



젖소 초유 중의 Insulin-like Growth Factor-I 함유 분획이 세포 성장에 미치는 영향

황경아 · 양희진 · 하월규¹ · 이수원*

성균관대학교 식품생명공학과, ¹파스퇴르유업(주)

Effect of Bovine Colostral Whey Fraction containing Insulin-like Growth Factor on Cell Proliferation

Kyung-A Hwang, Hee-Jin Yang, Woel-kyu Ha¹ and Soo-Won Lee*

Department of Food Biotechnology, Sungkyunkwan University

¹Food Research & Development Lab., Pasteur Milk Co., Ltd.

Abstract

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) rich fraction, which was obtained molecules ranged between 30 kDa and 1 kDa, was fractionated by ultrafiltration from bovine colostral whey with 30 kDa and 1 kDa membrane. IGF-I included in fractionated IGF-I rich fraction was confirmed by SDS-PAGE and western blotting and then the quantity of IGF-I was measured by ELISA. IGF-I concentration in IGF-I rich fraction was 10 ng/mg protein.

Effect of IGF-I rich fraction on *in vitro* proliferation of several cells was tested. IEC-6 cell proliferation rate was increased 60%, 53%, 30%, and 20% at 10ng, 1ng, 0.1ng, and 0.01ng of IGF-I, respectively, compared to control group which was not supplemented by IGF-I rich fraction. IGF-I rich fraction stimulated *in vitro* proliferation of IEC-6 cell in a dose dependent manner by increasing cell number. Detroit 551 cell proliferation was enhanced 56% and 26% at 10 ng and 1 ng level of IGF-I, respectively, compared to control group. EL-4 cell and L6 cell proliferation was increased 53% and 46% at 10 ng of IGF-I, respectively, compared to control group.

Key words : IGF-I, colostral whey, ultrafiltration, cell proliferation

서 론

젖소 초유는 분만 후부터 일주일 이내에 분비되는 물질로서 정상유에 비해 풍부한 영양소와 면역조절물질, 성장 및 상처치유물질 등 다량의 생리활성물질을 함유하고 있다(Pakkanen and Aalto, 1997). 따라서 초유는 수동면역 부여 및 세포분화와 단백질 합성 촉진 및 골근육 형성에 관여하고 특히 신생아의 장관세포 발달에 영향을 미친다(Uramkpa et al., 2002). 우유 성분 중에서 세포증식 활성을 보이는 성분을 milk growth factor(MGF)라고 하며 분자량은 5~25 kDa의

polypeptide 혹은 단백질로서 insulin-like growth factor(IGF- I, II), epidermal growth factor(EGF), transforming growth factor(TGF), platlet-derived growth factor(PDGF)등이 대표적인 MGF로 보고되고 있다(Simmen et al., 1990).

특히 초유 유래 성장인자 중에서 IGF- I 은 우유에서 유래하는 MGF 중에서 가장 다량 함유되어 있으며 70개의 아미노산 잔기로 이루어진 polypeptide이다. IGF- I 의 생리활성은 *in vivo*와 *in vitro*에서 세포증식 및 신체성장 발달조절, 동화작용과 세포의 재생 촉진 기능 등이 있다(Monzavi and Cohen, 2002).

IGF- I 의 함량은 모유 초유와 젖소 초유를 비교했을 때 젖소 초유 중의 함유량이 현저히 높으며, 분만 48시간 이후 모유와 젖소 초유 중 IGF- I 은 함유량은 1/3 이하로 급격히 낮아지는 것으로 보고되어 있다(Einspanier and Schams, 1991).

* Corresponding author : Soo-Won Lee, Department of Food Biotechnology, Sungkyunkwan University, 300, Chunchun-dong, Jangan-gu, Suwon, Kyunggi-do 440-746, Korea. Tel: 82-31-290-7805, Fax: 82-31-290-7815, E-mail: leesw@skku.ac.kr

또한 분만 후 2일 이내의 초유 중 IGF-I은 약 73%가 유리형(free form)으로 존재하며 2일 이후의 초유 중 IGF-I은 약 91%가 IGF binding protein과 결합된 결합형(bound form)으로 존재하며 이러한 현상은 binding protein은 비유초기에는 미량으로 존재하지만 비유기간이 경과함에 따라서 증가하면서 IGF-I과 결합하여 기인하는 것으로 알려지고 있다(Sejrsen et al., 2001).

