

한우 Lactoferrin이 TNF- α 와 NO 생성에 미치는 영향

이수원 · 양희진 · 황보 식
성균관대학교 생명공학부

Effect of Lactoferrin from Korean Native Cattle on the Production of Tumor Necrosis Factor- α and Nitric Oxide

S. W. Lee, H. J. Yang, and S. Hwangbo

Department of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University

Abstract

Lactoferrin(Lf) has the function of modulation in the host defense systems, including cytokine production and immune responses. We have tested the effect of Lf and Lf hydrolysates(Lf-H) on the productions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and nitric oxide(NO) in macrophage cells. Lf from Korean native cattle(K-Lf) and hydrolyzed K-Lf(K-Lf-H) increased the production of TNF- α in RAW264.7 cells with dose-dependency. Bovine Lf(B-Lf), human Lf(H-Lf), and its hydrolysates did not induce either TNF- α production or NO production. On the other hand those didn't affect on the production of TNF- α in lipopolysaccharide(LPS)-stimulated RAW264.7 cells. K-Lf induced the production of NO similar to its role on the TNF- α production.

Key words : lactoferrin, tumor necrosis factor- α , nitric oxide, lipopolysaccharide.

서론

Lactoferrin(Lf)은 철을 결합하는 당단백질로서, transferrin family 단백질 중의 한 종류로^(1,2) 젖, 침, 눈물 등에 들어 있으며, 유선과 mucous에서 분비되고, neutrophil의 secondary granules에서도 분비된다. 특히 초유 중에 매우 많이 함유되어 있으며, 691개의 아미노산으로 구성되어 있다⁽³⁾. Pierce 등⁽⁴⁾에 의하여 Holstein bovine Lf(B-Lf)의 peptide를 구성하는 689개의 아미노산 서열이 규명되었으며, 분자량은 대략 70~80kDa으로 밝혀졌다. Lf는 유해한 미생물의 감염에 대한 방어작용⁽⁵⁾, 유아의 장내에서의 철분 흡수 촉진작용⁽⁶⁾, myelopoiesis의 조절작용⁽⁷⁾, 염증 반응의 조절작용⁽⁸⁾ neutrophil에 의한 hydroxyl기의 생성⁽⁹⁾, lym-

phocytes의 성장촉진 효과⁽¹⁰⁾, lysozyme regeneration의 감소⁽¹¹⁾ 및 macrophage, granulocyte, neutrophil, leukocytes의 조절작용⁽¹²⁾ 등의 생리적 기능이 있는 것으로 알려져 있다.

최근의 연구에 의하면, macrophage를 Lf로 자극했을 때 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin-8(IL-8), nitric oxide(NO) 등이 분비되고⁽¹³⁾, *in vivo*에서 Lf이 TNF- α 와 interleukin-6(IL-6)의 방출을 조절하는 등 cytokine의 조절작용에 관여한다는 연구보고가 많다⁽¹⁴⁾. TNF- α 는 lipopolysaccharide(LPS)나 phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)의 자극에 의해 macrophage, 또는 monocyte로부터 분비되는 대표적인 proinflammatory cytokine으로서⁽¹⁵⁾ 생성된 종양세포의 괴사와 apoptosis 등을 유도하는 antitumor 물질로 알려져 있었으나, 최근에는 많은 질환물에서 TNF- α 의 병리적 역할이 증명되면서, 알레르기나 염증반응의 주요 매개물질로 이해되고 있다⁽¹⁶⁾. TNF- α 의 대표적인 병리작용은 천식이나 아토피성 피부염 등과 같은 알러지 염증질환⁽¹²⁾에서부터 그람음

Corresponding author : Soo-Won Lee, Department of Food & Life Science, Sungkyunkwan University, 300, Chunchun-dong, Jangan-gu, Suwon, Kyunggi-do, Korea. E-mail : leesw@skku.ac.kr

성균의 내독소에 의해 야기되는 패혈증이나 immunological liver injury 등과 같은 급성질환, 전신 홍반성 낭창, 장기이식 및 류마티스성 관절염 등과 같은 autoimmune disease에서 확인되고 있다⁽¹⁷⁾. 또한 최근에는 TNF- α 가 human immunodeficiency virus(HIV)의 DNA 복제를 촉진시키고, 암세포 전이시 필수적인 혈관신생에도 관여하는 것으로 보고되고 있다⁽¹⁸⁾. 그리고 활성화된 대식세포에서 분비되는 것으로 알려진 NO는 암세포의 미토콘드리아 호흡과 병원성 균류를 억제함으로써 숙주방어에서 중요한 역할을 하며⁽¹⁹⁾, 또한 혈관 내에서 NO는 acetylcholine과 다른 물질들이 평활근을 이완시켜 혈관 팽창을 유도하고^(20,21), 혈소판의 응집을 방지함으로써 혈액의 응고를 방지하는 역할을 하는 것으로 알려져 이들 cytokine에 대한 관심이 증가되고 있다⁽²²⁾.

그러나 이러한 Lf의 기능들은 주로 Holstein과 같은 외래의 유종종에서 대부분 이뤄졌을 뿐 우리나라 재래종인 한우의 Lf(K-Lf)에 대한 연구는 미약한 실정이다.

