



초유 유청분획의 EL-4 세포 증식 효과

하월규¹ · 원도희 · 양희진 · 황경아 · 이수원*

성균관대학교 식품생명공학과, ¹파스퇴르유업(주) 식품연구소

Effect of Colostral Whey Fraction on the Proliferation of EL-4 Cell

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

Department of Food Biotechnology, Sungkyunkwan University

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

Abstract

To investigate the effect of Holstein colostrum peptide fraction on proliferation of immune cell, polypeptide fractions were separated from acid whey into 3 fractions depending on molecular weight by ultrafiltration: Fraction I, which contains the polypeptide larger than 10,000 Da, Fraction II, which contains the polypeptide ranging from 1,000 Da to 10,000 Da and Fraction III, which contains the polypeptide smaller than 1,000 Da. EL-4 cell (murine T lymphoma cell) was used to evaluate immune enhancing effect of each fraction from Holstein colostrum. Fraction II showed the highest proliferative effect of the colostrum whey fractions on EL-4 cell at 1 mg/mL compared with whole whey and other fractions and this proliferative activity was shown in dose dependent manner. Fraction II showed the highest proliferative effect on PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) stimulated EL-4 cell. Heated Fraction II showed similar effect to native α_2 on proliferation of both EL-4 cell and PMA stimulated EL-4 cell.

Key words : colostrum, polypeptide fraction, ultrafiltration, EL-4 cell

서 론

초유에는 다양한 면역증진인자(immune factor)와 세포분열 활성인자(mitogenic factor)가 존재하며(Berseth et al., 1983; Klagburn, 1978; Simmen et al., 1990; Widdowson et al., 1976) 모유는 fibroblast의 DNA 합성을 촉진하는 mitogenic factor가 존재한다고 하였으며(Klagburn, 1978), hepatocyte와 enterocyte의 분화도 역시 촉진한다고 보고되고 있다(Ichiba et al., 1992; Kohono et al., 1991). Sirota 등(1995)은 사람 초유 투여량과 사람의 말초혈액단핵구에서 interleukin-2(IL-2) 생산량은 반비례한다고 하였다. 한편 소의 초유에도 면역증강인자를 함유하고 있다는 연구결과가 보고되고 있다

(Hooton et al., 1991; Mandalapu et al., 1995; Sambasivarao et al., 1996; Sirota et al., 1995). 포유동물의 초유와 정상유에 포함되어 있는 growth factor의 분자량은 5,000~10,000 Da 범위로서 초유가 정상유보다 10배 내지 500배 이상 많이 함유되어 있다고 보고되고 있다(Donovan et al., 1994; Simmen et al., 1990). 특히 소의 초유에는 insulin-like growth factor(IGF)가 모유보다 훨씬 많이 함유되어 있지만 정상유에는 아주 소량 함유되어 있다는 사실이 밝혀진 바 있다(Baxter et al., 1984; Collier et al., 1991; Vacher and Blum, 1993). 그러나 사람의 초유에는 주로 epidermal growth factor(EGF)가 함유되어 있어 신생아의 초기 장관 성숙을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Okuyama et al., 1998; Thompson et al., 1994). EGF와 IGF 이외에도 소의 초유나 정상유에는 transforming growth factor(TGF)- α , β , platelet-derived growth factor(PDGF) 등이 손상된 장관의 재생을 촉진하는 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(MacDonald et al., 1997; MacDonald et al., 1998; Playford et al., 1999).

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

초유에 함유되어 있는 growth factor들의 우수성에 대해서 Rao 등(1998)은 지방과 casein을 제거한 우유성분이 장관단백질 분해효소에 의한 EGF 가수분해를 저해하는 기능이 있었다고 하였고, 단백질 가수분해 효소 저해활성은 유즙 중에 본래 함유되어 있는 단백질 분해효소의 inhibitor에 의해서 기인하였을 것이라고 보고하였다. Regester 등(1997)은 치즈 유청에서 유래한 polypeptide 혼합물이 유전자 재조합으로 제조된 growth factor 보다 fibroblast의 성장을 훨씬 증진하였다고 보고하였다.

