

## 인유 중의 Epidermal Growth Factor 분리 및 특성에 관한 연구

신영하 · 양희진 · 양동훈 · 이수원\*

성균관대학교 식품·생명자원학과

### Studies of Purification and Characterization of Epidermal Growth Factor from Human Colostrum

Young-Ha Shin, Hee-Jin Yang, Dong-Hoon Yang and Soo-Won Lee\*

Department of Food and Life Science, Sungkyunkwan University

#### Abstract

The purpose of this study was to purify epidermal growth factor(EGF) as growth factor from human colostrum. The effects of purified EGF fraction were directly related to the growth of cells. Results were as follows; After eliminated fat from colostrum, skim milk was obtained. We obtained the EGF fraction by performing ultrafiltration and gel filtration, and then were convicted by SDS-PAGE. The result of analysis of purified EGF fraction by high performance liquid chromatography(HPLC) was shown a peak at 31.185 min period. And it was similar with standard EGF that was shown a peak at 31.545 min. 10 ng of EGF was contained in 10 mg/mL through immunoassay to measure EGF content from isolated fraction. After SDS-PAGE, isolation degree of purified fraction was convicted through western blotting. BALB/3T3 cell was the most effectively stimulated and proliferated at 1 mg/mL concentration of the purified EGF fraction and percentage of cell proliferation was about 95%. In the case of IEC-6 cell, that was about 71%.

**Key words** : epidermal growth factor, human colostrum, HPLC, immunoassay

#### 서 론

신체의 다양한 분비기관에서 분비되는 peptide growth factor는 항상 소화장관에서 존재하거나 음식물로 섭취되어 장관 내에 존재한다(Kong et al., 1998). Growth factor의 종류에는 epidermal growth factor(EGF), insulin-like growth factor(IGF), transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ), platlet-derived growth factor(PDGF) 등이 있으며 기능 또한 각기 달라 임상적으로 다양한 목적에 사용되고 있다(Dignass and Sturm, 2001).

그 중 EGF는 성인의 경우 타액선(salivary gland)과 십이지

장의 Brunner's gland에서 분비되어 장관 내의 조직 재생인자로써 이용되고(Savage and Cohen, 1972), 모유 중의 EGF는 장관 내 유용한 미생물의 정착과 장관 성숙을 촉진하는 역할을 한다(Cohen and Carpenter, 1975). 이러한 EGF의 기능으로 알려진 것은 먼저 표피세포 내 세포핵에 작용하여 표피세포의 분열과 증식속도를 촉진하고 표피세포의 분열증식 속도와 진피 재생속도까지 조절함으로써 피부재생 전 과정을 주도하며 피부재생 촉진인자(Interlukin-1 등)를 합성, 분비하도록 한다(Taylor et al., 1970).

EGF는 우유 중에는 매우 소량으로 존재하지만 인유의 경우에는 가장 함량이 많은 growth factor이며, 특히 초유 중에 다량 함유되어 있다(Azuma et al., 1989). 따라서 EGF를 함유한 조제유는 인공 수유아에게 신생아 초기에 장관면역의 성장과 장관 내 미생물의 균총을 개선하는 기능을 모유 수유아와 비슷한 수준으로 개선할 수 있을 것으로 생각되어진다(Yagi et al., 1986).

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

최근의 연구에 따르면 우유에는 EGF가 2 ng/mL 미만 함유되어 있는 반면에 인유에는 30~40 ng/mL 함유되어 있어 우유 초유보다 약 20배 이상 더 많이 함유되어 있다.(Iacopetta et al., 1992). 그리고 인유의 경우 분만 후 비유 초기에서 약 30일까지의 인유에서 EGF함량이 상당히 높은 것으로 알려져 있다(Petrides et al., 1985).

본 연구는 인유 초유 중에 함유되어 있는 peptide growth factor 중에서 인유에 다량 함유되어 있는 EGF를 분리하고, 분리된 EGF 분획이 세포 성장에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하기 위해 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

공시재료로 사용한 인유는 분만 후 24시간 이내에 착유한 초유를 사용하였고 표준물질로 사용된 EGF 표준품은 (주)대웅제약으로부터 제공받았다.

