



α - Lactalbumin의 암세포 증식 저해효과에 관한 연구

이수원 · 신영하 · 황보 식
성균관대학교 생명공학부

Antitumor Activity of α -Lactalbumin on the Tumor Cells

Soo-Won Lee, Young-Ha Shin and Sik Hwangbo
Faculty of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University

Abstract

Bovine serum albumin(BSA), α -lactalbumin(α -LA), β -lactoglobulin(β -LG) and bovine immunoglobulin G (IgG) were investigated the cytotoxicity on tumor cell lines. α -LA was shown a tendency of dose dependant on cytotoxicity using WiDr. The growth of WiDr was inhibited 82% by 1mg/ml of α -LA. However, IgG, BSA and β -LG were not shown the cytotoxicity on WiDr. When α -LA was purified by using high pressure liquid chromatography(HPLC), the main component(α -LA) was eluted at 33.057 min and extremely small quantities eluted at 32.310 min. The cytotoxicity of main component (eluted at 33.057 min peak) was lower than commercial α -LA. And the cytotoxic activity of hydrolyzed α -LA and α -LA treated with EDTA were lower than commercial α -LA on tumor cells.

Key words : α -lactalbumin, cytotoxicity, whey protein, MTT assay

서 론

우유에는 수많은 영양소가 함유되어 있으며, 그 중에서도 단백질은 가장 중요한 영양소원이다. 우유 단백질은 소화성이나 아미노산 조성 등으로 볼 때, 영양학적으로 가장 우수한 식품 단백질의 하나이다(Lee, 2001). 우유 단백질은 음용 또는 유제품의 형태로 폭 넓게 이용되어 왔으나, 최근 단백질의 분리기술이 발전하여 상업적인 규모로 우유로부터 특정 단백질을 대량으로 분리할 수 있게 되었다(Kee and Hong, 1998; Ye et al, 2000). 따라서, 우유로부터 분리한 특정 우유 단백질을 식품소재로 이용되는 단계에 와 있으며, 우유 단백질의 중요성이 새로운 관점에서 주목을 받기 시작하고 있다.

유청 단백질 중의 casein micelle의 안정화에 기여하는 β -lactoglobulin(β -LG) (Kee and Hong, 1992; Kuwata et al, 1995) 유당의 생합성에 관여하는 α -lactalbumin(α -LA)등은 (Hakansson et al, 1995; Chang et al, 2000; Tonya et al, 2000)

새로운 형태의 식품소재로 개발할 수 있는 가능성이 매우 높은 대표적인 성분이라 할 수 있다. 이 밖에도 우유 중에는 극히 미량으로 함유되어 있으나, 생리적으로 다양한 기능을 발휘하고 있는 성분이 많이 포함되어 있다. Immunoglobulin(Ig)은 병원성 미생물 등에 의해 발생하기 쉬운 질병에 대한 면역력을 신생아에게 부여하는 역할을 하며, 이는 정상유에 비해 초유에 다량으로 함유되어 있다(Hakansson et al, 1995; Bounou et al, 1991; Willi et al, 1991). 또한 락토펜은 미생물에 대한 방어작용, 철분흡수 촉진작용, 염증 조절작용 등 우유의 대표적인 생리활성물질이다(Arnold et al, 1997; Bullen and Armstrong, 1981; Nemetm and Simmonovits, 1997; Mannsson et al, 1990). 이밖에도 분자량 5 kDa~10 kDa 사이에 많은 세포성장인자가 함유되어 있어, 우유는 생리활성인자의 보고라 해도 과언이 아니다.

현재, 유청단백질 중 대량 생산되어 판매되고 있는 성분은 BSA, α -LA, β -LG 그리고 IgG 등이다. 그 중에서 α -LA는 모유 유청의 약 41%, 총 단백질의 약 28%를 차지하고 있으나, 우유 중에는 총 단백질의 약 3% 정도를 함유하고 있어, 우유와 모유에서의 α -LA의 기능적 차이가 있음이 시사되고

Corresponding author : S. W. Lee, Faculty of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, 300, Chunchun-dong, Jangan-gu Suwon, Kyunggi-do, Korea.