본 연구에서는 알칼리성 영역에서 가용성인 초유 유청분획의 면역 증진 효과에 대해서 조사하기 위한 초기 연구로서 T helper (Th)세포인 EL-4 세포의 증식효과에 대해서 실험하였다.

재료 및 방법

초유 유청 분획의 조제

초유 유청은 경기도 지역에서 수집한 분만 후 48시간까지의 Holstein 초유로부터 Fig. 1과 같이 제조하였다. 초유를 5,000 rpm, 4°C에서 30분 동안 원심분리하여 지방을 제거한 후 탈지 초유로부터 유청을 분리하기 위해서 1N HCl을 이용하여 pH를 4.6으로 조정 한 후 20°C에서 정치하였다. 산성화된 탈지초유를 3,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 유청과 케이스인을 분리하였다. 분리한 유청의 pH를 1 N NaOH로 다시 7.0으로 조정 한 후 5,000 rpm, 4°C에서 30분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하였다.

분리된 유청을 ultrafiltration unit(DC-10, Amicon, USA)를 이용하여 분자량에 따라 분획을 분리하였다. Fraction I은 10 kDa membrane에서 정치되는 분획으로 하였다. Fraction I의 여과액을 이용하여 Fraction II는 10 kDa membrane을 통과하고 1 kDa의 membrane을 통과하지 못하는 분획으로 하였으며 1 kDa을 통과한 분획을 Fraction III로 하였다. 각각의 얻어진 분획은 농축 후 pH를 7.0으로 조정 한 후 이를 동결 건조하여 시료로 사용하였다. 각각의 초유 유청 분획은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco/BRL Co., USA)배지에 용해하여 사용하였고 열처리한 초유 유청분획을 만들기 위해서 각각의 분획용액을 100°C에서 10분간 가열하였다.

EL-4 세포

T cell line은 한국세포주은행(KCLB)에서 구입한 murine T lymphoma cell인 EL-4 cell(KCLB 40039)을 사용하였다. EL-4 cell은 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL의 streptomycin, 10 mM의 HEPES buffer, 20 mM L-glutamine 그리고 5%

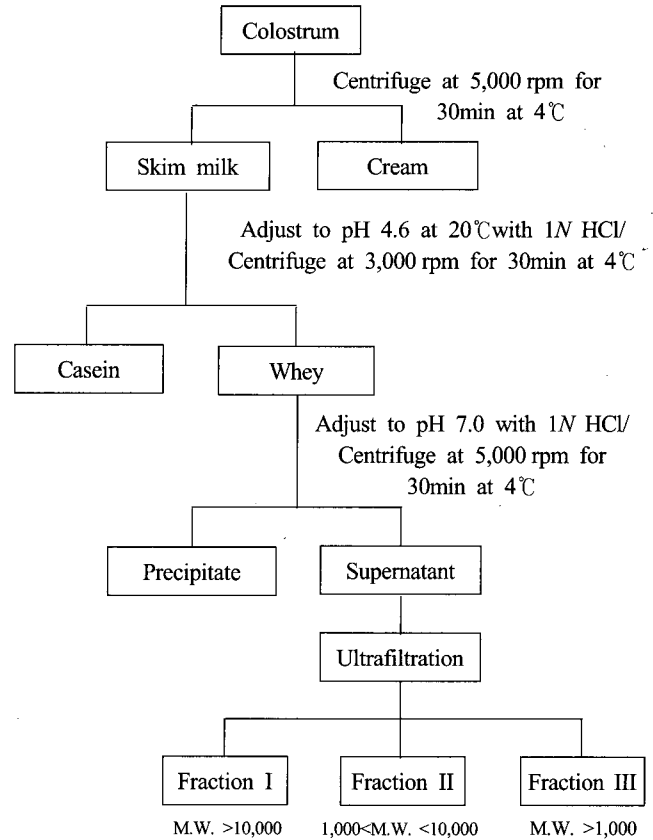


Fig. 1. Separating scheme of the colostrum whey fractions.

horse serum을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco/BRL Co, USA)에서 유지하고 배양하였다. 그리고 세포의 배양은 5%의 CO₂와 95% 상대습도의 조건 하에서 37°C에서 배양하였다.

