

홀스타인 초유 whey fraction의 면역세포 활성화에 관한 연구

양희진 · 이승환 · 황보식 · 양동훈¹ · 이수원*

성균관대학교 식품생명자원학과, ¹유니온통상

Studies on the Immune Cell Activations of Bovine Colostral Whey Fractions

Hee-Jin Yang, Seung-Hwan Lee, Sik Hwangbo, Dong-Hoon Yang¹ and Soo-Won Lee*

Department of Food and Life Science, Sungkyunkwan University

¹Union Trade Co.

The purpose of this study is to observe the effect of bovine colostrum whey and whey fractions on proliferation of Th1 cells and to verify the effect of whey fractions that are directly related to growth of Th1 cells on macrophages activation. Whey was fractionated into 3 fractions depending on by ultrafiltration (fraction (Fr.) I; molecular weight (Mw.) 10 kDa and more, Fr. II; Mw. 1 kDa-10 kDa, Fr. III; Mw. less than 1 kDa) and examined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Fr. II stimulated and proliferated Th1 cells most at 1 mg/mL concentration and the percentage of cell proliferation was 67.1%. The secretive induction of tumor necrosis factor- α (TNF- α) by whey, Fr. II, protein fraction (Fr. P) and oligosaccharide fraction (Fr. O) after fractionating Fr. II into Fr. P and Fr. O on the basis of Th1 cells growth was that Fr. O had more 80% secretive induction of TNF- α than that of 1 μ g/mL lipopolysaccharide that was positive control. So confirmed that Fr. O induced TNF- α secretion by activating macrophages.

Key words: whey, Th1 cell, macrophage, oligosaccharide, TNF- α

서론

우유는 완전한 식품으로 인정 받고 있으며 인간의 건강을 증진시키는데 큰 공헌을 하고 있다⁽¹⁾. 초유란 포유동물이 분만 후 1주일 이내에 분비하는 유즙을 말한다. 그러나 최근에는 대체로 분만 후 48시간~72시간 이내에 분비하는 유즙을 초유로 정의하고 있다. 일반적으로 48시간 이내에 분비되는 초유 속에는 기능성 물질들이 다량 함유되어 있다.

화학적으로 젖소 초유는 매우 복잡한 액상의 물질로서 단백질, 탄수화물, 지방, 비타민, 미네랄 등이 풍부하다. 또한 갓 태어난 송아지에게 영양소를 공급하는 풍부한 에너지원이며 병원성 미생물에 대한 방어, 미성숙한 장관의 발달, 각종 장기와 조직의 성장, 그리고 면역 체계의 발달 등에 관여하는 면역조절인자, 생리활성인자, 항균인자, 성장호르몬, 성장인자, 세포분열 활성인자 등을 다량 함유하고 있다^(2,3). 이러한 면역적, 생리활성적 특성을 지니고 있는 물질과 인자들

은 주로 초유 whey에 함유되어 있다. α -lactalbumin, β -lactoglobulin이 whey 단백질의 약 70~80%를 차지하고 있고, 이외의 단백질 성분들은 serum albumin, lactoferrin, lactoferoxidase, lactoferricin, immunoglobulin, growth factor, lysozyme, 그리고 미량의 bioactive factor 등이며 각각의 특성을 규명하기 위하여 많은 연구들이 진행되고 있다.

출생 직후의 신생아의 위장관은 성장, 형태학적인 변화, 그리고 기능적 성숙을 하게 되고, 초유 중에 존재하는 성장촉진인자의 분자량은 대략 5,000~10,000 Da 범위이며 정상유보다 10배에서 500배정도 많이 함유되어 있다^(2,4). 이러한 성장촉진인자는 장관면역에 관여하며 특히 미성숙된 장관의 성장을 촉진시킨다⁽⁵⁾. 초유는 인슐린, cortisol, 그리고 insulin-like growth factor(IGF)와 같은 호르몬과 성장촉진인자를 다량 함유하고 있다. 그 중 IGF-I은 신생아의 위장관의 성장에 있어서 중요한 역할을 한다⁽⁶⁾. 젖소 초유의 whey는 interleukin-1(IL-1), IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (INF- γ) 등의 면역조절인자의 특성을 지니고 있는 cytokines를 함유하고 있으며, 이러한 면역조절 및 매개인자는 젖소의 유선에서 생산되어 분비된다⁽⁷⁾. 원⁽⁸⁾은 분만 후 48시간 이내에 분비되는 젖소 초유 whey가 *in vitro* 실험에서 murine Th1 cell인 EL-4와 BALB/c mouse의 splenocyte의 증식을 촉진시키며, 분자량이 1 kDa~10 kDa인 젖소 초유