한우가 유전적 관계에서 Holstein과 차이가 있다는 보고⁽²³⁾로 볼 때 젖소와 한우의 Lf 간에도 차이가 있을 것으로 여겨진다. 따라서 본 연구는 K-Lf과 그 가수분해물이 macrophage에서 TNF- α 와 NO 생산에 작용하는 역할과 다른 Lf과의 차이를 비교하는데 그 목적을 두었다.

재료 및 방법

시료 및 시약의 제조

K-Lf은 축산기술연구소 대관령 지소에서 착유한 한우 초유를 제공받아 지방을 제거하고, casein을 침전시킨 후 분획한 유청단백질을 batch extraction, ion exchange chromatography, gel filtration chromatography, heparin agarose affinity chromatography의 방법을 차례대로 이용하여 정제하였다⁽²⁴⁾. B-Lf과 human Lf(H-Lf)은 Sigma社 제품을 구입하여 사용하였고 Lf의 가수분해물(Lf-h) 제조는 Tomita 등⁽²⁵⁾의 방법에 따라 pepsin을 사용하여 조제하였다. 세포배양을 위해서 각각의 Lf와 Lf-h을 배지에 용해시킨 후, 0.22 μ m filter(Millipore, USA)로 여과하여 실험에 사용하였다. Cell line은 한국 세포주 은행(KCLB)으로부터 분

양 받아 사용하였으며, culture medium은 Gibco/BRL Co.의 제품을 사용하였고, 그 외 모든 시약은 Sigma社 제품을 사용하였다.

세포 배양

RAW264.7(KCLB40071) cell은 murine macrophage cell로 10%(v/v) fetal bovine serum (FBS)과 항생제(penicillin 100units/ml, streptomycin 100mg/ml)를 함유하는 DMEM배지 (pH 7.2)를 사용하여 세포가 culture dish(ϕ 100)의 90% 정도 자랐을 때 scraping하여 1:10의 비율로 계대 배양하여 실험에 사용하였다. murine fibroblast cell인 L929(KCLB10001 : NCTC clone 929) cell은 10%(v/v) FBS와 1% penicillin/streptomycin을 함유하는 RPMI1640 배지(pH 7.2)를 사용하여 세포가 culture dish(ϕ 100)의 90% 정도 자랐을 때 1% trypsin/EDTA를 가하여 cell을 떼어낸 후 1:5의 비율로 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

In vitro TNF- α 의 분비 및 활성 측정

TNF- α 의 분비 및 활성의 측정은 Choe와 Lee⁽²⁶⁾의 방법을 변형하여 실시하였다. Lf과 LPS(*E. coli* 0111:B4) 자극에 의한 RAW264.7 cell의 TNF- α 의 분비정도를 측정하기 위해 96-well plate에 RAW264.7 cell을 2×10^5 cells/well 농도로 주입하였다. 각각의 well에 Lf과 Lf-h을 농도별로 첨가하고 LPS는 1 μ g/ml 농도로 함께 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 6시간 동안 배양시킨 후 상등액을 취하였다. 이 상등액에 분비된 TNF- α 활성의 측정을 위해 TNF- α 에 민감한 L929 cell을 사용하였다. L929 cell을 3×10^4 cells/well로 조절하여 4시간 배양한 후 배지를 제거하고 actinomycin D를 포함한 새로운 배지에 앞서 취한 상등액을 첨가하였다. 이를 18시간 배양 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)(5mg/ml)를 각 well에 5 μ l씩 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 상등액을 제거하고 여기에 PBS buffer 100 μ l와 20% SDS solution 50 μ l를 첨가하여 CO₂ incubator에서 24시간 동안 발색시킨 후, ELISA microplate reader(ELX 800, Bio-tec Ins., USA)를 이용하여 540nm에서 발색의 정도를 측정하였다.

In vitro Nitric oxide의 생성 및 정량

Lf에 의한 RAW264.7 cell의 NO 생성량의 변화를 측정하기 위해 배양한 cell을 scraping한 후 1.0×10^5 cells/well의 농도로 조절하여 96-well microplate에 넣고 Lf과 Lf-h을 농도별로 (0~1000 μ g/ml) 첨가하였다. 또한, NO생성을 촉진시키기 위하여 interferon- γ (IFN- γ)를 10 unit/ml 첨가하였으며, LPS는 100ng/ml의 농도로 각각 첨가한 후, 전체량을 120 μ l가 되도록 조절하였다. 이것을 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후, 상등액 100 μ l를 취하여 새로운 96-well microplate에 옮겼으며, Griess reagent I액(0.2% naphthylethylene diamine)과 II액(10% phosphoric acid containing 2% sulfanilamide)을 각각 50 μ l씩 첨가하였다. 상온에서 10분간 방치한 후 ELISA microplate reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 sodium nitrite의 검량선으로부터 NO의 대사산물인 nitrite의 농도를 산출하였다.