### 인유 초유 처리 및 정제

공시유인 인유는 15,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 지방을 제거하여 skim milk로 제조하였다(Azuma et al., 1989; Kanda et al., 1994). Skim milk를 30 kDa cut-off ultrafiltration membrane(Millipore, USA)과 1 kDa cut-off ultrafiltration membrane(Amicon, USA)을 이용하여 1~30 kDa 분획을 얻었다. 이 분획을 sephadex G-75(Sigma, USA) 수지로 충전한 column( $\phi$  2.5×40 cm)에 전개시켜 fraction collector(Bio-rad, USA)로 분획하였고 UV monitor system(Bio-Rad, USA)을 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정 후 탈염, 건조하여 시료로 사용하였다.

### High Performance Liquid Chromatography

정제된 EGF 분획의 분리 정도를 확인하기 위하여 각 단계별로 얻은 fraction은 HPLC(Young-Lin, Korea)를 사용하여 분석하였다. 분석조건으로는 Deltapack C18 reverse phase column(100 Å, 5  $\mu$ m, 3.9×150 mm, Waters, USA)을 사용하였고, 이동상으로 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)를 포함한 acetonitrile을 사용하였다. 이때 acetonitrile은 1 mL/min의 유속으로 5%에서 80%의 gradient 조건으로 50 분간 전개하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### SDS-PAGE & Western Blot

Ultrafiltration로 분획한 fraction과 gel filtration을 통해서 얻은 fraction의 분리 정도를 확인하기 위하여 Laemmli(1970)의 방법으로 SDS-PAGE(Bio-rad, USA)를 실시

하였고 분리한 분획이 EGF와 동일한 물질임을 확인하기 위하여 Western blotting을 실시하였다(Hames and Rickwood, 1981).

### Immunoassay

정제된 분획 중에 포함되어 있는 EGF의 함량을 정량하기 위해서 Battelli 등(1999)의 방법을 이용하였다. 발색 정도는 ELISA reader(Bio-Tec Inc, USA)로 450 nm에서 측정하였다.

### Cell Proliferation

실험에 사용된 세포주는 BALB/3T3(KCLB 10163)와 IEC-6(KCLB 21592)로 한국 세포주은행(KCLB)으로부터 분양을 받아 사용하였다. 세포는 10%(v/v)의 fetal bovine serum(FBS), 항생제(penicillin-100units/mL, streptomycin - 100  $\mu$ g/mL)와 10 mM의 HEPES를 함유한 DMEM(Gibco/ BRL, USA) culture medium(pH 7.2)을 사용하여 배양하였으며 그 외의 시약은 Sigma제품을 사용하였다.

세포성장률은 Twentyman and Luscombe(1987)의 방법으로 MTT assay를 실시하여 측정하였다. BALB/3T3 cell은  $5 \times 10^3$  cells/well, IEC-6 cell의 경우에는  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 plating한 후 정제 분획을 단백질 농도를 기준으로 1 mg/mL, 100  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL, 100 ng/ml 농도별로 처리하여 48시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양시켰다.

## 결과 및 고찰

### EGF 분획 분리

인유 초유를 ultrafiltration 처리를 통해 얻은 분자량 1~30 kDa 분획과 EGF 표준품을 gel filtration chromatography 한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이것은 EGF의 분자량이 약 6 kDa라는 것을 바탕으로 시중에서 구입할 수 있는 가장 적절한 분자량을 지닌 ultrafiltration membrane들을 사용하여 1~30 kDa 사이의 분자량을 지닌 분획을 회수하였다. Ultrafiltration 분획을 분석한 line(a)의 세 개 peak 중 fraction No. 75~80의 부분에 해당하는 peak III 부분이 EGF 표준품을 분석한 line(b)의 main peak와 같은 위치에서 관찰되었다. 이것은 peak III 부분에 EGF 성분이 포함되어 있는 것으로 생각할 수 있으며 이 결과를 바탕으로 ultrafiltration 분획의 gel filtration을 반복 실시하여 얻은 peak III 분획을 동결건조 후 HPLC 분석에 사용하였다. 그러나 단백질 함량 측정 결과, 흡광도와는 무관하게 EGF 함유 peak 부분의 단백질 농도는