있다(Hakansson et al, 1995). 또한 α -LA의 단량체는 세포독성이 없으나, 2량체 이상의 다량체가 될 경우 세포독성을 나타내는 것이 보고되어 있으나 (Huang et al, 2000; Matsumura et al, 2000; Alstonmills et al, 1977), 이에 대한 정확한 이유는 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 상업적으로 제조·판매되고 있는 유청단백질 중 IgG, BSA, α -LA 그리고 β -LG를 이용하여 각종 암세포에 대한 세포독성을 검증하기로 하였다. 또한 그 중에서 가장 강한 세포독성을 나타내는 α -LA를 이용하여, α -LA과 세포독성의 관련성을 검토하여 보았다.

재료 및 방법

재 료

Bovine IgG, bovine serum albumin(BSA), α -LA, β -LG, trypsin, streptomycin, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), penicillin은 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였다. 암세포인 MKN45, T98G, HepG2, HT29, HeLa, A498, WiDr은 한국 세포주은행으로부터 분양을 받아 사용하였다. Fatal bovine serum(FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 및 RPMI1640 배지는 Gibco BRL Pro.에서 구입하였다. 그 밖의 시약은 생화학용을 사용하였다.

세포 배양

한국 세포주 은행으로부터 분양 받은 WiDr (KCLB 10218), A498 (KCLB 30044), HeLa (KCLB 10002), MKN45 (KCLB 80103), T98G (KCLB 21690), HepG2 (KCLB 58065), 그리고 HT29 (KCLB 30038)세포는 10%(v/v) FBS와 항생제 (penicillin, 100unit/streptomycin, 100mg/ml)를 함유하는 DMEM 및 RPMI1640 배지(pH 7.2)를 사용하여 5% CO₂ incubator(37°C)에서 배양하면서 세포가 culture dish(ϕ 100)의 90% 정도 성장하였을 때, trypsin/EDTA를 이용하여 culture dish로부터 떼어낸 후 1 : 9의 비율로 계대 배양하며 실험에 사용하였다.

MTT Assay

A498, WiDr, T98G는 56°C에서 30분간 불활성시킨 10% (v/v) fatal bovine serum(FBS)을 함유한 DMEM 배지를 이용하여 배양하였으며, HeLa, HT29, MKN-45, HepG2세포는 RPMI1640 배지로 배양하였다. 각각의 세포주는 시료를 처리하지 않은 대조군이 세포 접종 당시로부터 4일이 경과하여 MTT 시험 종료 후 두 세포가 지수 함수적으로 활발히 증식하면서 흡광도(OD₅₄₀)가 0.6~0.7에 이를 수 있는 세포수를

적정 세포수로 하여 MTT assay를 하였다(Kronman et al, 1981).

α -Lactalbumin의 정제

구입한 α -LA으로부터 미량성분을 제거하기 위하여 역상 HPLC column을 이용하여 정제하였다. column은 Nova-Pack C18(3.9×150mm, Waters)을 이용하였으며, HPLC는 M930 system (Young-Lin, Korea)을 사용하였다. 용출 용매는 A (10% acetonitril, 0.07% TFA함유) 및 B (90% acetonitril, 0.05% TFA함유)를 사용하였으며, 0~5min (A 100%), 5~40min (B 100%)의 직선 gradient로 분리하였다. 용출되는 단백질은 M720 detector (Young-Lin)를 사용하여 230nm에서 검출하였다.

α -Lactalbumin의 가수분해

α -LA을 20mM Tris-HCl (pH 7.5)에 용해시킨 후, trypsin을 사용하여 37°C에서 16시간 부분 가수분해하였다(E : S = 1 : 50). 가수분해 후, 단백질 용액을 100°C에서 2분간 가열하여 효소반응을 중지시켰다.

