

젖소 초유 중 Insulin-like Growth Factor-I 분획이 암세포에 미치는 영향

황경아 · 양희진 · 이수원
성균관대학교 식품생명공학과

서 론

젖소 초유는 분만 직후부터 일주일 이내에 분비되는 우유를 말하는데 단백질, 당질, 지방 및 비타민과 무기질 등의 다양한 영양소를 함유하는 액상으로서 정상유에 비해 면역증진 인자와 생리조절인자 및 세포분열 활성인자 등을 다량 함유하고 있다. 초유 내에 존재하는 생리활성물질, 즉 Milk growth factor(MGF)의 종류로는 Insulin-like growth factor(IGF), Epidermal growth factor(EGF), Transforming growth factor(TGF)등이 존재한다⁽¹⁾. 이들 가운데 IGF-I은 DNA 합성과 세포분열활성을 증가시키며 세포성장에 관여하는 것으로 알려져 있으며 또한 암세포 내의 IGF binding protein과 IGF receptor의 발현에 의해 암세포 증식의 억제 및 증식에도 관여한다. 이에 본 연구는 젖소 초유 중에 포함되어 있는 IGF-I 이 각 암세포에 미치는 영향을 알아보았다.

재료 및 방법

IGF-I rich fraction 분리는 분만 후 24시간 이내에 착유한 젖소 초유를 Hossner과 Yemm⁽²⁾의 방법으로 30kDa과 1kDa Ultrafiltration(UF) membrane를 이용하여 IGF-I rich fraction을 분리하였다. 분리된 IGF-I rich fraction내에 함유되어 있는 IGF-I은 Hossenlopp P 등⁽³⁾과 Battelli 등⁽⁴⁾의 방법으로 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(A) western blotting(B)으로 확인하였고, Fraction 내에 함유되어 있는 IGF-I의 정량은 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 측정하였다. 실험에 사용한 암세포주는 A427, SK-HEP-1, A498, HeLa, WiDr, SNU 16를 사용하였고 각 암세포에 IGF-I fraction 1, 0.1, 0.01 및 0.001mg/ml의 농도로 처리하여 IGF-I이 cell mediated에 미치는 영향을 MTT assay를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

IGF-I의 분자량이 7.6kDa인 것에 착안하여 젖소 초유 내의 free IGF-I을 30kDa과 1kDa의 cartridge를 사용한 ultrafiltration으로 분획하였다. IGF-I rich fraction에 포함되어 있는 IGF-I은 SDS-PAGE와 Western blotting으로 확인한 결과는 Fig.1과 같았으며 ELISA로 정량한 결과는 IGF-I rich fraction 중의 IGF-I 함량은 10ng/mg(protein concentration)으로 측정되었다.

암세포의 성장은 체내에 있는 세포 증식과 세포 apoptosis의 불균형에 의해 이루어지는데 이것은 세포 증식이 많거나 혹은 세포 apoptosis가 적게 발생하는 경우에 암이 성장하는 것을 의미한다. Butler 등⁽⁵⁾이 보고한 바에 의하면 IGF, EGF, TGF 등 성장인자에 의해 암세포의 억제 및 성장 조절이 되어진다고 하였다. 이에 이론적 근거를 두고, 분획한 IGF-I rich fraction이 암세포에 미치는 영향을 실험하였다. 그 결과 폐암세포인 A427 cell은 IGF-I rich fraction 1mg/ml(IGF-I 10ng)의 농도에서는 33%, 0.1, 0.01 mg/ml에서는 23%, 20% 및 0.001mg/ml에서는 약 13%의 세포 성장억제 효과를 Fig. 2(A)에 나타내었다. Kodama 등⁽⁶⁾이 폐암세포인 A549 cell을 사용하여 IGF-1이 세포에 미치는 영향을 보고하였는데 10~100ng/ml의 농도에서 A549 cell은 대조구에 비해 농도 의존적인 DNA 합성 저해와 cancer cell의 증식을 저해하며 최고 농도에서는 약 45%의 저해율을 보고하였다. 이는 본 실험에서와 같은 경향으로서 폐암세포에서는 mitogen으로서의 영향은 거의 미치지 않으며 세포증식 저해에 농도 의존적인 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

간암 세포인 SK-HEP-1에 대하여 IGF-I rich fraction이 세포 성장에 미치는 영향을 실험한 결과는 Fig. 2(B)와 같았다. 1mg/ml의 농도에서는 대조구에 대비하여 약 2%, 0.1mg/ml의 농도에서는 약 8%, 0.01mg/ml과 0.001mg/ml의 농도에서 약 17%와 13%의 암세포 성장 저해율을 보였다. SK-HEP-1 cell의 결과는 IGF-1의 농도가 높을 때보다 낮아질 때 세포 성장의 저해효과는 상승하였다. 이러한 결과는 Baserga 등⁽⁷⁾이 연구 보고한 IGFBP-3가 IGF와는 무관하게 직접세포에 작용하여 세포 성장을 억제시킬 수도 있고, 또는 발현된 IGFBP-3와 IGF가 결합함으로써 IGF의 mitogenic 효과는 상실하고 또한 IGF rich fraction의 농도를 낮게 처리한 농도에서는 IGFBP가 IGF와 결합이 적어지면서 IGFBP가 acutocrine action에 의해 자연스럽게 어느 정도까지는 암세포를 저해시킬 수 있다는 보고와 일치하는 결과였다.

