동안 배양하였다. 회수한 세포를 3 mM EDTA-2Na(Wako Pure Chemical Industries, LTD, Tokyo, Japan) 함유 PBS를 이용하여 세포를 세척한 후, 5,000개의 세포를 Flow cytometry(FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA)를 이용하여 탐식능을 측정하였다¹⁸.

통계처리

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

결 과

적혈구 수와 적혈구용적(PCV)

실험기간 동안 적혈구 수의 변화는 나타나지 않았다(Table 1). PCV치에 있어서도 EWD 또는 EF-203을 투여한 군에서는 대조군과 비교하여 유의한 PCV의 변화가 관찰되지 않았다(Table 2).

혈소판 수

혈소판 수는 대조군에 비해서 EWD 또는 EF-203 투여군에서는 실험 5일째부터 10일째에 걸쳐 유의한($p < 0.01$) 증가가 나타났다(Table 3).

백혈구 수 및 호중구 감별치

EWD 투여군에서 혈중 백혈구 수의 변화는 실험 2일째부터 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다($p < 0.01$). EF-203 투여군은 EWD 투여군에 비해서는

Table 1. The changes of RBC values ($\times 10^6/\mu\text{l}$) in rats administered with either EWD or EF-203

	Time (day)				
	0	2	5	7	10
Control	7.47 ± 0.09	7.23 ± 0.26	7.49 ± 0.25	7.39 ± 0.27	7.34 ± 0.29
EWD	7.18 ± 0.31	7.36 ± 0.36	7.35 ± 0.03	7.48 ± 0.16	7.30 ± 0.40
EF-203	7.25 ± 0.31	7.28 ± 0.25	7.16 ± 0.16	7.50 ± 0.13	7.14 ± 0.24

The data represent mean \pm SEM (n=8).

Table 2. The change of PCV values (%) in rats administered with either EWD or EF-203

	Time (day)				
	0	2	5	7	10
Control	41.82 ± 1.88	40.93 ± 1.28	41.81 ± 1.24	42.40 ± 1.36	41.20 ± 1.33
EWD	40.95 ± 1.66	40.10 ± 1.20	42.54 ± 1.30	44.12 ± 1.48	41.01 ± 1.76
EF-203	40.83 ± 1.91	40.03 ± 1.21	42.46 ± 0.69	40.20 ± 1.28	40.00 ± 1.86

The data represent mean ± SEM (n=8).

Table 3. The change of platelet values ($\times 10^5/\mu\text{l}$) in rats administered with either EWD or EF-203

	Time (day)		
	0	5	10
Control	6.16±0.19	6.46±0.18	6.57±0.19
EWD	6.23±0.26	9.12±0.25**	8.05±0.12**
EF-203	6.14±0.17	8.78±0.14**	7.16±0.12**

The data represent mean ± SEM (n=8).

**p<0.01, compared to control rats.

백혈구 수의 증가가 낮지만 대조군에 비해서 실험 2, 5일째 유의성 있는 증가(p<0.05-0.01)가 나타났다(Fig 1). EWD 또는 EF-203에 의한 백혈구 수의 증가는 실험 5일 이후부터 감소하여 실험 10일째에는 대조군의 범위로 돌아가는 경향을 보였다(Fig 1). 호중구 감별치의 변화는 실험 2일째 이후부터 EWD 또는 EF-203 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가(p<0.05-0.01)를 나타냈다(Fig 2). 이러한 증가는 실험 7일째 최고치를 나타내고 서서히 대조군치로 돌아가는 경향을 나타냈다.

호중구 탐식능

실험 2일째부터 EWD 투여군에서는 대조군에 비해 현저한 탐식능 증가가 관찰되었다(p<0.01). EF-203 투여군에서는 대조군에 비해 실험 5일째부터 뚜렷한 탐식능 증가가 나타났다(p<0.01). 탐식능의 증가는 5일째 이후부터 서서히 대조군치로 떨어지는 경향을 보였다(Fig 3).