결과 및 고찰

Lf과 가수분해물이 RAW264.7 cell의 TNF- α 분비에 미치는 영향

Macrophage는 LPS의 자극에 의해서 proinflammatory cytokine 인 IL-1, IL-6 및 TNF- α 를 분비한다. 본 연구에서는 RAW264.7 cell를 이용하여 Lf의 macrophage TNF- α 분비에 미치는 역할을 조사하였다. 먼저 LPS 자극 없이 RAW264.7 cell에 Lf(K-Lf, B-Lf, H-Lf)과 Lf-h(K-Lf-h, B-Lf-h)만 처리하여 세포가 TNF- α 를 분비하는지를 검사하였다. TNF- α 의 분비 여부는 시료로 자극했을 때 생성된 TNF- α 에 의해 사멸하는 L929 cell을 이용하여 cell survival rate(%)로 나타내었다(Fig. 1-a). 1mg/ml의 Lf과 Lf-h를 각각 RAW264.7 cell에 6시간 처리한 결과, K-Lf를 처리한 세포의 생존율은 약 22%, B-Lf과 H-Lf 처리 군에서는 각각 85%와 90%의 세포 생존율을 보이므로서, K-Lf에 의한 효과와는 현저한 차이를 나타내었다. 또한, K-Lf-h는 43%, B-Lf-h는 약 80% 정도의 세포 생존율을 보여줌으로써 K-Lf-h가 다른 Lf보다 더 많은 TNF- α 생성 유도 능력을 가지고 있음을 알 수 있다.

Lf과 Lf-h의 농도에 따른 TNF- α 의 분비량을 조사한 결과, K-Lf의 농도가 증가할수록 세포 생존율이 감소하는 것으로 보아 TNF- α 분비량이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 1-b). K-Lf의 최소 처리수준인 1 μ g/ml에 의하여 세

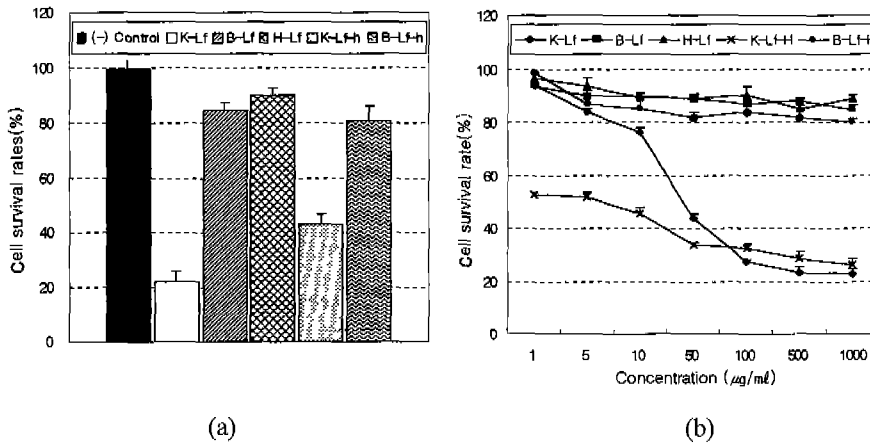


Fig. 1. TNF- α production of RAW264.7 cells by different kinds of lactoferrins and lactoferrin hydrolysates. Cell survival rates were adapted as an indicator of the produced TNF- α by RAW 264.7 cells. K-LF: lactoferrin from Korean native cattle, B-Lf: bovine lactoferrin, H-Lf: human lactoferrin, K-Lf-H: K-Lf-hydrolysates, B-Lf-H: B-Lf-hydrolysates. a: RAW 264.7 cells were treated with lactoferrins and its hydrolysates(1mg/ml) for 6hr. b: RAW264.7 cells were treated with different levels of lactoferrins and its hydrolysates for 6hr.

포 생존율이 약 6% 감소했으며, 5 μ g/ml에서 세포의 16%가 TNF- α 에 의하여 사멸하는 것으로 나타났다. 이 실험 결과의 오차 한계가 \pm 3%인 것을 고려할 때, 5 μ g/ml의 K-Lf에서 다른 Lf와 유의차 있게 TNF- α 를 분비하는 것으로 생각된다. 동일한 수준의 B-Lf과 H-Lf은 각각 11%와 6%의 세포 생존율의 감소를 보였으나, 이들은 고농도에서도 16% 이상의 생존율을 감소는 보이지 않는 것으로 보아, K-Lf에 비하여 전체적으로 TNF- α 의 분비량이 낮은 것으로 나타났다. Lf 가수분해물의 경우에는 K-Lf-h가 K-Lf에 비해 다소 낮은 농도가 증가함에 따라 TNF- α 분비가 증가되는 것으로 측정되어졌으며 B-Lf-h의 세포생존율은 B-Lf나 H-Lf의 수준과 비슷하게 나타났다.