*Corresponding author : Soo-Won Lee, Department of Food and Life Science, Sungkyunkwan University, 300, Chunchun-dong, Janggan-gu, Suwon, Kyunggi-do, Korea
 Tel: 82-31-290-7805
 Fax: 82-31-290-7815
 E-mail: leesw@skku.ac.kr

whey 분획에 의한 세포 증식 효과가 가장 높다고 보고하였다. 본 연구의 목적은 분만 후 5일 이내에 분비되는 젖소 초유의 whey 및 whey 분획이 Th1 cell의 증식에 미치는 영향을 조사하고, Th1 cell 증식에 직접적으로 관여하는 초유 whey 분획이 macrophage의 TNF- α 분비에 미치는 영향을 검증하여 젖소 초유 whey 분획이 면역세포 활성화에 미치는 영향을 검증하고자 실시하였다.

재료 및 방법

재료

초유는 분만 후 12시간 간격으로 총 10회에 걸쳐 500 mL 씩 손 착유하여 -20°C에 급속 냉동시켜 보관하였다가 상온에서 해동한 후에 모두 혼합하여 사용하였다.

초유 whey의 분리 및 한외여과(UF)에 의한 분획

지방을 제거한 초유 탈지유를 20°C에서 1 N HCl 용액으로 pH를 4.6으로 조정하여 케이신을 침전시킨 후, 1,250×g로 30분간 원심분리하여 whey를 분리하였다. 분리된 whey는 1 N NaOH 용액을 사용하여 pH를 7.2로 조정하여 본 실험에 사용할 초유 whey로 하였다. 초유 whey는 UF 막(Amicon, Beverly, USA)을 이용하여 세 개의 분획, 즉 분획 I(Fr. I, 분자량 10 kDa 이상), 분획 II(Fr. II, 분자량 1 kDa~10 kDa), 분획 III(Fr. III, 분자량 1 kDa 미만)로 각각 분획하였다.

Fr. II에 함유되어 있는 단백질과 당 성분을 각각 분획하기 위하여 Fr. II에 에탄올(Sigma, USA)을 최종 농도 70%(v/v)가 되도록 조절한 후, -20°C에서 단백질을 응집·침전시켰다. 이를 12,500×g에서 30분간 원심분리하여 당 분획(Fr. O)이 함유되어 있는 상등액과 침전한 단백질 분획(Fr. P)을 얻었다.

단백질 및 헥소오스 정량

단백질 정량은 Lowry 등⁽⁹⁾의 방법을 변형한 Markwell 등⁽¹⁰⁾의 방법으로 실시하였으며, 표준물질로는 BSA(Sigma, USA)을 사용하였다. 헥소오스 함량은 페놀-황산법⁽¹¹⁾에 준하여 실시하였으며, 표준물질로는 glucose(Sigma, USA)를 사용하였다.

세포배양

본 연구에 사용된 세포는 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양 받아 사용하였다. EL-4(KCLB40039)는 5%(v/v)의 horse serum, 1%(v/v) 항생제(penicillin-100 units/mL, streptomycin-100(g/mL)와 10 mM의 HEPES buffer, 20 mM의 L-glutamine을 함유한 DMEM(pH 7.2, Gibco/BRL, USA) 배양매지를 사용하여 T-75 flask(TPP, Swiss)에서 배양하였다. 세포가 충분히 배양된 상태일 때 새로운 T-75 flask에 1:20의 비율로 계대 배양하며 사용하였다.

RAW264.7(KCLB40071)은 10%(v/v) fetal bovine serum (FBS)을 함유한 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 세포가 culture dish(φ 100, TPP, Swiss)의 90% 이상 자랐을 때 cell scraper을 이용하여 세포를 culture dish에서 떼어낸 후 1:10의 비율로 계대 배양하여 사용하였다.

L929(KCLB10001)는 10%(v/v) FBS를 함유한 RPMI1640

(Gibco/BRL, USA) 배지를 사용하였다. 세포가 culture dish의 90% 이상 자랐을 때 1% trypsin/EDTA를 처리하여 L929를 culture dish로부터 떼어낸 후 1:9의 비율로 계대 배양하면서 사용하였다.

