大韓바이러스學會誌 : 第 29 卷 第 2 號 1999
J. Korean. Soc. Virology, Vol. 29, No. 2, 1999

락토페린이 국내분리 유아 로타바이러스의 MA 104세포 감염에 미치는 영향

건국대학교 축산대학 동물생명과학부[1], KIST생명공학연구소[2],
대구효성가톨릭대학교 의과대학 미생물학교실[3],

차광종[1*] · 유대열[2] · 이종기[3] · 유제현[1]

=Abstract=

Effect of Bovine and Human Lactoferrin on MA 104 Cell Infected with Human Rotavirus

Kwang-Jong Cha[1*], Dae-Yeul Yu[2], Chong-Kee Lee[3] and Jae-Hyeun Yu[1]

School of Animal Life Science, College of Animal Husbandry, Konkuk Univesity[1] Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology[2], Department of Microbiology, School of Medicine Catholic University of Taegu-Hyosung[3]

It has long been known that lactoferrin prevents human beings from infection of virus. To prove this activity of lactoferrin, we evaluated the activities of different lactoferrins to an isolate human rotavirus K-21. Bovine lactoferrin inhibited infection of K-21 to MA-104 cell at the concentration of 25.9 μM whereas bovine hydrolysed lactoferrin prevented rotavirus infection at 103.8 μM. However human lactoferrin prevented infection of K-21 at the concentration of 217.5 μM. These data suggested that lactoferrin activity may be unaffected by the intestinal digestive enzymes and bovine lactoferrin is more active than human lactoferrin with respect to prevention of rotavirus infection.

Key Words: Lactoferrin, Human rotavirus, Hydrolysed Lactoferrin, Digestive enzymes

서 론

로타바이러스는 세계적으로 가장 심한 증세를 나타내는 위장염 설사의 원인체로서 개발도상국에서는 로타바이러스 감염으로 매년 유아 약 100만이 사망하고 이는 전체 위장염으로 인한 사망자 중 20~25%를 차지한다. 세계 보건기구 (WHO)는 로타바이러스 감염에 대한 효율적인 억제와 예방을 최우선 과제로 삼고 있다 [9,23].

로타바이러스는 11개의 dsRNA 절편을 둘러싸고 있는 3개의 shell 즉 외피각, 내피각 및 core로 구성되어 있으며 구조단백질인 VP7과 VP4는 외피각을 이루고있고 바이러스의 혈청형을 결정한다. VP7 혈청형은 사람에서는 7종의 다른 혈청형이 관찰되었고 G1-G4의 4개 혈청형이 흔히 분리되고 있다. VP4 혈청형은 사람에서 6종의 다른 혈청형이 관찰되었고 P8과 P4의 2개 혈청형이 흔히 분리되고 있다 [13,32]. 그러나 사람에서도 송아지 로타바이러스 (bovine rotavirus: BRV)

접수 : 1999년 6월 15일
책임저자: 차광종, 서울시 광진구 모진동 93-1 건국대학교 축산대학 동물생명과학부 유가공연구실
Tel.: (02) 450-3688.

가 관찰되고 있다. Gerna 등 [15]은 이탈리아 유아로부터 BRV와 관련된 G6 혈청형의 로타바이러스 2주를 분리했고, Urasawa 등 [39]은 태국 유아로부터 BRV와 관련된 G10 혈청형의 로타바이러스를 분리했다.

로타바이러스는 다양한 혈청형에 의해 발병이 되고 있기 때문에 한 혈청형에 감염되었다 치료되더라도 다른 혈청형의 로타바이러스의 감염에 대한 방어 능이 형성되지 않기 때문에 효과적인 백신개발이 아직 되지 않고 있다 [8]. 로타바이러스의 감염을 막기 위해서 백신이 개발되어 왔지만 특별한 항체를 유아의 장관에 투입하는 어려움 때문에 바이러스에 대한 백신 시도의 성공은 의문으로 남아 있다 [14]. 이런 관점에서 볼 때, 식품성분에 의해 로타바이러스 저해를 막는 것이 이들 전체적인 문제를 해결하는 좋은 선택이 될 수 있다고 사료된다 [3].

젖은 각종 포유동물 새끼의 성장에 필요한 단백질, 지방, 무기질, 비타민 등의 우수한 급원이고 또한 각종 방어인자를 함유하고 있다. 특히 초유에는 면역 글로블린, 락토페린 (lactoferrin: LF), 라이소자임등의 생체방어에 기여하는 생리활성물질이 다량 함유되어 있다 [43]. Sorensen과 Sorensen [35]이 모유 중에 함유되어 있는 "붉은 단백질"을 LF이라고 처음 발표한 이래 1960년 Groves등 [18]은 우유 중에서 최초로 LF을 분리하였고 같은 해 Johansson [21]은 모유로부터 분리하였다. LF은 젖뿐만 아니라 타액, 눈물, 정액, 점액분비물 및 호중구 2차 돌기 등의 분비물 등에도 함유되어있는 분자량 81 KDa인 철 결합단백질이다 [16,33,31]. LF의 생리적 기능은 미생물 감염에 대한 방어작용 [2], 유아의 장내에서 철흡수 촉진작용 [29], 골수세포형성의 조절작용 [5], 염증반응의 조절작용 [30], 항암작용 [4], 임파구의 성장촉진효과 [20] 및 단핵구, 대식세포, 과립구, 호중구, 백혈구의 조절작용이 보고되었다 [1].

Human lactoferrin (HLF)과 bovine Lactoferrin (BLF)은 human immunodeficiency virus (HIV) 및 human cytomegalo virus (HCMV)의 MT4 세포 (T4 림파구세포)감염을 억제하고 [19], 또한 BLF은 SA11 (원숭이 로타바이러스)의 HT-29 세포 (사람의 결장선암 세포)감염을 억제하고 [36], human herpes simplex virus type 1 (HSV1) 및 type 2 (HSV2)의 Vero 세포 감염을 억제한다 [27].

