



몽고 마유에 함유된 사이토카인에 관한 연구

신무호 · 남명수* · 배형철 · 아말사나 룡산돌주¹ · 알탄체체그 미시그¹ · 윤도영²
충남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부, ¹몽고모넨자임생명공학연구소,
²한국생명공학연구원 세포생물학연구실

A Study on Cytokines in the Mongolia Mare's Milk

Mou-Ho Shin, Myoung-Soo Nam*, Amarsanaa Luvsandorj¹,
Altantsetseg Mishig¹ and Do-Young Yoon²
Lab. of Milk Food Biochemistry, Chungnam National University,
¹*MONENZYME Institute of Biotechnology, Ulaanbaatar, Mongolia,*
²*Lab. of Cell Biology, KRIBB*

Abstract

This study was carried out to detect the pro-inflammatory cytokines(IL-1, IL-6, TNF- α , IL-18) and IL-1 receptor accessory in mongolia mare's milk by western blotting. IL-1 and TNF- α were detected in 4 samples of mare's milk. Proteins of 6 kD and 7 kD were bound to specific antibody against hIL-18. But, IL-1 and TNF- α were not detectable in Difco skim milk. IL-6 like factor of 60 kD was detected in both Difco skim milk and mare's milk. Also, IL-1 receptor accessory of 55 kD was detected in the mongolia mare's milk.

Key words : mongolia mare's milk, cytokine, western blotting

서 론

마유는 우유와 비교해 볼 때 다른 점이 많다. 유색이 투명하고, 연한 회색을 띠고 있으며, 맛이 달콤하다(Bell et al., 1981). 이는 높은 유당 함량과 낮은 casein 함량 때문이다. 또한 마유의 일반성분은 낮은 지방함량을 제외하고는 우유보다는 인유에 훨씬 더 가깝다. 그래서 낮은 질소함량과 미네랄 함량, 높은 유당 함량은 이유식으로 이용하기에 적당하다고 볼 수 있다. 낮은 질소 함량과 미네랄 함량은 어린이들의 신체 기능상에 좋은 영향을 줄 수 있다. 높은 유당 함량은 galactose를 공급해 주어 신경체계의 발달에 중요한 역할을 해준다. 또한 낮은 지방함량과 저 칼로리는 다이어트 식품으로 이용하기에 좋다. 지방구의 평균지름은 2~3 μm 이다 (Doreau and Boulot., 1989; Welsch et al., 1988). 마유에는 포

화지방산 함량이 낮으며, 불포화지방산의 함량은 높은 편이다. 이것은 인유와 유사한 특징이나, 우유와는 반대의 특징이다 (Cogourdant and Drogoul, 1988). 마유는 casein과 whey protein의 비율도 인유와 유사하다(Welsch et al., 1988). 이것은 소화 에 매우 중요한 역할을 한다. 우유에서의 높은 casein함량은 위내에서 단단한 응고물로 존재하는데 이를 소화시키기에는 3~5시간 걸린다. 그러나 인유와 마유는 2시간 정도면 소화시켜 배설시킬 수 있다(Kalliala et al., 1951). 이러한 관점에서 볼 때 마유를 이유식으로 이용하기에도 적합하다고 할 수 있다. 그리고, 소량 함유되어 있는 Ca/P의 비율이 인유와 같은 2:1의 비율을 가지고 있다는 점이다. 또한 비타민 C가 많이 함유되어 있는 것도 특징이다(Servetnik and Maltseva, 1981).

마유는 유럽과 아시아, 서유럽에 위치한 나라에서 많이 이용되고 있다. 몽고지방에선 그들만의 독특한 마유주를 만들어 먹었으며, 의약품으로도 많이 이용되어 왔다. 특히 식이 요법 식품으로 많이 이용되었던 마유는 위 치료제로써, 그리고 간, 암 환자들, 결핵환자들의 치료제로써 많이 알려져 있다. 소련의 남쪽지방 사랍들, 마유나 Koumiss를 발효시켜 섭취

*Corresponding author : Myoung-Soo Nam, Lab. of Milk Food Biochemistry, Division of Animal Science & Resources, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea. Tel: 82-42-821-5782, Fax: 82-42-823-2766, E-mail: namsoo@cnu.ac.kr