결과분석

시험군에서 6개 well의 OD값으로부터 평균값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 OD₅₄₀값에 대한 백분율을 산출하였다. 이 백분율은 대조군과 비교한 시험군의 세포 생존율에 해당하는 값으로, 이를 이용하여 세포성장에 대한 영향을 분석하였다.

Table 1. Growth inhibitory rates of milk whey proteins on each human cancer cell lines (%)

Components	Cell lines							
	WiDr	A498	HeLa	HepG2	HT29	MKN45	T98G	
IgG	1.0 ¹⁾	0.2 ²⁾	29.7	2.3	37.2	16.4	9.3	0.7
	0.1	6.0	25.0	5.8	29.8	17.7	10.2	- 6.8
	0.01	- 8.4	31.8	- 9.2	15.8	12.5	4.6	- 3.4
BSA	1.0	16.4	6.1	- 2.1	17.6	37.6	6.4	- 3.9
	0.1	9.7	28.8	- 1.2	15.1	38.3	0.2	- 4.6
	0.01	- 5.6	34.7	2.1	10.8	39.4	- 2.1	4.3
β -LG	1.0	16.5	-6.8	- 7.9	1.3	17.8	25.5	-15.4
	0.1	12.3	18.9	- 6.2	16.4	21.3	8.6	- 5.6
	0.01	0.8	22.8	- 6.4	20.8	21.2	- 6.8	2.6
α -LA	1.0	92.8	93.5	99.0	53.4	86.7	98.5	33.8
	0.1	2.5	16.3	2.7	12.3	9.0	- 5.4	5.7
	0.01	- 8.9	15.2	-10.8	10.8	- 4.6	- 5.5	- 2.5

¹⁾ Sample concentration (mg/ml).

²⁾ Cell growth inhibitory rate (%).

결과 및 고찰

우유 단백질의 암세포에 대한 세포독성

우유 단백질이 암세포의 성장에 미치는 영향을 검증하기 위해 MTT assay를 실시한 결과, α -LA은 T98G를 제외한 모든 암세포에 대해 강한 세포증식 억제효과가 있는 것으로 나타났다(Table 1). α -LA은 1mg/ml의 농도에서 WiDr에서 약 92.8%, A498에서 93.5%, HeLa에서 99.0%, HepG2에서 53.4%, HT29에서 86.7%, 그리고 MKN45에서 98.5%의 세포성장 저해효과가 있었다. BSA의 경우 HT29에 대해서만 37% 이상의 성장 저해효과가 있는 것으로 나타났으며, 그 이외의 암세포에 대해서는 성장저해효과가 없는 것이 확인되었다(Table 1). IgG 및 β -LG 등은 암세포 성장을 거의 저해하지 못하였다. 일반적으로 세포 성장을 50% 이상 저해할 경우, 항암효과가 있는 것으로 보고되고 있어 (Matsumura et al, 2000 ; Eugene and Lawrence, 2000), α -LA를 제외한 다른 유청단백질은 본 연구에서 사용한 cell lines에 대해서는 항암효과가 거의 없을 것으로 생각된다.

WiDr을 이용하여 α -LA의 IC₅₀을 측정된 결과, 0.9mg/ml 이었으나(Fig. 1), 0.5mg/ml 이하의 농도에서는 성장 저해효과가 거의 없는 것으로 나타났다. 지금까지 보고된 바에 의하면, α -LA이 다량체일 경우 세포 성장억제효과가 없으나, 2량체 이상의 다량체를 형성할 경우나, 금속 이온과 결합할 경우, 또는 정제과정 중에 다른 미량성분이 혼입되었을 경우 (Tonya et al, 2000), 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있으나, 아직 정확한 이유는 잘 밝혀져 있지 않다. 따라서, 본 연구에 의해 나타난 α -LA의 세포독성 원인을 구명하기 위해 먼저 α -LA로부터 미량성분을 제거하기로 하였다.