EL-4 세포의 증식

EL-4 cell은 원심분리하여 5% horse serum을 함유하지 않는 DMEM 배지에 다시 분산시켜 수세하였다. EL-4 cell은 96 well의 바닥이 평평한 microplate(TPP, Swiss)에 1 × 10⁵ cell/mL의 농도로 분주하여 최종농도가 1 × 10⁴/well이 되도록 하였다. 그리고 1 mg/mL의 Whole whey, Fraction I, Fraction II, Fraction III를 함유하거나 초유성분을 전혀 첨가하지 않은 배지를 이용하여 5% CO₂와 95%의 상대습도의 조건 하에서 37°C, 2일간 배양하였다. 한편 투여량에 따른 세포증식 실험에서는 유청 분획을 10⁻⁵ mg/mL에서 10 mg/mL의 범위로 배지에 첨가하였다. 그리고 mitogen의 자극에 의한 효과를 실험하기 위해서 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA, Sigma, USA)를 10 ng/mL와 100 ng/mL의 농도로 첨가하였다. 48시간 배양한 후 5 µg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)를 첨가하여 4시간 동안 배양하고 그 이후에 100 µL의 20% SDS 용액을 각각의

well에 가하여 MTT-formazan product를 가용화하기 위해서 가하였다. 그리고 culture plate을 16시간 더 배양한 다음 540 nm에서 micro plate reader(ELx800, Biotech, USA)로서 흡광도를 측정하였다. 그리고 세포성장율은 초유 유청성분을 함유하지 않은 배지에서 성장한 EL-4 세포의 성장에 대한 초유분획이나 초유성분을 함유한 배지에서 성장한 EL-4세포의 성장 백분율(%)로 표시하였다.

결 과

초유 유청분획의 EL-4 cell의 증식 효과

초유 유청 분획의 EL-4 세포 성장에 대한 효과는 Fig. 2와 같다. EL-4 세포에 대한 1mg/mL의 Whole whey, Fraction I, Fraction II 그리고 Fraction III의 증식 효과는 각각 132.47, 74.72, 226.54 그리고 153.99%로 나타났다. 초유 유청분획 중에서 Fraction II가 EL-4 세포 증식에 가장 효과가 높은 것으로 나타났다(p<0.01).

위와 같은 결과는 초유 분획 중에서 분자량 1,000 Da에서 10,000 Da 사이의 등전점이 알칼리성 영역인 초유 유청분획에 Th 세포의 성장을 가장 촉진하는 mitogenic activity가 있는 것으로 생각된다. 그러나 분자량 10,000 Da 이상의 초유 유청분획과 유단백질을 함유하는 Fraction I은 상대적으로 Whole whey나 Fraction II 그리고 Fraction III에 비해서 Th 세포의 증식 효과가 낮은 것으로 나타났다.

초유 유청분획의 농도에 따른 EL-4 cell 증식 효과

Th 세포의 증식 효과가 가장 높은 Fraction II의 투여농도에 따른 EL-4 세포의 증식 효과를 연구하기 위해 Fraction II를 1 ng/mL에서 10 mg/mL까지의 농도로 첨가하여 나타난