본 연구는 대부분 free IGF-I의 형태로 존재하는 24시간 이내의 초유를 이용하여 IGF-I rich fraction을 회수한 후 *in vitro*에서 동물세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해서 실시하였다.

재료 및 방법

공시유

본 실험에서 IGF-I rich fraction 제조를 위해서 사용한 초유는 수원시 소재 축산농가에서 사육중인 홀스타인으로부터 분만 후 24시간 이내에 착유한 초유를 사용하였다.

초유 Whey 분리 및 Ultrafiltration(UF)에 의한 분획 초유는 5,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 지방을 제거한 다음 탈지유를 얻었다. 회수한 탈지유는 1N HCl 용액으로 pH를 4.5로 조정하여 casein을 침전시키고 원심분리한 후 상등액인 유청을 회수하였다. 회수된 유청은 Hossner과 Yemm (2000)의 방법에 준하여 30 kDa과 1 kDa(prepare/scale-TFF, Millipore, USA)의 ultrafiltration cartridge로 free IGF-I이 함유되어 있는 30 kDa과 1 kDa 사이의 IGF-I rich fraction을 분리하였다(Fig. 1). 이 모든 과정은 4°C cold room에서 수행하였다.

IGF-I의 확인 및 정량

Ultrafiltration에 의해 얻어진 30 kDa에서 1 kDa 범위의 IGF-I rich fraction의 분리와 함유된 IGF-I을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였고(Laemmli, 1970) western blotting (Hossenlopp et al., 1986)을 실시하여 IGF-I을 확인하였다. 그리고 IGF-I rich fraction에 함유하고 있는 IGF-I의 정량은 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay로 측정하였다(Battelli et al., 1999).

세포주의 배양

본 연구에 사용된 세포주는 IEC-6(KCLB 21592), Detroit 551(KCLB 10110), EL-4(KCLB 40039), L6(KCLB 21458)로서 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양 받은 후 계대배양하여 사용하였다. 즉, 10%(v/v)의 fetal bovine serum, 1%(v/v) 항생제(penicillin 100unit/mL, streptomycin 100 µg/mL)와 10 mM의

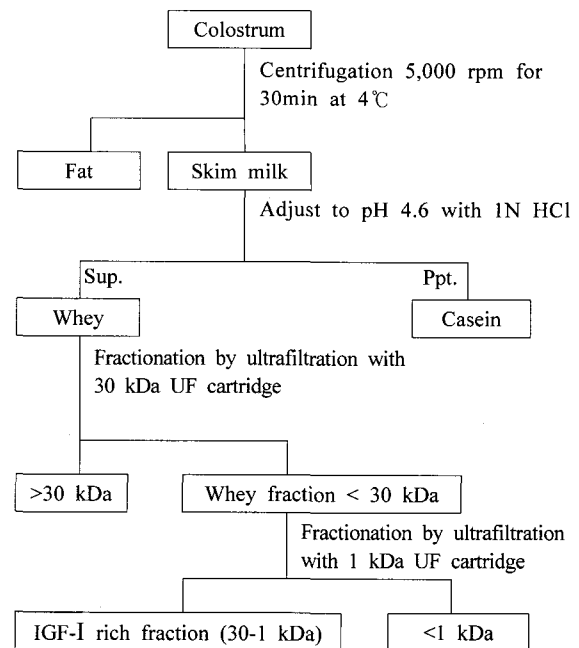


Fig. 1. Diagram of IGF-I rich fraction from bovine colostrum by ultrafiltration.

HEPES buffer, 20mM의 L-glutamine을 함유한 DMEM(pH 7.2, Gibco/BRL, USA) 배지에서 배양하였다. 세포가 petri dish(Φ 100)의 90% 정도로 충분히 성장하였을 때 trypsin/EDTA를 이용하여 세포를 petri dish로부터 떼어낸 후 1:9의 비율로 계대 배양하며 실험에 사용하였다.

Cell Proliferation

세포증식 효과의 측정은 Marin 등(1996)의 방법을 변형하여 실험하였고, 각 세포주의 적정 농도는 예비실험 결과에 준하여 정하였다. 각 세포는 적정 농도별로 96 well microplate (TPP, Swiss)에 분주한 후 처리구의 경우 각각의 IGF-I rich fraction을 첨가하고 5% CO₂와 95%의 상대습도의 조건 하에서 37°C, 2일간 배양한 다음 세포의 증식은 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 분석법으로 540nm에서 흡광도를 측정(ELx 800, Biotec, USA)하였고 대조구의 경우 IGF-I rich fraction을 첨가하지 않고 처리구와 동일한 조건에서 배양한 다음 측정하였으며, 처리구의 세포 증식은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