Th1 cell 증식

Th1 cell 증식 효과는 Marin 등⁽¹²⁾의 방법을 일부 수정하여 실시하였으며, EL-4 cell은 96 well의 microplate(TPP, Swiss)에 최종농도가 1×10⁴ cells/well 이 되도록 하였다. 각각 분획을 첨가하여 5% CO₂와 95%의 상대습도의 조건 하에서 37°C, 2일간 배양하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 분석법⁽¹³⁾ELISA microplate reader(ELx800, Bio-tec, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 증식효과를 검증하였다.

$$EL-4 \text{ cell 증식율}(\%) = (\text{실험구의 O.D.} / \text{대조구의 O.D.}) \times 100$$

Macrophage에 대한 세포독성 측정

TNF- α 분비 능력을 검증하기에 앞서 각 분획이 macrophage에 대한 세포독성의 유무를 측정하였다. RAW264.7을 1×10⁵ cells/well의 농도로 96 well microplate(TPP, Swiss)에 전 배양하여 부착시킨 후 각각 분획을 농도별로 분주하여 배양하였다. 배양조건은 5% CO₂와 95%의 상대습도의 조건 하에서 37°C, 24시간동안 배양하였다. 배양 후 MTT 분석법⁽¹³⁾으로 세포의 생존율로 독성유무를 판단하였다.

TNF- α 분비 능력

Macrophage를 자극·활성화시킴으로써 분비되는 TNF- α 를 이용하여 각각의 분획이 macrophage 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Choe 등⁽¹⁴⁾의 방법을 일부 수정하여 TNF- α 분비 능력을 조사하였다. Lipopolysaccharide(LPS) 처리구의 O.D.가 LPS를 처리하지 않은 대조구 O.D.의 50% 내외의 수치를 나타내는 희석배수의 결과를 L929의 생존율(%)로 환산하여 나타내었다.

$$L929 \text{ 생존율}(\%) = (\text{LPS 처리구 및 실험구의 O.D.} / \text{LPS를 처리하지 않은 대조구의 O.D.}) \times 100$$

결과 및 고찰

Whey 분획의 회수율

초유 whey 1 L를 분획한 후 단백질의 회수량을 조사한 결과, Fr. I이 약 72%, Fr. II가 약 18%, 그리고 Fr. III가 약 10%인 것으로 나타났다. 또한 헥소오스의 함량을 기준으로 볼 때 Fr. I, Fr. II, 그리고 Fr. III가 각각 22.1%, 7.4%, 그리고 70.1%였다(Table 1). Whey중 대부분의 단백질들은 분자량 10 kDa 이상이며, 그 중에는 당단백질이 다수 포함되어 있다⁽¹⁵⁻¹⁶⁾. 본 연구결과, Fr. I에 대부분의 단백질이 분획되어 있는 것으로 나타났으며, 당의 함량도 상당히 높은 것이 확인되었다. 또한 Fr. III에 당 함량이 가장 높은 것으로 볼 때, 대부분의 유당이 Fr. III에 함유되었으리라고 생각된다. 에탄올을 이용하여 Fr. II를 분획한 결과, Table 1에서 나타난 수

Table 1. Recovery rates for proteins and carbohydrates obtained from bovine colostrum whey fractions after ultrafiltration

| | Protein | | Carbohydrate | |
|---------------------------|-------------|------------------|--------------|------------------|
| | Quantity(g) | Recovery rate(%) | Quantity(g) | Recovery rate(%) |
| Colostrum whole whey | 68.52 | 100 | 42.36 | 100 |
| Fr. I (Mw. 10 kDa <) | 49.34 | 72 | 9.38 | 22.1 |
| Fr. II (Mw. 1 kDa~10 kDa) | 12.10 | 17.7 | 3.12 | 7.4 |
| Fr. III (Mw. 1 kDa >) | 6.99 | 10.2 | 29.71 | 70.1 |

(From colostrum whey 1 L)

Table 2. Comparisons on proliferation of EL-4 cells by bovine colostrum whey, Fr. I, II, III, Fr. P and Fr. O at the concentration of 0.1~10 mg/mL¹⁾ (%)

| Sample Conc. (mg/mL) | Whey | Fr. I ²⁾ | Fr. II ³⁾ | | | Fr. III ⁴⁾ |
|----------------------|------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| | | | Fr. II | Fr. P ⁵⁾ | Fr. O ⁶⁾ | |
| 10 | 23.6±1.1 ⁷⁾ | 103.6±1.8 | 92.2±1.7 | 70.3±1.8 | 39.4±1.1 | 14.9±1.5 |
| 5 | 107.5±1.9 | 87.7±1.8 | 35.2±1.2 | 85.5±1.3 | 37.9±1.8 | 13.3±1.5 |
| 2 | 89.3±1.7 | 73.4±1.2 | 156.3±1.4 | 77.1±2.1 | 20.5±2.5 | 6.4±1.1 |
| 1 | 100.9±2 | 71.4±1.5 | 167.1±1 | 63.9±1.9 | 13.2±2.1 | 152.1±1.6 |
| 0.1 | 88.5±1.7 | 64.9±1.9 | 120.9±2.7 | 69.4±1.8 | 15.6±1.2 | 119.1±2.2 |