고 찰

제난백유래물질인 EWD는 11가지의 단백질성분으로 구성된 물질이며⁹, EF-203은 EWD의 활성성분들로 다

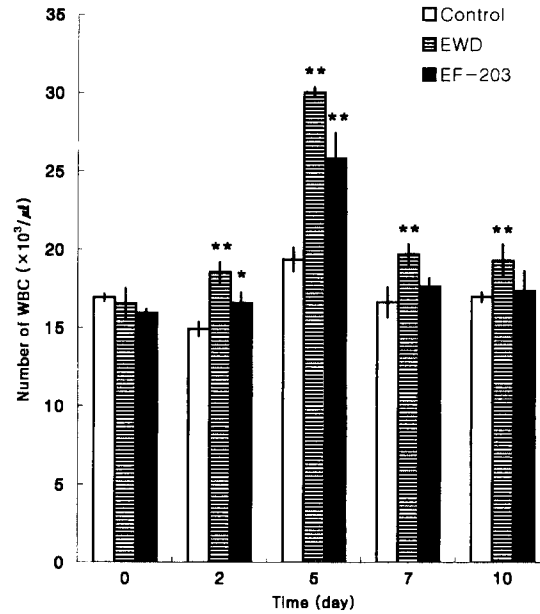


Fig 1. The change of WBC values in rats administered with either EWD or EF-203. The data represent mean ± SEM (n=8). **p<0.01, *p<0.05, compared to control rats.

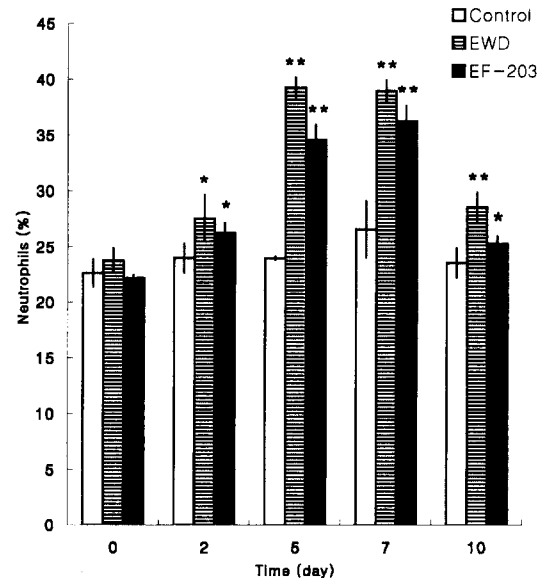


Fig 2. Differential count of neutrophils in WBC of rats administered with either EWD or EF-203. The data represent mean ± SEM (n=8). **p<0.01, *p<0.05, compared to control rats.

시 조성시킨 peptide이다¹².

본 연구의 결과에서 RBC와 PCV의 변화는 나타나

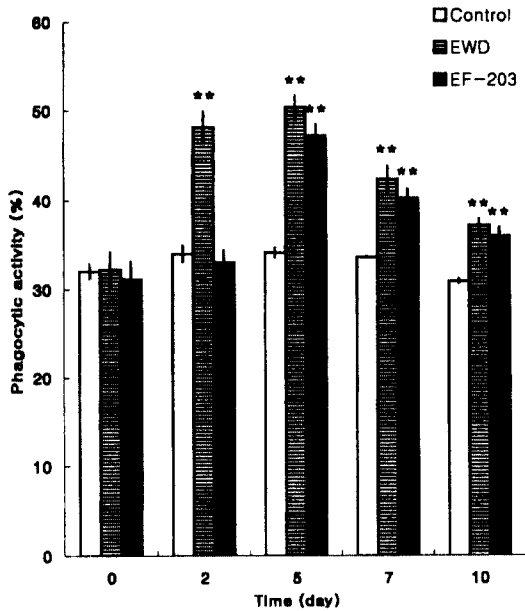


Fig 3. Phagocytic activity of neutrophils in rats administered with either EWD or EF-203. The data represent mean \pm SEM (n=8). **p<0.01, *p<0.05, compared to control rats.