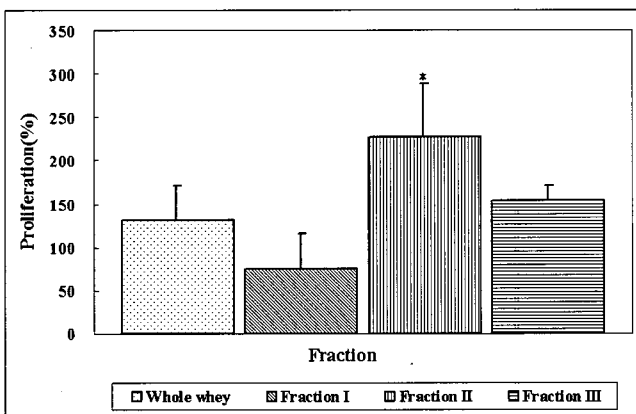


Fig. 2. Proliferative effect of colostrum whey fraction on EL-4 cell. Values were expressed as means±SD.

* Significant difference in EL-4 cell proliferation among whey fractions at p<0.01.

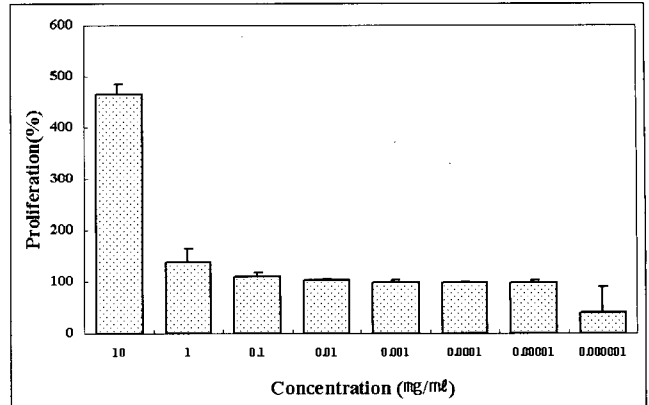


Fig. 3. Effect of bovine colostrum whey fraction II on the EL-4 cell proliferation depending on dosage.

Values were expressed as means±SD.

결과는 Fig. 3과 같다.

가장 높은 세포 성장 효과는 10 mg/mL에서 나타났으며 투여농도가 증가할수록 세포 증식 효과가 더 높게 나타났다. 그러나 투여량 1 mg/mL부터 EL-4 세포의 증식을 증진하는 것으로 나타났다.

PMA 자극한 EL-4 cell에 대한 초유 유청분획의 증식 효과

Th 세포 mitogen인 PMA를 각각 10 ng/mL과 100 ng/mL를 처리한 EL-4 세포에 대한 초유 유청 분획의 세포 증식 효과는 Fig. 4와 같다.

PMA를 10 ng/mL 처리한 EL-4 세포에 대한 초유 유청 분획의 증식 효과는 Whole whey, Fraction I, Fraction II 그리고 Fraction III가 각각 108, 59.14, 194 그리고 150.17%이었

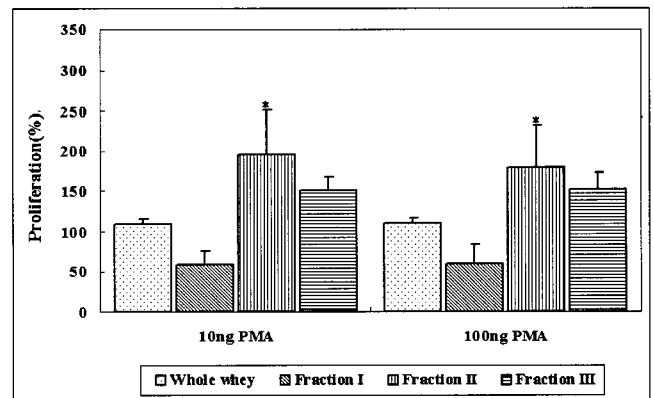


Fig. 4. Proliferative effect of bovine colostrum whey fractions on the EL-4 cell treated with phorbol 12-myristate 13-acetate. Values were expressed as means±SD.

* Significant difference in EL-4 cell proliferation among whey fractions at p<0.01.

