

PMA로 자극되어진 세포에서 염증 Cytokine 발현에 미치는 Bovine Lactoferrin의 생물활성 영향

정승희 · 강호범¹ · 김재화¹ · 윤성식² · 남명수*

충남대학교 농업생명과학대학 동물바이오시스템과학과, ¹한국생명공학연구원 유전체의학연구센터
²연세대학교 생명과학기술학부

The Biological Effects of Bovine Lactoferrin on Inflammatory Cytokine Expression in the PMA Stimulated Cells

Sung Hee Chung, Ho Bum Kang¹, Jae Wha Kim¹, Sung-Sik Yoon², and Myoung Soo Nam*

Department of Animal Biosystem Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

¹Genomics Medical Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

²Division of Biological Science and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

Abstract

Bovine lactoferrin is well known as biological activator in defense mechanism related some cells. In this study, we was investigated about the immune modulator as a role of lactoferrin through the transcriptional regulation of genes associated with hypersensitivity such as allergy, athma and inflammatory disease. Effects of inflammatory reaction of bovine lactoferrin was carried out by RT-PCR analysis from isolated total RNA treated with lactoferrin 0, 10, 50, 100, 500 µg/mL and PMA 100 ng/mL. The expression of the TYROBP, PITPNA, IL-10, SLP1, DC-stamp and ICAM-1 mRNA were increased by synergy effect of bovine lactoferrin and PMA. The results of RT-PCR showed that bovine lactoferrin and PMA had an effect of immune modulator by enhancement of TYROBP, PITPNA, SLP1, DC-stamp, IL-10 and ICAM-1 gene transcription in U937, Mutz-3 and NK92 cells, respectively. Bovine lactoferrin showed a potential of biological function which could be used for industrial applications as a material of food and pharmaceutical.

Key words: bovine lactoferrin, immune modulator, inflammatory, biological function

서 론

Bovine lactoferrin은 우유의 유청단백질에 속하는 분자량 82 kDa의 철 결합 단백질로 체액과 혈액에 존재하는 transferrin family의 하나이다. Lactoferrin은 젖소의 초유에 0.8 mg/mL 정도 함유되어 있으며, 정상유에는 0.1-0.4 mg/mL 정도로 미량이 함유되어 있다(Masson and Heremans, 1971; Suzuki *et al.*, 1977).

Lactoferrin의 생리활성에 관한 연구는 그 동안 많은 학자들에 의해 수행되어졌고 다양한 기능이 있는 것으로 밝혀졌지만 생체 내에서 그 기능이 발현되는 기전은 아직 정확히 밝혀져 있지 않다. Lactoferrin의 기능으로 가장 잘

알려진 것은 항균활성 기능(Arnold *et al.*, 1977; Ellison *et al.*, 1988)이 있고, 그 외에 염증반응의 조절 기능, 면역계의 활성화 및 myelopoiesis의 조절(Brock, 1995) 기능도 있는 것으로 보고되었다. Gifford 등(2005)은 lactoferrin을 단백질 가수분해효소로 처리해서 생성된 peptides(Lfc, N-terminal domain)는 lactoferrin보다 더 높은 활성과 다른 다양한 기능을 가지고 있다고 보고하였다. 모든 *in vitro* 실험에서 선천성 면역에 관련된 세포들(macrophage, neutrophils, basophils, eosinophils, mastocytes, NK cell)과 후천성 면역에 관련된 세포들(B cell, T cell, dendritic cell)에서 pro-inflammatory 또는 anti-inflammatory 물질로서 기능이 있는 것으로 밝혀졌다(Legrand *et al.*, 2005, 2006). 최근의 연구에서는 lactoferrin이 건강한 사람에게 면역과 항산화 상태를 유지시켜주는 보충제로서 기능이 있는 것으로 보고했다(Mulder *et al.*, 2008). Freiburghaus 등(2009)은 인간 결장암 세포에 bovine lactoferrin으로부터 유래된

