

ANIMAL

# Effect of lactoferrin hydrolysates on inflammatory cytokine modulation in HEK-293, RBL-2H3, and HMC-1 cells

Ji Yoon Son<sup>1</sup>, Hyung Churl Bae<sup>1</sup>, Gereltuya Renchinkhand<sup>1</sup>, Myoung Soo Nam<sup>1\*</sup>, Woan-sub Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Bio-system Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

<sup>2</sup>Major in Animal Biotechnology, Graduate School of Future Convergence Technology, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

\*Corresponding author: [namsoo@cnu.ac.kr](mailto:namsoo@cnu.ac.kr), [kimws@hknu.ac.kr](mailto:kimws@hknu.ac.kr)

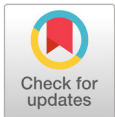
## Abstract

Lactoferrin (LF) is an iron-binding glycoprotein that is present in colostrum, milk, and other body secretions. The objective of this study was to investigate the effects of lactoferrin hydrolysates (LHs) on the production of immunomodulatory factors, including inflammatory related cytokines. The nuclear factor (NF)- $\kappa$ B reporter assay using human embryonic kidney 293 cells (HEK-293) revealed that NF- $\kappa$ B activity was significantly decreased by 1, 50, and 100  $\mu$ g/mL of LH and the fractions above and below the 10 kDa LH. The mRNA expression of interferon (IFN)- $\gamma$  in rat basophilic leukemia mast cells (RBL-2H3) treated with the fraction above the 10 kDa LH decreased in a dose-dependent manner, but the cells treated with LH and the fraction below the 10 kDa LH showed an increased expression of IFN- $\gamma$  in a dose-dependent manner. The level of cyclooxygenase (COX)-2 expression decreased dose-dependently in RBL-2H3 cells treated with LH and the fraction above the 10 kDa LH, but the cells treated with the fraction below the 10 kDa LH showed an increased COX-2 expression in a dose-dependent manner. The mRNA expression of interleukin (IL)-4 was dose-dependently decreased by the fraction below the 10 kDa LH in human mast cells (HMC-1). The mRNA expressions of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and IL-6 were significantly dose-dependently decreased by the fractions above and below the 10 kDa LH, but was dose-dependently increased by LH. The production of IL-4 was a little increased by the fraction above the 10 kDa LH compared to the positive control, but was decreased with LH and the fraction below the 10 kDa LH in HMC-1 cells. It was concluded that LF hydrolysates had an immunomodulating effect on anti-, pro-inflammatory and anti-allergic reactions.

**Keywords:** cytokine, hydrolysates, immune-modulating, inflammatory, lactoferrin

## Introduction

Lactoferrin (LF)는 항염증 작용을 하여 반응의 유해성을 낮출 수 있다. 조직이 감염되면 괴사 조직으로부터 방출된 유리 철에 의해 생성되거나 활성화된 과립구에 의해 과잉



### OPEN ACCESS

**Citation:** Son JY, Bae HC, Renchinkhand G, Nam MS, Kim W. 2020. Effect of lactoferrin hydrolysates on inflammatory cytokine modulation in HEK-293, RBL-2H3, and HMC-1 cells. Korean Journal of Agricultural Science 47:83-93. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20200001>

**Received:** November 12, 2019

**Revised:** January 06, 2020

**Accepted:** January 15, 2020

**Copyright:** © 2020 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

생산되는 반응성 산소가 풍부하게 생성된다. 이러한 염증성 파열은 전 염증성 cytokine의 과도한 방출과 함께 주로 interleukin (IL)-1과 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )가 패혈성 쇼크의 병인에 크게 기여한다(Annane et al., 2005). LF는 대식세포와 상호작용하는 염증반응을 억제하고 세포에 의한 염증성 cytokine의 생성을 억제함으로써 다른 항 염증성 cytokine과 유사한 방식으로 염증성 cytokine의 생성을 조절한다(Crouch et al., 1992; Yamaguchi et al., 2001). LF는 인간 단핵 세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-8의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다(Haversen et al., 2002).

염증반응이 일어나는 동안 LF가 방출되고 염증부위에서 LF의 농도는 염증반응의 feed-back 기전에서 중요한 역할을 하는데 0.4 - 2.0  $\mu\text{g/mL}$ 에서 200  $\mu\text{g/mL}$ 로 증가한다(Farnaud and Evans, 2003). LF의 선천적 및 적응성 면역 반응은 병원체에 대한 1차 숙주방어 기전에서 중요한 구성요소가 된다(Kruzel et al., 2002; Legrand et al., 2005). Cytokine 및 산화질소(NO)의 생성 증가에 의한 대식세포의 활성화는 세포 내 병원체의 증식을 감소시킨다(Wakabayashi et al., 2003; Kawai et al., 2007).