K-Lf은 그 자체만으로 macrophage로부터 TNF- α 의 분비를 유도해 내는 결과를 보여 주며 B-Lf, H-Lf과의 차이가 현저하게 나타났다. 이러한 결과로 실험에 사용된 K-Lf의 오염성을 의심할 수 있는데 본 실험에 사용한 K-Lf은 다단계 정제 과정과 순도 테스트를 거쳐 제조되었으므로, 생존율 감소효과는 LPS 오염과는 관계가 없다고 생각되어진다. 그리고 K-Lf가 bioassay 방법에 사용된 L929 cell에 직접적인 세포독성효과를 나타내어 위와 같은 결과를 얻었을 가능성은 cytotoxic 실험결과와 또한 Lf를 열변성시킨 후의 실험 결과에 의해 사전에 배제되어질 수 있었다(data 생략). 따라서 K-Lf은 macrophage로부터 TNF- α 분비를 유도할 수 있는 능력을 가졌다고 판단된다. 지금까지 Lf은 그 자체만으로 macrophage의 TNF- α 생성 유도에는 그다지 효과가 없는 것으로 생각하는 것이 일반적인 견해였다. 그러나 본 실험 결과는 K-Lf가 macrophage로부터 TNF- α 생성을 유도하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 아직 명확하게 규명되지는 않았지만 간접적으로는 소의 종간의 차이에 의해서 기인되는 것으로 생각된다. 이러한 차이에 대해서는 더 연구되어야 할 과제로 생각된다.

Lf과 가수분해물이 LPS 자극에 의하여 유도된 TNF- α 생성량에 미치는 영향

Lf이 LPS 자극에 의하여 RAW264.7 cell에서 다량 유도되는 TNF- α 분비량에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 1 μ g/ml의 LPS로

RAW264.7 cell을 6시간동안 자극하여 TNF- α 의 분비정도를 확인한 결과, 약 28%의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 2-a). LPS의 양을 기준으로 하여, K-Lf, B-Lf, H-Lf을 각각 LPS와 함께 처리하여 RAW264.7 cell에서 분비된 TNF- α 의 함량을 조사한 결과, LPS자극에 의한 세포생존율이 약 28%인데 비하여 K-Lf, B-Lf, H-Lf의 첨가에 의하여 각각 31%, 51%, 63%로 증가하였다(Fig. 2-a). 또한, K-Lf-h, B-Lf-h의 첨가에 의해 54%, 55%로 세포 생존율이 각각 증가하였다. 세포 생존율의 증가는 LPS자극에 의하여 분비되는 TNF- α 의 생성량이 감소되는 것으로 볼 수 있는데, LPS 자극에 의한 세포 생존율을 기준으로 할 때 K-Lf이 3%, B-Lf이 23%, H-Lf이 35%, K-Lf-h가 26%, B-Lf-h가 27%로 TNF- α 분비량이 상대적으로 감소된 것으로 해석된다. 실험에 사용한 Lf와 Lf-h가 전부 TNF- α 생성량을 감소시키는 경향을 나타내었으며, 그중 H-Lf이 가장 큰 TNF- α 생성 억제력이 있음을 알 수 있었다. 그리고, 각 Lf의 처리 농도를 변화시켜서 이에 따른 세포 생존율의 변화를 조사한 결과, B-Lf, H-Lf, 그리고 K-Lf-h 경우에는 처리된 Lf의 농도가 증가할수록 LPS의 자극에 의한 TNF- α 분비를 약간 억제하는 경향을 보였으며(Fig. 2-b), H-Lf의 경우는 저해력이 좀 더 높아지는 것으로 나타났다. 그러나 B-Lf-h는 농도의 증가가 LPS의 자극에 의한 TNF- α 생성에 별다른 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

Lf의 처리가 LPS에 의하여 유도된 TNF- α 생성량을 감소시키는 본 실험 결과는 다음과 같이 생각할 수 있다. 첫째, Lf 자체가 bioassay 과정에서 TNF- α 에 의하여 L929 cell 사멸과정에 영향을 미쳤을 수 있다. 이 경우에는 Lf이 RAW264.7 cell이 TNF- α 생산에 직접 작용했을 수도 있고, L929 세포에 작용하여 TNF- α 의 기능을 억제했을 가능성도 있다. 그러나 이러한 가능성은 recombinant TNF- α 를 Lf과 함께 L929 cell에 처리했을 때 TNF- α 단독 처리한 세포와 비교하여 생존율에 아무런 차이를 보이지 않는 결과⁽²⁶⁾가 있어, 이러한 가능성은 희박할 것으로 생각한다. 둘째, Lf이 LPS의 RAW264.7 cell의 TNF- α 생성 유도를 저해하였을 가능성이 있다. 즉, Lf이 LPS와 직접 결