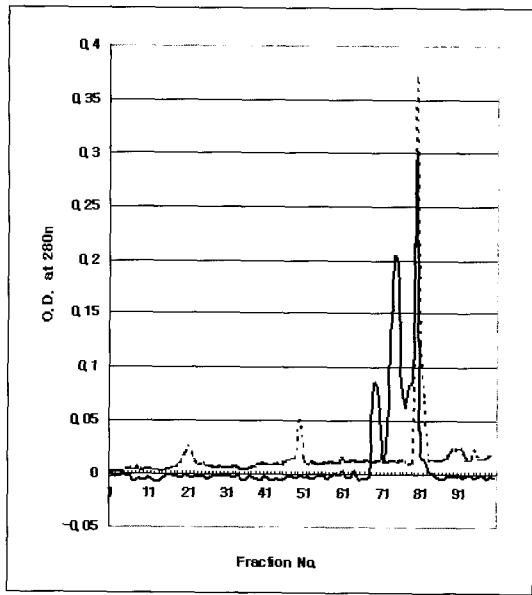


Fig 1. Gel filtration chromatography of EGF rich fraction by ultrafiltration.

- (a) — ; EGF rich fraction by ultrafiltration (1~30 kDa)
- (b) ---- ; Standard EGF

높지 않은 것으로 측정되었다.

Azuma 등(1989)의 결과와 비교해 보면 그들은 실험을 통해 모유 중에 존재하는 EGF를 분리하게 위해서 skim milk를 곧바로 gel filtration chromatography를 실시하였다. 하지만 본 실험에서는 공시유의 특성상 분리를 용이하게 하기 위하여 먼저 분자량을 기준으로 한 ultrafiltration 처리를 거친 후 gel filtration을 실시한 방법상의 차이점이 있었다. 이러한 차이점과 gel filtration이 행해진 조건의 차이로 분획 peak의 retention time과 흡광도의 차이가 나타나지만 전체적인 pattern은 동일하게 나타났다.

### High Performance Liquid Chromatography(HPLC) 분석

Fig. 2는 HPLC를 이용한 분석결과로 정제 과정을 거치면서 EGF가 정제되어 가는 정도를 확인할 수 있었다. Fig. 2(a)는 EGF 표준품을 분석한 결과로, 31.545분대에 하나의 peak로 나타났다. 이 EGF 표준품의 순도가 98.8%라는 것을 감안할 때 이 EGF 표준품의 peak를 기준으로 다른 분석 그래프와 비교할 수 있었다. Fig. 2(b)는 skim milk를 분석한 결과로 용출 초기에 미세한 peak들이 많이 용출되었고, 32.3분경에 용출된 peak와 EGF 표준품의 peak를 비교하면 용출 시간대가 거의 일치하는 것으로 보아 이 부분에 EGF가 포함되어 있는 것으로 추측할