Bioactive peptides (BPs)는 신체 기능이나 상태에 긍정적인 영향을 미치고 궁극적으로 건강에 영향을 줄 수 있는 특정 단백질 조각으로 정의된다(Kitts and Weiler, 2003). BPs 연구 중 우유 단백질 가수분해물의 bioactive peptides (BPs)에 대한 연구가 가장 많고 활발하게 연구되고 있다. BP는 일반 식품, 식이 보조제, 기능성 식품 또는 의료 식품으로 소비자에게 공급될 수 있다. 이들 생물 활성 BPs는 항균활성, 항고혈압제, 항산화제, 항세포독성제, 면역조절제, 아편유사제 및 무기물 운반활성을 포함하여 매우 중요한 생물학적 활성 및 기능성을 나타낸다.

다양한 식이단백질로부터 유래된 BPs는 많은 연구자들에 의해 연구되었다(Clare and Swaisgood, 2000; FitzGerald and Meisel, 2003; Li et al., 2004). BPs는 단백질 서열 내에서는 비활성이지만 다음 3가지 방법에 의해 생성될 수 있다. 첫째, 소화 효소에 의한 가수 분해를 통해, 둘째, 단백질 분해 미생물에 의한 단백질의 가수분해를 통해, 셋째, 미생물 또는 식물로부터 유래된 단백질 분해효소의 작용을 통한 방법이다(Korhonen and Pihlanto, 2007). 한편 Park and Nam (2015)은 주요 우유단백질로부터 BPs 형성에 관하여 보고하였다.

본 연구는 알칼리성 protease에 의해 생성된 LF 가수분해물이 항염증성 cytokine과 전염증성 cytokine (interleukin-13, tumor necrosis factor- $\alpha$ )을 포함하여 면역조절 및 cytokine 생산에 미치는 영향을 밝힘에 있다. Human embryonic kidney 293 cells (HEK-293), rat basophilic leukemia mast cells (RBL-2H3) 및 human mast cells (HMC-1) 세포를 이용하여 염증반응에 관련된 cytokine으로 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-8의 발현을 조사하였다.

## Materials and Methods

### LF 가수분해

LF 분말은 Sindayikengera and Xia (2006)과 Stancius et al. (2010) 방법에 따라 가수분해하였다. LF를 1.0 N NaOH로 pH 9.0에 2% 용액으로 조정하였다. Shaking incubator (KMC-8480SFN No. 50, Vision Scientific Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 이용하여 단백분해효소인 Alcalase (Alcalase® CLEA, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)와 LF를 1 : 100 (w/w)으로 조정하고 50°C에서 5시간 반응시킨 후 90°C에서 10분간 열처리하여 가수분해를 정지시켰다. 가수분해물을 12,000  $\times$  g에서 25분 동안 원심분리하고 침전물을 제거한 후, 가수분해물을 cut off 10 kDa의 centricon (Vivaspin20, GE Healthcare, Chicago, USA)을 사용하여 4°C에서 3시간 동안 8,000  $\times$  g 원심분리하였다. 가수분해물을 10 kDa 미만과 10 kDa 이상으로 나누어 실험에 사용하였다.

## 세포배양

HEK-293, RBL-2H3, HMC-1는 한국생명공학연구원(Daejeon, Korea)에 분양받았고 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Rockville, MD, USA), 과 1% (100 U/mg) penicillin/streptomycin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)을 첨가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>와 대기 습도가 유지되는 배양조건에서 배양하였다. 24-well (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)에  $4 \times 10^5$  cells/mL 조정하여 24시간 배양 후 LF 가수분해물 50 µg/mL 처리하였다.

## MTT 분석

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)의 formazan으로 mitochondrial 의존적인 감소는 세포 생존의 지표로서 세포 호흡을 측정하는데 사용하였다. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 positive control로 사용하여 18시간 동안 배양 한 후, 세포를 MTG 0.5 mg/mL를 함유하는 DMEM 배지에서 3시간 동안 배양시켰다. 이어서 매질을 제거하고 isopropanol을 첨가하여 formazan을 용해시켰다.  $5,000 \times g$ 에서 5분간 원심분리한 후, 각 시료의 상등액을 96-well plate에 옮기고, Versa Max™ Tunable Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA)로 570 nm에서 흡광도를 판독했다. LPS 단독으로 처리한 배양액의 흡광도를 100% 세포 생존력으로 간주하였다.

## Nuclear factor (NF)-κB 활성화에 관한 luciferase 분석

HEK-293 세포에 NF-κB 프로모터가 접합된 luciferase report 유전자로 구성된 재조합 DNA plasmid p-κB3-tk-Luc (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)을 Attractance Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 HEK293 세포에 transfection한 다음 제조사의 실험방법을 따랐다. Transfected-HEK293 세포는 96-well plate ( $1 \times 10^5$  cells/mL)에 넣고 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 습식배양기에서 배양했다. 6시간 후, ONE-glo luciferase 분석(Promega, Madison, USA)을 제조사의 방법에 따라 사용하였다. 검출은 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)에서 수행하였다.