결과 및 고찰

IGF-I rich fraction 분리 확인

IGF-I의 분자량을 기초로 free IGF-I을 분리하기 위하여 30 kDa과 1 kDa의 ultrafiltration cartridge를 사용하여 분획하였다. 이 과정에서 retentate인 30 kDa 이상의 성분을 제거하고

free IGF-I을 포함하는 30 kDa과 1 kDa 사이의 IGF-I rich fraction을 분리하여 SDS-PAGE(Fig. 2A)와 Western blotting (Fig. 2B)으로서 IGF-I의 존재를 확인하였다.

IGF-I rich fraction의 SDS-PAGE 결과 20 kDa 이하 성분만 확인되었으며 30 kDa 이상의 성분은 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 ultrafiltration이 IGF-I rich fraction을 선택적으로 분리하는 과정에서 유청 중 30 kDa 이상의 거대분자를 효과적으로 제거할 수 있는 방법이라는 사실을 확인할 수 있었다.

본 연구와 유사한 연구에서 Hossner과 Yemm(2000)은 초유를 30kDa의 membrane으로 diafiltration 처리한 다음 회수한 permeate에 IGF-I에 상당하는 30 kDa 이하의 성분들이 확인되었다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서 IGF-I을 선택적으로 분리하기 위해서 사용한 ultrafiltration이 효과적으로 IGF-I을 포함하는 IGF-I 농축물을 제조하는데 적합한 방법으로 판단된다.

IGF-I 정량

IGF-I을 함유하는 것으로 확인된 IGF-I rich fraction에서 IGF-I의 함량을 측정된 결과 IGF-I rich fraction에는 단백질 1 mg 당 10 ng의 IGF-I이 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

Cell Proliferation

IGF-I rich fraction의 *in vitro* 세포증식 활성도를 실험한 결과는 Fig. 3과 같다.

IEC-6 cell(epithelial cell line)은 1 mg/mL IGF-I rich fraction 처리구에서 대조구보다 약 60%의 세포성장을 증가를 보였으며 100 µg/mL과 10 µg/mL에서는 각각 53%, 30%의 성장률 증가를 나타내었다. Detroit 551(skin cell line)은 1 mg/mL에서 처리구에서 대조구에 비해 약 56%의 세포성장을 증가를 나

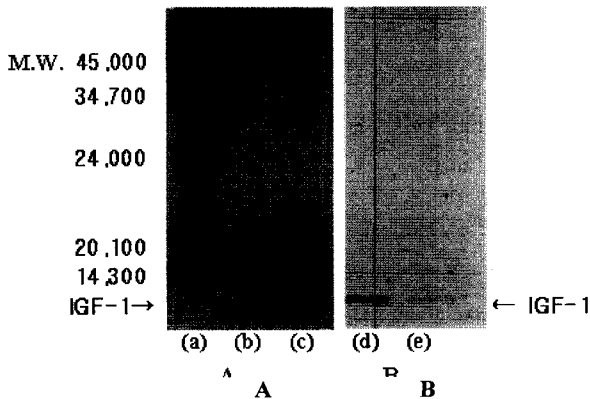


Fig. 2. SDS-PAGE (A) & Western blotting (B) patterns. (a): Low molecular weight marker, (b): Standard IGF-I, (c): IGF-I rich fraction, (d): Standard IGF-I, (e): IGF-I rich fraction.