¹⁾Percentage of control proliferation was 100. ²⁾Fr. I: colostrum whey fraction(Mw. 10 kDa <), ³⁾Fr. II: colostrum whey fraction((Mw. 1 kDa~10 kDa),⁴⁾Fr. III: colostrum whey fraction(Mw. 1 kDa >), ⁵⁾Fr. P: protein fraction from Fr. II, ⁶⁾Fr. O: oligosaccharide fraction from Fr. II.⁷⁾Mean proliferation(%)±standard deviation obtained from three separate experiments(n=3 for each determination) are shown.

치를 계산해보면 단백질과 올리고당이 각각 79.5%와 20.5%인 것으로 나타났다. 따라서, 유즙 중의 유리 올리고당, 또는 glycopeptide성 성분들은 Fr. II에 분획된 것으로 생각된다.

Th1 세포 활성화

이러한 각각의 분획을 이용하여 Th1 cell에 대한 세포증식을 조사하였다. 각각의 시료를 이용하여 농도 대비 세포 증식효과를 조사한 결과, Table 2와 같이 1 mg/mL의 농도를 기준으로 할 때, whey와 Fr. I은 거의 세포증식효과가 없었으나, Fr. II는 약 67%, 그리고 Fr. III는 약 52%의 증식효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 0.1 mg/mL에서도 약 20%의 세포증식 효과가 있는 것으로 나타났다.

Sirota 등⁽¹⁷⁾은 사람의 초유가 농도 의존적으로 natural killer(NK)의 세포독성을 저해하였는데, human recombinant IL-2를 첨가함으로써 그 결과가 역전되었으며, 낮은 농도의 사람 초유가 IL-2 분비를 유도하고, 분비된 IL-2가 NK cell을 활성화시켜 세포독성 효과를 발휘하게 한다고 보고하였다. Cross 등⁽¹⁸⁾은 *in vitro*에서 면역적 기능을 조사해 본 결과, whey protein concentrate(WPC)가 세포분열물질에 의해 활성화된 T, B lymphocyte의 증식을 억제하였으나 T lymphocyte의 IL-2 의존적 증식을 억제하지는 않았다고 하였다. 또한 T, B lymphocyte의 증식을 억제하는 WPC를 pepsin과 pancreatin으로 가수분해할 경우 WPC의 T, B lymphocyte 증식 억제 효과는 제거된다고 보고하였다. 이러한 보고는 고분자 peptide보다 저분자 peptide가 T, B lymphocyte의 증식을 증대시킬 수 있음을 의미하므로 본 연구에서의 결과(Table 2)와도 일치한다. Sirota 등⁽¹⁷⁾은 비교적 낮은 농도인 0.5% 인 간의 초유가 peripheral blood mononuclear cells로부터 IL-2 분비를 유도하였으나 상대적으로 고농도인 10%에서는 IL-2 분비가 저해되었다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 저농

도에서의 Fr. II, III에 의해 Th1 cell이 증식(Table 2)하였으며, Fr. II 1 mg/mL 농도에서 세포증식 효과가 가장 높았는데, 이러한 결과는 초유의 유래가 다르기는 하지만 Sirota 등⁽¹⁷⁾의 보고와 일치하고 있으며, 특히 Fr. II가 Th1 cell의 증식을 유도하고 있는 것으로 확인되었다.

Colic 등⁽¹⁹⁾은 IL-2에 의한 *in vitro*상에서 lymphocyte의 증식은 IL-2 증가와 IL-2R α 발현에 의해 상승 조절된다고 보고하였다. 세포 표면에는 각종 수용체가 존재하는데 그 중, T cell 표면에는 세 개의 chain으로 구성되어 있는 IL-2R이 존재한다. Luk 등⁽²⁰⁾은 T cell 증식과 FasL가 발현되는 것은 IL-2에 의해 Stat5가 활성화됨으로써 일어나며 T cell의 생존은 Akt와 Bcl-2의 발현을 활성화시키는 receptor region에 의존하기 때문에, 성장과 생존을 자극하는 IL-2R chain의 신호 전달이 T cell의 운명을 좌우한다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 Fr. II에 의한 Th1 cell 증식 효과는, Th1 cell이 Fr. II에 의해 활성화되어 IL-2를 분비하고 분비된 IL-2가 IL-2R α , β chain과 결합한 후, γ chain에 의한 세포 내 신호전달을 통해서 Th1 cell 증식이 일어나는 autocrine action에 기인한다고 생각된다.