며, PMA 100 ng/mL 처리한 세포의 증식효과는 각각 110.12, 60.87, 179.64 그리고 151.94%로 나타났다.

Mitogen 처리한 EL-4 세포의 증식에 미치는 초유 유청분획의 효과는 mitogen을 처리하지 않은 EL-4 세포의 증식효과와 비슷한 경향을 보였다.

열처리한 초유유청 분획의 EL-4 cell 증식 효과

100°C에서 10분간 열처리한 초유 유청 분획의 EL-4 세포 증식 효과는 Fig. 5와 같다. PMA를 처리하지 않은 EL-4 세포의 증식에 대한 열처리 초유 유청 분획의 증식 효과는 Whole whey, Fraction I, Fraction II 그리고 Fraction III가 각각 97.58, 187.62, 200.81 그리고 127.48%로 나타났고 10 ng/mL의 PMA를 처리한 EL-4 세포에 대한 증식 효과는 각각 125.44, 200.59, 221.24 그리고 143.03%로 나타났으며 100 ng/mL의 PMA를 처리한 세포의 증식 효과는 각각 116.56, 197.64, 206.78 그리고 144.48%로 나타났다.

Fraction I의 경우 열처리에 의해서 EL-4 세포의 증식 효과가 더 높게 나타났으며, 10 ng/mL와 100 ng/mL의 PMA 처

리한 EL-4 세포에 대해서도 열처리한 초유 유청 분획이 증식 효과가 열처리하지 않은 것보다 높게 나타났다. 그러나 Fraction II와 Fraction III에 의한 증식 효과는 열처리에 의해 거의 영향을 받지 않았다.

이상의 결과는 사람 초유 투여량과 사람의 말초혈액단핵구에서 IL-2 생산량은 반비례한다는 보고(Hooton et al., 1991; Sirota et al., 1995)와 lactoferrin과 같은 고분자 유청단백질이 사람의 림프구 증식을 억제한다(Richie et al., 1987)는 연구 보고로서 추정해 보면 열처리에 의해 쉽게 변성될 수 있는 고분자의 초유 유청단백질은 T cell의 증식을 저해하여 IL-2 생산을 억제할 수 있다고 생각된다. 따라서 이러한 T cell의 증식을 억제하는 고분자 단백질이 열변성되지만 열처리에 대해 안정한 polypeptide는 거의 영향을 받지 않기 때문에 Fraction I은 오히려 열처리에 의해서 EL-4 세포의 증식효과가 약간 증가한 것으로 생각되지만 확인되지는 않았다. 그러나 분자량 10,000 Da 이하의 polypeptide를 함유하는 초유 유청분획(Fraction II와 Fraction III)의 경우 열처리가 EL-4 세포 증식에 거의 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

고 찰

초유 중에는 면역증강 성분뿐만 아니라 면역 억제 성분도 함께 함유되어 있어, 면역 증강 및 억제 성분에 의해 면역기능을 조절한다. Noda 등(1984)은 TGF가 EL-4-NOB-1 murine thymoma cell에 의한 IL-2 생산을 억제한다고 보고하였다. 초유 중에 함유되어 있는 humoral factor가 NK cell 활성을 낮춘다는 보고도 있다(Baley and Schacter, 1985; McDonald et al., 1992; Sancho et al., 1991; Engelhard et al., 1986). 사람 초유의 투여량이 증가할수록 PHA로 자극한 사람 말초혈액단핵구의 IL-2 생산과 NK cell 활성에 반비례하였다고 하였다(Sirota et al., 1995). 한편 초유가 Con A로 자극한 사람 말초혈액단핵구의 IL-2 생산을 저해한다(Hooton et al., 1991)고 보고되고 있다. 이러한 연구는 초유 성분 중에서 Th1 cell의 활성을 저해하는 성분이 있다는 사실을 간접적으로 보여주고 있다.