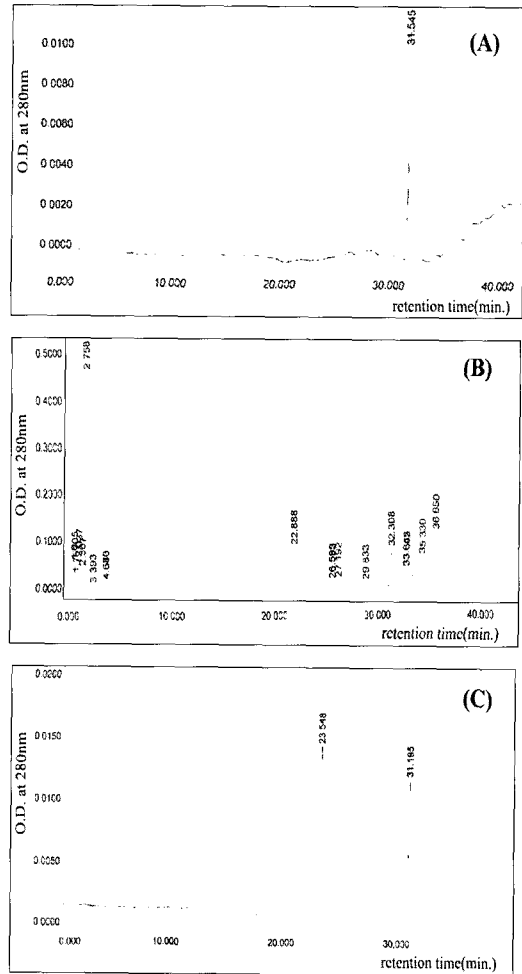


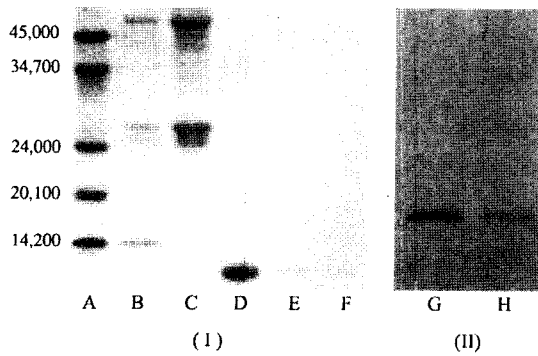
Fig 2. High performance liquid chromatography analysis of EGF fractions.

- (A) Standard EGF, (B) Skim milk,
- (C) Purified ultrafiltration fraction(1~30 kDa)

수 있었다. Ultrafiltration을 이용하여 1~30kDa으로 분획한 fraction을 HPLC로 분석한 결과인 Fig. 2(c)는 용출 초기에는 작은 미지의 peak들이 나타나지만 31.185분 경에 단일의 peak를 보였다. 이 peak는 EGF 표준품인 Fig. 2(a)의 HPLC pattern과 retention time이 거의 일치하여 동일한 것으로 확인되었다.

### 분리도 확인

Ultrafiltration에 의해 분리된 분획을 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였고 정제된 EGF분획이 표준품 EGF와 동일한 물질인지 확인하기 위하여 western blotting을 실시하였다(Fig. 3). 지방을 제거한 인유 skim milk(B)와 skim milk를 ultrafiltration으로 처리해 얻은 30 kDa이상 분획(C)을 비교하여 보면 분자량 24,000 이상의 큰 분자량들의 성분으로 농축된 것을 관찰할 수 있었다. 분자량 1~



**Fig 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns(I) of the fraction and western blotting analysis(II).**

- lane A : Low molecular weight marker (Sigma, U.S.A)
- lane B : Human skim milk
- lane C : 30 kDa > purified fraction
- lane D : 1~30 kDa purified fraction
- lane E : Purified EGF fraction
- lane F : Standard EGF
- lane G ; Standard EGF
- lane H ; Purified EGF fraction

30 kDa 분획(D)은 표준물질 lysozyme보다 조금 아래쪽에 밴드가 위치하여 농축된 것으로 관찰되었고 gel filtration에 의해 정제한 fraction(E)의 밴드는 표준품 EGF(F)와 같은 7~8 kDa 위치에 밴드가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 정제단계를 거치면서 30 kDa 이상의 큰 분자량을 지닌 여러 밴드가 분리되어 제거되면서 정제된 EGF fraction을 단일 밴드로 확인할 수 있었다(Fig. 3-(I)).

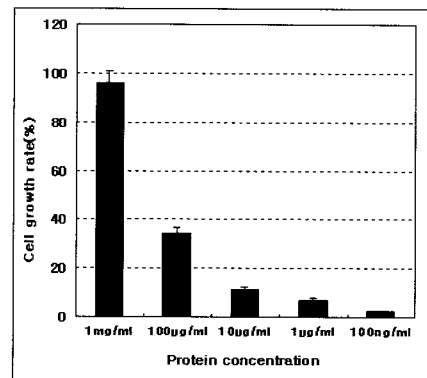
그리고 western blotting을 한 결과 EGF 표준품(G)과 비교하였을 때 정제된 획분(H)의 발색이 진하지 않아 분획 중 포함되어 있는 EGF함량이 많지는 않지만 정제된 획분에 EGF를 포함하고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-(II)).