α -LA의 정제 및 세포독성

본 연구에 사용한 α -LA는 전기영동상 정제도가 85% 이

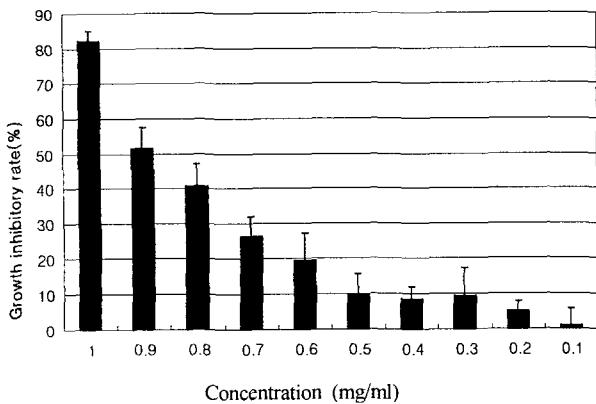


Fig. 1. Growth inhibition concentrations of α -lactalbumin on WiDr.

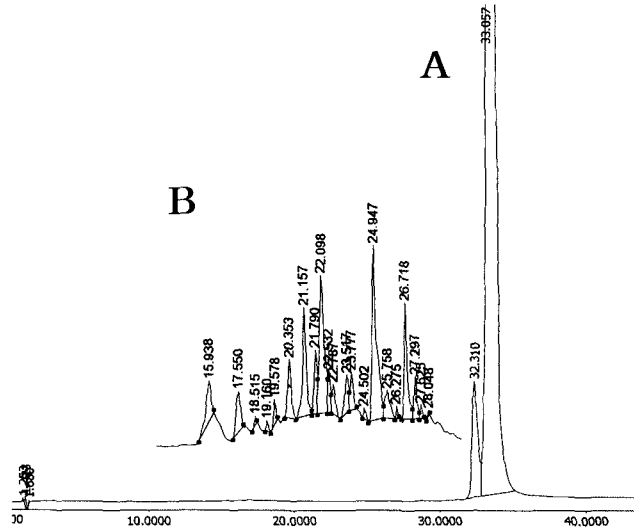


Fig. 2. HPLC patterns of α -lactalbumin (A) and hydrolyzed α -lactalbumin(B) on C18 reversed phase column. Elution peak at 33.057min was collected and lyophilization for cytotoxicity analysis. Inset in B shows hydrolyzed α -lactalbumin with trypsin for 16 hr at 37°C.

상의 것으로 (Eugene and Lawrence, 2000; Kronman et al, 1981), 정제과정 중에 암세포의 성장을 억제하는 성분이 α -LA 확분에 혼입되어 있을 가능성을 배제할 수 없어, α -LA를 HPLC로 정제하기로 하였다. 구입한 α -LA을 C₁₈ 역상 column을 이용하여 분리한 결과, 32.31분대의 극히 미량의 성분과 33.057분대의 주요 성분으로 분리되어 용출되었다 (Fig. 2-A). 주요성분인 33.057분대의 peak를 분취하여 농축시킨 후, SDS-PAGE로 분석한 결과, α -LA인 것이 확인되었다(Fig. 3, lane 1). 또한, 전기영동상 이 성분은 HPLC로 분리하기 전의 α -LA에 존재하고 있는 저분자량의 물질들(Fig. 3, lane 2, <)이 대부분 제거된 것이 확인되었다.

HPLC로 정제한 α -LA를 이용하여 세포독성을 조사한 결과, WiDr의 경우 정제한 α -LA (1mg/ml)은 약 43.1%의 세포독성만 있는 것으로 나타났으며(Table 2), 정제하기 전의 세포독성과 비교할 경우 약 50%의 차이를 나타내었다. 또한 HeLa에서는 약 98%, A498에서는 약 60% 이상의 세포독성이 감소하는 것으로 나타났다. 이는 혼입된 미량성분이 직접 세포독성에 관여했거나 (Bounous et al, 1991; Matsumura et al, 2000), 간접적으로 α -LA의 구조적 변화에 관여하고 있을 가능성을 시사한다고 생각된다.

