

초유에 함유되어 있는 면역조절물질인 MIEF가 B 세포의 분화에 미치는 영향

이종호 · 이종길* · 한성순
충북대학교 약학대학

(Received April 23, 1994)

Induction of B Lymphocyte Differentiation by a Colostral Immunomodulatory Protein MIEF

Jong Ho Lee, Chong Kil Lee* and Seong Sun Han
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheonju 360-763, Korea

Abstract—The levels of maternal immunity enhancing factor(MIEF), which is an immunomodulatory protein identified from bovine colostrum, were determined by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the colostrum and normal milk collected during the first two weeks of lactation. The mean concentration of MIEF in the colostrum of the first day of lactation was 109 µg/ml, and fell from the third day of lactation to 3~4 µg/ml. The molecular weight of the purified MIEF determined by reducing SDS-PAGE and TSK G2000SW column chromatography was 22,000 and 24,000 daltons, respectively, showing that MIEF is a monomeric peptide in its native form. To examine the capacity of MIEF to induce differentiation of B lymphocytes, human tonsillar lymphocytes were cultured in the presence of different concentrations of MIEF, and then antibody secreting cells were enumerated by enzyme-linked immunospot(ELISPOT) assay. When added to cultures of human tonsillar lymphocytes, MIEF induced differentiation of resting B lymphocyte to antibody secreting plasma cells as efficiently as LPS.

Keywords □ Colostrum, Maternal immunity enhancing factor(MIEF), Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), Enzyme-linked immunospot(ELISPOT) assay, B lymphocyte differentiation.

초유는 신생아의 발육에 필요한 각종 영양소는 물론이고 항체,¹⁻³⁾ lactoferrin,⁴⁾ lysozyme⁵⁾과 같은 수동면역성분 및 신생아의 성장을 촉진 시키는 epidermal growth factor,⁶⁾ insulin-like growth factor,^{7,8)} transforming growth factor⁹⁾ 등을 포함하고 있는 영양소 및 비 영양소의 이상적인 복합물인 것으로 보고되어 왔다. 초유에 함유되어 있는 각종 성분들 중에서도 수동면역성분은 면역능이 발달하지 못한 신생아에게 일시적 면역능을 부여하는데 아주 중요한 역할을 담당하는 것으로 잘 알려져 있다.¹⁻³⁾ 그런데, 초유에는 수동면역을 부여하는 성분들 뿐만이 아니라

면역 세포의 성장 및 분화를 조절하는 성분들도 포함되어 있음이 확인되고 있다.¹⁰⁻¹⁶⁾

1979년 Wiczorek 등은 면양의 초유로부터 주로 proline으로 구성되어 있는 폴리펩타이드(proline-rich polypeptide, PRP)를 분리하여 면역반응을 조절하는 작용을 갖고 있음을 밝혔다.¹⁰⁾ 이 PRP의 분자량은 약 6,000 dalton 이었으며,¹⁰⁾ 1983년 Staroscik 등은 분자량 6,000의 PRP를 chymotrypsin으로 절단하여 면역조절능을 갖고 있는 최소 단위 펩타이드인 nonapeptide를 분리하여 그 아미노산 서열을 밝혔다.¹¹⁾ PRP 및 nonapeptide가 면역계에 미치는 영향은 실험동물의 면역상태(immune status)에 따라 면역능을 증가 또는 억제하는 것으로 나타났다.¹¹⁾ 1988년

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

Julius 등은 면양의 초유에서 분리한 PRP가 휴면중인 B 세포 및 갓 태어난 생쥐에서 분리한 B세포의 성장 및 분화를 촉진시킨다는 것을 보고한 바 있다.¹²⁾