## IL-4 측정

HMC-1 세포를 24-well plate ( $5 \times 10^5$  cells/mL, completed medium)에서 배양한 후, PMA 1 µg/mL (PMA, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)를 positive control로 사용하였고, 시료 1, 50, 100 µg/mL을 처리하였다. 6, 12, 24 시간 배양 후, 상등액을 수집하고 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA, Biolegend, USA) 방법으로 IL-4를 분석하였다. IL-6, TNF-α, IL-1β는 제조사의 방법에 따라 ELISA kit를 사용하여 검출하였다. Cytokines은 SOFT max 곡선적합 프로그램(Molecular Devices, California, USA)을 사용하여 표준곡선으로부터 정량하였다.

## RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)

IL-4, IL-6, cyclooxygenase (COX)-2, IL-13, interferon (IFN)-γ 및 TNF-α mRNA를 검출하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 세포를 12-well ( $1 \times 10^6$  cells/mL, completed medium)에서 배양하고, 3가지 유형(LH, 10 kDa LH 미만, 10 kDa LH 이상)의 시료를 1, 50, 100 µg/mL로 세포에 처리하였고, positive control은 1 µg/mL의

PMA를 처리하였다. 세포 회수 후 Trizol 시약(Invitrogen Corporation, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)을 사용하여 총 RNA를 분리했다. 전체 RNA 1 µg을 25 units/µL Oligo (dT) primer, 1 mM dNTPs, 1.75 unit/µL 리보뉴클레아제 억제제, 2.5 unit/µL M-MLV 역전사 효소, M-MLV RT 5X 완충액(Promega, Madison, USA)를 사용했다. 사용한 primer는 Table 1과 같다. 사용한 PCR 기기는 Gene Amp PCR systeme-2700 (Applied Biosystems, Foster, USA) 이다.

RT-PCR kits (Promega, Madison, USA)에 Oligo dT, dNTP mix, Ribonuclease inhibitor, M-MLV Reverse Transcriptase, M-MLV RT 5X buffer를 사용하여 45°C에서 30분, 94°C에서 5분 동안 반응시킨 후 94°C에서 30초 동안 denaturation 시키고, 55 - 62°C에서 30초 동안 annealing시킨 다음, 72°C에서 1분 동안 24 - 27 cycle 반복한 다음, 마지막 extension은 72°C에서 5분 동안 PCR (Applied Biosystems, Foster, USA)을 수행했다. PCR 산물은 2% agarose gel에 주입하고 100 V 조건에서 15분 동안 전기영동을 수행했다.

**Table 1.** List of primer set for RT-PCR.

Gene		Primer	Sequence 5' → 3'
HMC-1 cells (human)	GAPDH	Forward	<i>CCATCACCATCTTCCAGGAG</i>
		Reverse	<i>ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT</i>
	IL-4	Forward	<i>TCTCACCTCCCAACTGCTTCC</i>
		Reverse	<i>CGTTTCAGGAATCGGATCAGC</i>
	INF-γ	Forward	<i>CAGCTCTGCATCGTTTTGGGTTCT</i>
		Reverse	<i>TGCTGTTTCGACCTCGAAACAGCAT</i>
	COX-2	Forward	<i>CGAGGTGTATGTATGAGTGTG</i>
		Reverse	<i>TCTAGCCAGAGTTTACCCTGA</i>
RBL-2H3 cells (rat)	IL-4	Forward	<i>ACCTTGCTGTCACCCTGTTC</i>
		Reverse	<i>TTGTGAGCGTGGACTCATT</i>
	IL-13	Forward	<i>GCTCTCGTTGCCTTGGTGGTC</i>
		Reverse	<i>CATCCGAGGCCTTTTGGTTAGAG</i>
	TNF-α	Forward	<i>CACCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC</i>
		Reverse	<i>CCGACTCCGTGATGCTTAAGTACT</i>
	IL-6	Forward	<i>AGTAAGTTCCCTCTCTGCAAGAGACT</i>
		Reverse	<i>CACTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC</i>

HMC, human mast cell; RBL, rat basophilic leukemia mast cells; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IL, interleukin; INF, interferon; COX, cyclooxygenase; TNF, tumor necrosis factor.

## Cytokine 측정

각 세포를 24-well (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)에  $4 \times 10^5$  cells/mL로 조정 후 PMA (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 1 µg/mL을 처리하고, 대조군과 LF 시료 50 µg/mL을 각 세포에 처리하고, 0, 4, 8, 12시간 배양 후 상층액을 모아 enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA) kit (BD Bioscience, Oxford, UK)를 이용하여 TNF-α와 IL-6를 측정하였다.