**EGF 함량 측정**

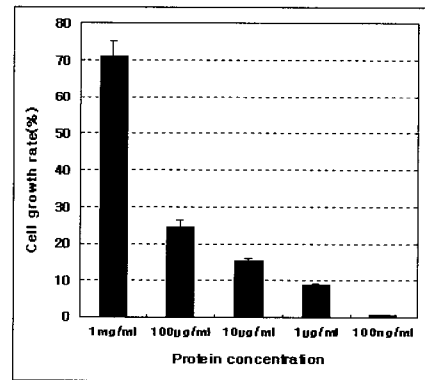
EGF 분획 중 EGF 함량을 측정하기 위하여 항체를 이용한 immunoassay를 실시하였다. 먼저 EGF 표준품을 사

용하여 10에서 100 ng/mL까지 농도별로 EGF를 처리하여 standard curve를 구하여 정제 각 단계에 따른 EGF 함량을 측정하였다. 표준품 EGF 함량을 기준으로 각 정제 단계별 EGF 함량은 human milk, skim milk, ultrafiltration fraction, gel filtration fraction, HPLC fraction에 각각 0.3, 1.3, 2.5, 3.1과 10.8 ng/mL을 포함하고 있는 것으로 측정되었다(Table 1).

이러한 결과는 정제 단계를 거치면서 EGF의 함량이 점차 증가하는 것을 관찰할 수 있었고 또한 정제 과정이 효과적으로 EGF를 농축할 수 있는 것으로 생각되었다.



(A)



(B)

**Fig 4. Effect of cell proliferation by purified EGF fraction from human colostrum.**

A: BALB/3T3 cell, B: IEC-6 cell.

**Table 1. Concentration and recovery rate of EGF on each purification fraction**

Purification step	EGF concentration (ng/mL)	Total protein (mg)	Total volume (mL)	EGF yield (%)	Total purification (fold)
Skim milk	1.3	2070	100	100	-
Ultrafiltration fraction	2.5	247	25	48	4
Gel filtration fraction	3.1	31	15	36	24
HPLC fraction	10.8	15	2.5	21	29

### Cell proliferation

Fig. 4-(A)는 정제한 EGF 분획이 BALB/3T3 세포의 성장에 미치는 영향을 나타낸 것으로서 단백질 농도 1 mg/mL(EGF 농도 환산시 1 ng/mL)에서 약 95%의 성장률을 보여주었고, 100  $\mu$ g/mL과 10  $\mu$ g/mL의 농도에서는 각각 35%, 10%의 세포 성장률을 나타내었다. Fig. 4-(B)는 정제한 EGF 분획이 IEC-6 세포의 성장에 미치는 영향을 나타낸 것으로 1 mg/mL 농도에서 71%의 성장률을 보였고, 100  $\mu$ g/mL과 10  $\mu$ g/mL 농도에서는 각각 25%, 15%의 세포 성장률을 보였다.

Quaroni 등(1979)의 연구에 의하면 EGF를 intestinal cell 인 IEC-6에 처리하여 배양했을 때 단계별로 세포 성장에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. Reeves 등(1991)의 연구에서는 먼저 세포의 크기는 EGF 비처리구에 비해 EGF 처리구의 경우 그 크기가 1.5배 정도 컸고, 배양이 이루어지면서 생성되는 colony의 크기와 수는 비처리구의 경우  $4.0 \times 10^4$  cells/well인 것에 비해 처리구는  $12.3 \times 10^4$  cells/well로 증가한 것으로 관찰되었다. 또한 세포의 수가 두배가 되는 doubling time은 비처리구의 경우 20~25시간이 걸리는 것에 비해 시료 처리구는 15~18시간으로 8~40%까지 세포성장기간을 감소시켰다.