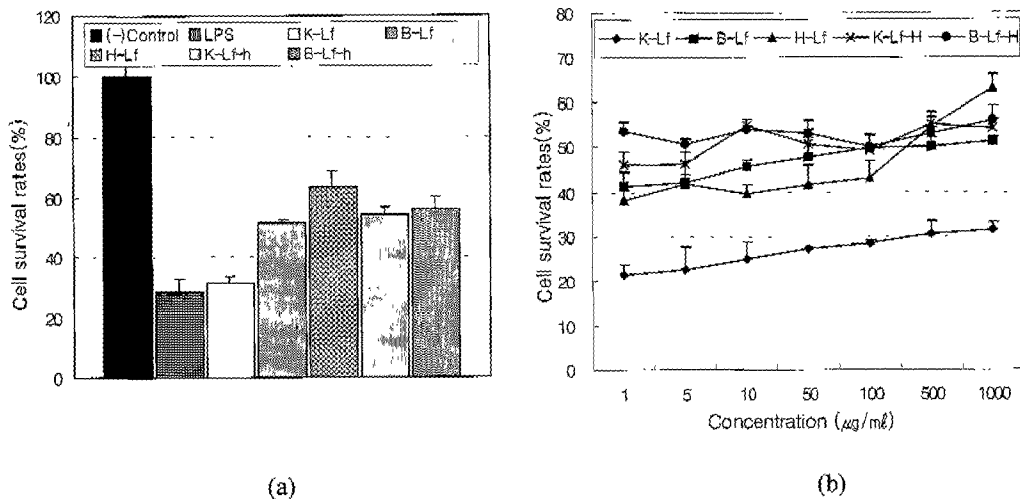


Fig. 2. TNF- α production of RAW264.7 cells by different kinds of lactoferrins and lactoferrin hydrolysates with LPS stimulation. Cell survival rates were adapted as an indicator of the produced TNF- α by RAW 264.7 cells. K-Lf: lactoferrin from Korean native cattle, B-Lf: bovine lactoferrin, H-Lf: human lactoferrin, K-Lf-H: K-Lf-hydrolysates, B-Lf-H: B-Lf-hydrolysates: RAW264.7 cells were stimulated by 1 μ g/ml LPS. a: RAW 264.7 cells were treated with lactoferrins and its hydrolysates (1mg/ml) for 6hr. b: RAW264.7 cells were treated with different levels of lactoferrins and its hydrolysates for 6hr.

합하여 LPS와 세포의 상호작용을 직접적으로 방해한다고 가정할 수 있다. 그러나 LPS가 비록 Lf에 결합한다고 해도 이들의 세포 자극 효과가 크게 감소되지는 않으며 H-Lf의 처리에서 보는 것처럼 35% 정도의 TNF- α 생성량 억제 효과를 나타내기는 어려우리라 생각한다. 셋째, Lf이 RAW264.7 cell의 TNF- α 유전자의 발현에 영향을 미치므로서 생성량의 감소를 가져왔다고 생각할 수 있다. 오래 전부터 Lf이 DNA와 직접적으로 결합하는 특성을 지니고 있다고 알려져 왔으며⁽²⁷⁾, 이런 특성은 Lf의 분리, 정제 과정에서 널리 이용되어져 왔다⁽²⁸⁾. 이러한 Lf의 성질을 고려해 볼 때 Lf이 TNF- α 유전자의 발현 조절부위에 직접적으로 결합하여 그 생성량을 조절했다고 가정해 볼 수 있다. 이미 몇몇 연구에서 Lf이 유전자의 발현 조절에 직접적으로 관여하는 조절인자의 역할을 한다는 보고가 있어⁽²⁹⁾, 이러한 가설이 타당할 수 있음을 입증시켜준다고 할 수 있을 것이다. 그러나, Lf이 TNF- α 의 유전자 발현 조절에 직접 관여하였는지, 혹은 TNF- α 유전자 발현

을 조절한다고 알려진 nuclear factor- κ B (NF- κ B)와 같은 인자의 발현 조절 등을 통하여 간접적으로 그 역할을 하였는지는 명확하지 않다⁽²⁹⁾.

Zagulski 등⁽³⁰⁾은 B-Lf을 mouse에 투여하고 24시간 후 *E. coli*를 mouse에 치사량 주입했을 때 TNF- α 의 분비를 억제하여 사망률을 낮추었다고 하였으며, Machnicki 등⁽¹⁴⁾도 *in vivo*상에서 Lf이 TNF- α 분비에 억제효과가 있음을 입증하였다. 또한 Sawatzki와 Rich⁽³¹⁾는 LPS를 주입 후 Lf의 농도가 급격히 증가(5~6배)하는 것을 확인하였으며, Guttenberg 등⁽³²⁾은 염증부위에 Lf의 농도가 급격히 증가하는 것을 확인함으로써 Lf이 생체 내에서 항염증인자로서 중요한 역할을 한다는 것을 보여주었다. Lf에 의한 생체 내에서의 방어효과는 설명하기 어려우나 현재까지는 IL-1 β ⁽³³⁾, TNF- α ⁽¹²⁾와 같은 proinflammatory cytokine의 분비를 저해하여 감염동물의 치사율을 감소시킨다고 보고되고 있다.

Lf과 Lf가수분해물이 RAW 264.7 cell의 NO 생성에 미치는 영향

Lf이 RAW264.7 cell의 NO 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, Lf과 Lf-h를 단독으로 처리하였을 경우, K-Lf(1mg/ml)에 의해 3배 정도 NO 생성량이 증가하는 것으로 나타났으나 B-Lf는 NO 생성에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3-a). 또한 K-Lf-h의 첨가도 대조구에 비해 2배 이상의 NO 생성을 유도하였으나, B-Lf-h의 처리는 약간의 NO 생성만을 유도하였다.