*Corresponding author: Myoung Soo Nam, Department of Animal Biosystem Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea. Tel: 82-42-821-5782, Fax: 8242-823-2766, E-mail: namsoo@cnu.ac.kr

peptide인 lactoferrin을 처리한 결과 분화의 비율이 감소하였다고 보고했다. Lang 등(2011)은 Heparan Sulfate Proteoglycans에 결합한 lactoferrin이 SARS(severe acute respiratory syndrome) 감염을 방어할 수 있다고 보고했다. 한편 Wong 등(1998)은 β -lactoglobulin은 쥐의 비장세포 배양 시 IgM의 생산을 향상시킨다고 보고하였다. 사람 대식세포유사세포인 U937의 분화와 식균작용은 glycomacropptides(κ -casein의 106-169)로 처리 할 경우 현저히 향상되었다고 보고하였다(Li and Mine, 2004). 또한 Pellegrini 등(2001)은 β -lactoglobulin의 trypsin 가수분해물로부터 얻은 단편들이 gram-positive bacteria에 대해서 활성이 있다고 보고하였다.

본 논문은 우유 유청단백질의 하나인 lactoferrin이 사람 기원의 단핵세포주인 U937 세포, Dendritic cell(수지상 세포)을 분화시킨 Mutz-3 세포, 그리고 NK-92 세포를 이용하여 각 세포에서 염증 및 면역관련 유전자의 발현 조절을 RT-PCR 방법으로 조사함으로써 lactoferrin의 다양한 생리활성 기능과 산업적 응용에 기여할 수 있는 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

Lactoferrin

Bovine lactoferrin은 Morinaga Milk Industry Co., LTD. (Japan)의 영양과학연구소로부터 공급받은 것을 순도를 높이기 위해서 한 번 더 정제하여 전기영동에서 단일밴드로 확인된 lactoferrin을 사용하였다.

동물 세포주 및 배양

한국생명공학연구원 유전체의학센터에서 제공받은 사람 유래 U937, Mutz-3, NK-92 세포를 24-well plate에 2×10^5 cells/mL로 조정하여 lactoferrin 0, 10, 50, 100, 200 μ g/mL과 Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA) 100 ng/mL(천연물 추출액)을 첨가하여 5% CO₂ 세포 배양기에서 37°C에서 12시간 배양하였다. 사용된 배지는 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM; Gibco, USA)배지에 10% fetal bovine serum(Gibco, USA)을 첨가하여 사용하였다.

세포주의 Total RNA 추출 및 cDNA 합성

배양이 완료된 세포는 TRI Reagent로 total RNA를 분리하였다. 배양된 세포를 PBS로 세척한 후 TRI Reagent를 500 μ L씩 분주하여 세포를 lysis한 후 클로로포름 200 μ L를 첨가하여 15초간 혼합하였다. 그 후 20분간 원심분리(12,000 g)하여 상층액을 이소프로판올 500 μ L와 혼합하여 다시 15분간 원심분리(12,000 g)하였다. 상층액을 제거한 후 100% 에탄올과 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 75:25로 혼합하여 만든 75% 에탄올을 각 튜브에 1 mL

씩 분주하여 5분간 원심분리(12,000 g)한 후 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. DEPC water를 50 μ L씩 분주하여 녹인 후 260 nm에서 흡광도를 측정하고 total RNA 양을 정량하였다.

cDNA를 합성하기 위하여 M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA)를 이용하였다. Oligo(DT) primer(25 nM) 1 μ L, dNTP mix(10 nM) 1 μ L, Taq DNA polymerase(Promega, USA) 추출한 RNA 1 μ L와 DEPC water로 11 μ L를 맞추고 65°C에서 5분간 반응시킨 후 즉시 얼음에서 냉각시켰다. 이후 5배 완충용액 4 μ L, DEPC water 1 μ L, DTT(100 mM) 1 μ L, M-MLV reverse transcriptase 1 μ L를 섞어 7 μ L씩 각 PCR tube에 더한 후 42°C에서 60분, 75°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