사람 모유의 casein을 trypsin으로 절단하여 얻은 펩타이드 단편들도 면역반응을 증가시키는 작용을 갖고 있음이 보고 되었다.¹³⁾ 1981년 Jolles 등은 casein을 trypsin으로 절단하여 얻은 펩타이드 단편들이 생쥐로 하여금 면양 적혈구에 대한 용혈성 항체의 생성을 촉진시키며, 복강 마크로파지의 탐식력을 증가시키는 작용을 갖고 있음을 보고 하였다.¹³⁾ 1984년 Parker 등은 casein으로 부터 얻은 펩타이드 단편들 중에서 면역조절능을 갖고 있는 최소 단위 펩타이드는 여섯개의 아미노산으로 구성된 hexapeptide 임을 보였으며, 인공적으로 합성한 hexapeptide도 시험관 내 및 실험동물에 투여시 면역 반응을 증가시키는 작용을 갖고 있음을 밝힌 바 있다.¹⁴⁾

저자 등은 소의 초유로부터 돼지 및 사람의 자연 살해세포의 기능을 활성화시켜 표적 암세포에 대한 자연살해능을 증가시키는 물질을 순수 분리하여 그 특성을 밝힌 바 있다.^{15,16)} 본 연구에서는 소의 초유에서 분리된 이 면역조절물질(이하 Maternal immunity enhancing factor, MIEF라 칭함)에 대한 항체를 이용하여 초유 및 정상 우유중 MIEF의 농도를 정량하였고, 비변성 조건하에서 MIEF의 분자량을 측정하였으며, MIEF가 사람의 편도선에서 분리한 B 세포의 분화에 미치는 영향에 대하여 연구검토 하였다.

실험방법

시료—본 연구에 사용된 초유 및 우유는 충북종축장에서 사육중인 젖소(호스타인)로부터 출산 직후 및 각 날짜별로 채취하여 -20°C 에 보관한 것을 사용하였다.

세포의 배양—림파구의 배양은 10%의 우혈청(Hyclone, USA), 2 mM의 glutamine(Sigma, USA), 100 units/ml의 penicillin 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 streptomycin(Sigma, USA)을 첨가한 RPMI-1640(Sigma, USA) 배지(이하 'RPMI-1640-완전배지'라 칭함)를 이용하여 37°C , 5% CO_2 조건하에서 배양하였다.

MIEF의 분리—MIEF는 이 등이 이미 보고한 방법에 의하여 분리 하였다.¹⁵⁾ 최종적으로 분리된 MIEF는 환원 조건의 Sodium dodecyl sulfate-po-

lyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 및 Silver staining 결과 분자량이 22,000 dalton인 단일 밴드로 확인 되었다.

항체의 생산 및 정제—MIEF에 대한 항체는 토끼를 이용하여 생산 하였다. 즉, MIEF 60 μg 을 Freund's complete adjuvants와 혼합하여 피하에 주사한 후, Freund's incomplete adjuvants와 혼합한 MIEF 120 μg 을 3일 간격으로 3번 더 피하에 주사하고, 항체를 생산한 것으로 확인된 토끼로부터 항혈청을 분리하였다.

항혈청중의 IgG의 분리는 protein A affinity column을 이용하였다.¹⁷⁾ 즉, 항혈청 20 ml을 0.01M Tris-Cl buffer(pH 8.0)로 미리 평형시킨 Protein A-Sepharose 4B column(bed volume 1 ml)에 부하한 후, 5 ml의 0.01M Tris-Cl buffer(pH 8.0)로 세척하고, Protein A-Sepharose 4B에 결합된 항체를 0.1M glycine(pH 3.0)용액으로 용출시켰다.

단백질의 정량—단백질의 정량에는 Bicinchoninic acid를 이용한 단백질 정량법이 이용되었다.¹⁸⁾ 즉 시료 20 μl 에 Bicinchoninic acid 시약(Pierce, USA) 1 ml을 가하여 60°C 에서 1시간 배양시킨 후 방냉시켜 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로서는 우혈청 albumin을 이용하였다.

분자량의 측정—비 변성 조건에서 MIEF의 분자량은 TSK G 2000SW column(300×7.5 mm) chromatography를 이용하여 측정하였다. 즉, 시료를 0.1M NaCl이 함유되어 있는 0.02M phosphate buffer에 용해시켜 500 μl 를 TSK G 2000SW column에 주입시키고 0.1M NaCl을 함유하는 0.02M Trisaminomethane buffer(pH 7.0)로 1 ml/min의 속도로 전개시켰다. 물질의 검출은 280 nm에서 실시하였다. 표준물질로서는 분자량이 66,000인 albumin, 29,000인 carbonic anhydrase, 12,400인 cytochrome C 등을 사용하였다.