각종 Lf의 첨가량이 NO생성에 미치는 영향을 조사한 결과, K-Lf와 K-Lf-h는 처리농도가 증가함에 따라 NO생성량이 증가하였으나, B-Lf와 B-Lf-h는 NO생성량에 직접적으로 영향을 초래하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3-b).

Lf과 Lf-h를 LPS와 IFN- γ 와 같이 첨가하였을 때, TNF- α 와는 달리 LPS(100ng/ml) 단독으로는 NO 생성을 크게 유도하지 않았으며 (Fig. 4-a), LPS와 IFN- γ (10 units/ml)를 동시에 처리할 경우에는 IFN- γ 단독으로 NO를 유도하는 것보다 synergistic effect에 의해 NO 생성량을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 4

-a). IFN- γ 와 동시에 처리한 경우, K-Lf, B-Lf에 비하여 NO 생성량이 높은 것으로 나타났다(Fig. 4-a and b). 또한 Lf을 IFN- γ 와 LPS를 함께 처리하였을 경우에는 전반적으로 NO 생성량이 IFN- γ 단독 처리구보다는 약간 높지만 비슷한 경향을 나타내었다.

Lf-h와 LPS의 혼합첨가에 의해서도 역시 Lf 첨가시와 마찬가지로 NO 생성에는 거의 영향을 주지 못한 것으로 나타났으며, 이러한 경향은 IFN- γ 단독, 또는 IFN- γ 와 LPS를 동시에 첨가한 경우에도 거의 같은 양상을 나타내었다(Fig. 4-c and d).

K-Lf에 의한 NO생성량은 TNF- α 의 생성량과 같이 K-Lf의 농도가 높아짐에 따라 증가하는 경향을 보여주었지만, B-Lf는 NO의 생성에는 별다른 영향을 미치지 못하였다. Lf이 LPS와 IFN- γ 처리에 의해서 다소 NO 생성이 증가되는 것 같지만, 이러한 결과는 Lf의 첨가의 영향보다는 IFN- γ 와 LPS의 효과로 인한 증가로 생각된다. 또한 K-Lf의 첨가에 의해서는 약간의 증가효과가 있는 것으로 나타났으나, B-Lf의 첨가에 의해서는 무첨가구와 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과는 So-

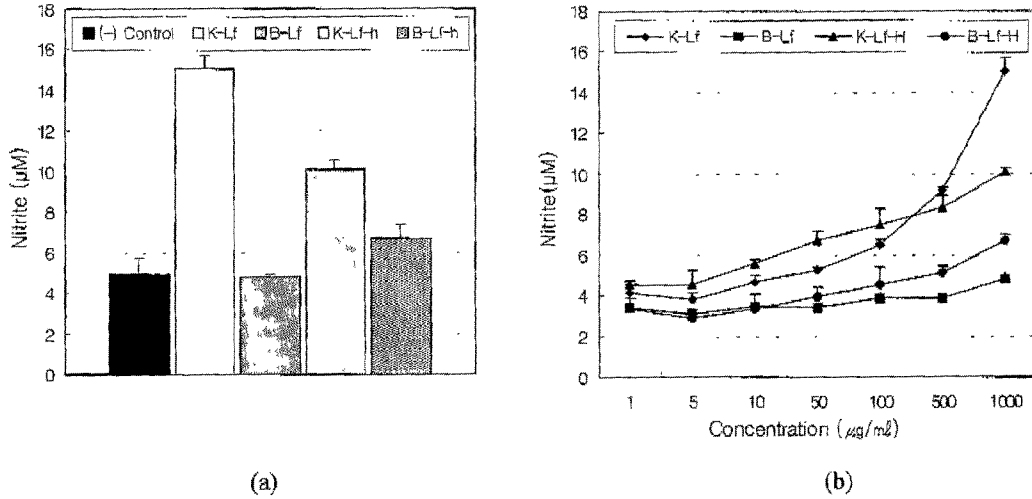


Fig. 3. NO production of RAW264.7 cells by different kinds of lactoferrin and lactoferrin hydrolysates. The concentration of nitrite was calculated with the standard values using known concentrations of NaNO₂. K-LF: lactoferrin from Korean native cattle, B-Lf: bovine lactoferrin, K-Lf-H: K-Lf- hydrolysates, B-Lf-H: B-Lf-hydrolysates. a: RAW 264.7 cells were treated with lactoferrins and its hydrolysates(1mg/ml) for 24hr. b: RAW264.7 cells were treated with different levels of lactoferrins and its hydrolysates for 24hr.