락토페린에 의한 면역세포 U937, Mutz3, NK92 세포에서 조절되는 면역 유전자 발현 조사

Lactoferrin과 PMA를 처리한 구와 처리하지 않은 구로 나누어 PTPNA(phosphatidylinositol transfer protein, alpha), TYROBP(TYRO protein tyrosine kinase binding protein), SLIP(secretory leukocyte peptidase inhibitor), ICAM1(intercellular adhesion molecule 1), IFN- α (interferon- α), DC STAMP(dendritic cell STAMP), IL-1 α (interleukin-1 α), IL-10(interleukin-10), GAPDH(glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) 유전자 발현을 RT-PCR로 조사하였다. RT-PCR 조건은 94°C에서 5 min(1 cycle), 94°C에서 30s, 55°C에서 30s 그리고 72°C에서 30s(30 cycles), 72°C에서 5 min(1 cycle) 이었다. GAPDH조건은 94°C에서 5 min(1 cycle),

Table 1. List of primer sets used for RT-PCR

Gene	5'- primer -3'	Position
GAPDH	GACTGCTGTCTGCCCTCTCT	sense
	GCAATTCCTGTAGCTCTCAA	antisense
DC STAMP	CACCCACCTGCTCTGCCTGC	sense
	CCAGCACCCAGCCTGCTTC	antisense
ICAM-1	CCGGCGCCCAACGTGATTCT	sense
	AGAAGCTGCGCCCGTTGTCC	antisense
IL-10	GCACCCACTTCCCAGGCAACC	sense
	CCCAGGGAGTTCACATGCGCC	antisense
IL-1 α	GTAGCCACGTAGCCACGCCT	sense
	CCCCCTGCCAAGCACACCCA	antisense
IFN- α	TACGATGGCCTCGCCCTTTC	sense
	TGCTCTGACAACCTCCCAGGCA	antisense
PTPNA	ACCCAGCAGCTCCACCTCC	sense
	CATCCCCGCTCCCCACAGGA	antisense
SLPI	CCCTTCTGGTGTCTGCTTGCC	sense
	CGCTTGCACTGGCCATCCATCT	antisense
TYROBP	GTGCTCATTGCCCTGGCCGT	sense
	ACGCTGTTTCCGGGTCGCTG	antisense

94°C에서 30s, 55°C에서 30s 그리고 72°C에서 30s(20 cycles), 72°C에서 5 min(1 cycle)으로 하였다. 실험에 사용된 유전자의 primer set는 Table 1과 같다.

Agarose 전기영동

PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가된 2% agarose gel에서 100 V로 20분간 전기영동 한 후 자외선 광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다.

결과 및 고찰

U937 세포주를 이용한 락토페린의 염증반응 효과

Lactoferrin을 사람유래 단핵구세포주인 U937세포에 처리하여 발현의 차이를 보이는 유전자중 염증반응과 관련된 TRROBP, PIPNA, SLPI(Fig. 1A) DC STAMP, IL-10, ICAM-1(Fig. 1B)의 발현변화를 RT-PCR 실시하여 조사한 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. Lactoferrin 단독 또는 PMA 단독으로는 PIPNA나 TYROBP의 발현이 미약하나 면역증강물질인 PMA를 같이 처리하였을 경우 PIPNA나 TYROBP의 발현이 아주 강하게 나타남으로써 두 물질이 서로 상승작용을 하는 것으로 생각되며 생체 면역활성에 영향을 주는 것으로 생각된다(Fig. 1A). 이러한 유전자의 알려진 기능으로는 phospholipase C 신호전달에 관련된 PIPNA 유전자와 면역관련 수용체와 관련된 신호전달과 연관된 TYROBP 유전자, 상피세포 보호로 면역반응에 기여하는데 관련된 SLPI 유전자의 lactoferrin에 의한 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 1A에 나타난 바와 같이 lactoferrin과 PMA 혼합 처리시에 발현이 아주 강하게 나타남으로써 이 두 물질이 이들 유전자의 발현에 강하게 상승작용을 하는 것으로 생각된다. 이러한 사실은 lactoferrin의 농도증가에 의한 TYROBP, PIPNA 유전자의 발현증가가 농도 의존적으로 증가하고 있음을 보임으로서 검증하였다(Fig. 1B).