본 연구는 유아 위장염을 일으키는 국내의 유아 분변으로 부터 분리한 K-21 strain과 표준 human rotavirus (HRV) S2 strain에 사람과 소의 LF 농도를 다르게 첨가하여 각각 MA-104 세포에 감염시켰을 때 그 억제 효과를 규명하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

1. Lactoferrin

Bovine whole latoferrin (BWLF), Bovine hydrolysed latoferrin (BHLF; Morinaga milk industry Co. Ltd, Japan)과 Human whole lactoferrin (HWLF; Sigma Chem., Co., USA) 각각 415 μM을 무혈청 배지199 (M199; No. 9466: Irvine scientific, Santa Anna. CA.)에 용해하여 0.45 μm filter로 여과한 후 -20℃에 보관하면서 사용하였다.

2. 세포배양

로타바이러스를 증식시키기 위해 사용된 MA-104 세포 (원숭이 신장 세포; 미국 Stanford University 의과 대학의 Dr. Greenberg Lab.에서 분양받음)는 M199에서 증식시킨 후 동결 해동하여 사용하였다. 세포의 증식과 유지는 M199에 7% Fetal calf serum (FCS: Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah.)과 1% L-glutamin penicillin streptomycin (L-GPS: Irvine scientific. santa Anna. CA.)을 혼합하여 75 cm^2 크기의 T-flask에서 3~4일 후에 단층이 형성된 세포를 계대배양하여 사용하였다.

3. 로타바이러스 회전배양

국내 분리주 HRV K-21 (G1)과 표준 HRV S2 (G2)를 Chiarini 등 [6]의 방법에 따라 바이러스는 0.2% 트립신 10 μl/ml을 넣어 37℃ 배양기에서 30분 동안 활성화시켰고, MA-104 세포의 단층이 형성된 시험관에, 활성화시킨 바이러스를 넣어 회전 배양기에서 1시간 동안 흡착시켰다. 그 다음 무혈청 M199 ml당 0.2% 트립신 1 μl를 첨가하여 37℃ 배양기에서 6일간 회전 배양하면서 세포변성효과 (CPE)를 관찰한 후 동결과 해동을 3회 반복하여 바이러스를 회수, -80℃에 보관하면서 사용하였다.

4. 로타바이러스의 역가분석

로타바이러스의 역가 분석은 Ruggeri 등 [32]과

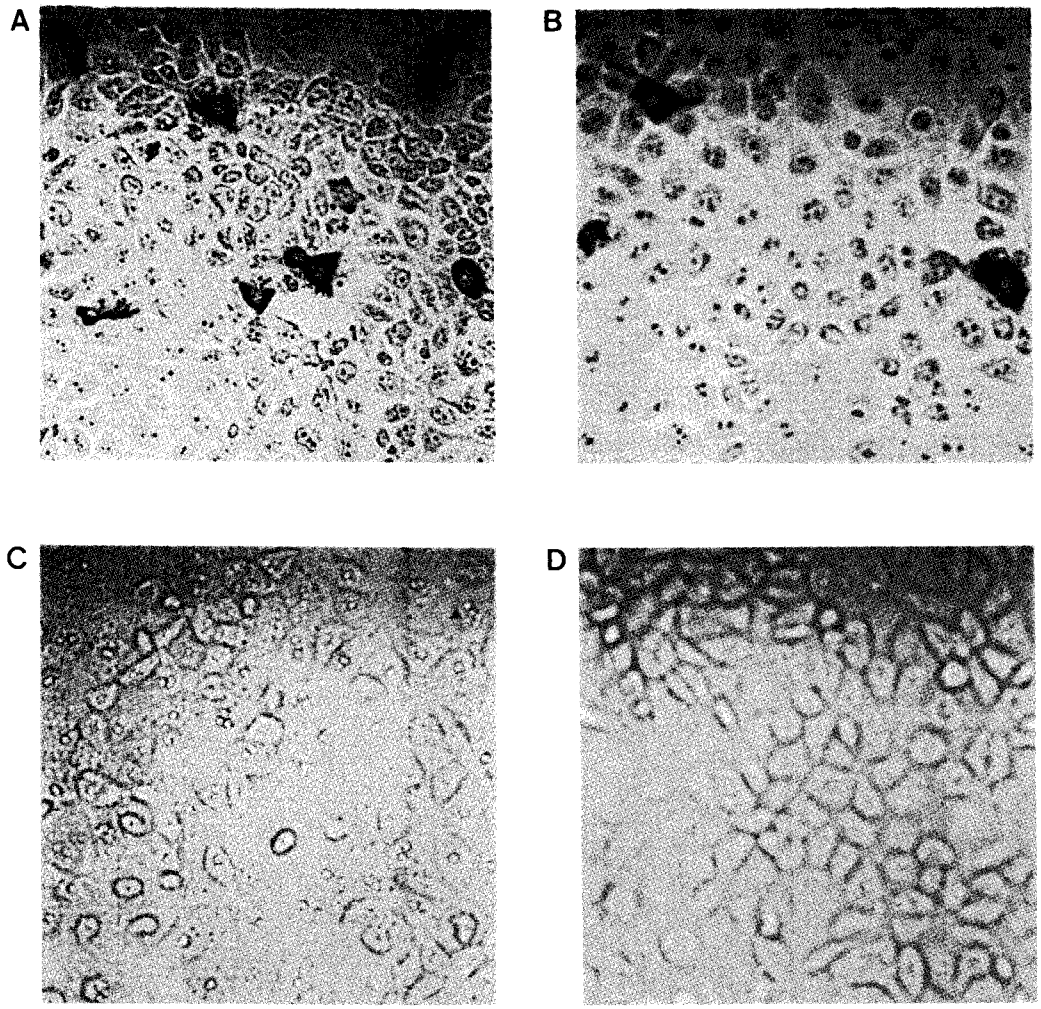


Figure 1. AEC staining of the HRV K-21 infected cells inhibited by BWLF treatment (×200; Olympus TE 3000). A: Virus control, B: LF concentration 13.0 μM, C: LF concentration 51.9 μM, D: LF concentration 217.5 μM.