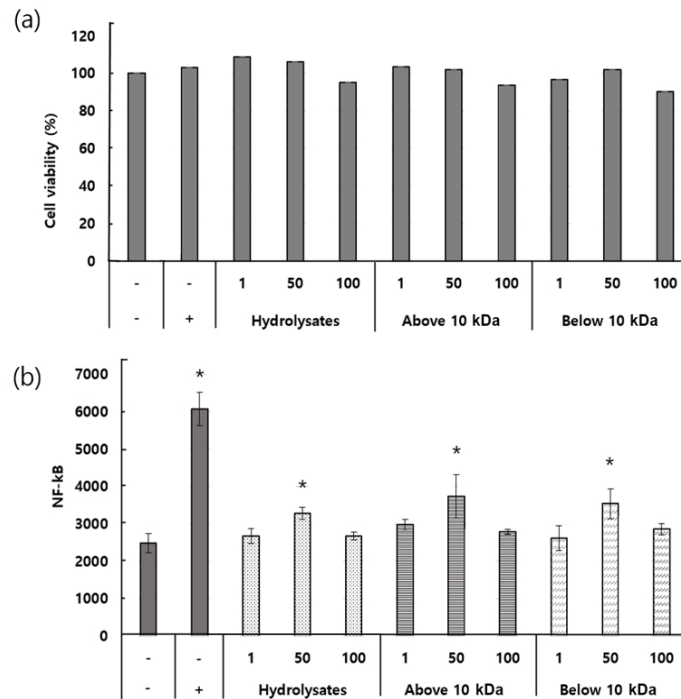
## 통계처리

모든 실험은 t-테스트로 수행되었다. 신뢰 수준( $p < 0.05$ )은 유의한 것으로 간주되었다. 실험군간 차이의 유의성은 Student's unpaired t-test를 사용하여 분석했다. 표준오차(SEM, standard error of the mean) 값은 평균  $\pm$  SEM으로 표시했다. \* $p < 0.05$  인 경우 평균 차이가 유의하게 고려되었다.

## Results and Discussion

### HEK-293에서 NF- $\kappa$ B 활성에 관한 luciferase 분석

LF를 alcalase로 가수분해한 시료의 양상은 Son et al. (2018)에 나타난 바와 같다. 즉 알칼리 처리로 생성된 LF 가수분해물은 다양한 크기의 펩타이드로 분자량은 대부분 10 kDa 미만으로 판단되었다. NF- $\kappa$ B 염증 경로가 TNF- $\alpha$ 로 자극되면 NF- $\kappa$ B 프로모터가 반딧불에서 발견되는 발광효소인 luciferase의 전사를 유발하여 방출되는 빛의 양으로 NF- $\kappa$ B 활성을 확인하였다. Fig. 1a에 나타난 바와 같이, 1, 50, 100  $\mu$ g/mL의 LH, 10 kDa 및 10 kDa LH 미만으로 처리된 형질전환된 NF- $\kappa$ B 벡터 HEK-293 세포의 luciferase 분석에서 HEK-293은 3 종류(LH, 10 kDa LH 이상 및 미만) 세포의 세포독성을 나타내지 않았다. Fig. 1b는 LH의 10 kDa 이상 및 10 kDa 미만의 50  $\mu$ g/mL 처리구에서 NF- $\kappa$ B 활성이 1 및 100  $\mu$ g/mL보다 더 많은 효과를 나타냈다. NF- $\kappa$ B 활성은 LH 3 종류(LH, 10 kDa LH 이상 및 미만) 모두 50  $\mu$ g/mL 처리구에서 가장 높았다. 따라서 luciferase 저해 메커니즘은 LF가 NF- $\kappa$ B 활성화에 관여하는 것으로 확인되었고, Haversen et al. (2002)도 같은 결과를 보고하였다.



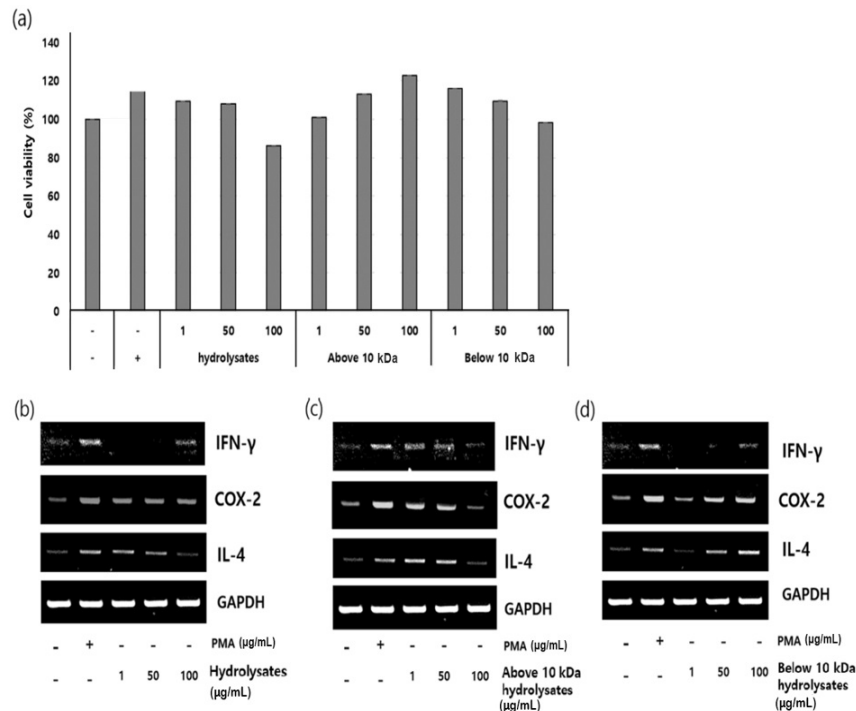
**Fig. 1.** Effect of lactoferrin (LF) hydrolysates on the cell viability and luciferase assay for nuclear factor (NF)- $\kappa$ B activity induced by LF hydrolysates in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. (a) Effect of LF hydrolysates on the cell viability. (b) Luciferase assay for NF- $\kappa$ B activity which is induced by LF hydrolysates. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was treated 1  $\mu$ g/mL. Significantly different from control. \* $p < 0.05$ .