사람유래 U937 세포를 이용하여 항원제시세포로 작용하는 Dendritic Cell(DC, 수지상세포) marker 유전자인 DC-STAMP가 lactoferrin에 의한 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 1C에 나타난 바와 같다. Lactoferrin 단독으로는 DC-STAMP의 발현이 되지 않지만, PMA 단독으로는 DC-STAMP의 발현이 아주 강하게 나타남으로써 DC-STAMP 발현에는 lactoferrin이 영향을 주지 못하는 것으로 생각된다. 또한, 알러지와 관련된 IL-10 유전자의 lactoferrin에 의한 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 1C에 나타난 바와 같다. Lactoferrin 단독 또는 PMA 단독으로는 IL-10의 발현이 미미하지만, Lactoferrin과 PMA 혼합처리 시는 IL-10의 발현이 아주 강하게 나타남으로써 이 두 물질이 IL-10 발현에 강하게 상승작용을 하는 것으로 생각된다. 사람유래 U937 세포를 이용하여 세포표면

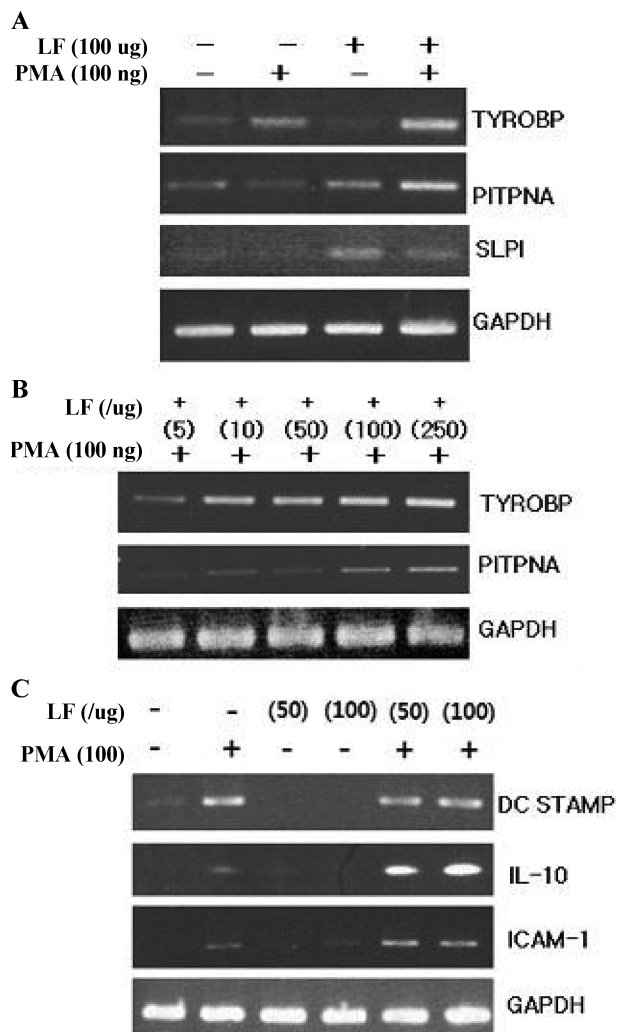


Fig. 1. Modulation of immune activity-related genes in the lactoferrin and PMA treated U937 cell. (A) TYROBP, PIPNA and GAPDH, (B) TYROBP and PIPNA, (C) DC STAMP, IL-10 and ICAM-1.