Kaljot 등 [22]의 방법에 따라 바이러스는 ml당 0.2% 트립신 5 μl를 첨가하여 37℃ 배양기에서 30분간 활성화시킨 후 무혈청 M199로 10^1에서 10^8까지 희석하였고, 5일간 배양하여 MA-104 세포의 단층이 형성된 6 well plate는 무혈청 M 199로 2번 세척 후 희석한 바이러스 액을 각 well에 0.5 ml씩 넣어 CO_2 배양기에서 1시간 동안 흡착시켰다. 그 다음 1.1% agarose (Seakem ME agarose; FMC Corp., Philadelphia)를 전자레인지에서 4분간 완전히 용해시켜 흡착시킨 바이러스와 2×M199를 1: 1로 섞고 0.2% 트립신 0.5 μl을 첨가하여 혼합하였다. 37℃로 낮아졌을 때 각 well에 남아있는 바이러스를 피펫으로 제거한 후 agarose가 첨가된 배지 4 ml씩 중층 하여 37℃ 배양기에서 6일간 배양하였다. 배양 후 neutral red (GIBCO)를 무혈청 M199와 1:20으로 희석한 다음 1 ml씩 각 well에 넣어 배양기에서 7시간 동안 염색하여 fluorescent light box위에서 plaque수를 세었다.

5. 로타바이러스의 MA 104 세포감염에 대한 BLF 및 HLF의 영향분석

Kaljot 등 [22]의 방법을 응용하여 MA104 세포를 96 well plate의 각 well에 200 μl씩 넣고 5일 동안 배양하고 바이러스 100 μl에 0.2% 트립신 1 μl를 넣은 후 37℃ 배양기에서 30분 동안 활성화시

Table 1. Effect of lactoferrin on inhibition of the human rotavirus infected cell

Unit : %

LF & virus	LF concentration (μM)									
	0.4	0.8	1.6	3.2	6.5	13.0	25.9	51.9	103.8	217.5
BWLF +K-21	58.97a ±6.24	66.01 ±6.64	79.00 ±4.48	87.01 ±1.86	92.31 ±4.16	96.61 ±1.81	99.70 ±0.73	–	–	–
BHLF +K-21	54.84 ±7.99	61.61 ±7.02	67.68 ±6.48	75.43 ±7.30	80.04 ±6.77	86.47 ±3.30	90.77 ±2.43	96.92 ±1.46	99.70 ±0.73	–
BWLF +S2	50.22 ±5.01	54.13 ±4.73	61.67 ±3.13	72.45 ±6.73	84.11 ±5.62	89.78 ±4.88	96.46 ±2.47	99.42 ±1.43	–	–
BHLF +S2	46.76 ±6.85	51.50 ±6.41	58.05 ±3.93	65.25 ±5.04	72.39 ±5.72	78.10 ±8.09	83.73 ±6.22	88.19 ±6.35	94.70 ±4.13	99.71 ±0.71
HWLF +K-21	41.02 ±7.92	51.58 ±6.84	60.39 ±4.27	70.07 ±5.67	75.94 ±4.67	85.91 ±3.34	89.14 ±3.92	93.55 ±2.40	97.65 ±1.81	99.71 ±0.71
HWLF +S2	41.45 ±5.80	51.31 ±3.63	60.55 ±3.23	68.87 ±3.18	78.74 ±3.83	85.21 ±3.30	92.29 ±2.16	95.68 ±2.24	98.46 ±1.81	–

[a] Mean±SD

켰으며 0.25 μl의 트립신이 첨가된 M199 30 ml을 준비하여 활성화된 바이러스 4 μl를 넣어 실험에 이용하였다. 96 well plate 에서 MA 104세포의 단층이 형성된 세포는 무혈청 M199로 2번 세척하였고 바이러스는 100 μl씩 각 well에 넣었다. BLF와 HLF은 무혈청 M199에 용해시킨 후 0.45 μm filter로 여과하였다.

먼저 각 well에 무혈청 M199 50 μl를 넣고 첫 번째 well에 여과된 LF 50 μl를 넣어 계속적으로 2배 계단 희석하고 (2에서 2048배까지 희석) 바이러스 100 μl를 혼합한 후 CO_2 배양기에서 하루 배양하였다. TNC (10 mM Trizma base, 100 mM NaCl, 15 mM $CaCl_2$ pH 7.4)로 2번 세척하고 10% formalin을 각 well에 60 μl씩 넣어 상온에서 30분 동안 세포를 고정시켰다. 다시 TNC로 2번 세척하여 1% triton을 각 well에 60 μl씩 넣었고 상온에서 4분간 정치 후 TNC로 2번 세척하여 1% FCS가 첨가된 TNC로 5000배 희석한 1차 항체 (7A12)를 25 μl씩 각 well에 첨가하여 37℃ 배양기에서 1시간 동안 배양시켰다. 다시 TNC로 2번 세척하였고 1% FCS가 첨가된 TNC로 4000배 희석한 2차 항체 (affinity purified antibody peroxidase HRP goat anti-mouse (IgG); Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.)를 75 μl씩 각 well에 넣어 37℃ 배양기에서 1시간 동안 배양하였다.

AEC staining은 N, N-dimethylformamide (No. D-4254; Sigma) ml당 4 mg의 3-amino-9-ethylcarbazole (No. A-5754; Sigma), 0.05 M sodium acetate buffer와 H_2O_2 (1.5 ml, 3.5 ml, 5 μl)를 혼합하여 각 well에 60 μl씩 첨가하였고 상온에서 10분간 반응하여 염색 후 TNC로 2번 세척하여 현미경 상에서 사진 촬영하였다.

결 과

1. 로타바이러스 역가

국내 유아설사 환자로부터 분리한 HRV K-21과 표준로타바이러스 S2의 감염가를 측정하기 위해 7차 계대배양한 로타바이러스를 10^{-8}까지 희석하여 0.7% agarose 배지에 6일간 배양한 후 0.7% agarose 배지로 중층 하여 neutral red staining에 의해 원형 탈색된 부분의 plaque forming unit (PFU) 수를 관찰하였다 그 결과 K-21은 Yo, Hosokawa 보다는 높고 Wa보다는 낮은 1×10^7 PFU/ml이었고, S2는 7×10^6 PFU/ml이었다.