MIEF의 정량—시료중 MIEF의 정량에는 indirect competitive ELISA assay법이 이용되었다.¹⁹⁾ 즉, 96-well microtiter plate(Immuno plate Maxisorp, Nunc, USA)의 각 well에 MIEF 용액(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 50 μl 를 가해 MIEF를 coating시킨 후 blocking buffer (0.17M H_3BO_3 , 0.12M NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% NaN_3 , 0.05% Tween 20, 0.25% BSA, pH 8.5)로 blocking시켰다. 각 well에 대하여 competitive inhibi

tor로 사용된 MIEF 용액 50 μ l, 생리식염수로 적절히 희석한 초유 또는 정상 우유의 유청 50 μ l 및 blocking buffer로 희석한 MIEF에 대한 항체 50 μ l씩을 가하고 상온에서 3시간 방치하였다. Blocking buffer로 세척한 후, alkaline phosphatase가 부착된 goat anti-rabbit IgG(Pierce, USA)를 1 : 1,000으로 희석하여 well당 50 μ l씩 가하고 37°C에서 2시간 방치하였다. Blocking buffer 및 최종적으로 PBS로 세척한 다음 기질인 p-nitrophenyl phosphate(PNPP, Sigma) 용액(3 mM PNPP, 0.05% Na₂CO₃, 0.05 mM MgCl₂) 75 μ l씩을 각각 가하고 37°C에서 발색 시켰으며, 1N NaOH 50 μ l씩을 가하여 반응을 종료시켰다. 발색 정도는 ELISA reader(Titertek Multiskan PLUS)를 이용하여 405 nm에서 측정하였다.

림파구의 분리—림파구는 30세 이하의 편도선 환자에서 절제한 편도선으로부터 분리하였다. 충북대학교 부속 병원으로부터 제공받은 편도선은 100 units/ml의 penicillin, 100 μ g/ml의 streptomycin 및 5 μ g/ml의 amphotericin B가 함유되어 있는 Phosphate-buffered saline(이하 solution A라 칭함)에 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 편도선을 세절한 후, 100 mesh의 wire mesh 상에서 분쇄하여 세포 현탁액을 얻어 solution A로 3회 세척하였다. 림파구의 분리는 Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation 방법을 이용하였다. Ficoll-Hypaque의 상단에 모인 림파구는 Balanced salt solution(BSS)로 3회 세척한 후 RPMI-1640-완전 배지에 현탁시켰다. 살아 있는 세포의 수는 trypan blue-dye exclusion 방법으로 측정하였다.

림파구의 자극—편도선에서 분리한 림파구를 24-well flat bottom plate의 각 well에 3×10⁶씩 가하고, MIEF를 10 또는 30 μ g/ml로 가한 후 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 음성 대조군은 시료 대신 RPMI-1640-완전 배지를 가한 것이며, 양성 대조군은 lipopolysaccharide(LPS)를 30 μ g/ml로 가한 것이 이용되었다. 림파구 배양액에는 배양 3일째 및 그 이후로는 2일 간격으로 feed mix를 각 well에 80 μ l씩 가하여 주었다. Feed mix는 Minimum essential medium 70 ml(Gibco, USA)에 우혈청 50 ml(Hyclone, USA), 100X-essential amino acid solution(Gibco, USA) 10 ml, 100X-nonessential amino acid solution(Gibco, USA) 5 ml, 200 mM glutamine 5 ml,

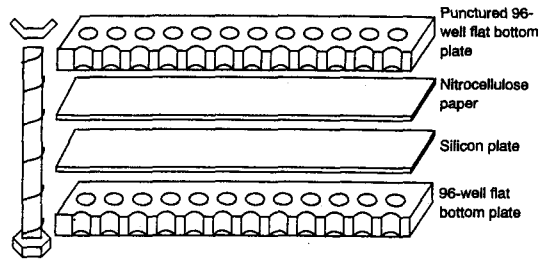


Fig. 1—Diagrammatic view of the ELISPOT apparatus.

dextrose 1 g, 7.5% NaHCO₃ solution 15 ml을 첨가한 것이다.