*In vitro*에서는 배양시 사용되는 배지에 첨가된 다른 성분에 의한 세포의 성장을 배제할 수 없다는 점을 고려해야하기 때문에 차후에 *in vivo*의 동물 실험에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

### 요 약

인유 초유로부터 지방을 제거하여 skim milk을 얻었다. 이것을 ultrafiltration을 한 후 gel filtration을 거쳐 EGF fraction을 획득하였으며, 이를 SDS-PAGE로 확인하였다. high performance liquid chromatography(HPLC)에 의해 EGF fraction을 분석한 결과, standard EGF 분석과 비교했을 때 31.545분대와 유사한 31.185분대에 peak가 나타난 것을 확인하였다. 분리한 fraction 중 EGF 함유량을 측정하기 위해 immunoassay를 실시한 결과 건조중량 10 mg/mL 중에 약 10 ng의 EGF가 포함되어 있는 것으로 측정되었다. SDS-PAGE 후 실시한 western blot을 통하여 분리한 분획의 분리도를 확인하였다. 세포 성장에 미치는 영향을 살펴본 결과, fibroblast cell인 BALB/3T3의 경우에는 건조중량 1 mg/mL 농도의 fraction 처리후 약 95%의 성장률을 보였으며, epithelial cell인 IEC-6의 경우에는 약 71%의 성장률을 보였다.

### 참고문헌

1. Azuma, N., Hesaka, E., Kaminogawa, S., and Yamauchi, K. (1989) Occurrence of high molecular weight EGF complexes in human milk. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 1043-1050.
2. Battelli, M. G., Abbondanza, A., Musiani, S., Buonamici, L., Strocchi, P., Tazzari, P. L., Gramantieri, L., and Stirpe, F. (1999) Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinica Chimica Acta.* **281**, 147-158.
3. Cohen, S. and Carpenter, G. (1975) Human epidermal growth factor : Isolation and chemical and biological properties. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **72**, 1317-1321.
4. Dignass, A. U. and Sturm, A. (2001) Peptide growth factor in the intestine. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol.* **13**, 763-770.
5. Hames, B. D. and Rickwood, D. (1981) Gel electrophoresis of proteins. Oxford University Press, New York.
6. Iacopetta, B. J., Grieco, F., Horisberger, M., and Sunahara, G. I. (1992) Epidermal growth factor in human and bovine milk. *Acta Paediatr.* **81**, 287-291.
7. Kanda, Y., Yamamoto, N., and Abe, Y. (1994). Growth factor from human milk purification and characterization. *Life Science* **55**, 1509-1520.
8. Kong, W., Yee, L. F., and Mulvihill, S. J. (1998) Hepatocyte growth factor stimulates fetal gastric epithelial cell growth *in vitro*. *J. Surg. Res.* **78**, 161-168.
9. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
10. Petrides, P. E., Hosang, M., Shooter, E., Esch, F. S., and Bohlen, P. (1985) Isolation and characterization of epidermal growth factor from human milk. *FEBS.* **187**, 2736-2743.
11. Quaroni, A., Wands, J., Trelstad R. L. and Isselbacher, K. J. (1979) Epithelioid cell cultures from rat small intestine. *J. Cell Biology* **80**, 248-255.
12. Reeves, J. R., Richard, R. C., and Cooke, T. (1991) The effects of intracolonic EGF on mucosal growth and experimental carcinogenesis. *Br. J. Cancer* **63**(1), 223-226.
13. Savage, C. R. Jr. and Cohen, S. C. (1972) Epidermal growth factor and a New Derivative. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization. *J. Biol Chem.* **247**, 7609-7611.
14. Taylor, J. M., Cohen, S., and Mitchell, W. M. (1970) Epidermal Growth factor : high and low molecular weight forms. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **67**, 164-171.

15. Twentyman, P. R. and Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye(MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer* 56, 279-285.
16. Yagi, H., Suzuki, S., Noji, T., Nagashima, K., and Kuroume, T. (1986) Epidermal growth factor in cow's milk and milk Formulas. *Acta Pediatr. Scand.* 75, 233-235.
- 
- (2003. 4. 15. 접수 ; 2003. 5. 29. 채택)