2. BWLF이 HRV K-21의 세포감염에 미치는 영향

LF이 로타바이러스의 MA 104 세포 감염에 미치는 영향을 조사하기 위해서 유아설사 분변에서 분리 배양한 로타바이러스 중 가장 발생빈도가 높은 HRV K-21 (A군, 아군 Ⅱ, G1, P1A)과 표준바이러스 S2 A군, 아군 Ⅰ, G2, P1B에 BWLF, BHLF,

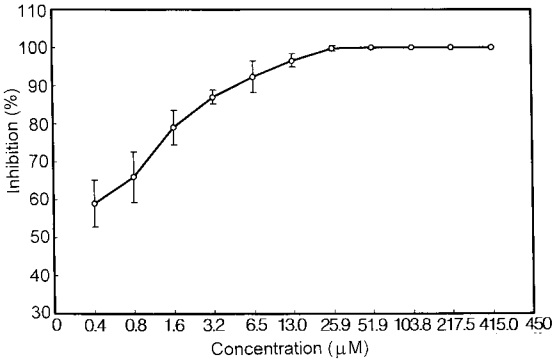


Figure 2. Effect of BWLF on inhibition of the HRV K-21 infected cells.

HWLF 각각을 농도에 따라 (415×2^{-10}~415×2 μM) 첨가하여 15 hrs 배양한 다음 AEC stain법으로 염색시켜 현미경 상에서 염색된 세포 수를 계산하여 억제 율을 관찰하였다.

Figure 1은 BWLF 0, 13.0, 51.9와 217.5 μM에서 HRV K-21의 MA 104 세포 감염상태를 현미경 상에서 촬영하여 나타낸 것이다. Table 1와 Figure 2는 감염된 세포 수를 계산하여 그 억제 율을 나타낸 것으로 BWLF농도 0.8, 3.2와 13.0 μM에서 각각 66.01±6.64%, 87.01±1.86%와 96.61±1.81%였으며 LF농도가 증가함에 따라 비례하여 높아졌고 25.9 μM에서부터 99% 이상의 억제 율을 나타내었다.

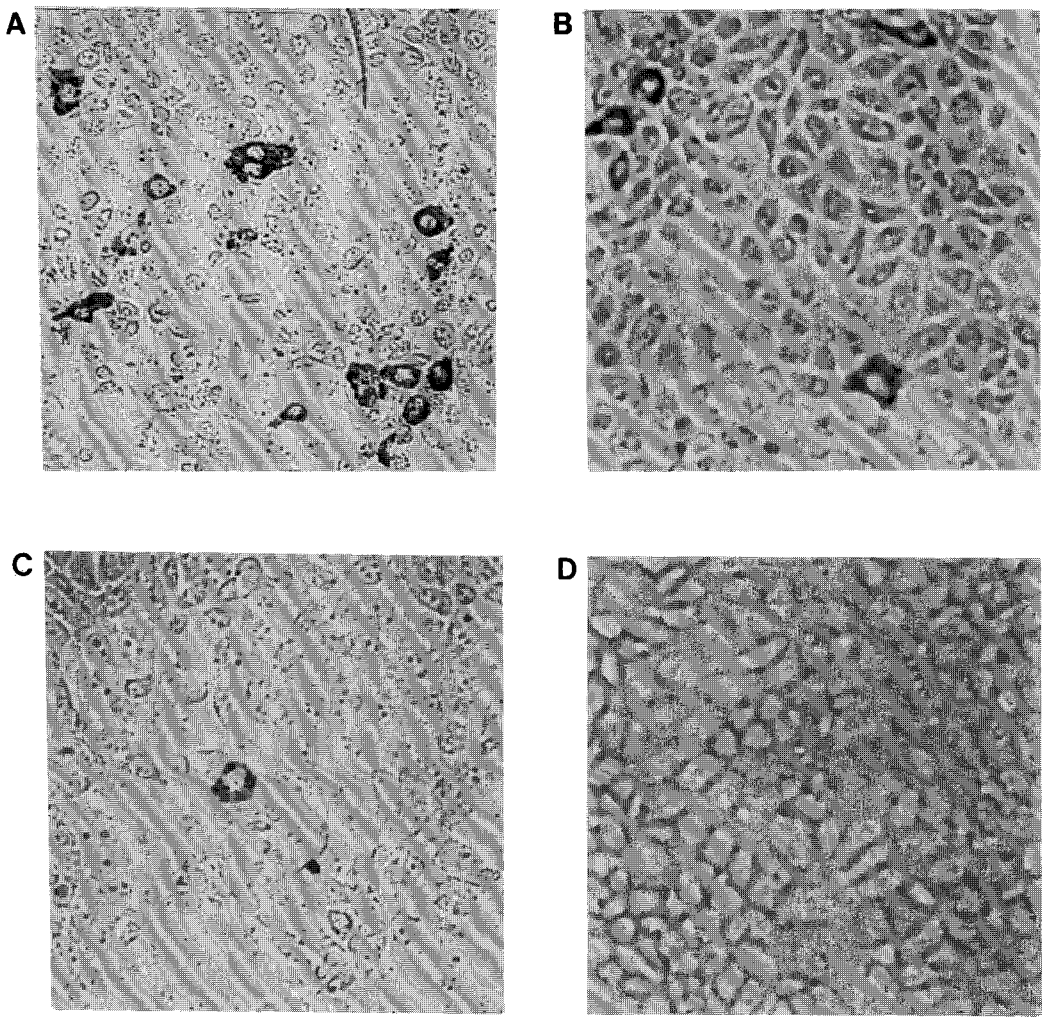
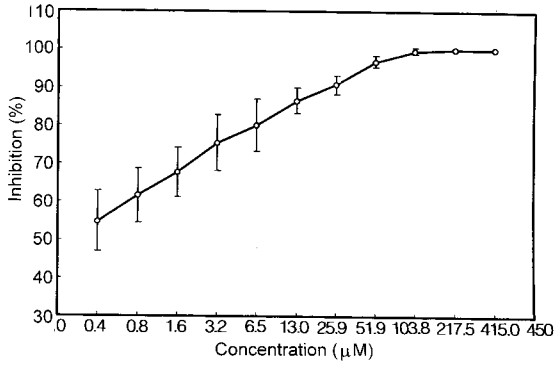


Figure 3. AEC staining of the HRV K-21 infected cells inhibited by BHLF treatment (×200; Olympus TE 3000). **A:** Virus control, **B:** LF concentrtion 13.0 μM, **C:** LF concentration 51.9 μM, **D:** LF concentration 217.5



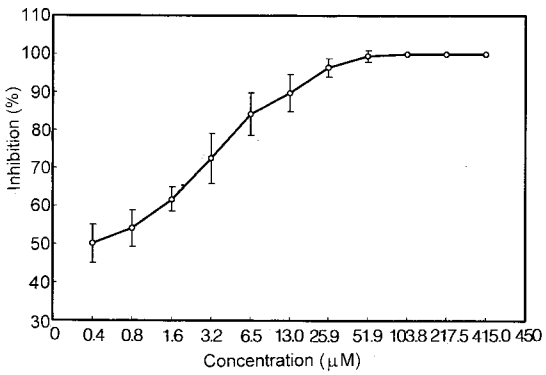


Figure 4. Effect of BHLF on inhibition of the HRV K-21 infected cells.