항체 생산 세포 수의 측정—항체를 생산하는 세포의 수는 Czerkinsky 등의 enzyme-linked immunospot(ELISPOT) assay 방법을 이용하여 측정하였다.²⁰⁾ ELISPOT assay를 위하여 저자 등이 사용한 기구는 Fig. 1에 모식적으로 보인 바와 같은 well을 관통시킨 두 개의 96-well microtiter plate 사이에 한 장의 nitrocellulose filter와 silicon 고무판을 끼워 고정시킨 것이다. Nitrocellulose paper를 갖고 있는 각 well에 0.75 μ g의 goat anti-human IgM(μ -chain specific, Sigma) 용액을 가해 coating시킨 후, 5% 우혈청을 함유하는 0.01M phosphate buffered saline(PBS)로 blocking 시킨 다음 자극시킨 림파구를 가하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 4시간 배양하였다. 배양 종료 후, 0.05% Tween 20을 함유하는 PBS(PBST)로 세척한 다음, 1% BSA를 포함하는 PBST용액을 이용하여 1 : 1000으로 희석한 biotin-conjugated anti-human immunoglobulins(Sigma, USA)를 well당 150 μ l씩 가하고 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. PBST로 세척하고, PBST로 1 : 2000으로 희석한 avidin-conjugated peroxidase(Sigma, USA)를 well당 150 μ l씩 가하고 상온에서 2시간 동안 방치하였다. PBST 및 최종적으로 PBS로 세척한 다음 기질인 2-amino-9-ethylcarbazole(AEC) 용액을 가하였다. AEC 용액은 AEC를 dimethylformamide에 0.125 mg/ml로 녹인 것 500 μ l에 30% H₂O₂ 5 μ l, acetate buffer(pH 5) 9.5 ml를 혼합한 것이며, 각 well에 150 μ l씩 가하고 30분간 발색시켰다. 증류수로 세척하여 발색을 중지시켰으며, 형성된 spot은 현미경을 이용하여 30배에서 계산하였다.

실험결과 및 고찰

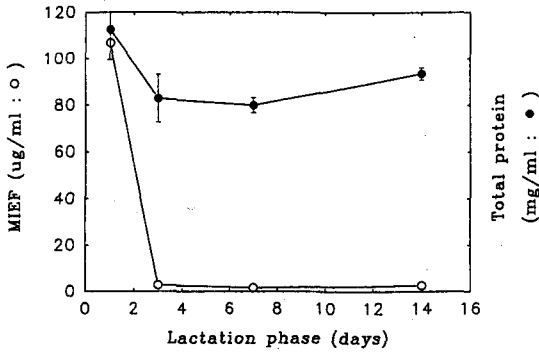


Fig. 2—Concentration of MIEF in colostrum and early milk. Colostrum or milk was collected on the indicated day of lactation from 5 different cows, and MIEF concentration was determined by indirect competitive ELISA.

MIEF의 정량—소의 초유에서 분리된 면역조절물질인 MIEF가 과연 초유에만 들어있는 것인지를 확인하기 위하여 MIEF에 대한 항체를 이용하여 초유 및 정상 우유중의 MIEF의 농도를 정량하였으며, 그 결과는 Fig. 2에 보인 바와 같다. Fig. 2에 보인 결과는 5마리의 암소로부터 출산후 날짜별로 채취한 초유 및 우유에 대하여 MIEF의 농도를 정량한 것이다. MIEF는 출산후 첫째날에 채취한 초유에 평균 109 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 함유되어 있었으며, 수유 3일째 및 그 이후에 채취한 우유에는 MIEF의 농도가 급격히 감소하여 3~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 함유되어 있음을 알 수 있었다.