## RBL-2H3에서 LH에 의한 세포생존율과 cytokine 발현

Fig. 2a는 LH가 RBL-2H3에서의 세포 생존력 및 mRNA 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 세포 생존율은 3종류(LH, 10kDa LH 이상 및 미만) 모두 10 kDa 이상과 10 kDa 미만의 시료에서는 유의한 효과가 없었다. 그러나 100  $\mu\text{g/mL}$  농도의 LH는 대조군에 비해 세포독성 효과를 나타내었다. PMA를 처리한 RBL-2H3 세포에서 LH에 의해 발현된 rat IFN- $\gamma$ , COX-2, IL-4의 mRNA를 나타낸 것이다(Fig. 2b and 2d). IFN- $\gamma$  mRNA의 발현 억제는 LH 1, 50  $\mu\text{g/mL}$ , 10 kDa 미만 1, 50  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서 나타냈다(Fig. 2b and 2d). 또한 10 kDa 이상 가수분해물에서는 100  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서 억제되었다(Fig. 2c). 이는 염증관련 cytokine인 IFN- $\gamma$ 의 발현에 LF 가수분해물의 적정량이 영향을 미침을 알 수 있었다. COX-2 mRNA는 LH 처리구에서는 1, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 처리 양과 관계없이 일정하게 발현되었다(Fig. 2b). 그러나 10 kDa 이상 처리구에서는 농도 의존적으로 발현이 감소되었고(Fig. 2c), 10 kDa 미만에서는 농도 의존적으로 발현이 증가되었다(Fig. 2d). IL-4 mRNA의 발현은 3 시간 자극 후 LH와 10 kDa LH 이상 처리구에서는 농도 의존적으로 감소되지만(Fig. 2b and 2c), 10 kDa 미만에서는 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 2d).

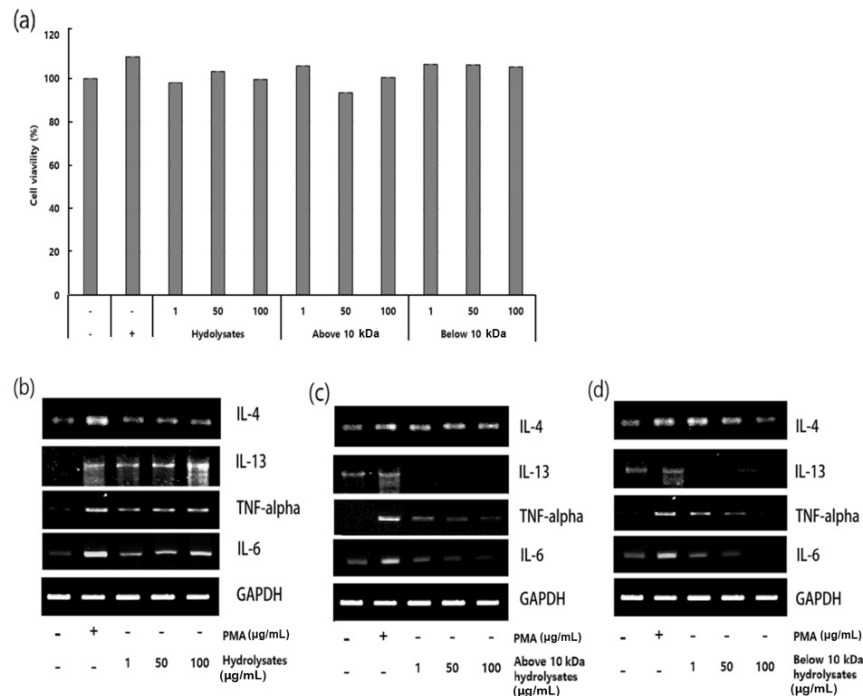
이와 같이 LH 가수분해물은 RBL-2H3 세포에서 염증성 cytokine인 IL-4의 발현을 조절하는 기능이 있는 것으로 확인되었다. COX-1은 COX-2와 달리 위장관 보호, 혈소판 생성, thromboxane과 같은 효소와 관련이 있다. COX-2는 prostaglandin을 생산하여 통증과 염증을 일으킨다(Nadler et al., 2000).