3. BHLF이 HRV K-21의 세포감염에 미치는 영향

BHLF 0, 13.0, 51.9와 217.5 μM에서 HRV K-21의 MA 104 세포 감염상태는 Figure 3과 같으며 감염된 세포 수를 계산하여 그 억제 율을 나타낸 결과는 Table 1과 Figure 4에서 보는 바와 같이 BHLF 농도 0.8, 3.2, 13.0과 51.9 μM에서 각각 61.61±7.02%, 75.43±7.30%, 86.47±3.30%와 96.92±1.42%로 BHLF의 농도에 비례하여 높게 나타났고 103.8 μM에서부터 99% 이상의 억제 율을 나타내었다.

BWLF과 BHLF이 HRV K-21의 세포감염에 미치는 영향을 비교해 보면 LF농도 25.9 μM에서 BWLF은 99% 이상, BHLF은 90% 이상의 억제 율로서, BWLF이 약 9% 정도 높은 억제 율을 나타내었다.

4. BWLF이 HRV S2의 세포감염에 미치는 영향

BWLF이 HRV S2의 MA 104 세포 감염에 미치는 영향은 Table 1와 Figure 5에서 보는 바와 같이 BWLF의 농도 0.8, 3.2와 13.0 μM에서 각각 54.13±4.73%, 72.45±6.73%와 89.78±4.88%로 BWLF의 농도에 비례하여 높게 나타났고 51.9 μM에서부터 100% 억제 율을 나타내었다.

BWLF의 HRV K-21과 HRV S2에 대한 억제 율을 비교해 보면 25.9 μM에서 K-21에 대한 억제 율은 100%, S2에 대한 억제 율은 97%로 억제 율이 서로 유사하게 나타났다.

5. BHLF이 HRV S2의 세포감염에 미치는 영향

BHLF이 HRV K-21의 MA 104 세포 감염에 미치는 영향은 Table 1와 Figure 6에서 보는 바와 같이 BHLF의 농도 0.8, 3.2, 13.0과 51.9 μM에서 각각 51.50±6.41%, 65.25±5.04%, 78.10±8.09%와 88.19±6.35%로 BHLF의 농도에 비례하여 높게 나타났고 217.5 μM에서부터 100% 억제 율을 나타내었다.

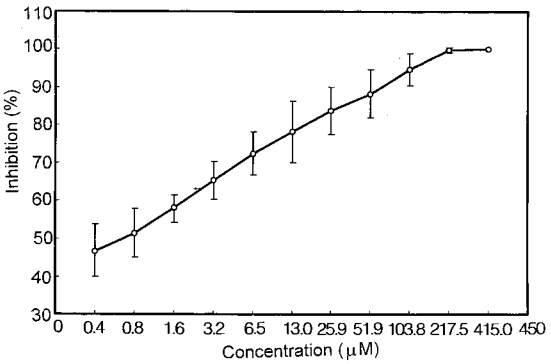


Figure 6. Effect of BHLF on inhibition of the HRV S2 infected cells.

6. HWLF이 HRV K-21의 세포감염에 미치는 영향

HWLF 0, 13.0, 51.9와 217.5 μM에서 HRV K-21의 MA 104 세포 감염상태는 Figure 7과 같으며 감염된 세포 수를 계산하여 그 억제 율을 나타낸 결과는 Table 1와 Figure 8에서 보는 바와 같이 HWLF의 농도 0.8, 3.2, 13.0과 51.9 μM에서 각각 51.58±6.84%, 70.07±5.67%, 85.91±3.34%와 93.55±2.40%로 HWLF의 농도에 비례하여 높게 나타났고 217.5 μM에서부터 100% 억제 율을 나타내었다.