MIEF의 분자량—비 변성 조건에서 MIEF의 분자량을 TSK G2000 SW column chromatography을 이용하여 측정된 결과는 Fig. 3에 보인 바와 같이 약 24,000 dalton인 것으로 나타났다. MIEF의 분자량을 환원 조건의 SDS-PAGE에서 측정해 본 결과는 22,000 dalton 이었다.¹⁵⁾ 이러한 결과로 부터 MIEF는 분자량이 22,000에서 24,000 dalton인 monomeric peptide임을 알 수 있었다.

MIEF의 독특한 물성은 37°C로 가온하면 침전되나 4°C로 냉각 시키면 다시 용해된다는 것이다.¹⁵⁾ 이러한 독특한 물성을 갖는 단백질이 몇 종 포유동물의 초유에서 확인 보고된 바 있으나, 저자 등이 분리한 MIEF와는 변성 및 비변성 조건에서의 분자량에서 분명히 다른 것으로 나타났다. 즉, Julius 등이 면양의 초유에서 분리한 것은 비 변성 조건에서는 분자량이 18,000 dalton이나 Sodium dodecyl sulfate(SDS)에

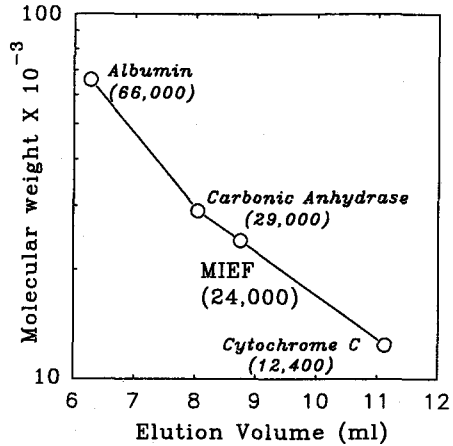


Fig. 3—Molecular weight of MIEF. Molecular weight was determined by TSK G 2000SW column chromatography.

의해서 6,000 dalton의 peptide 3개로 분리되며,²⁰⁾ Seto 등이 소의 초유에서 분리한 것은 비 변성 조건에서는 60,000 dalton이나 SDS에 의하여 19,000 및 10,000 dalton으로 분리 된다고 보고 하였다.²¹⁾ 저자 등이 분리한 MIEF와 Seto 등이 보고한 60,000 dalton의 peptide와의 관계는 앞으로 더 규명되어야 할 것이다.

MIEF에 의한 B 세포의 분화—MIEF가 B 세포의 분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 저자 등은 well을 관통시킨 두 개의 96-well microtiter plate 사이에 한장의 nitrocellulose paper와 silicon 고무판을 끼워 고정시킨 장치를 고안하여 사용하였다. 이 장치는 nitrocellulose paper만 교체하면 재 사용이 가능하므로 값이 매우 저렴하고, 항체를 생산하는 B 세포의 수를 측정하기 위하여 개발되어 있는 기존의 Plaque forming cell assay방법²²⁾에 비교하여 림프구 배양액 중에 생성되어진 항체의 양을 정량할 수 있으며 nitrocellulose에 coating 시키는 항체를 조절함으로써 특정 isotype의 항체를 생산하는 B 세포만을 선택적으로 측정할 수 있는 장점을 갖고 있다. 저자 등이 고안한 장치를 사용하여 enzyme-linked immunospot(ELISPOT) assay를 실시한 결과 나타나는 spot의 모양은 Fig. 4에 보인 바와 같다.