한편 초유성분은 rat 장관상피세포(RIE)와 사람의 결장암 세포인 HT-29 세포의 성장을 증진시키는데, 이러한 효과는 주로 초유 중 분자량이 30 kDa 이상인 성분에서 기인한다고 하였으며(Playford et al., 1999), 초유 중에 들어있는 생리활성 펩타이드는 분자량 30 kDa 이상의 단백질에 관심이 집중되어 왔다.

그러나 초유 성분 중 면역력을 억제할 수 있는 단백질과 펩타이드에 관한 연구에서 immunoglobulin이 다량 함유된 초유는 신생아에게 정맥주사하였을 때 NK세포 활성을 억제하며(Chirico et al., 1990) 소의 초유 중에 함유되어 있는

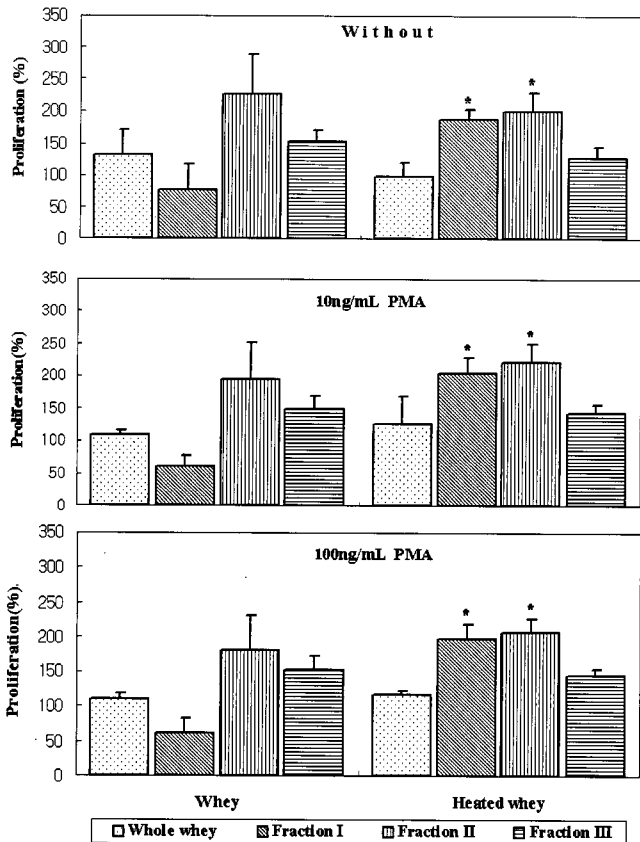


Fig. 5. Effect of heat treated bovine colostrum whey fractions on the proliferation of EL-4 cell treated with phorbol 12-myristate 13-acetate. Values were expressed as means±SD.

* Significant difference in EL-4 cell proliferation among whey fractions at p<0.01.

growth factor인 TGF- β 는 EL-4-NOB murine thymoma cell에 의한 IL-2 생산을 억제하는 효과가 있다고(Noda et al., 1984) 보고되고 있다. 또한 모유에 함유되어 있는 lactoferrin은 mitogen이나 동종항원(alloantigen)에 대한 사람의 림프구 증식을 억제한다고 보고된 바 있다(Richie et al., 1987). 사람 초유 중에 함유되어 있는 단백질에 의한 면역 억제 활성은 신생아에 있어서 항원에 대한 면역반응을 억제하는 T 억제세포(T suppress cell)의 활성을 유도하여 그 이후 항원에 대한 과민반응을 예방할 수 있다. 그러나 이와 같은 활성은 신생아의 장관에서 주로 발견되어 장관벽 림프구(intestinal wall lymphocytes)의 반응을 억제한다. 이러한 과정은 장관 내의 항원 유입에 의한 과민반응을 예방하여 알레르기의 발생을 억제하는 기작으로 제안된 바 있다(Mincheva-Nilsson et al., 1990). 그러나 사람 초유 중에 함유되어 있는 어떤 성분은 IL-2의 생산을 저해한다고 하였다(Hooton et al., 1991). IL-2는 면역 기능 중에서 세포 면역의 중추적 역할을 하는 T 세포의 growth factor로서 체액성 면역의 발달에도 많은 영향을 줄 수 있다. 위와 같은 초유의 면역 억제 기능은 대부분 분자량 10,000 Da 이상의 단백질에서 기인한다고 할 수 있다.