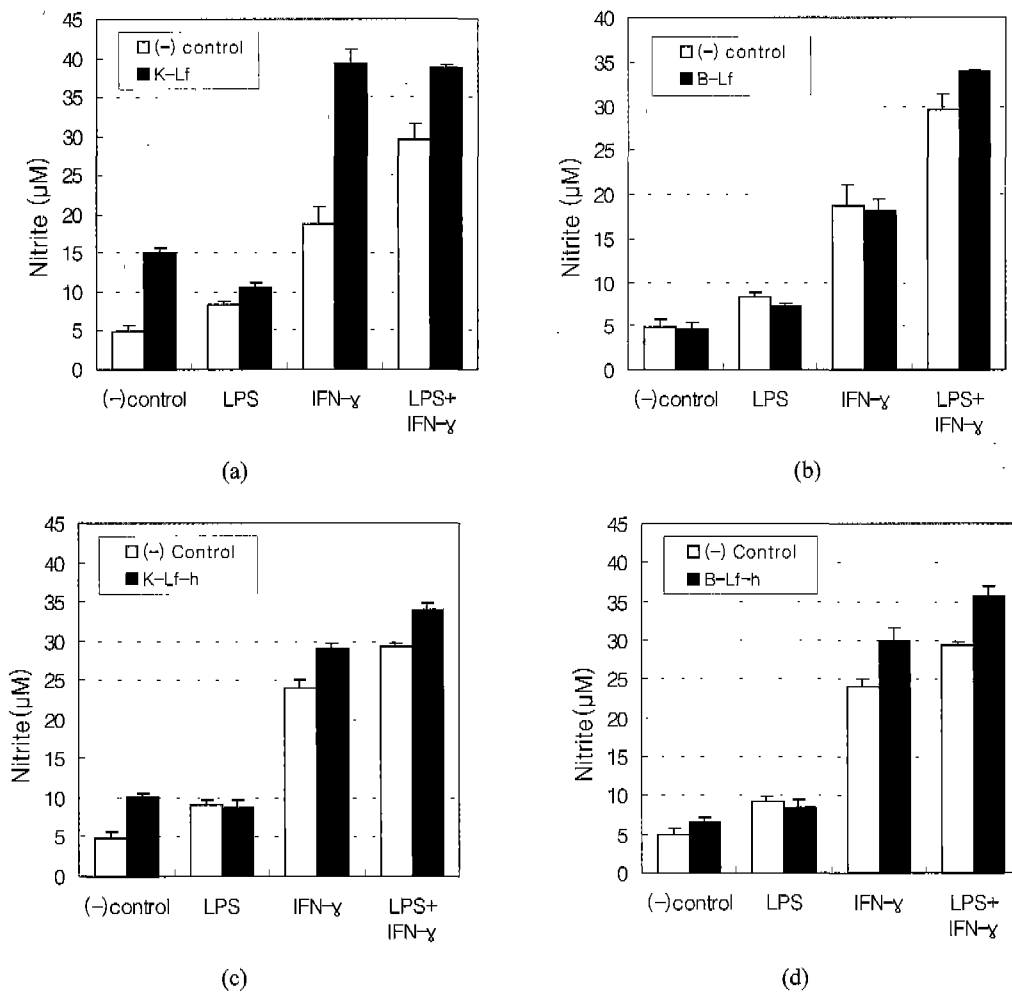


Fig. 4. NO production of RAW264.7 cells by different kinds of lactoferrins and lactoferrin hydrolysate with stimulants. The concentration of nitrite was calculated with the standard values using known concentrations of NaNO_2 . RAW 264.7 cells were treated with lactoferrins and its hydrolysates (1mg/ml) with stimulants for 24hr. K-LF: lactoferrin from Korean native cattle, B-Lf: bovine lactoferrin, K-Lf-H: K-Lf-hydrolysates, B-Lf-H: B-Lf-hydrolysates.

rimachi 등⁽¹³⁾이 쥐의 bone marrow에서 분리한 macrophage에 Lf만을 처리하여 NO의 생성을 유도한 결과와 비슷한 경향을 보여주었다. 이와 같이 우리의 고유 유전자원 중의 하나인 한우의 K-Lf는 다른 Lf와 비교할 때 그 생리학적 특성이 상이하며, 특히 항암, 또는 항염증 관련 기능이 매우 우수할 것으로 생각되며, 이에 대한 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것이라 생각한다.

요약

Lf는 cytokines의 생성 및 면역반응 등의 생체 방어적 기능을 하는 물질로 알려져 있다. 본 연구에서는 Lf와 Lf-h에 의해 macrophage에서 $\text{TNF-}\alpha$ 와 NO 생성에 미치는 효과를 조사하였다. K-Lf 및 K-Lf-h는 단독으로 $\text{TNF-}\alpha$ 의 생성을 증가시켰으며, Lf의 농도에 따라 그 생성량이 증가하였다. LPS와 함께 작용시켰을 경우에는 큰 효과가 없는 것으로 나타났으나, 세

포 성장률은 증가시켰다. 그러나 B-Lf, H-Lf, 그리고 이들의 가수분해물들은 단독으로는, RAW264.7 cell을 자극하여 TNF- α 나 NO의 생성을 증가시키지 못하였다. 또한, K-Lf는 그 자체만으로 TNF- α 에서 보여준 것처럼 NO생성에 영향을 미치며 농도가 높아짐에 따라 NO 생성을 증가시키는 경향을 보여주었다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비에 의하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다(KRF-99-005-G00004).