취하는 지역의 사람들, 그리고 일반적으로 마유를 많이 이용하여 생활하고 있는 곳에서 공통적으로 폐, 위장 계통에서 발생하는 암 발병율이 매우 낮게 나타났다(Solaroli, 1992). 또한, 병원에서는 수술중인 환자들이나, 조산한 아기들에게 마유가 쓰이고 있다(Cogourdant and Drogoul, 1988). 그리고, 저칼로리로서 다이어트에 좋으며, 피부나 머리결을 건강하게 해준다고 보고되었다. 소련의 만성위궤양, 결핵감염환자들이 치료를 위하여 요양중인 약 11,000명의 환자들을 대상으로 Koumiss를 섭취시킨 결과 마유가 인체에 이롭다는 것을 확인할 수 있었다(Nassal and Rembalski, 1980; Cogourdant and Drogoul, 1988). 앞으로 마유가 미용으로, 약국에서의 약제로, 뿐만 아니라 다이어트식품으로 이용될 것이다(Drogoul and Monotenot, 1990).

본 연구는 예로부터 마유를 치료제로 이용하려는 것에 착안하여 마유 성분이 면역세포 유도로 특히 염증 반응과 관련이 있는 cytokine 즉, hTNF- α , hIL- β , hIL-18, hIL-1Ra, hIL-6 및 IL-1 receptor accessory와의 관련성을 중심으로 연구를 수행한 것으로 마유의 생리활성 물질을 탐색하는 기초 자료를 얻고자 실행하였다.

재료 및 방법

몽고 마유의 화학적 조성

몽고 마유는 몽고의 Monenzyme사로부터 전지분무건조, 전지동결건조, 탈지분무건조 및 탈지동결건조로 제조된 마유를 제공받아서 실험을 수행하였고, 몽고 마유의 화학적 성분분석 결과도 Monenzyme사로부터 제공받았다.

몽고마유의 전기영동

Laemmli(1970)의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)방법으로 마유를 전기영동하였다.

Western blotting

Burnette(1981)와 Towin 등(1979)의 방법을 이용하여 12.5% SDS-PAGE를 수행한 gel을 메탄올에 침지시킨 nitrocellulose membrane에 밀착시킨 후 4°C에서 200 mA로 2시간 동안 이동시켰다. membrane에 blocking solution으로 3% bovine serum albumin(BSA)에 침지시킨 다음 0.05% Tween 20이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척 후 탐색하고자 하는 cytokine의 항체를 1% BSA가 포함된 PBS solution에 1:1,000으로 희석하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 phosphate buffered saline Tween-20(PBST)로 씻어내고, 2차 항체와 반응시킨 다음 alkaline phosphate buffer용액 10 mL에 발색시약인 nitroblue tetrazolium chloride

(NBT) 66 μ L : 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt (BCIP) 33 μ L을 혼합하여 약 30분 정도 반응시킨 후 증류수로 세척하고 건조시켰다. 각 cytokine의 항체는 hTNF- α , hIL- β , hIL-18, hIL-1Ra 및 hIL-6 항체로 R&D(Minneapolis, MN, USA)사에서 구입하였고 IL-1 receptor accessory 항체인 anti-pep3는 Yoon와 Dinarello(1998)이 제작한 것을 사용하였다.

결과 및 고찰

몽고 마유의 화학적 조성

몽고 마유의 일반적인 화학적 조성분은 Table 1에서 보는 바와 같이 우유의 조성분과 비교하여 보면 유당 함량이 높으며, 지방 함량이 낮은 것이 특징이다. 마유의 일반성분이 우유보다 인유에 훨씬 가깝다고 밝힌 Pitruzzella(1990)의 보고와 유사함을 보여주고 있다. Table 2는 몽고 마유의 화학적 조성분을 전지분무건조, 전지동결건조, 탈지분무건조, 탈지동결건조의 4군으로 나누어 나타낸 것이다. 전지분무건조 마유와 전지동결건조 마유의 지방 함량이 각각 26.40%와 31.17%이고 탈지분무건조 마유와 탈지동결건조 마유의 지방 함량은 각각 2.10%와 1.23%이다. 그리고 유당 함량은 탈지분무건조 마유와 탈지동결건조 마유는 각각 70.56%와 76.42%로 높고, 전지분무건조 마유와 전지동결건조 마유는 각각 47.87%와 45.33%로 나타났다.