α -LA을 trypsin을 이용하여 가수분해한 후, 이 분해물을 HPLC로 분석한 결과, α -LA의 대부분이 가수분해되었음이 확인되었다(Fig. 2-B). α -LA의 용출 시간인 33.057분에는 peak가 없었으며(Fig 2-A), 미량성분의 검출시간대에서도 검출되는 peak는 없었다. 또한, 대부분의 분해물은 약 15분~28

Table 2. Growth inhibitory rates of commercial, purified and hydrolyzed α -lactalbumin on each cell lines (17.(%))

	α -Lactalbumin	Purified α -Lactalbumin	Hydrolyzed α -Lactalbumin	EDTA treated α -Lactalbumin
WiDr	92.8 ¹⁾	43.1	46.8	17.2
A498	93.5	30.2	26.8	17.8
HeLa	99.0	11.1	13.2	8.5
MKN45	98.5	25.4	24.5	15.3

¹⁾ Cell growth inhibitory rate (%).

분 사이에 용출되는 것이 확인되었다. α -LA의 부분 가수분해물을 이용하여 세포독성을 검사한 결과, 세포독성 활성이 거의 대부분 상실된 것을 확인하였다(Table 2). 이는 α -LA의 단량체, 또는 다량체가 분해되었거나, 정제과정 중에 혼입된 미량성분이 그 기능을 상실하였기 때문이라 생각된다. α -LA의 다량체에 의한 세포독성을 구명하기 위하여 다음과 같은 연구를 하였다.

EDTA 처리에 의한 α -LA의 세포독성

α -LA의 단량체는 세포독성이 없으나, 2량체 이상의 다량체가 될 경우 세포독성을 나타내며, 이러한 다량체의 형성은 Ca^{2+} 등의 금속이온에 의해 촉진되는 것으로 알려져 있어(Huang et al, 2000; Matsumura et al, 2000; Alstonmills et al, 1977), 이를 검증하기 위하여 EDTA를 이용하여 금속이온을 chelating한 후, 세포독성을 검사하였다. EDTA를 10 mM~0.1mM 농도로 첨가한 후 WiDr과 A498에 대해서 MTT assay를 실시한 결과, 0.1mM에서 세포 독성이 없는 것으로 나타났다(결과 생략). α -LA (1mg/ml)과 EDTA (0.1 mM)를 혼합한 후, 각종 암세포의 세포독성에 관한 효과를 조사한 결과, EDTA첨가에 의해 세포독성 효과가 현저하게 낮아지는 것이 확인되었다(Table 2). 따라서 0.1mM의 EDTA첨가에 의해 α -LA의 다량체 형성이 억제된 것이라 생각되며, 이는 Ca^{2+} 과 같은 금속이온에 의해 α -LA의 다량체가 촉진되며, 이에 따라 세포독성이 강해진다는 지금까지의 결과와 일치하였다. 연구결과, α -LA의 세포독성은 다량체 형성에 의한

것이며, Sigma사의 α -LA를 사용한 결과, 여기에는 미량성분이 함유되어 있는 것으로 보고 따라서 정제과정 중에 제거되지 않은 성분들이 관여하고 있다고 사료된다.