참고문헌

1. Aisen, P. and Listowsky, I. : Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 357 (1980).
2. Rose, T. M., Plowman, G. D., Teplow, D. B., Dreyer, W. J., Hellstrom, K. E. and Brown, J. P. : Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 1261 (1986).
3. Metz-Boutigue, M. H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. and Jolles, P. : Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.*, 45, 659 (1984).
4. Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P. and Tartar, A., Montreuil, J. and Spik, G. : Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.*, 26, 177 (1991).
5. Arnold, R. R., Cole, M. F. and McGhee, J. R. : A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*, 15, 263 (1997).
6. Nemet, K. and Simonovits, I. : The biological role of lactoferrin. *Haematologia* (Budap). 18, 3 (1985).
7. Broxmeyer, H. E., DeSousa, M., Smithyman, A., Ralph, P., Hamilton, J., Kurland, J. I. and Bognacki, J. : Specificity and modulation of the action of lactoferrin, a negative feedback regulator of myelopoiesis. *Blood*, 55, 324 (1980).
8. Oseas, R., Yang, H. H., Baehner, R. L. and Boxer, L. A. : Lactoferrin: a promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *Blood*, 57, 939 (1981).
9. Ambruso, D. R. and Johnston, R. B. Jr. : Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions, and an enzymatic generating system. *J. Clin. Invest.*, 67, 352 (1981).
10. Hashizume, S., Kuroda, K. and Murakami, H. : Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium. *Biochim. Biophys. Acta.*, 763, 377 (1983).
11. Anderson, W. L. and Tomasi, T. B. Jr. : Stimulation of reduced lysozyme regeneration by transferrin and lactoferrin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 182, 705 (1981).
12. Beutler, B., Milsark, I. W. and Cerami, A. C. : Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science*, 30, 869 (1985).
13. Sorimachi, K., Akimoto, K., Hattori, Y., Ieiri, T. and Niwa, A. : Activation of macrophages by lactoferrin: secretion of TNF-alpha, IL-8 and NO. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 43, 79 (1997).
14. Machnicki, M., Zimecki, M. and Zagulski, T. : Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 *in vivo*. *Int. J. Exp. Pathol.*, 74, 433 (1993).
15. Manogue, K. R., Denventer, J. H. V. and Cerami, A. : Tumor necrosis factor or cachectin. *The Cytokine Handbook*, Thomson, A. (Ed). Academic press, Inc. Sandiego (1992).
16. Vilcek, J. and Lee, T. H. : Tumor necrosis factor. New insights into the molecular

- mechanisms of its multiple actions. *J. Biol. Chem.*, 266, 7313 (1991).
17. Tiegs, G., Wolter, M. and Wendel, A. : Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem. Pharmacol.*, 38, 627 (1989).
 18. Sekut, L. and Connolly, K. M. : Pathophysiology and regulation of TNF- α in inflammation. *Drug News Perspect.*, 9, 261 (1996).
 19. Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, 6, 3051 (1992).
 20. Ignarro, L. J. : Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30, 535 (1990).
 21. Moncada, S. and Higgs, E. A. : Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.*, 21, 361 (1991).
 22. Furchgott, R. F. and Vanhoutte, P. M. : Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.*, 3, 2007 (1989).
 23. 이성수, 고서봉, 오운용, 양영훈, 김규일, 조병욱 : 미토콘드리아 DNA D-loop Region의 PCR-RFLP를 이용한 한우 제주 재래 한우와 타품종과의 유전적 관계분석. *한국축산과학회지*, 40, 335 (1998).
 24. 양희진, 하월규, 양동훈, 박기문, 이수원 : 초유로부터 Lactoferrin의 분리·정제. *한국축산식품학회지*, 20, 125 (2000).
 25. Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamaguchi, K., Wakabayashi, H. and Takase, K. : Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.*, 74, 4137 (1991).
 26. Choe, Y. H. and Lee, S. W. : Effect of lactoferrin on the production of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *J. Cell Biochem.*, 76, 30 (1999).
 27. Garre, C., Bianchi-Scarra, G., Sirito, M., Musso, M. and Ravazzolo, R. : Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562 (s) cells. *J. Cell Physiol.*, 153, 477 (1992).
 28. Hutchens, T. W., Magnuson, J. S. and Yip, T. T. : Interaction of human lactoferrin with DNA: one-step purification by affinity chromatography on single-stranded DNA- agarose. *Pediatr. Res.*, 26, 618 (1989).
 29. He, J. and Furmanski, P. : Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature*, 373, 721 (1995).
 30. Zagulski, T., Lipinski, P., Zagulska, A., Broniek, S. and Jarzabek, Z. : Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection *in vivo*. *Br. J. Exp. Pathol.*, 70, 697 (1989).
 31. Sawatzki, G. and Rich, I. N. : Lactoferrin stimulates colony stimulating factor production *in vitro* and *in vivo*. *Blood Cells*, 15, 371 (1989).
 32. Gutteberg, T. J., Rokke, O., Andersen, O. and Jorgensen, T. : Early fall of circulating iron and rapid rise of lactoferrin in septicemia and endotoxemia: an early defence mechanism. *Scand. J. Infect. Dis.*, 21, 709 (1989).
 33. Silva, A. T. and Cohen, J. : Role of interferon-gamma in experimental gram-negative sepsis. *J. Infect. Dis.*, 166, 331 (1992).

(2001년 7월 25일 접수)