당단백질 결합과 관련된 ICAM-1 유전자의 lactoferrin에 의한 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 1C에 나타난 바와 같다. PMA와 lactoferrin 각각 단독 처리 경우에는 미약하게 발현이 되었지만 PMA와 lactoferrin의 혼합처리한 경우에는 ICAM-1의 발현이 매우 강하게 나타남으로써 lactoferrin이 ICAM-1의 발현에 상승작용 하는 것으로 생각된다. Legrand 등(2005, 2006)은 *in vitro* 연구에서 선천성 면역에 관련된 세포인 macrophage, neutrophil, basophil, eosinophil, mastocyte, NK 세포와 후천성 면역에 관련된 세포인 B 세포, T 세포, dendritic 세포를 포함하는 세포활성의 조절에서 pro-inflammatory와 anti-inflammatory 행위자로서 lactoferrin의 역할을 보고하였다. 대부분의 경우, lactoferrin에 의해 면역세포의 활성의 조절은 면역세포에 의한 pro-inflammatory interleukins 즉, IL-1, IL-6, IL-18, TNF- α 와 endothelial cell에 의한 adhesion molecules의 발현을 감소 또는 증가시키는 결과를 나타내었다(Elass

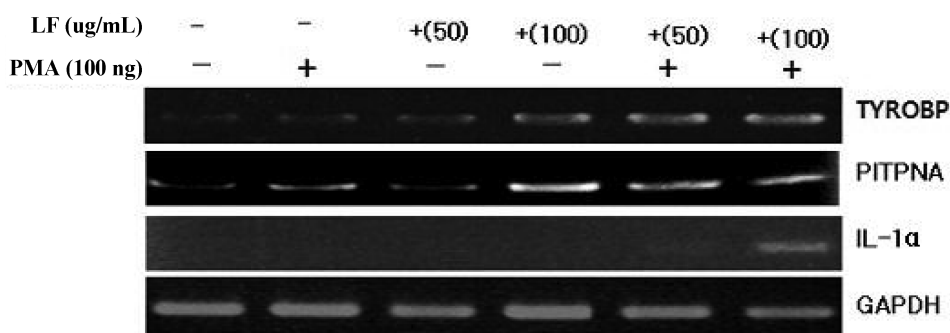


Fig. 2. Modulation of immune activity-related genes (TYROBP, PTPNA and IL-1 α) in the lactoferrin and PMA treated Muts-3 cell.

et al., 2002). 반면에 lactoferrin의 anti-inflammatory 특성의 대부분은 endotoxin에 대한 lactoferrin의 중화효과와 그와 관련된 수용체들에 의해 설명이 가능할 것이다(Legrand *et al.*, 2005; Legrand *et al.*, 2006).

Muts-2 세포에서 면역 관련 유전자들의 발현유전자의 변화

Dendritic cell(수지상 세포) 세포를 분화시키기 전 세포인 Muts-3 세포를 이용하여 TYROBP, PTPNA 그리고 IL-1 α 유전자의 lactoferrin에 의한 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. TYROBP 유전자는 lactoferrin 단독 처리 경우 강하게 발현하였는데 이는 면역반응을 유도하는 PMA와 혼합처리 했을 경우와 비슷하게 발현하였다. 따라서 lactoferrin이 TYROBP 유전자 발현에 강하게 영향을 미치는 것으로 생각된다. 또한 PTPNA 유전자 역시 lactoferrin을 처리했을 경우에 강하게 발현하였고, IL-1 α 유전자 발현에는 아주 미약하게 작용하였다. Spadaro 등(2008)의 보고에 의하면 재조합 인체 lactoferrin의 하나인 talactoferrin(TLF)을 항암물질로써 임