Fr. II의 분자량은 1 kDa~10 kDa 사이로서 peptide와 올리고당의 분획이라 할 수 있다. 특히 올리고당은 세포 표면과 세포내에서 신호전달 과정에 관여하며⁽²¹⁾, 당 성분이 monocyte/macrophage를 활성화시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다⁽²²⁻²³⁾. 따라서 Fr. II의 세포증식효과가 단백질 분획에 의한 것인지, 아니면 유즙 중의 올리고당에 의한 것인지를 확인하기 위하여 단백질 분획(Fr. P)과 당 분획(Fr. O)을 이용하여 세포증식효과를 조사하였다. 그 결과, Fr. P와 Fr. O 단독으로는 Th1 cell 증식에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Table 2). 따라서 Fr. II에 의한 Th1 cell의 증식효과는 단백질 또는 올리고당의 단독적인 작용보다 단백질과 올리고당의 복합적

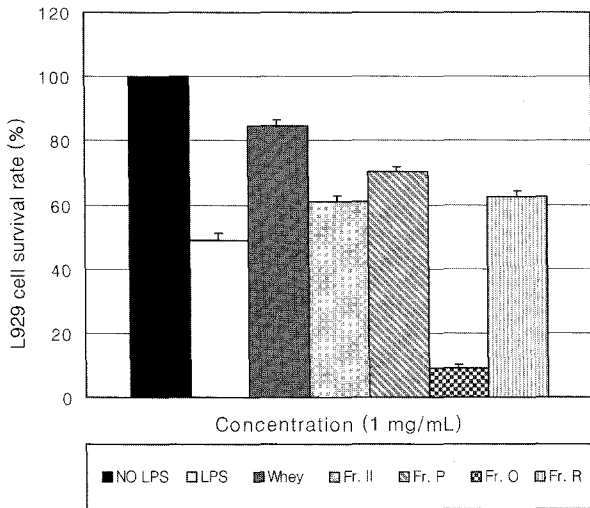


Fig. 1. TNF- α production secreted from RAW264.7 cells stimulated by bovine colostrum whey, Fr. II, Fr. P and Fr. O. Concentration of LPS was at 1 μ g/mL. Fr. II: colostrum whey fraction (Mw. 1 kDa~10 kDa), Fr. P: protein fraction from Fr. II, Fr. O: oligosaccharide fraction from Fr. II. Fr. R was reconstituted in proportion to protein and oligosaccharide contained in Fr. II.

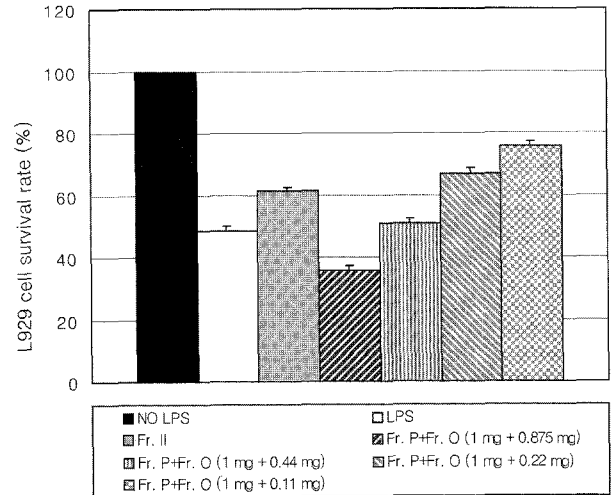


Fig. 2. TNF- α production secreted from RAW264.7 cells stimulated by different concentrations of Fr. O. Concentration of protein contained in Fr. II was fixed at 1 mg/mL. Concentration of LPS was at 1 μ g/mL. Fr. II: colostrum whey fraction (Mw. 1 kDa~10 kDa), Fr. P: protein fraction from Fr. II, Fr. O: oligosaccharide fraction from Fr. II.

인 작용에 의해 유도되는 것으로 생각된다.