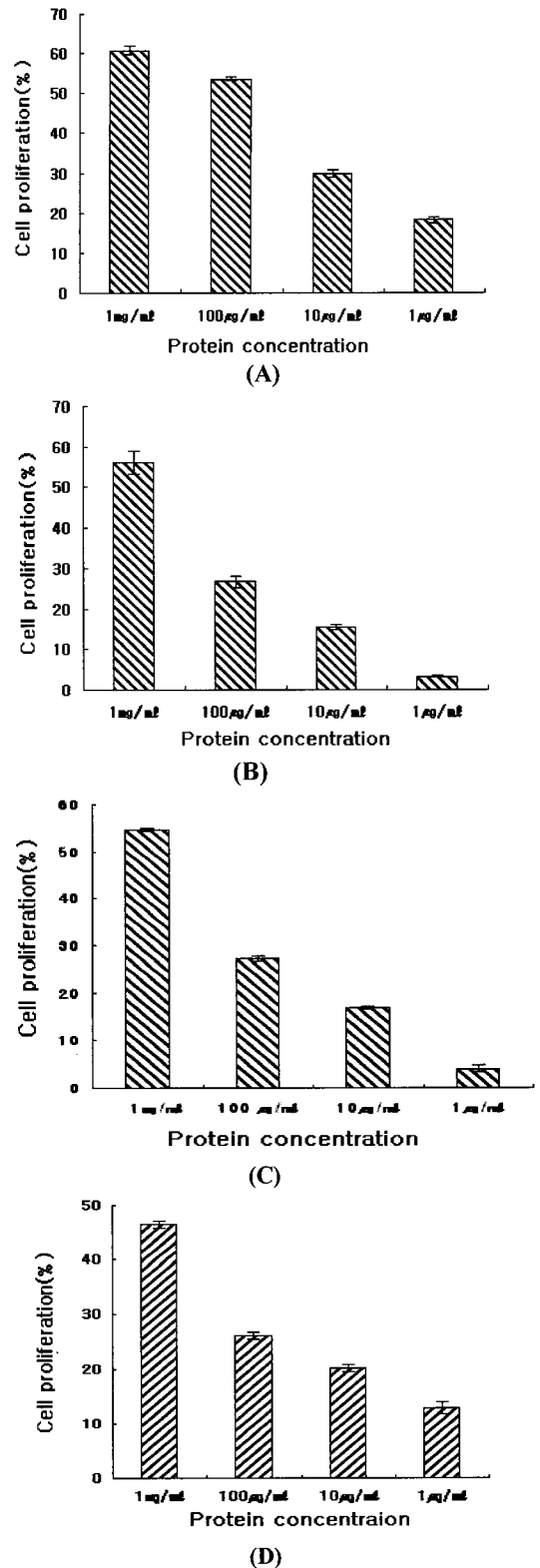


Fig. 3. *In vitro* cell proliferation of different cell lines. Supplementation levels of IGF-I rich fraction were from 1mg/mL to 1µg on the basis of protein content. Cell proliferation was expressed as the percentage of cell number in groups supplemented IGF-I rich fraction to that of control group (A) IEC-6, (B) Detroit 551, (C) EL-4 (D) L6.

타내었고 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 각각 26%, 15%의 성장률 증가를 보였으며, EL-4(Th cell line)는 1 mg/mL 처리구에서 대조구에 비해 약 55%의 세포 성장률 증가를 나타내었다. L6 cell(skeletal muscle cell)은 1 mg/mL 처리구에서 대조구에 비해 약 46%의 세포성장을 증가를 보였고 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 각각 26%와 20%의 세포성장률 증가를 나타내었다.

IGF-I과 세포증식 효과에 대해서 Qureshi 등(1997)의 보고에 의하면 human esophageal epithelial cell에 IGF- I 을 처리했을 때 세포수가 농도 의존적으로 증가함을 나타내었다. 또한 세포배양 3일 후는 대조구가 4.5×10^5 cell 인데 비해 IGF-I 처리구는 9×10^5 cell로 약 두 배가 증가한 것과 비교해 보면 본 실험의 결과에서도 동일한 경향을 나타내는 것으로 보아 IGF- I 이 세포의 증식을 촉진한다는 사실을 확인할 수 있었다. 그리고 Belford 등(1995)은 recombinant IGF와 EGF를 각각 50ng/mL의 농도로 투여하였을 때 L6 skeletal muscle myoblast, Balb/c 3T3 fibroblasts 및 human skin fibroblast SF cell의 세포 성장에 미치는 영향을 평가한 결과 IGF는 Balb/c 3T3 fibroblast와 human skin fibroblast SF에서 각각 대조구에 비해 약 8% 미만의 성장률 증가를 보였고, L6 skeletal muscle myoblast 에서는 약 30%의 성장률 증가를 나타내었으나 EGF는 Balb/c 3T3 fibroblast와 L6 skeletal muscle myoblast에서는 5% 이하의 성장률 증가를 보이는 것으로 보고되고 있으며 L6 skeletal muscle myoblast의 경우 EGF보다 IGF-I이 더 많은 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.

본 실험에서 나타난 IGF-I의 L6 skeletal muscle myoblast 세포의 증진효과는 Belford 등(1995)이 보고한 recombinant IGF-I의 투입농도 보다 훨씬 낮은 수준에서도 더 높은 세포 증식효과를 나타내었다. 이러한 결과는 초유 유청에서 유래하는 IGF-I rich fraction 중에는 IGF-I 뿐만 아니라 세포성장에 영향을 주는 생리활성 peptide가 함유되어 있어 기인된 결과로 생각된다.