지 않은 것으로 보아, EWD 또는 EF-203은 적혈구의 조혈 및 성숙에는 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다. 그러나 EWD 또는 EF-203은 혈중 백혈구 수와 호중구의 탐식활성을 증가시키는 것으로 나타나 계란백유래물질들은 특히 과립구계 세포들의 증식에 관여하며 또한 그 기능들을 증강시킬 수 있는 물질이었다. EWD 또는 EF-203의 백혈구 수 증가 및 탐식증강 기간은 7일 정도이고 그 이후 시간이 지남에 따라 정상으로 되돌아가는 것으로 나타났다.

최근의 보고에 의하면 mouse에 계란에서 유래된 물질을 경구적으로 투여했을 때 복강 macrophages의 탐식능을 증강시키고², *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus* 감염에 대해 숙주의 저항능력을 증강시켰다^{1,2}. 그리고 *in vitro* 상태에서 개의 말초혈액 다형핵백혈구와 단핵구세포의 탐식활성에 있어서 계란백에서 추출한 EWD의 탐식활성의증강효과가 보고되었다⁹. 소와 물고기에서도 계란백에서 추출한 물질의 비특이적 면역증강효과가 밝혀졌는데, 계란백에서 추출한 물질중의 하나인 AEWP를 경구적으로 투여한 결과 호중구의 *Staphylococcus aureus*에 대한 살균작용이 증가하였으며 이러한 계란백 추출물의 탐식세포에 대한 작용은 활성화된 단핵구세포에서 액성인자가 생산되어

일어나는 것으로 제안되었다^{8,10,12,21}. 본 연구에서 백혈구 수의 증가 및 호중구의 탐식활성증강도 생체내에서 EWD나 EF-203에 자극된 면역세포들 특히 단핵구세포들이 분비하는 cytokines, 즉 액상인자들에 의해 과립구계 세포들의 숫자가 증가되었을 것으로 생각된다. 이러한 cytokines으로는 과립구 증식인자로 interleukin(IL) 314와 granulocyte-colony stimulating factor(G-CSF)¹⁷ 등이 있다. 이 물질들은 면역증강물질이나 mitogen 등에 의해 조혈기계통에서 과립구계의 전구세포들의 증식과 성장을 촉진시킨다¹⁴. 또한 단핵구세포들에서 분비되는 액상인자들 중에는 탐식세포의 탐식능을 증강시키는 물질이 생산되어 호중구의 탐식능을 증강시켰을 것으로 추론된다. 탐식활성을 촉진시키는 cytokines으로는 IL 1 β ¹³, IL 6¹⁴, IL 8³, tumor necrosis factor (TNF)- α ^{11,16} 등이 있다. TNF- α 는 탐식활성을 증강시킬 뿐만 아니라 직, 간접적으로 조혈작용을 촉진시키는 것으로 보고되어지고 있다^{11,16}. TNF- α 는 transforming growth factor(TGF)- β , interferons, prostaglandins과 함께 조혈작용에 관여하는 물질로 알려져 있는데¹¹, 이것은 G-CSF의 수용체를 변형시켜 조혈작용을 촉진시키는 것으로 보고되어 있다^{5,11,16}. 따라서 본 연구에서의 EWD 또는 EF-203에 의한 백혈구 수의 증가효과와 호중구 탐식증강효과는 단핵구세포를 비롯한 기타 면역세포들이 분비하는 여러 가지 액상인자들, 예를 들면 G-CSF 및 TNF- α 와 같은 cytokines의 단독 또는 상호작용에 의해서 일어나는 것으로 사료되었다.

그러나 본 연구에서 EWD나 EF-203 투여로 혈소판 수의 증가가 나타났다. 이러한 사실은 EWD나 EF-203이 골수세포계에 있어서 혈소판 전구세포들을 활성화시키는 것으로 사료되나, 어떤 경로를 통해 혈소판 생성이 증가되는지 그리고 그 조절인자가 무엇인지는 계속적인 연구가 뒤따라야 할 것으로 보인다.