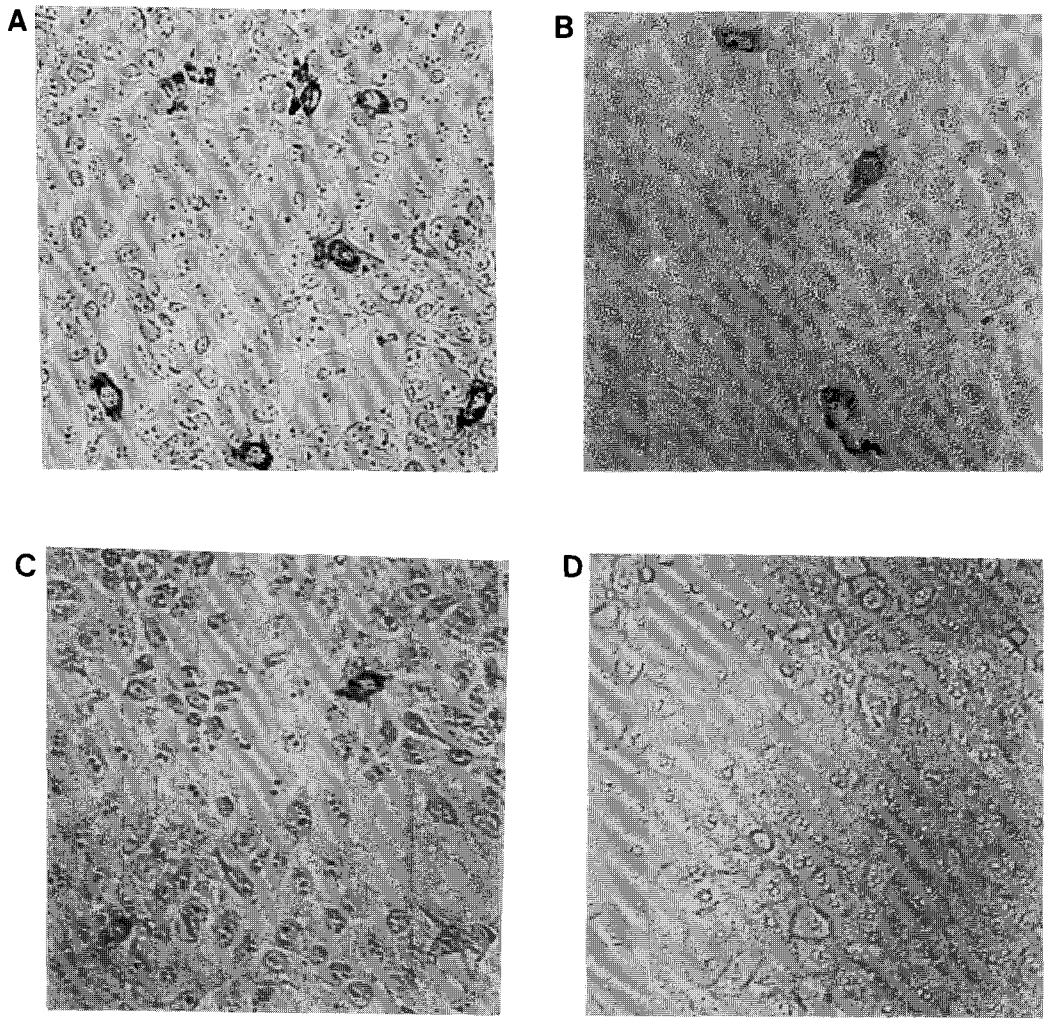


Figure 7. AEC staining of the HRV K-21 infected cells inhibited by HWLF treatment (×200; Olympus TE 3000). **A:** Virus control, **B:** LF concentrtion 13.0 μM, **C:** LF concentration 51.9 μM, **D:** LF concentration 217.5 μM.

BWLF와 HWLF이 HRV K-21의 세포 감염에 미치는 영향을 비교해 보면 LF농도 25.9 μM에서 BWLF는 HRV K-21을 100%, HWLF는 89%로 BWLF이 약 11% 높은 억제 율을 나타내었다.

7. HWLF이 HRV S2의 세포감염에 미치는 영향

HWLF이 K-21의 MA 104 세포 감염에 미치는 영향은 Table 1과 Figure 9에서 보는 바와 같이 HWLF의 농도 0.8, 3.2, 13.0과 51.9 μM에서 각각 51.31±3.63%, 68.87±3.18%, 85.21±3.30%와 95.68±2.24%로 HWLF의 농도에 비례하여 높게 나타났고 217.5 μM에서부터 100% 억제 율을 나타냈다.

HWLF이 HRV K-21과 HRV S2의 세포감염에 미치는 영향을 비교해보면 HWLF농도 217.5 μM에서 HRV K-21과 HRV S2 모두에 대해 100% 억제 율을 나타냈다.

고 찰

로타바이러스를 예방하기 위해 백신개발이 꾸준히 발전되어 오고 있지만 여러 가지 HRV의 혈청형에 의해 발병되는 임상증세를 완전히 방어하는데는 어려움이 있다 [7,10,14,17]. 실제 시험

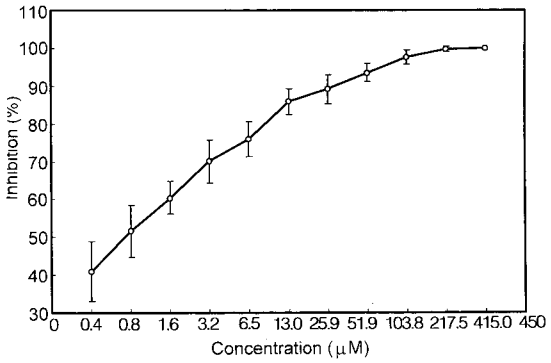


Figure 8. Effect of BWLF on inhibition of the HRV K-21 infected cells.

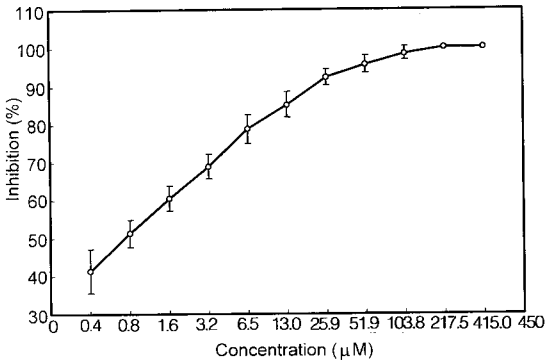


Figure 9. Effect of BWLF on inhibition of the HRV S2 infected cells.

에서 백신개발의 일차적 실패는 로타바이러스들의 부위에 나타난 제한된 면역 반응 때문이다. 로타바이러스 설사의 진행에 따른 가장 중요한 방어 인자는 소장 내강에 존재하는 IgA의 존재이다 [34].

로타바이러스 감염을 억제하기 위해 식품성분으로 로타바이러스감염을 방어하는 많은 연구가 보고되고 있다. Holstein젖소에 HRV Wa strain (혈청형 1), Ku strain (혈청형 2), Mo strain (혈청형 3)을 면역시킨 후 초유를 탈지하고 동결건조하여 유아에게 음용 시켰을 때 항-로타바이러스-초유가 로타바이러스 위장염을 예방하고 [11], 모유의 mucin이 in vitro와 in vivo에서 HRV Wa, DS-1, P와 ST3 strain을 억제한다 [41]. 난백의 ovomucoids와 ovalbumin이 로타바이러스 감염을 억제하고 [42], 난황에서 분리한 sialyloligosaccharides가 in vitro와 in vivo에서 로타바이러스 (SA-11)를 상당히 억제한다고 보고되고있다 [24,25]. 그리고 녹차 추출물 중의 458D의 epigallo catechin gallate가 1 μg/ml 농도로 HRV 감염가를 96.2% 억제한다 [12]. 본 연구에서는 HLF와 BLF로 국내 유아 로타바이러스와 표준 로타바이러스 S2의 MA 104세포 감염에 미치는 영향을 조사하였다.