Macrophage 활성화

초유 whey분획 중 세포증식효과가 가장 뛰어난 Fr. II가 macrophage의 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

Th1 cell 증식의 결과를 토대로 Fr. II에 의한 macrophage 활성화 실험을 실시하였다. 먼저 Fr. II를 Fr. P와 Fr. O로 분획하여, 각각의 분획이 murine macrophage인 RAW264.7에 대하여 세포독성이 있는지를 확인한 결과, 0.001~1 mg/mL 농도에서 각각의 분획이 대조구 대비 90% 이상의 생존율을 보임으로써 RAW264.7에 독성을 갖지 않음을 확인하였다(data 생략).

RAW264.7를 LPS로 자극한 후 TNF- α 의 분비량을 시간대 별로 측정한 결과, 6시간 자극으로 충분히 TNF- α 를 분비하는 것으로 나타났다. 따라서 whey 분획을 이용한 macrophage 자극 시간을 6시간으로 정한 후 본 연구를 실시하였다. 각각의 시료를 이용하여 RAW264.7를 자극한 후, 분비된 TNF- α 함유 배양액을 이용하여 L929의 생존율을 조사한 결과, 초유 whey는 1 mg/mL에서 그 생존율이 84.8%를 나타냄으로써 TNF- α 분비 유도 능력은 그리 크지 않은 것으로 나타났다 (Fig. 1). Fr. II의 경우, 60.8%, Fr. P는 70.4%를 나타내었으나, Fr. O의 경우 L929 생존율이 9%에 불과하였다. Fr. II에 존재하는 단백질과 올리고당의 함량비는 약 4:1이며 (Table 1), 이와 유사한 비율로 Fr. P와 Fr. O를 다시 혼합한 시료인 Fr. R의 경우, Fr. II에 의한 L929 생존율 60.79%와 거의 유사한 62.6%의 생존율을 나타내었다 (Fig. 1, Fr. R). 따라서, 양성대조구로 사용한 LPS 보다도 약 80% 이상의 TNF- α 분비 유도 능력이 강한 것으로 확인된 Fr. O는 macrophage를 활성화시켜 TNF- α 분비를 유도하는 분획인 것으로 확인되었다. 이는 macrophage의 활성화에 의한 TNF- α 분비의 주체는 Fr. O인 것을 입증하는 것이라고 할 수 있을 것이다.

이를 재확인하기 위하여 Fr. P와 Fr. O 혼합물의 단백질 함유량을 1 mg이 되도록 조정된 후, 올리고당의 함유량을 0.11~0.875 mg까지 증가시켜 TNF- α 분비 능력을 측정하였다. 그 결과, 당의 함량이 높을수록 농도 의존적으로 L929의 생존율이 각각 75.7%, 66.8%, 50.7%, 35.9%로 낮아져, Fr. II에 존재하는 올리고당 분획이 TNF- α 분비를 유도하고 있는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 따라서, 본 연구에 사용된 Fr. II의 Fr. O 분획은 macrophage의 활성화에 직접적으로 관여하고 있을 것으로 생각된다.

TNF는 암세포의 괴사를 유도하는 인자로 알려져 있다⁽²⁴⁾. Wang 등⁽²⁵⁾은 IL-2와 IL-6 DNA를 mouse에 복강 주사하게 되면 macrophage의 세포독성, MHC II 발현, IL-1, TNF의 분비 등이 증가되었으며, 이러한 결과는 IL-6 DNA 보다는 IL-2 DNA의 경우가 더 효과적으로 macrophage를 활성화시켜 항암관련 면역 반응을 활성화시킨다고 보고하였다. 본 연구에서는 Fr. II가 Th1 cell의 증식을 유도하고 있는 것으로 확인되었고, 이러한 T cell 증식 효과는 IL-2의 autocrine action으로 생각된다. 따라서 본 연구의 T cell 증식 결과 (Table 2)는 체내 면역체계에서 Fr. II에 의한 T cell 활성화뿐만 아니라, T cell이 분비한 IL-2에 의해 macrophage 역시 활성화되어 TNF- α 분비를 유도할 수 있으므로 Wang 등⁽²⁵⁾의 연구 보고와 같이 감염된 세포나 암세포에 대한 세포독성 효과가 일어날 가능성이 높다고 생각된다.