MIEF가 B 세포의 분화에 미치는 영향을 사람 편도선에서 분리한 림프구에 대하여 조사한 결과는 Fig. 5에 보인 바와 같다. Fig. 5에 보인 것은 nitroce-

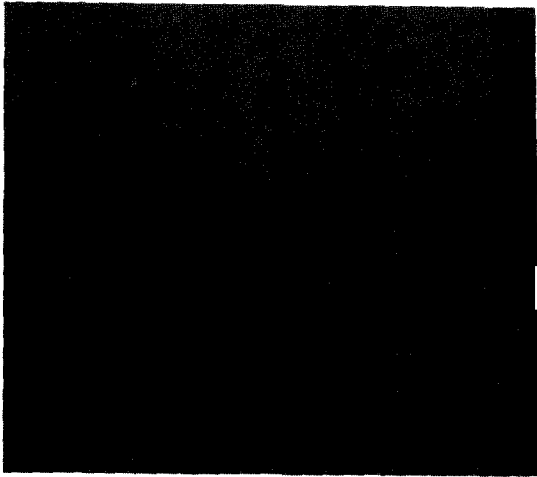


Fig. 4—Typical spots from the ELISPOT assay. The spots were readily countable at 30X magnification.

llulose paper에 μ -chain에 specific한 anti-IgM 항체를 coating 시킴으로서 IgM을 생산하는 B 세포의 수를 측정하여 보인 것이다. MIEF는 휴면중인 B 세포로 하여금 항체를 생산하는 plasma cell로의 분화를 촉진시켰으며, MIEF에 의한 B 세포 분화의 유도는 배양액에 가해진 MIEF의 농도 및 배양기간이 증가할수록 증가하는 것으로 나타났다. MIEF를 30 μ g/ml로 첨가한 경우 MIEF에 의한 B 세포 분화 촉진 효과는 양성 대조군으로 사용한 lipopolysaccharide(30 μ g/ml)에 의한 B 세포 분화 촉진 효과와 근소한 차이를 보일 정도로서 MIEF의 활성이 강한 것으로 나타났다.

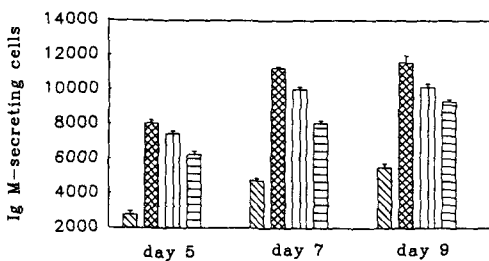


Fig. 5—Induction of B cell differentiation by MIEF, Human tonsilar lymphocytes(1×10^6 cells/ml) were cultures with no stimulus, 30 μ g/ml of LPS, 30 μ g/ml of MIEF, or 10 μ g/ml of MIER for the indicated period of days, and then IgM-secreting cells were enumerated by ELISPOT assav.

MIEF를 10 μ g/ml로 가한 경우에도 MIEF에 의한 B 세포 분화 촉진 효과를 확인할 수 있었으며 배양기간이 증가함에 따라서 항체를 생성하는 세포의 수가 많아지는 것으로 나타났다. 배양 기간이 증가함에 따라서 항체를 생산하는 세포의 수가 점차 증가되는 경향은 음성 대조군에서도 나타났데, 이러한 효과는 배양액에 첨가된 우혈청 등에 함유되어 있는 LPS 및 기타 비특이적으로 면역세포를 자극하는 물질들에 의한 작용인 것으로 생각된다. MIEF에 의한 B 세포 분화의 유도가 MIEF의 B 세포에 대한 직접적인 작용에 의한 것인지 아니면 항원전달세포나 T 세포를 자극함으로써 생성된 사이토카인에 의한 작용인지는 앞으로 규명되어야 할 것이다.

초유로부터 얻는 가장 큰 혜택중의 하나는 면역계가 발달하지 못한 신생아에게 일시적 수동면역을 부여하는 모체의 항체가 전달된다는 것이다.¹⁻³ 특히, 모체의 항체를 주로 초유를 통해서만 공급받는 동물인 소, 돼지, 말, 염소, 면양의 경우에는 초유를 먹지 않은 신생동물은 살아 남을 수 없을만큼 초유를 통해서 전달받는 모체의 항체가 중요하다. 그런데, 초유는 일시적 수동면역능을 부여하는 역할 외에도 신생아 면역계의 발달에 중요한 영향을 미치는 것으로 보인다.