몽고 마유에 함유된 Pro-Inflammatory Cytokines의 탐색

Table 1. Chemical composition of Mongolia mare's milk (%)

Sample	Moisture	Protein	Ash	Fat	Lactose
Mare's milk	89.37	2.00	0.27	1.85	6.51

Table 2. Chemical composition of spray dried skim mare's milk, freeze dried skim mare's milk, spray dried mare's milk and freeze dried mare's milk (%)

Samples	Moisture	Protein	Ash	Fat	Lactose
Spray dried of skim mare's milk	3.12	20.81	3.41	2.10	70.56
Freeze dried of skim mare's milk	3.37	15.08	3.90	1.23	76.42
Spray dried of whole mare's milk	4.53	18.22	2.98	26.40	47.87
Freeze dried of whole mare's milk	3.58	17.22	2.70	31.17	45.33

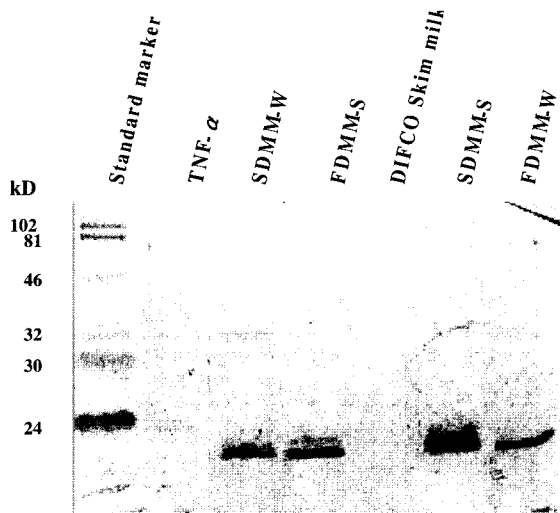


Fig. 1. Western blotting of dried mare's milk with anti TNF- α antibody. The analysis was performed as described in the experimental section. The membrane was incubated with rabbit anti hTNF- α antibody. The bound antibody was detected by the addition of alkaline phosphatase-conjugated anti rabbit-IgG.

SDMM-S : spray dried skim mare's milk
 FDMM-S : freeze dried skim mare's milk
 SDMM-W : spray dried whole mare's milk
 FDMM-W : freeze dried whole mare's milk

1) TNF- α (Tumour necrosis factor- α)의 확인

TNF- α 는 단핵구, 대식세포, T세포, B세포, NK세포 등에서 endotoxin의 자극에 의해 분비되는 물질로 157개의 아미노산으로 구성되어 있는 분자량 17 kD의 단백질이다. 몽고 마유에서 TNF- α 를 탐색하기 위하여 실험한 결과는 Fig. 1에 나타나 있다. 4종류의 건조 마유 모두에서 17 kD에서 확인할 수 있었다. 그러나, 탈지분유(Difco)에서는 확인할 수 없었다. 이 실험으로 마유에서는 TNF- α 가 함유되어 있음을 확인하였지만, 탈지분유(Difco)는 함유되어 있지 않음을 확인하였다. 이와 같은 결과는 탈지분유를 초유가 아닌 정상유로 제조하였기 때문에 초유보다는 사이토카인의 함유량이 현저히 적어서 측정이 불가능한 것으로 생각된다. 우유초유에서 TNF- α 를 확인한(Katsuro 등, 2000)의 실험결과와는 차이가 있었다. 그리고 Rudloff 등(1992)은 모유초유에서도 TNF- α 를 확인하였다.

2) IL-1 β (Interleukin-1 β)의 확인

IL-1 β 는 활성화된 단핵구로부터 분비되는 분자량 17 kD의 단백질이다. IL-1 β 를 몽고 마유에서 탐색하기 위하여 실험한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 전지분무건조 마유, 전지냉동건조 마유, 탈지분무건조 마유 및 탈지냉동건조 마유는

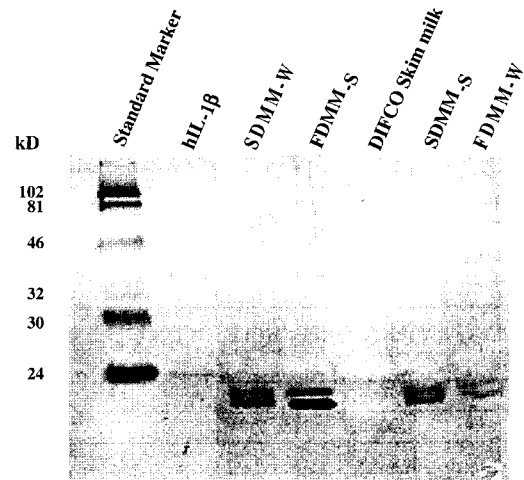


Fig. 2. Western blotting of dried mare's milk with anti hIL-1 β antibody. The analysis was performed as described in the experimental section. The membrane was incubated with mouse anti hIL-1 β antibody. The bound antibody was detected by the addition of alkaline phosphatase conjugated anti mouse-IgG.