Sugisawa 등⁽³⁾에 의하면 젖소 초유가 phagocytosis를 촉진하는 효과가 있고 초유의 농도 25%까지 phagocytosis를 촉진하는 효과가 농도 의존적으로 증가하며, 이러한 초유의 효과는 정상유나 혈청과 비교했을 때 훨씬 더 높다고 보고하였다. 또한 강력하게 다형핵 백혈구의 phagocytosis를 활성화시켜 신생아의 비특이적 면역 반응의 발달에 기여한다고 보고하였다. 본 연구에서는 TNF- α 분비를 유도하는 분획이 Fr. O인 것으로 확인되어, 이 Fr. O에 의해 macrophage가 활성화

화됨으로써 phagocytosis가 촉진되고 macrophage가 분비한 TNF에 의해 세포독성이 증가될 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 관점에서 Sugisawa 등⁽³⁾의 초유에 의한 phagocytosis 촉진 효과는 초유 중에 함유되어 있는 올리고당과 glycoconjugates에 기인한 것이라고 생각된다.

초유 올리고당을 낮은 pH에서 여러 가지 소화 효소를 이용하여 올리고당의 소화정도를 조사한 결과, 아주 약간의 구조적 변형이 발생하였으며, 이러한 올리고당의 구조적 변형은 산성 올리고당보다 중성 올리고당에서 미세하게 변형되었다. 또한 구조적 변형을 가져온 중성 올리고당은 lacto-N-triose와 galactose였으며, N-acetylneuraminic acid 혹은 fucosyl 잔기를 가지고 있는 올리고당의 경우는 변형이 없었고, 올리고당은 약 5% 미만으로 소화되며 대부분의 올리고당은 대장까지 운반되어 prebiotics 혹은 장관 면역 체계에 영향을 미치는 인자로서 중요한 역할을 한다고 하였다⁽²⁶⁾. 이러한 올리고당의 생리학적 특성은 젖소의 경우 장관에서 효소에 의해 분해되어 흡수되지 않는다⁽²⁷⁻²⁸⁾. 인유에도 올리고당의 함유량이 많지만 신생아의 소장에서 소화되거나 흡수되지 않으며 원형 그대로 대장으로 운반된다⁽²⁹⁾. 따라서 본 연구에서 확인된 Fr. O에 의한 macrophage 활성화는 초유 올리고당 및 glycoconjugates가 소화효소에 의해 분해되지 않고 장관에 도달하여 pathogen에 대한 경쟁적 저해인자로서 장관면역에 관여하며, 또한 monocyte/macrophage를 직접적으로 자극하여 활성화시킴으로써 phagocytosis로 pathogen을 제거하고 세포 내에서의 신호전달, 세포 상호간의 신호전달을 통한 세포성 면역반응을 유도할 수 있으리라 생각되며, 이에 관한 연구가 지속적으로 이루어져야 한다고 생각된다.

요 약

본 연구에서는 분만 후 5일 이내에 분비되는 젖소 초유의 whey 및 whey 분획이 Th1 cell의 증식에 어떤 영향을 미치는지, 그리고 Th1 cell 증식에 직접적으로 관여하는 whey 분획이 macrophage의 TNF- α 분비에 미치는 영향을 조사하였다. 초유 whey를 ultrafiltration으로 분자량별로 분획한 결과, 단백질 성분의 회수율은 Fr. I, II, III가 각각 72%, 17.7%, 10.2%였으며, 당 성분의 회수율은 Fr. I, II, III가 각각 22.1%, 7.4%, 70.1%였다. Fr. II를 재분획한 Fr. P의 단백질 회수율과 Fr. O의 당 회수율은 각각 86.9%, 88.8%였다. 각각의 whey 분획의 농도 대비 Th1 cell 증식 효과를 검증한 결과, 1 mg/mL 농도에서 Fr. II가 Th1 cell을 가장 많이 자극시켰으며, 세포증식율은 67.1%였으나, Fr. II의 단백질 및 올리고당 분획의 세포증식효과는 없는 것으로 나타났다. Whey의 각각의 분획을 이용하여 TNF- α 분비 능력을 조사한 결과, Fr. O가 양성대조군으로 사용한 LPS보다 약 80% 이상의 TNF- α 분비 유도 능력이 있는 것으로 나타났다.

문 헌

1. Kalle, M. Cow milk and human development and well-being. *Livest. Prod. Sci.* 65: 1-18 (2000)
2. Simmen, F.A., Cera, K.R. and Maha, D.C. Stimulation by colos-