BWLF 39.6 μg/ml와 HWLF 75.2 μg/ml에서 HIV의 MT4 세포와 섬유아세포의 감염을 억제하고 BWLF 36.7 μg/ml와 HWLF 90.2 μg/ml에서 human cytomegalo virus (HCMV)의 MT4 세포와 섬유아세포의 감염을 억제하고 [19], 또 BWLF은 HSV1과 HSV2의 Vero 세포 감염을 억제하는 것으로 보고되고 있다 [27]. 최근에 Superti 등 [36]은 소 apo-LF 25 μM에서 SA11 로타바이러스의 HT-29세포 감염을 억제한다고 보고하였다. 본 실험에서도 BWLF 25,9 μM에서부터 HRV K-21의 MA 104 세포 감염을 100% 억제하는 것으로 나타났다.

펩신에 의해 가수분해된 LF 생성물이 완전한 LF에 비해 수십 배에서 수백배 높은 항균작용이 있었지만 [38] 본 결과에서는 완전한 LF이 가수분해된 LF보다 HRV에 대한 억제 율이 약10% 높게 나타났다. HCMV와 HIV에 대해 BWLF이 HWLF 보다 1~2.5배 더 강한 세포감염 억제 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며 [19], 본 결과에서도 BWLF이 HWLF보다 HRV K-21에 대한 세포감염 억제 율이 높게 나타났다. HWLF은 friend virus를 감염시킨 쥐의 생존율을 연장시키고 [26], hepatitis C virus (HCV) E1과 E2의 기능을 억제한다 [40]고 보고되고 있다.

본 결과에서도 HWLF이 HRV K-21과 S2의 세포 감염을 억제하는 것으로 나타났다. HSV와 HIV를 포함한 enveloped virus는 glycosaminoglycans 수용체와 상호 작용하므로서 감염경로를 방해하여 세포감염을 억제하지만 로타바이러스는 세포표면 위에 있는 glycosamineglycans 이외의 glycidic잔기와 결합하여 세포감염을 억제한다 [36].

모유 초유의 LF농도는 6~8 mg/ml, 정상유 (normal milk)는 2 mg/ml 수준이다 [28]. Table 1에 나타난 결과와 비교해 보면 모유 초유의 LF농도는 97% 이상, 정상유의 LF농도는 89%이상 HRV 감염을 억제할 수 있기 때문에 로타바이러스 감염을 예방하기 위해서는 유아기에 반드시 모유를

먹여야 한다. 또한 우유 초유 LF농도는 5 mg/ml, 정상유는 0.02 mg/ml수준이다 [37]. Table 1에 결과와 같이 우유 LF은 모유 LF 보다 10%정도 로타바이러스 억제 율이 높기 때문에 생체 반응기 즉 유전 전환동물을 이용한 LF의 대량생산이 가능해지면 조제분유나 이유식 등에 첨가하므로서 유아 로타바이러스 감염을 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

Lactoferrin이 virus 감염증을 막는다는 것은 의약 적으로 잘 알려진 사실이다. 본 연구에서는 국내 분리 rotavirus를 이용하여 사람과 소의 lactoferrin이 로타바이러스 감염, 억제 효과가 있는지를 조사하고자 하였다. 소유래 lactoferrin (BWLF)은 25.9 μM의 농도에서 국내 분리 주인 human rotavirus K-21이 MA 104세포에 감염하는 것을 막았으며, 또한 소화효소 분해형인 hydrolyzed lactoferrin도 효과가 다소 낮기는 하였으나 바이러스 감염을 막는 것을 알 수 있었다. 반면에 사람유래 lactoferrin은 약 10배의 농도인 217.5 μM에서 로타바이러스 감염을 억제함을 알 수 있었다. 본 연구 결과로 볼 때 lactoferrin의 활성도는 소화효소에 의하여 구조가 파괴되어도 바이러스 감염 억제효과가 있다는 것이며, 동시에 소유래 lactoferrin이 사람유래 lactoferrin 보다 효과가 높다는 것을 시사하고 있다.

참 고 문 헌

1) **Ambruso DR, Johnston RB:** Lactoferrin enhaces hydroxy radical prodution by human neutrophils, neutrophil particulate fractions and an enzymatic generating system. *J Clin Invest* **67:** 352-355, 1981.

2) **Arnold RR, Cole MF, McGhee JR:** A bacteriocidal effect for human LF. *Science* **197:** 263-265, 1977.

3) **Bass DM, Baylor MR, Chen C, Meng L, Greenberg HB:** Liposome mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J Clin Invest* **90:** 2313-2320, 1992.

4) **Bezault J, Bhimani R, Wiprovnick J, Furmanski P:** Human LF inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res* **54:** 2310-2312, 1994.

5) **Broxemeyer HE, De Sousa M, Smithyman A, Ralph P, Amilton J, Kurland J, Bognacki J:** Specificity and modulation of the action of LF, a negative feedback regulator of myelopiesis. *Blood* **55:** 324-333, 1980.

6) **Chiarini A, Arista S, Giammanco A, Sinatra A:** Rotavirus persistence in cell culture: select of resistant cells in the presence of fetal calf serum. *J Gen Virol* **64:** 11101-1110, 1983.

7) **Chiristry C, Madore HP, Tresnor JJ, Pray K, Kapikian AZ, Chanock RM, Dolin R:** Safety and immunogenicity of live attenuated rhesus monkey rotavirus vaccine. *J Infect Dis* **154:** 1045-1047, 1986.

8) **Conner ME, Madson DO, Estes ME:** Rotavirus vaccines and vaccination potentional. *Curr Top Microbial Immunol* **105:** 253, 1994.

9) **Cook SM, Glass RI, Le Baron CW, Ho MS:** Global seasonality of rotavirus infections. *Bull WHO* **68:** 171-177, 1990.

10) **De Mol P, Zissis G, Butzler JP, Mutwewingabo A, Andre FE:** Failure of live, attenuated oral rotavirus vaccine. *Lancet* **2:** 108-113, 1986.

11) **Ebina T, Ohta M, Kanamaru Y, Yamamoto-Osumi Y, Baba K:** Passive immunization of suckling mice and infants with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus. *J Med Viol* **38:** 117-123, 1992.