**Fig. 2.** Effect of lactoferrin (LF) hydrolysates on the cell viability and mRNA expression by and RT-PCR during 3 hours in rat basophilic leukemia mast cells (RBL)-2H3 cells. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was treated 1  $\mu\text{g/mL}$ . (a) Cell viability (b) lactoferrin (LF) hydrolysates (c) above 10 kDa LF hydrolysates (d) below 10 kDa LF hydrolysates. INF, interferon; COX, cyclooxygenase; IL, interleukin; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

### HMC-1 세포에서 LH에 의한 세포생존율과 cytokine 발현

Fig. 3은 HMC-1의 세포생존력 및 mRNA 발현에 대한 3 종류(LH, 10 kDa LH 이상 및 미만)의 효과를 나타낸 것이다. 세포 생존능력은 3종류의 LH 가수분해물의 농도에 유의한 영향을 미치지 않았다. 10 kDa 이상 및 10 kDa 미만의 LH로 처리된 HMC-1에서의 mRNA 발현은 Fig. 3b 와 3d에 나타난 바와 같다. Fig. 3b에 나타난 바와 같이, LH 1, 50 및 100  $\mu\text{g/mL}$ 는 음성대조군보다 IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-13의 분비를 유의하게 증가시켰다. 그러나 10 kDa LH 이상 및 미만 처리구인 Fig. 3c 및 3d는 양성대조군보다 IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-13의 발현을 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다. 특히 100  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서는 발현 농도를 확인하기 어려웠다. 한편 3종류(LH, 10kDa LH 이상 및 미만) 가수분해물을 RAW264.7 cell (macrophage)에 처리하여 IL-13과 IL-6의 발현을 조사한 결과는 1, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서는 전혀 발현되지 않았다. 또한 TNF- $\alpha$ 는 LH와 10 kDa LH 이상에서는 1  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서 발현되었으나 50  $\mu\text{g/mL}$ 와 100  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서는 전혀 발현되지 않았고 10 kDa LH 미만 처리구에서도 전혀 발현되지 않았다(Son et al., 2018). 인간 비만세포인 HMC-1는 IgE (Fc $\epsilon$ RI) (Moon et al., 1998)에 대한 고친화성 수용체의 교차결합에 반응하여 다수의 염증촉진 매개체를 방출함으로써 allergy 질환에서 중요한 역할을 한다. 또한 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, GM-CSF도 중요한 역할을 하며, 잠재적인 유도인자이다(Galli et al., 1992). IL-6는 또한 IL-4와 같은 보조인자로도 불린다. IL-6는 체내의 국소알레르기 반응과 관련된 비만세포에서 분비되고, 인간 호중구, T-림프구, 호산구로부터 분비된다(Metcalf et al., 1997). 한편 Togawa et al. (2002)는 LF의 경구 투여 시 TNF- $\alpha$ 와 IL-10의 분비를 억제한다고 보고하였다.



**Fig. 3.** Effect of lactoferrin (LF) hydrolysates on the cell viability and mRNA expression by treated with LF hydrolysates treated human mast cell (HMC)-1 cells. Above 10 kDa LF hydrolysates and below 10 kDa LF hydrolysates were treated by different concentrations during 3 hours. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was treated 1  $\mu\text{g/mL}$ . (a) Cell viability (b) LF hydrolysates (c) above 10 kDa LF hydrolysates (d) below 10 kDa LF hydrolysates. IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