상 진행과 임상 실험의 단계 3에 적용하였는데, monocyte(단핵구)로부터 유래된 dendritic cell(수지상 세포)의 성숙을 유도하는 것으로 밝혀졌다. TLF의 생리학적으로 기능을 나타내는 농도는 100 μ g/mL로 human leukocyte antigen (HLA) class II, CD83, CD80, CD86 공동 분자, CXCR4, CCR7 주화성 수용체 등의 발현을 상향 조절하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과는 dendritic cell을 통한 후천성 면역에 선천성 면역을 연결하는데 있어서 TLF가 면역 조절의 중요한 역할을 하는 기능임을 암시하는 것이다.

NK92 세포에서 면역 관련 유전자들의 발현

NK92 세포에서는 lactoferrin과 PMA를 처리하여 TYROBP와 PTPNA 유전자의 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 3A에 나타난 바와 같다. PTPNA 유전자는 lactoferrin과 PMA 단독 처리 경우에 발현이 잘 되었고, TYROBP 역시 NK세포에서는 잘 발현되는 유전자로 사료된다. NK92세포에 lactoferrin과 PMA를 처리하여 IL-1 α 와 DC-stamp, IFN- α 유전자의 발현여부를 RT-PCR

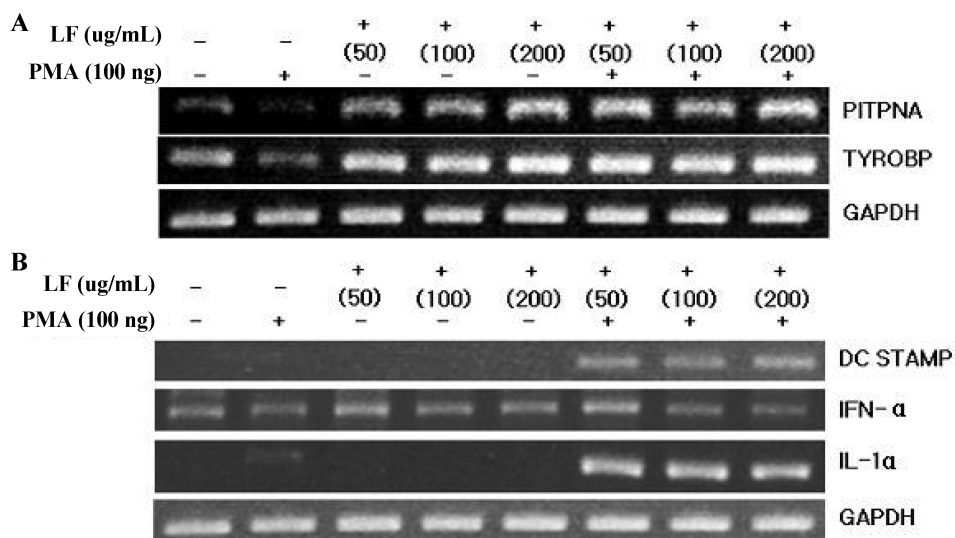


Fig. 3. Modulation of immune activity-related genes in the lactoferrin and PMA treated NK92 cell. (A) TYROBP and PTPNA, (B) DC-STAMP, IFN- α and IL-1 α .

로 조사한 결과는 Fig. 3B에 나타난 바와 같다. IL-1 α 와 DC-stamp 유전자는 lactoferrin과 PMA 단독 처리하였을 경우 발현되지 않았는데, 두 물질을 혼합하여 처리하였을 경우에는 발현되었다. 따라서 lactoferrin과 PMA 두 물질의 상호작용에 의하여 이러한 유전자가 발현되는 것으로 사료된다. 반면 IFN- α 의 유전자는 큰 영향을 받지 않았다.