- trum or mature milk of gastrointestinal tissue development in newborn pigs. *J. Anim. Sci.* 68: 3596-3603 (1990)
3. Sugisawa, H., Itou, T. and Sakai, T. Promoting effect of colostrum on the phagocytic activity of bovine polymorphonuclear leukocytes *in vitro*. *Biol. Neonate.* 79: 140-144 (2001)
4. Donovan, S.M. and Odle, J. Growth factors in milk as mediators of infant development. *Annu. Rev. Nutr.* 14: 147-167 (1994)
5. Parkkinen, J., Finne, J., Achtman, M., Vaisanen, V. and Korhonen, T. Escherichia coli strains binding neuraminyl alpha 2-3 galactosides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 456-461 (1983)
6. Xu, R.-J. Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 35-48 (1996)
7. Katsuro, H., Satoshi, K., Hitoki, Y., Rikio, K. and Hiroshi, I. Detection of cytokines in bovine colostrum. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 76: 183-190 (2000)
8. Won, D.H. Immune effect of bovine colostrum whey. M.S. thesis, Sungkyunkwan Univ., Seoul (1999)
9. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265 (1951)
10. Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L. and Tolbert, N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87: 206-210 (1978)
11. Hodge, J.E. and Hofeiter, B.T. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Vol. 1, p. 338, Whistler, R.L. and Wolfrom, M.L. (eds.). Academic Press, New York, USA (1962)
12. Marin, M.L., Murtha, J., Dong, W., Pestka, J.J. Effects of mycotoxins on cytokine production and proliferation in EL-4 thymoma cells. *J. Toxicol. Environ. Health.* 48: 379-96 (1996)
13. Charnichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Michell, J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942 (1987)
14. Choe, Y.H. and Lee, S.W. Effect of lactoferrin on the production of tumor necrosis factor- α and nitric oxide. *J. Cell. Biochem.* 76: 30-36 (1999)
15. Pramod, K.G. and Gill, H.S. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *Br. J. Nutr.* 84: S69-S74 (2000)
16. Kobata, A. Milk glycoproteins and oligosaccharides. p. 423. In: *The Glycoconjugates*. Vol. I, Horowitz, M. and Pigman, W. (eds.). Academic Press, New York, USA (1977).
17. Sirota, L., Straussberg, R., Notti, I. and Bessler, H. Effect of human colostrum on interleukin-2 production and natural killer cell activity. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal.* Ed. 73: F99-F102 (1995)
18. Cross, M.L. and Gill, H.S. Modulation of immune function by a modified bovine whey protein concentrate. *Immunol. Cell. Biol.* 77: 345-350 (1999)
19. Colic, M. and Savic, M. Garlic extracts stimulate proliferation of rat lymphocytes *in vitro* by increasing IL-2 and IL-4 production. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 22: 163-181 (2000)
20. Luk, V.P., Yosef, R., James, D.L., Brad, H.N., Abul, K.A. and David, B. Uncoupling IL-2 Signals that Regulate T Cell Proliferation, Survival, and Fas-mediated Activation-Induced Cell Death. *Immunity.* 11: 281-288 (1999)
21. Zanetta, J.-P. Structure and functions of lectins in the central and peripheral nervous system. *Acta Anatomica.* 161: 180-195 (1998)
22. Putz, E.F. and Mannel, D.N. Monocyte activation by tumour cells: A role for carbohydrate structures associated with CD2. *Scandinavian J. Immunology* 41: 77-84 (1995)
23. Zhu, H.-G., Zollner, T.M., Klein-Franke, A. and Anderer, F.A. Activation of human monocyte/macrophage by IL-2/IFN- γ is linked to increased expression of an antitumor receptor with specificity for acetylated mannose. *Immunology Letters* 38: 111-119 (1993)

24. Smyth, M.J. and Johnstone, R.W. Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Microsc. Res. Tech.* 50: 196-208 (2000)
25. Wang, Q., Cao, X., Wang, J., Zhang, W., Tao, Q. and Ye, T. 2000. Macrophage activation of lymphoma-bearing mice by liposome-mediated intraperitoneal IL-2 and IL-6 gene therapy. *Chin. Med. J (Eng)*. 113: 281-285 (2000)
26. Gnoth, M.J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E. and Rudloff, S. Human milk oligosaccharides are minimally digested *in vitro*. *J. Nutr.* 130: 3014-3020 (2000)
27. Green, B., Merchant, J. and Newgrain, K. Milk composition in the eastern quoll, *Dasyurus viverrinus* (Marsupialia, Dasyuridae). *Aust. J. Biol. Sci.* 40: 379-387 (1987)
28. Messer, M., Fitzgerald, P., Merchant, J. and Green, B. Changes in milk carbohydrates during lactation in the eastern quoll *Dasyurus viverrinus* (Marsupialia). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 88: 1083-1086 (1987)
29. McVeagh, P. and Brand, M.J. Human milk oligosaccharides, only the breast. *J. Paediatr. Child. Health.* 33: 281-286 (1997)

(2001년 12월 30일 접수; 2002년 8월 15일 채택)