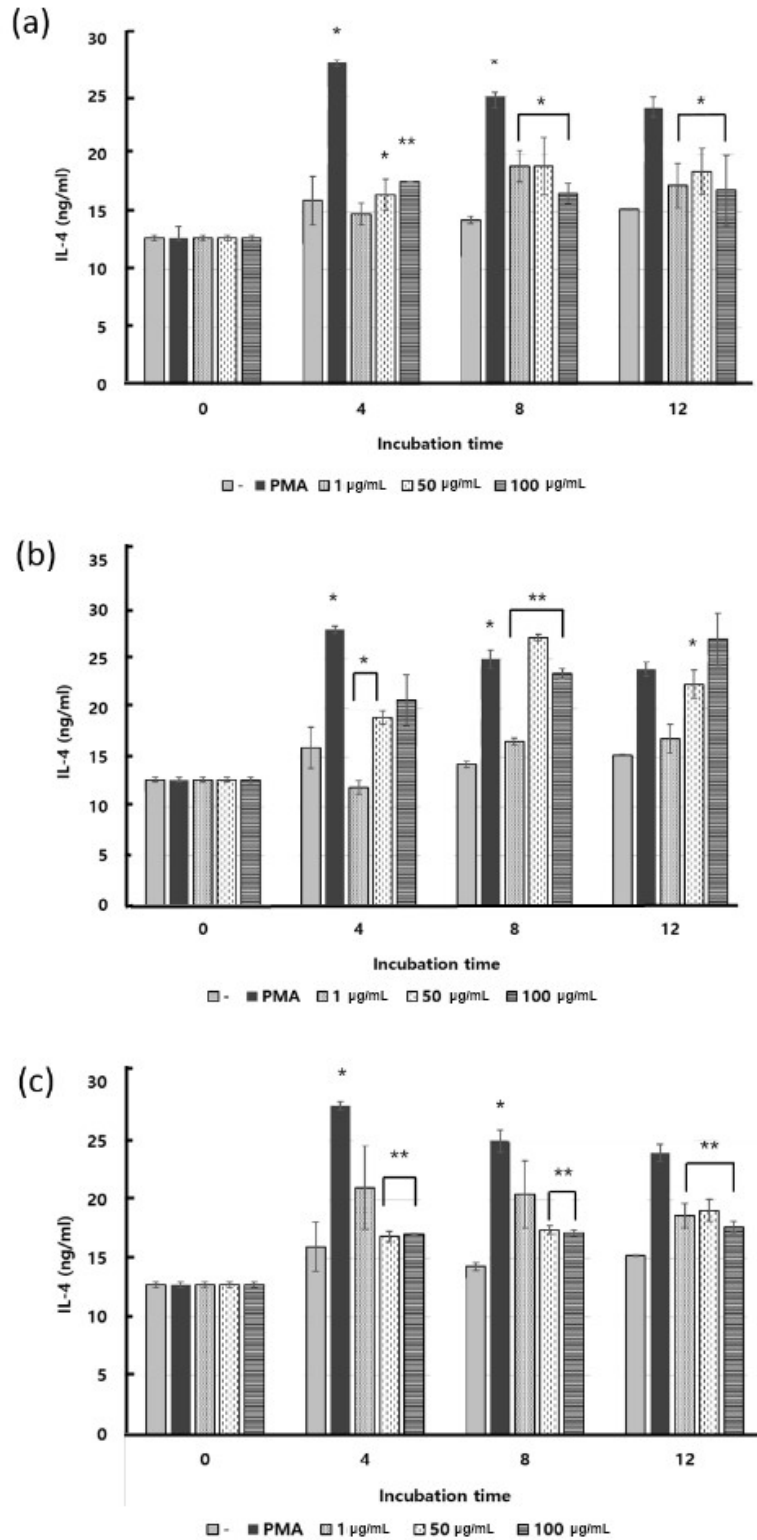
## HMC-1 세포에서 LH에 의한 IL-4 생산

Allergy 관련 cytokine인 IL-4의 생산에 대한 LH의 효과를 확인하기 위해 배양 상등액에 함유된 cytokine의 양을 측정한 결과는 Fig. 4a - 4c와 같다. Fig. 4a와 4c는 반응 4, 8, 12시간에는 양성대조군보다 현저히 적은 양의 IL-4를 생산하였다. 그러나 Fig. 4b는 8시간 반응 때는 50 µg/mL 처리구에서 양성대조군 25 ng/mL 보다 높은 27.4 ng/mL의 IL-4를 생산하였고, 12시간 반응 때는 100 µg/mL 처리구에서 양성대조군 24 ng/mL 보다 높은 26.4 ng/mL의 IL-4를 생산하였다. 따라서 LH 가수분해물 중 10 kDa 미만은 allergy 증상과 직접 관련이 있는 cytokine인 IL-4의 생산을 억제함으로써 allergy 증상을 저감시킬 수 있다고 판단된다. 또한 LH 가수분해물의 peptide 분자량에 따라 비만세포에 미치는 영향이 다르게 조절되어 IL-4의 생산에 영향을 주는 것으로 사료된다.

## Conclusion

HEK-293 세포에 LH, 10 kDa 이상과 미만 처리구 모두 NF-κB 생성은 양성대조구에 비해 현저히 감소하였다. RBL-2H3 세포에서 LH 및 10 kDa 이상 LH 100 µg/mL 처리구는 IL-4 및 COX-2의 발현을 감소시켰지만 10 kDa 미만 처리구는 농도의존적이다. IFN-γ의 mRNA 발현은 양성대조구에 비해 10 kDa 이상 LH 처리구는 농도 의존적으로 감소하였고, LH와 10 kDa 미만 LH 100 µg/mL 처리구만 낮게 발현되었다. Allergy 관련 cytokine인 IL-4, IL-6, IL-13 및 TNF-α의 발현은 HMC-1 세포에서 발현을 확인하였다. IL-4의 발현은 10 kDa 이상 LH에서 증가하였고 10 kDa 미만 LH 처리구는 농도 의존적으로 감소하였다. IL-13은 LH 처리구는 농도 의존적으로 발현하였고 10 kDa 이상과 미만에서 전혀 발현되지 않았다. TNF-α의 발현은 LH 처리구는 농도 의존적으로 발현하였으나 10 kDa 이상과 미만에서 농도 의존적으로 발현이 저해되었다. IL-6도 TNF-α와 같은 양상을 보였다. 따라서 lactoferrin 가수분해물 peptides는 염증반응 관련 cytokine의 발현 조절에 영향을 미치는 것으로 사료된다.