본 연구에서는 초유로부터 면역 억제 성분을 효과적으로 제거하고 면역 증강 효과가 있는 초유 성분을 선택적으로 분리하여 면역 기능이 미숙한 유아를 위한 조제유류에 이용하는 경우 장관 면역 발달을 통한 전신 면역의 성숙 및 발달을 촉진하여 능동면역을 발달시킬 수 있을 것으로 기대된다. 그리고 면역 기능이 저하된 환자나 노약자의 면역 기능을 증진시킬 수 있는 식품의 소재로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Baley, J. E. and Schacter, B. Z. (1985) Mechanisms of diminished natural killer cell activity in pregnant women. *J. Immunol.* **134**, 3042-3048.
- Baxter, R. C., Zaltsman, Z., and Turtle, J. R. (1984) Immunoreactive somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and its binding protein in human milk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **58**, 955-959.
- Berseth, C. L., Lichtenberger, L. M., and Morriss, F. H. (1983) Comparison of the gastrointestinal growth-promoting effects of rat colostrum and mature milk in newborn rats *in vivo*. *Am. J. Clin. Nutr.* **37**, 52-60.
- Chirico, G., Maccario, R., Montagna, D., Chiara, A., Gasparoni, A., and Rondini, G. (1990) Natural killer cell activity in preterm infants: Effect of intravenous immune globulin administration. *J. Pediatr.* **117**, 465-466.
- Collier, R. J., Miller, M. A., Hidebrant, J. R., Torkelson, A. R., White, T. C., Madsen, K. S., Vicini, J. L., Eppard, P. J., and Lanza, G. M. (1991) Factors affecting insulin like growth factor 1 concentration in bovine colostrum. *J. Dairy Sci.* **74**, 2905-2911.
- Donovan, S. M. and Odle, J. (1994) Growth factors in milk as mediators of infant development. *Ann. Rev. Nutr.* **14**, 147-167.
- Engelhard, D., Waner, L. J., Kapoor, N., and Good, A. R. (1986) Effect of intravenous immune globulin on natural killer cell activity: possible association with autoimmune neutropenia and idiopathic thrombocytopenia. *J. Pediatr.* **108**, 77-81.
- Hooton, J. W., Pabst, H. F., Spady, D. W., and Paetkau, V. (1991) Human colostrum contains an activity that inhibits the production of IL-2. *Clin. Exp. Immunol.* **86**, 520-524.
- Ichiba, H., Kusuda, S., Itagane, Y., Fujita, K., and Issiki, G. (1992) Measurement of growth promoting activity in human milk using a fetal small intestinal cell line. *Biol. Neonate* **61**, 47-53.
- Klagburn, M. (1978) Human milk stimulate DNA synthesis and cellular proliferation in cultured fibroblast. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **75**, 5057-5061.
- Kohno, Y., Shiraki, K., and Mura, T. (1991) The effect of human milk on DNA synthesis of neonatal rat hepatocytes in primary culture. *Pediatr. Res.* **29**, 251-255.
- MacDonald, C. E., Calnan, D. P., Podas, T., Johnson, W., and Playford, R. J. (1998) Clinical trial of colostrum for protection against NSAID induced enteropathy. *Gastroenterol.* **114**, G0856.
- MacDonald, T. M., Morant, S. V., and Robinson, G. C. (1997) Association of upper gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs with continued exposure: Cohort study. *BMJ.* **315**, 1333-1337.
- Mandalapu, P., Pabst, H. F., and Paetkau, V. (1995) A novel immunosuppressive factor in human colostrum. *Cell Immunol.* **162**, 178-184.
- McDonald, T., Sneed, J., Valenski, W. R., Dockter, M., Cooke, R., and Herrod, H. G. (1992) Natural killer cell activity in very low birth weight infants. *Pediatr. Res.* **31**, 376-380.
- Mincheva-Nilsson, L., Hammastrom, M. L., Juto, P., and Hammarstrom, S. (1990) Human milk contains proteins that stimulate and suppress T lymphocyte proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* **79**, 463-469.