요 약

상업적으로 생산 판매되고 있는 여러 가지 유청 단백질을 이용하여 각종 암세포에 대한 세포독성을 조사한 결과, IgG, BSA, β -LG는 세포독성이 거의 없었으나, α -LA가 강한 세포독성을 갖고 있음이 확인되었다. MKN45, HeLa, WiDr, 그리고 A498의 경우, α -LA(1mg/ml)에 의해 세포성장률이 95% 이상 억제되는 것으로 나타났다. HPLC를 이용하여 α -LA에 혼입되어 있는 미량성분을 제거한 후, 세포독성을 조사한 결과, α -LA이 나타내었던 세포독성이 대부분 없어지는 것으로 나타났다. 또한 α -LA를 trypsin으로 부분 가수분해한 후, 각종 암세포에 대한 성장 억제효과를 검토한 결과, 암세포에 대한 독성을 상실하는 것으로 나타났으며, α -LA를 EDTA로 처리할 경우, α -LA의 세포독성이 대부분 상실되는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Alstonmills, B., Allen, J. C., Sternhagen, L. and Hepler, C. D. (1977) Effects of whey-milk proteins on Caco-2 and HT-29 intestinal cell lines. *Livestock Prod. Sci.*, **50**, 147.
- Arnold, R. R., Cole, M. F. and Mcghee J. R (1977) A bactericidal effect of human lactoferrin. *Science*, **197**, 163.
- Bounous, G., Batist, G. and Gold, D. (1991) Whey protein in cancer prevention. *Cancer Letters*, **57**, 91.
- Bullen, J. J. and Amstrong J. A. (1981) The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leukocyte. *J. Immunol.*, **36**, 781.
- Chang, J. Y., Bulychev, A. and Li, L. (2000) A stabilized molten globule protein. *European Biochemical Societies, FEBS Letters*, **487**, 298.
- Eugene, A. P. and Lawrence, J. B. (2000) α -Lactalbumin : structure and function. *FEBS Letters.*, **473**, 269.
- Hakansson, A., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Sabharwal, H. and Svanborg, C. (1995). Apoptosis induced by a human milk protein. *Proc. Natl. Acad. USA.* **92**. 8064.

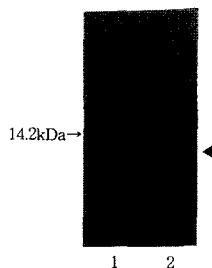


Fig. 3. SDS-PAGE patterns of α -lactalbumin and commercial α -lactalbumin. Lanes 1. purified α -lactalbumin; 2. commercial α -lactalbumin.

8. Huang, G. C., Li, Z. Y. and Zhou, J. M. (2000) Conformational specificity of trigger factor for the folding intermediates of α -lactalbumin. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1480**, 77.
9. Kee, H. J., and Hong, Y. H. (1992) Determination of α -lactalbumin in heated milks by HPLC. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **24**, 393-395.
10. Kee, H. J., and Hong, Y. H. (1998) Functional properties of α -lactalbumin separated from Bovine Whey. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **18**, 9-18.
11. Kronman, M. J., Sinha, S. K. and Brew, K. (1981) Characteristics of the binding of Ca^{2+} and other divalent metal ions to bovine alpha-lactalbumin. *J. Biol. Chem.*, **256**, 8582.
12. Kuwata, T., Pham, A. M., Ma, C. Y. and Nakai, N. (1995) Elimination of β -lactoglobulin from whey to stimulate human milk protein. *J. Food Sci.*, **50**, 605.
13. Lee, S. W. (2001) Biological activity of whey proteins and peptides. *J. Korean Dairy Technol. Sci.* **19**, 103~115.
14. Mannsson, B., Geborek, P. S., Saxne, T. and Bjornsson, S. (1990) Cystidine deaminase activity in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis : relation to lactoferrin, acidosis and cartilage proteoglycan release. *Ann. Rheum. Dis. Aug.*, **49**, 594.
15. Matsumura, Y., Lee, D. S. and Mori, T. (2000) Molecular weight distributions of α -lactalbumin polymers formed by mammalian and microbial transglutaminases. *Food Hydrocolloids*, **14**, 49.
16. Nemetn, K. and Simmonovits, I. (1997) The biological role of lactoferrin. *Haematol.*, **18**, 3.
17. Tonya H., Yuri, V., Griko, P. and Privalov, L. (2000) A calorimetric study of the influence of calcium on the stability of bovine α -lactalbumin. *Biophysical Chemistry*, **84**, 27.
18. Twentyman, P. R. and Lucombe, M. (1987) A study of some variables in a tstrazolium dye(MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer.*, **56**, 279.
19. Willi., E. H., Klein, P. D. and Reeds, P. J. (1991) The importance of α -lactalbumin in infant nutrition. *American Institute of Nutrition*, **24**, 277.
20. Ye, X., Yoshida, S. and Ng, T. B. (2000) Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin B and β -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. *J. Biochem. & Cell Biology*, **32**, 114.

(2001년 9월 13일)