A498 cell은 1mg/ml일 때 22%의 암세포 성장저해 효과를 보였으며, 0.1mg/ml의 농도에서는 약 9%의 성장저해율과 0.01mg/ml과 0.001mg/ml의 농도에서는 약 1% 이하의 저해율로서 0.01mg/ml 이하의 농도에서는 암세포 성장저해율의 효과는 거의 없었으나 mitogen으로서의 활성 또한 나타나지 않았다(Fig. 2(C)).

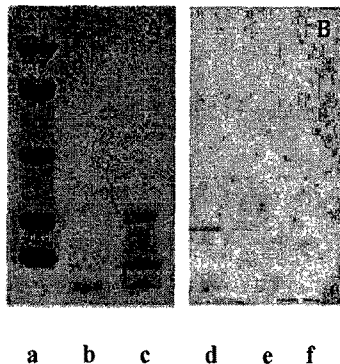


Fig. 1. SDS-PAGE(A) and Western blotting(B) analysis of the fractions.

lane a- Marker(Sigma, USA)

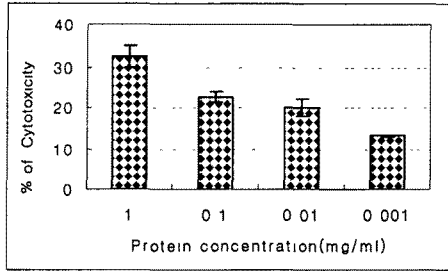
lane c- IGF-1 rich fraction(M.W.1-30kDa)

lane e- IGF-1 rich fraction(M.W. 1-30kDa)

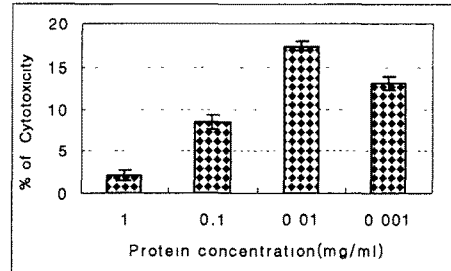
lane b- Standard IGF-1(R&D systems, USA)

lane d- Standard IGF-1(R&D systems, USA)

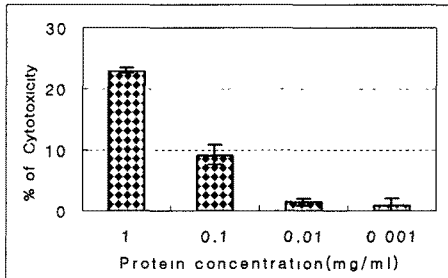
lane f- Bovine Serum Albumin



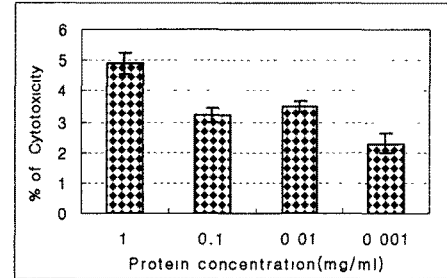
(A) A427



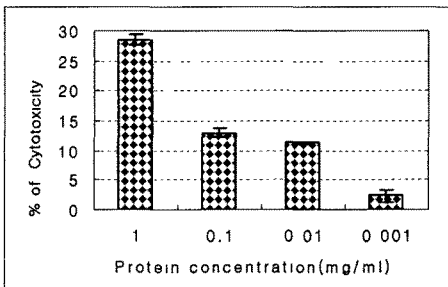
(B) SK-HEP-1



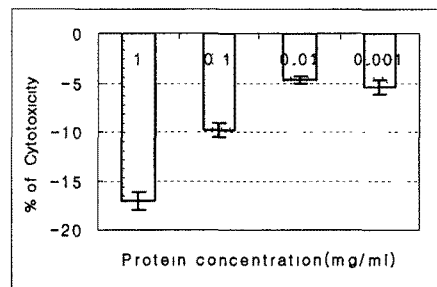
(C) A498



(D) HeLa



(E) WiDr



(F) SNU 16

Fig. 2. Cytotoxicity of cancer cells by IGF- I rich fraction.