이상의 본 연구결과로부터 계란 유래물질인 EWD 또는 EF-203은 유약동물이나 면역기능저하 동물에 있어서 면역증강 목적으로 사료에 첨가할 수 있으며 또한 항생물질과의 병용투여로 질병의 치료에 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

결론

랫드의 혈구세포 변화와 호중구 탐식활성에 있어서 계란백유래물질(EWD 및 EF-203)의 효과를 검토하였다. EWD 또는 EF-203을 200 mg/kg의 용량으로 3일간 경구투여한 후, 7일간 혈구세포의 변화와 호중구의

탐식능을 알아 보았다. EWD 또는 EF-203을 투여한 군에 있어서 WBC 수와 호중구 감별치는 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다($p < 0.05-0.01$). 또한 호중구의 탐식활성에 있어서도 EWD 또는 EF-203을 투여한 랫드에서 유의한 탐식증강효과가 나타났다($p < 0.01$). 이러한 점은 계란백유래물질이 면역자극 작용이 있음을 시사하였다. 그리고 EWD 또는 EF-203을 투여한 랫드에 있어서 혈소판 수도 유의하게 증가된($p < 0.01$) 것으로 보아 혈소판 생성을 자극하는 효과도 있음을 제시하였다. 그러나 RBC 수와 PCV치에는 변화가 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 계란백유래물질(EWD 및 EF-203)은 혈소판 수의 증가 및 호중구의 비특이적 면역증강을 유도하는 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

1. Araki S, Kimura M, Suzuki M, Fujimoto M. Effect of egg white product on neutrophil function in weaning piglets. *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(5): 1055-1056.
3. Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med* 1991; 173: 771-774.
4. Chang HR, Grau GE, Pecher JC. Role of TNF and IL-1 in infection with *Toxoplasma gondii*. *Immunology* 1990; 69: 33-37.
5. Chen BD, Mueller M. Recombinant tumor necrosis factor enhances the proliferative responsiveness of murine peripheral macrophages to macrophage colony-stimulating factor but inhibits their proliferative responsiveness to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1990; 75(8): 1627-1632.
6. Chong KT. Prophylactic administration of interleukin-2 protects mice from lethal challenge with gram-negative bacteria. *Immunol* 1987; 55: 668-673.
7. Czuprynski CJ, Brown JF. Recombinant murine interleukin-1 α enhancement of nonspecific anti-bacterial resistance. *Infect Immun* 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) and recombinant bovine interferon alpha 1 (rBoIFN α 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 (rBoIFN α 1) in veterinary medicine. In 'Vaccines in Agriculture: Immunological Application to Animal Health and Production'. CSIRO Press: Melbourne, Australia, Aug. 1994; 15: 57-63.
11. Jacobsen SW, Ruscetti FW, Dubois CM, Keller JR. Tumor necrosis factor α directly and indirectly regulates hematopoietic progenitor cell proliferation: role of colony-stimulating factor receptor modulation. *J Exp Med* 1992; 175: 1759-1772.
12. 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.
13. Ozaki Y, Ohashi T, Minami A, Nakamura S. Enhanced resistance of mice to bacterial infection induced by recombinant human interleukin-1 α . *Infect Immune* 1987; 55: 1436-1440.
14. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Immunology*. 3rd ed. London, UK: Mosby-Year Book Europe Ltd. 1993: 13-32, 93-108.
15. 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.
16. Rusten LS, Jacobsen FW, Lesslauer W, Loetscher H, Smeland EB, Jacobsen SW. Bifunction effects of tumor necrosis factor α (TNF α) on the growth of mature and primitive human hematopoietic progenitor cells: involvement of p55 and p75 TNF receptors. *Blood* 1994; 83(11): 3152-3159.
17. Shirai R, Kadota J, Tomono K. Protective effect of granulocyte colony-stimulating (G-CSF) in a granulocytopenic mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection through enhanced phagocytosis and killing by alveolar macrophages through priming tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) production. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 73-79.
18. Steinkamp JA, Wilson JS, Saunders GC, Stewart CC. Phagocytosis: flow cytometric quantitation with fluorescent microspheres. *Science* 1982; 215: 64-66.
19. Uchida A, Klein E. Activation of human blood lymphocytes and monocytes by the streptococcal preparation OK432. *Immunol Lett* 1985; 10: 177-181.

20. Unanue ER, Allen PM. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 1982; 236: 551-557.
21. Yoshida T, Sakai M, Kitao T, Khilil 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.