요 약

유청단백질의 일종인 lactoferrin은 이미 많은 보고에 의해서 여러 가지 생리활성기능이 있는 것으로 밝혀지고 있는데, U937, NK92, 수지상세포의 분화된 상태인 mutz-3와 muDC를 이용하여 과민반응과 천식, 면역 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사 한 결과 의미 있는 결과를 도출하였다. Lactoferrin 단독 또는 면역증강물질인 PMA와 혼합하여 처리 한 경우 상승효과 작용으로 과민반응과 천식, 면역 관련 유전자의 발현을 강하게 유도하였다. 이는 유청단백질의 주요 성분 중 하나인 lactoferrin이 면역기전에 중요한 역할을 하고 있다는 결과로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 농림수산식품부 농림수산식품기술평가원에서 2009년 지원(과제번호: 109149033HD110)에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Arnold, R. R., Cole, M. F., and McGhee, J. R. (1977) A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* **197**, 263-265.
2. Brock, J. (1995) Lactoferrin: A multifunctional immunoregulatory protein. *Immunology Today* **16**, 417-419.
3. Ellison, R. T., Giel, T. J. and Laforce, F. M. (1988) Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect. Immun.* **56**, 2774-2781.
4. Ellass, E., Masson, M., Mazurier, J., and Legrand, D. (2002) Lactoferrin inhibits the lipopolysaccharide-induced expression and proteoglycan-binding ability of interleukin-8 in human endothelial cells. *Infect. Immun.* **70**, 1860-1866.
5. Freiburghaus, C., Janicke, B., Lindmark-Msson, H., Oreds-

- son, S. M. and Paulsson, M. A. (2009) Lactoferricin treatment decrease the rate of cell proliferation of a human colon cancer cell line. *J. Dairy Sci.* **92**, 2477-2484.
6. Gifford, J. L., Hunter, H. N., Vogel, H. J. (2005) Lactoferrin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 2588-2598.
7. Lang, J., Yang, N., Deng, J., Liu, K., Yang, P., Zhang, G. and Jiang, C. (2011) Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans. *PLoS One* **6**, e23710.
8. Legrand, D., Ellass, E., Carpentier, M. and Mazurier, J. (2005) Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 2549-2559.
9. Legrand, D., Ellass, E., Carpentier, M. and Mazurier, J. (2006) Interaction of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochem. Cell Biol.* **84**, 282-290.
10. Li, E. W. and Mine, Y. (2004) Immunoenhancing effects of bovine glycomacropeptide and its derivatives on the proliferative response and phagocytic activities of human macrophaglike cells, U937. *J. Agri. Food Chem.* **52**, 2704-2708.
11. Masson, P. L. and Heremans, J. F. (1971) Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol.* **39B**, 119-129.
12. Mulder, A. M., Connellan, P. A., Oliver, C. J., Morris, C. A., and Stevenson, L. M. (2008) Bovine lactoferrin supplementation supports immune and antioxidant status in healthy human males. *Nutr. Res.* **28**, 583-589.
13. Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., and Hunziker, P. (2001) Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovi Ne β -lactoglobulin. *Biochem. Biophys. Acta* **1526**, 131-140.
14. Spadaro, M., Caorsi, C., Ceruti, P., Varadhachary, A., forni, G., Pericle, F., and Giovarelli, M. (2008) Lactoferrin, a major defense protein of innate immunity, is a novel maturation factor for human dendritic cells. *FASEB J.* **22**, 2747-2757.
15. Suzuki, T., Nonaka, M., Kiyosawa, I., and Ogasa, K. (1977) Lactoferrin contents in bovine colostrum and milk. *J. Jpn. Soc. Food Nutr.* **30**, 317-322.
16. Wong, K. F., Middleton, N., Montgomery, M., Dey, M., and Carr, R. I. (1998) Immunostimulation of murine spleen cells by materials associated with bovine milk protein fractions. *J. Dairy Sci.* **81**, 1825-1832.

(Received 2012.1.30/Revised 2012.4.17/Accepted 2012.6.8)