17. Noda, K., Umeda, M., and Ono, T. (1984) Transforming growth factor activity in human colostrum. *Gann* **75**, 109-112.
18. Okuyama, H., Urao, M., Lee, D., Drongowki, R. A., and Coran, A. G. (1998) The effect of epidermal growth factor on bacterial translocation in newborn rabbits. *J. Pediatr. Surg.* **33**, 225-228.
19. Playford, R. J., Floyd, D. N., MacDonald, C. E., Calnan, D. P., Adenekan, R. O., Johnson, W., Goodlad, R. A., and Marchbank, T. (1999) Bovine colostrum is health food supplement which prevents NSAID induced gut damage. *Gut* **44**, 653-658.
20. Rao, R. K., Baker, R. D., and Baker, S. S. (1998) Bovine milk inhibits proteolytic degradation of epidermal growth factor in human gastric and duodenal rumen. *Peptides* **19**, 495-504.
21. Regester, G. O., Belford, D. A., Godard, C., Howarth, G. S., Smither, G. W., Copeland, A. C., De Silva, K. S., Toneman, L. Z., and Read, L. C. (1997) Prospective clinical applications for a growth factor extract from whey: Gut disease and wound repair. Proceed. 2nd International Whey Conference, Chicago, USA, pp. 333.
22. Richie, E. R., Hilliard, J. K., Gilmore, R., and Gillespie, D. J. (1987) Human milk-derived lactoferrin inhibits mitogen and alloantigen induced human lymphocyte proliferation. *J. Reprod. Immunol.* **12**, 137-148.
23. Sambasivarao, D., Hooton, J., Dost, A., and Paetkau, V. (1996) A novel immunosuppressive factor in bovine colostrum blocks activation of the interleukin 2 gene enhancer at the NFAT site. *Biochem. Cell Biol.* **74**, 585-593.
24. Sancho, L., de la Hera, A., Casas, J., Vaquer, S., Marthinez, C., and Alvarez-Mon, M. (1991) Two different maturational stages of natural killer lymphocytes in human newborn infants. *J. Pediatr.* **119**, 446-454.
25. Simmen, F. A., Cera, K. R., and Maha, D. C. (1990) Stimulation by colostrum or mature milk of gastrointestinal tissue development in newborn pigs. *J. Animal Sci.* **68**, 3596-3603.
26. Sirota, L., Straussberg, R., Notti, I., and Bessler, H. (1995) Effect of human colostrum on interleukin-2 production and natural killer cell activity. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal.* **73**, F99-102.
27. Thompson, J. F., Van Den Berg, M., and Stokkers, P. C. F. (1994) Developmental regulation of epidermal growth factor receptor kinase in rat intestine. *Gastroenterol.* **107**, 1278-1287.
28. Vacher, P. Y. and Blum, J. W. (1993) Age dependency of insulin like growth factor-1, insulin protein and immunoglobulin concentrations and gamma glutamyl transferase activity in first colostrum of dairy cows. *Milchwissenschaft* **48**, 423-425.
29. Widdowson, E. M., Colombo, V. E., and Artavanis, C. A. (1976) Changes in the organs of pigs in response to feeding for the first 24 hours after birth. II. The digestive tract. *Biol. Neonate* **23**, 272-281.

(2005. 2. 2. 접수 ; 2005. 6. 1. 채택)