자궁암세포인 HeLa cell은 1mg/ml는 약 5% 이하의 세포 증식 저해율을 나타내었으며 0.1~0.001 μ g/ml의 모든 농도에서 약 3% 이하의 암세포 성장 저해율을 보였다(Fig. 2(D)).

IGF-I rich fraction이 WiDr cell에 미치는 영향은 Fig. 2(E)와 같았다. IGF-I rich fraction의 1mg/ml 농도에서는 약 30%의 세포성장 저해율을 나타내었고, 0.1, 0.01 및 0.001 μ g/ml의 농도에서는 약 13%, 11%와 2%의 세포 성장 저해율을 나타내었다. Remacle-Bonnet 등⁽⁸⁾이 HT29-D-4(colon cancer) cell로 IGF-I의 세포에 미치는 영향을 실험한 결과, IGF-I 50ng/ml의 농도로 처리시 약 5%의 세포증식 저해율과, TNF- α 4ng/ml의 농도에서는 약 10%, IFN은 40ng/ml의 농도에서 약 84% 및 IGF과 IFN을 동시에 세포에 처리 시 약 30%의 세포 성장 저해율을 보고하였다. 이런 결과는 colon cancer cell을 IGF-I 단독

으로 처리 하였을 때보다 IFN과 함께 배양함으로써 세포성장 저해에 더 큰 효과를 가져왔으며, 본 실험에서 분획한 IGF-I rich fraction도 IFN과 함께 배양했을 때 암세포의 성장 저해에 synergy 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

위암 세포주인 SNU 16에 대해 IGF-I fraction의 영향은 Fig. 2(F)와 같았다. 1mg/ml과 0.1mg/ml의 농도에서 약 17%와 10%의 세포 증식을 보였고, 0.01~0.001 μ g/ml의 농도에서는 약 5% 이하의 세포 성장률을 나타내었다. 위암 발생원인은 아직 확실히 밝혀져 있지 않지만, 위암을 포함한 위장관 암에서는 세포의 성장이 제한되지 않은 상태인데 이때 여러 성장인자의 분비나 성장인자에 대한 반응에 이상이 있는 것으로 알려져 있다. Lee 등⁽⁹⁾의 실험결과에 의하면 SNU 638 cell line을 사용하여 IGF 50ng/ml의 농도를 처리했을 때 약 0.5배의 세포 증식율이 있다고 보고하였고, 이는 본 실험에서 얻은 결과와 같은 경향을 확인할 수 있었다. mitogenic effector인 IGF-I이 세포 표면에 있는 IGF-I receptor와 결합하여 tyrosin kinase를 활성화시킴으로서 나타난다고 Rajaram 등⁽¹⁰⁾이 보고한 결과와 같은 mechanism에 의한 것으로 생각되어진다.

요 약

IGF-I rich fraction 분리는 분만 후 24시간 이내에 착유한 젖소 초유를 30kDa과 1kDa Ultrafiltration(UF) membrane을 이용하여 분리하였다. 분리한 IGF-I rich fraction은 sandwich ELISA로 정량한 결과 1mg/ml 각 암세포에 미치는 영향을 실험하였다. 그 결과IGF-I rich fraction 1mg/ml의 농도로 처리하였을 때 A-427cell은 33%, SK-HEP-1 cell은 약 2%, A498 cell은 약 22%의 암세포 성장저해 효과를 보였고 HeLa는 약 5% 이하의 세포 증식 저해율과 WiDr cell은 약 30%의 세포성장 저해율을 나타내었으며, 유일하게 위암 세포주인 SNU 16에 대해서는 1mg/ml과 100 μ g/ml 및 10~1 μ g/ml의 농도에서 약 15%와 10% 및 약 5% 이하의 세포 증식율을 나타내었다.

참고문헌

1. Simmen, F. A. et al. (1988) *Dev. Biol.*, **130** : 16
2. Hossner, K. L. et al. (2000) *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **32**(3), 161.
3. Hossenlopp P., et al. (1986) *Anal. Biochem.*, **154**(1), 138.
4. Battelli M. G., et al. (1999) *Clinica Chimica Acta.*, **281**, 147.
5. Butler, J. E. et al. (1994) *Brussels: International Dairy Federation.*, 14
6. Kodama Y.,(2002) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **27**, 336.
7. Baserga R., et al. (1994) *Cell.*, **79**, 927.
8. Remacle-Bonnet M. M., et al. (2000) *Cancer Res.*, **60**, 2007.
9. Lee, D. Y. et al. (2001) *J. Korean Cancer Assoc.*, **33**(2), 121.
10. Rajaram, J. et al. (1997) *Endocr Rev.*, **18**, 801.