초유가 신생동물의 면역계의 발달에 미치는 영향에 관한 연구에서 Kim 등은 초유를 먹이지 아니하고 무균적으로 키운 새끼 돼지는 혈중 항체가 전혀 없으며, 항체를 생산하는 세포, 자연살해세포, K 세포 등의 면역능이 전혀 없으나 초유를 먹임으로서 수일 내에 혈중 항체의 양이 정상 새끼돼지의 수준에 이르며, 각종 면역세포의 기능이 정상 새끼 돼지와 같은 정도로 활성화됨을 보고한 바 있다.²³⁻²⁴ 이러한 현상은 초유에 함유되어 있는 모체의 항체가 그대로 흡수되어 새끼 돼지의 혈중에 존재하면서 다른 한편으로는 항원으로서 일련의 anti-idiotypic network 반응을 불러 일으킨 결과일 것으로 설명 되었다.²³⁻²⁵

본 연구에서 저자 등은 초유에 함유되어 있는 면역조절물질인 MIEF가 B 세포의 분화를 강력히 촉진시킴을 보였다. 저자 등은 또한 MIEF가 자연살해세포의 기능을 활성화 시킴을 이미 보고한 바 있다.¹⁵ 초유에는 MIEF 외에도 면역세포의 분화 및 기능을 활성화 시키는 성분들이 함유되어 있다는 사실이 여러 연구자들에 의해서 이미 보고된 바 있다.¹⁰⁻¹⁴ 이러한

결과는 일부 포유동물의 초유에는 모체의 항체와 같이 일시적 수동면역을 부여하는 성분들 뿐만이 아니라 능동적으로 작용하여 신생아 면역계의 발달을 도와 주는 면역조절성분들도 함유되어 있음을 보여 주는 것이다. 모체의 항체를 태반을 통하여 전달 받는 사람의 초유에도 면양이나 소의 초유에서 발견된 것과 같은면역조절 물질이 함유되어 있는지는 앞으로 더 규명해야할 것이다.

결 론

소의 초유에서 분리된 면역조절물질인 MIEF는 수유 첫째날의 초유에 평균 109 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 함유되어 있었으며, 수유 3일째 및 그 이후의 우유에는 농도가 급격히 감소하여 3~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 함유되어 있었다. MIEF의 분자량을 환원 조건의 SDS-PAGE 및 TSK G 2000 SW column chromatography를 이용하여 측정된 결과 22,000 및 24,000 dalton인 것으로 나타나 MIEF는 monomeric peptide임을 알 수 있었다. MIEF가 B 세포의 분화에 미치는 영향을 사람 편도선에서 분리한 림파구에 대하여 enzyme-linked immunospot(ELISPOT) assay로 조사한 결과 MIEF는 휴면중인 B 세포로 하여금 항체를 생산하는 plasma cell로의 분화를 촉진시켰으며, MIEF에 의한 B 세포 분화의 유도는 배양액에 첨가한 MIEF의 농도 및 배양기간이 증가할수록 증가하는 것으로 나타났다. MIEF의 B 세포에 대한 분화촉진 효과는 양성 대조군으로 사용한 lipopolysaccharide(LPS)와 근소한 차이를 나타낼 정도로서 그 활성이 매우 큰 것으로 나타났다.