요 약

젖소 초유 유청을 ultrafiltration으로서 30kDa와 1kDa 사이의 IGF- I rich fraction을 분획하였다. 분획한 IGF-I rich fraction은 SDS-PAGE와 Western blotting으로 IGF- I 이 존재하는 것을 확인하였고, sandwich ELISA로써 그 함량을 측정 한 결과 fraction중 IGF- I 의 함량은 단백질 mg당 10 ng으로 나타났다. IGF- I rich fraction으로 IEC-6, Detroit 551, EL-4 및 L6 *in vitro* 세포의 증식에 미치는 효과를 실험한 결과 IEC-6 cell은 IGF-I 기준으로 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng에서 각각 대조구에 비해서 60%, 53%, 30%, 그리고 20%의 세포증식효

과를 나타내었다. IEC-6의 증식은 IGF-I의 투여량이 증가할 수록 세포의 증식효과가 더 높게 나타났다. Detroit 551 cell은 10 ng과 1 ng 수준에서 각각 56%와 26%의 세포증식 효과를 나타내었다. 그리고 EL-4 cell과 L6 cell은 10 ng 수준에서 각각 53%와 46%의 세포증식 효과를 나타내었다. 모든 세포주에서 IGF- I 함유농도가 10 ng 투여구에서 세포 증식율이 가장 높았으며 IEC-6 cell, Detroit 551 및 EL-4 cell은 모두 약 60%의 세포 성장률을 나타내었고 L6 cell은 약 50%의 성장률을 보였다.

감사의 글

본 연구는 2001년 농림부 첨단기술개발사업과제의 지원에 의하여 이루어진 것이며 연구비지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Battelli, M. G., Abbondanza, A., Musiani, S., Buonamici, P., Trocchi, P. L., Tazzari, L., and Gramantieri, F. S. (1999) Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinica. Chimica. Acta.* **281**, 147.
- Belford, D. A., Rogers, M. L., Regester, G. O., Francis, G. L., Smithers, G. W., Liepe, I. J., Priebe, I. K., and Ballard, F. J. (1995) Milk-derived growth factors as serum supplements for the growth of fibroblast and epithelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Ani.* **31**, 752-760.
- Einspanier, R. and Schams, D. (1991) Changes in concentrations of insulin-like growth factor-1, insulin and growth hormone in bovine mammary gland secretion ante and post partum. *J. Dairy Res.* **58**(2), 171-178.
- Hossenlopp, P., Seurin, D., Segovia-Quinson, B., Hardouin, S., and Binoux, M. (1986) Analysis of serum insulin-like growth factor binding protein using western blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding site. *Anal. Biochem.* **154**(1), 138-143.
- Hossner, K. L. and Yemm, R. S. (2000) Improved recovery of insulin-like growth factors(IGFs) from bovine colostrum using alkaline diafiltration. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **32** (3), 161-166.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Marin, M. L., Murtha, J., Dong, W., and Pestka, J. J. (1996)

- Effects of mycotoxins on cytokine production and proliferation EL-4 thymoma cells. *J. Toxicol. Environ. Health.* **48**(4), 379-396.
8. Monzavi, R. and Cohen, P. (2002) IGFs and IGF-BPs : role in health and disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **16**(3), 433-437.
 9. Pakkanen, R. and Aalto, J. (1997) Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *Int. Dairy Journal.* **7**, 285-297.
 10. Qureshi, F. G., Tchorzewski, M. T., Dimcan, C. J., and Harmon, J. W. (1997) EGF and IGF-I synergistically stimulate proliferation of human esophageal epithelial cells. *J. Surg. Res.* **69**(2), 354-358.
 11. Sejrsen, K., Pedersen, L. O., Vestergaard, M., and Purup, S. (2001) Biological activity of bovine milk contribution of IGF-I and IGF binding proteins. *Livestock Production Science.* **70**, 79-85.
 12. Simmen, F. A., Cera, K. R., and Mahan, D. C. (1990) Stimulation by colostrum or mature milk of gastrointestinal tissue development in newborn pigs. *J. Anim. Sci.* **68**(11), 3596-3603.
 13. Uramkpa, F. O., Ismond, M. A. H., and Akobundu, E. N. T. (2002) Colostrum and its benefits. *Nutr. Res.* **22**, 755-767.
-
- (2004. 2. 19. 접수 ; 2004. 6. 7. 채택)