12) **Ebina T, Tsukada K:** Protease inhibitors prevent the development of human rotavirus-induced diarrhea in suckling mice. *Microbiology and Immunology* **35:** 583-588, 1991.

13) **Estes MK, Cohen J:** Rotavirus gene structure and function. *American Soci Microbiol* **53(4):** 410-449, 1989.

14) **Forrest BD:** Diarrhoeal disease and vaccine development. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **87:** 39-41, 1993.

15) **Gerna G, Sarasini A, Parea M, Arista S, Miranda P, Brussow H, Hoshino Y Flores J:** Isolation and characterization of two distinct hu-

man rotavirus strains with G6 specificity. *J Clin Microbiol* **30:** 9-16, 1992.

16) **Goldman AS, Smith CW:** Host resistance factors in human milk. *J Pediatr* **82:** 1082-1087, 1973.

17) **Greenberg HB:** Rotavirus vaccination-Current status-Abrif summary. In Biotech-nology R & D Trends; Tzotzos, G. T., Ed.; Annals of the New York Academy of Sciences 700; New York Academy of Sciences: New York p32-35, 1993.

18) **Groves ML:** The isolation of red protein from milk. *J Amer Chem Soc* **82:** 3345-3350, 1960.

19) **Harmsen MC, Swart PJ, de-Bethune MP, Pauwels R, de-Clercq E, The TH, Meijer DK:** Antiviral effects of plasma and milk protein: LF shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *J Infect Dis* **172:** 380-388, 1995.

20) **Hashizume S, Kuroda K, Murakami. M:** Identification of LF as an essential growth factor for human lymphatic cells lines in serum-free medium. *Biochim Biophys Acta* **763:** 377-382, 1983.

21) **Johansson BG:** Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chem Scand* **14:** 510-513, 1960.

22) **Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg BH:** Infectious rotavirus enters cells direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol* **62(4):** 1136-1144, 1988.

23) **Kapikian AZ, Chanock RM:** Rotaviruses. Virology 2, 2nd: In B. N. Fields and D. M. Knipe (ed), Raven press, New York 1353-1404, 1990.

24) **Koketsu M, Juneja LR, Kim M, Ohta M, Matsuura F, Yamamoto T:** Sialyloligosaccharides of egg yolk fraction. *J Food Sci* **58:** 743-747, 1993.

25) **Koketsu M, Nitoda T, Juneja LR, Kim M, Kashimura N, Yamamoto T:** Sialyloligosaccharides from egg yolk as an inhibitor of rotaviral infection. *J Agric Food Chem* **43:** 858-861, 1995.

26) **Lu L, Hangoc G, Oliff A, Chen LT, Shen RN, Broxmeyer HE:** Protective influence of LF on mice infected with the polycythemia-inducing strain of friend virus complex. *Cancer Res* **47:** 4184-4188, 1987.

27) **Marchetti M, Pisani S, Antonini G, valenti P, Seganti L, Orsi N:** Metal complexes of bovine LF inhibit in vitro replication of herpes simplex virus type 1 and 2. *BioMetals* **11:** 89-94, 1998.

28) **Nagasawa T, Kiyosawa I, Kawahara K:** Amounts of lactoferrin inhuman colostrum and milk. *J Dairy Sci* **55:** 1651-1657, 1972.

29) **Nemet K, Simonovits I:** The biological role of LF. *Haematologia* **18:** 3-12, 1985.

30) **Oseas R, Yang HH, Baehner RLM, Boxer LA:** LF: A promoter of polymorpho-nuclear leukocyte adhesiveness. *Blood* **57:** 939-945, 1981.

31) **Reiter B:** Developments in dairy chemistry-3-lactose and minor constituents, Edited by P. F. Fox. Elsevier Apple Sci. Pub New York. p281-336, 1985.

32) **Ruggeri FM, Greenberg HB:** Antibodies to the trypsin cleavage peptide Vp8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J Virol* **65(5):** 2211-2219, 1991.

33) **Schanbacher FL, Smith KL:** Formation and role of unusual whey proteins and enzymes: Relation to mammary function. *J Dairy Sci* **58:** 1048-1052, 1975.

34) **Shaw RD, Groene WS, Macknow ER, Merchant AA, Cheng EH:** VP4-specific intestinal antibody response to rotavirus in a murine model of heterotypic infection. *J Virol* **65:** 3052-3059, 1991.

35) **Sorensen M, Sorensen SPL:** Compt. rend. trav. Lab. (Carlsberg). [Ser Chim]. **23:** 55-59, 1939.

36) **Superti F, Ammendolia MG, Valenti P, Seganti L:** Antirotaviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Med Microbiol Immunol* **186:** 83-91, 1997.

37) **Suzuki T, Nonaka M, Kiyosawa I, Ogasa K:** Lactoferrin contents in bovine colostrum and milk. *J Japan Soc Food Nutr* 42-46, 1977.

38) **Tomita M, Takase M, Wakabayashi H, Bellamy W:** Antimicrobial peptides of LF. *Adv Exp Med Biol* **357:** 209-218, 1994.

39) **Urasawa S, Hasegawa A, Urasawa T, Tani-**

guchi K, Wakasugi F, Suzuki H, Inouye S, Pongprot B, Supawadee J, Suprasert S, Sangsiyanond P, Tonusin S, Yamazi Y: Antigenic and genetic analysis of human rotaviruses prevailing Chang Mai, Thailand: Evidence for a close relationship between human and animal rotaviruses. *J Infect Dis* **166:** 227-234, 1992.

40) **Yi M, Kaneko S, Yu DY, Murakami S:** Hepatitis C virus envelope proteins bind LF. *J Virol* **71:** 5997-6002, 1997.

41) **Yolken RH, Peterson JA, Vonderfecht SL, Fouts ET, Midthun K, Newburg DS:** Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *J Clin Invest* **90:** 1984-1991, 1992.

42) **Yolken RH, Willoughby R, Wee SB, Miskuff R, Vonderfecht SR:** Sialic acid glycoproteins inhibit in vitro and in vivo replication of rotaviruses. *J Clin Invest* **79:** 148-154, 1987.

43) 山内邦男, 今村 明, 守田哲朗. 牛乳成分の 特性と 健康. 光生館 p1-27, 1993.