감사의 말씀

본 연구에 사용된 편도선은 충북대학교 부속 병원에서 절제한 환자의 것이며, 편도선의 일부를 분양 받을 수 있도록 협조하여 주신 신시욱 교수님께 감사드립니다. 분자량 측정을 도와 주신 서울대학교 천연물과학연구소의 김영식 교수님께 감사드립니다. 본 연구는 파스퇴르 유업(주)의 연구비에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Ogra, S. S. and Ogra, S. S.: Immunological aspects of human colostrum and milk. *J. Pediatr.* **92**, 546 (1978).
- Goldman, A. S., Garza, C., Nichols, B. L., and Goldblum, R. M.: Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. *J. Pediatr.* **100**, 563 (1982).
- Loneerdal, B.: Biochemistry and physiological function of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **42**, 1299 (1985).
- Arnold, R. R., Cole, M. F., and McGhee, J. R.: A bactericidal effect for human milk lactoferrin. *Science* **197**, 263 (1977).
- Parry, R. M., Chandan, R. C., and Shahani, K. M.: Isolation and characterization of human milk lysozyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 59 (1960).
- Carpenter, G.: Epidermal growth factor is a major growth promoting agent in human milk. *Science* **210**, 198 (1980).
- Baxter, R. C., Zaltsman, Z., and Turtle, J. R.: Immunoreactive somatomedin-C/insulin-like growth factor I and its binding protein in human milk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **58**, 955 (1984).
- Donovan, S. M., Hintz, R. L., Wilson, D. M., and Rosenfeld, R. G.: Insulin-like growth factor I and II and their binding proteins in rat milk. *Pediatr. Res.* **29**, 50 (1991).
- Noda, K., Umeda, M., and Ono, T.: Transforming growth factor activity in human colostrum. *Gann.* **75**, 109 (1984).
- Wieczorek, Z., Zimecki, M., Janusz, M., Staroscik, K., and Lisowski, J.: Proline-rich polypeptide from ovine colostrum: its effect on skin permeability and on the immune response. *Biol. Chem.* **36**, 875 (1979).
- Staroscik, K., Janusz, M., Zimecki, M., Wieczorek, Z., and Lisowski, J.: Immunological active mono-peptide fragment of a proline-rich polypeptide from ovine colostrum: amino acid sequence and immunoregulatory properties. *Molec. Immun.* **20**, 1277 (1983).
- Julius, M. H., Janusz, M., and Lisowski, J.: A colostrum protein that induces the growth and differentiation of resting lymphocytes. *J. Immunol.* **140**,

- 1366 (1988).
- 13) Jolles, P., Parker, F., Floch, F., Migliore, D., Alliel, P., Zerial, A., and Warner, G. H.: Immunostimulating substances from human casein. *J. Immunopharmac.* **3**, 363 (1982).
 - 14) Parker, F., Migliore-Samour, D., Floch, F., Zerial, A., Werner, G., Jolles, J., Casaretto, M., Zahn, H., and Jolles, P.: Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence, synthesis and biological properties. *Eur. J. Biochem.* **145**, 677 (1984).
 - 15) Lee, C. K., Lee, J. H., and Han, S. S.: Isolation and characterization of an immunomodulatory protein bovine colostrum. *Arch. Pharm. Res.* **16**, 140 (1993).
 - 16) Lee, J. H., Han, S. S., Lee, C. K.: Augmentation of human NK cell activity by the colostrum immunomodulatory protein MIEF isolated from bovine colostrum. *Chungbuk J. Pharm. Sci.* **8**, 31 (1993).
 - 17) Ey, P. L., Prowse, S. J., and Jenkin, C. R.: Isolation of pure IgG1, IgG2a, and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Biochemistry* **15**, 429 (1978).
 - 18) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C.: Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76 (1985).
 - 19) Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., and Strober, W.: *Current protocols in immunology*. John Wiley and Sons, Inc, p. 2.1.1 (1991).
 - 20) Czerkinsky, C., Nilsson, L. A., Nygren, H., Ouchterlony, O., and Tarkowski, A.: A solid-phase enzyme-linked immunospot(ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods.* **65**, 109 (1983).
 - 21) Seto, A., Okabe, T., and Ito, Y.: A new protein with a particular thermoprecipitability in bovine milk. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **150**, 446 (1975).
 - 22) Cunningham, A. J. and Szenberg, A.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody detecting cells. *Immunology* **14**, 599 (1968).
 - 23) Kim, Y. B.: Developmental immunity in the piglets. *Original Article Series.* **11**, 549 (1975).
 - 24) Kim, Y. B., and Ichimura, M. S.: Porcine natural killer(NK)/killer(K) cell system. In Tumbleson, M. F.(Ed), *Swine in Biomedical Research*. Voi III, Plenum Press, New York. pp. 1811 (1986).
 - 25) Jerne, N. K.: Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.* **125**, 373 (1974).