**Fig. 4.** The concentration of interleukin (IL)-4 production by treated with in lactoferrin (LF) hydrolysates in human mast cell (HMC)-1 cells. Incubation time was 0, 4, 8, 12 hours. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) concentration was treated 1 µg/mL. (a) LF hydrolysates (b) above 10 kDa LF hydrolysates (c) below 10 kDa LF hydrolysates. Significantly different from control. \*p < 0.05, \*\*p < 0.005.

## Acknowledgements

본 연구는 2018년 충남대학교 자체연구(CNU학술연구지원사업:2018-1043-01) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## Authors Information

Ji Yoon Son, Precision Biosensor, Assistant Research Engineer

Hyung Churl Bae, <https://orcid.org/0000-0003-0781-6611>

Gereltuya Renchinkhand, <https://orcid.org/0000-0003-2107-0430>

Myoung Soo Nam, <https://orcid.org/0000-0003-0866-1041>

Woan-sub Kim, <https://orcid.org/0000-0002-5612-3515>

## References

- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. 2005. Septic shock. *Lancet* 365:63-78.
- Clare DA, Swaisgood HE. 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science* 83:1187-1195.
- Crouch SP, Slater KJ, Fletcher J. 1992. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood* 80:235-240.
- Farnaud S, Evans RW. 2003. Lactoferrin-A multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology* 40:395-405.
- FitzGerald RJ, Meisel H. 2003. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: *Advances in Dairy Chemistry*. 3<sup>rd</sup> edited by Fox PF, and Mc Sweeney PLH. pp. 657-698. Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY, USA.
- Galli SJ, Gordon JR, Wershil BK. 1992. Cytokine production by mast cells and basophils. *Current Opinion in Immunology* 3:865-872.
- Haversen L, Ohlsson BG, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Mattsby-Baltzer I. 2002. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cellular Immunology* 220:83-95.
- Kawai K, Shimazaki K, Higuchi H, Nagahata H. 2007. Antibacterial activity of bovine lactoferrin hydrolysate against mastitis pathogens and its effect on superoxide production of bovine neutrophils. *Zoonoses and Public Health* 54:160-164.
- Kitts DD, Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9:1309-1323.
- Korhonen H, Pihlanto A. 2007. Bioactive peptides from food proteins. *Handbook of food products manufacturing*. Edited by Hui YH. pp. 5-37. John Wiley&Sons, Inc., California, USA.
- Kruzel ML, Harari Y, Mailman D, Actor JK, Zimecki M. 2002. Differential effects of prophylactic, concurrent and the therapeutic lactoferrin treatment on LPS-induced inflammatory responses in mice. *Clinical & Experimental Immunology* 130:25-31.
- Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. 2005. Lactoferrin: A modulator of immune and inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Science* 62:2549-2559.
- Li G, Le G, Shi Y, Shrestha S. 2004. Angiotensin 1-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research* 24:469-486.
- Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. 1997. Mast cells. *Physiological Reviews* 77:1033-1079.
- Moon TC, Murakami M, Ashraf MD, Kudo I, Chang HW. 1998. Regulation of cyclooxygenase-2 and endogenous cytokine expression by bacterial lipopolysaccharide that acts in synergy with c-kit ligand and FcεRI crosslinking in cultured mast cells. *Cellular Immunology* 185:146-152.

- Nadler MJS, Matthews SA, Turner HA, Kinet JP. 2000. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: Coupling form to function. *Advances in Immunology* 76:325-355.
- Park YW, Nam MS. 2015. Bioactive peptides in milk and dairy products: Review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 35:831-840.
- Sindayikengera S, Xia W. 2006. Nutrition evaluation of casein and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *Journal of Zhejiang University Science B* 7:90-98.
- Son JY, Park YW, Renchinkhand G, Paik SH, Nam MS. 2018. Characterization of lactoferrin hydrolysates on inflammatory cytokine expression in RAW264.7 macrophage. *Korean Journal of Agricultural Science* 45:439-448. [in Korean]
- Stanciu N, Hintoiu A, Stanciu S, Rapeanu G. 2010. Thermal treatment can modify the susceptibility of whey protein concentrate to enzymatic hydrolysis. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 7:30-36.
- Togawa J, Nagase H, Tanaka K, Inamori M, Nakajima A, Ueno N, Saito T, Sekihara H. 2002. Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17:1291-1298.
- Wakabayashi H, Takakura N, Teraguchi S, Tamura Y. 2003. Lactoferrin feeding augments peritoneal macrophage activities in mice intraperitoneally injected with inactivated candida albicans. *Microbiology Immunology* 47:37-43.
- Yamaguchi M, Matsuura M, Kobayashi K, Sasaki H, Yajima T, Kuwata T. 2001. Lactoferrin protects against development of hepatitis caused by sensitization of kupffer cells by lipopolysaccharide. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8:1234-1239.