SDMM-S : spray dried skim mare's milk
 FDMM-S : freeze dried skim mare's milk
 SDMM-W : spray dried whole mare's milk
 FDMM-W : freeze dried whole mare's milk

17 kD에서 확인할 수 있었다. 그러나, 탈지분유(Difco)에서는 확인할 수 없었다. Soder(1987)는 모유초유에서 hIL-1 β 가 함유되어 있음을 확인하였다. Katsuro 등(2000)은 같은 암소에서 생성되는 우유의 초유와 일주일이 지난 상유에서 IL-1 β 존재의 차이를 보여주었고 초유에서는 확인되었지만, 상유에서는 함유하지 않음을 확인하였다.

3) IL-18(Interleukin-18)의 확인

IL-18을 몽고 마유에서 탐색하기 위하여 실험한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 6~7 kD에서 확인할 수 있는 밴드를 나타낸 탈지냉동건조 마유를 제외한 전지냉동건조 마유, 탈지분무건조 마유 및 전지분무건조 마유에서는 희미한 밴드를 나타내었다. 그러나 탈지분유(Difco)에서는 확인할 수 없었다. Yasushi 등(2001)은 모유초유에서 hIL-18을 확인하였다.

4) IL-6(Interleukin-6)의 확인

IL-6는 단핵구, 섬유아세포, 혈관내피세포 등에서 합성되어지는 분자량 26 kD의 단백질이다. IL-6를 몽고 마유에서 탐색하기 위하여 실험한 결과는 Fig. 4와 같다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 모든 시료에서 IL-6를 확인할 수 있었다. Saito

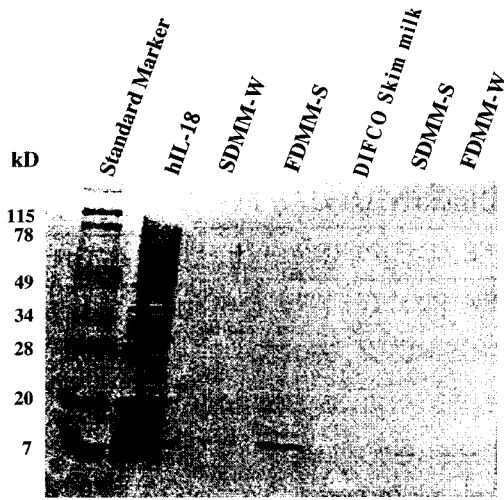


Fig. 3. Western blotting of dried mare's milk with anti hIL-18 antibody. The analysis was performed as described in the experimental section. The membrane was incubated with mouse anti hIL-18 antibody. The bound antibody was detected by the addition of alkaline phosphatase conjugated anti mouse-IgG.

SDMM-S : spray dried skim mare's milk
 FDMM-S : freeze dried skim mare's milk
 SDMM-W : spray dried whole mare's milk
 FDMM-W : freeze dried whole mare's milk

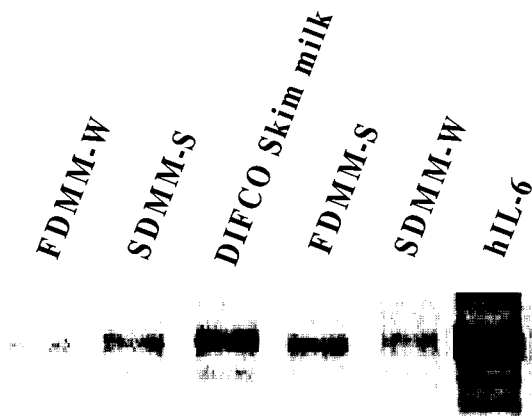


Fig. 4. Western blotting of dried mare's milk with hIL-6 antibody. The analysis was performed as described in the experimental section. The membrane was blocked with BSA and incubated with rabbit anti hIL-6 antibody. The bound antibody was detected by the addition of alkaline phosphatase conjugated anti rabbit-IgG.

SDMM-S : spray dried skim mare's milk
 FDMM-S : freeze dried skim mare's milk
 SDMM-W : spray dried whole mare's milk
 FDMM-W : freeze dried whole mare's milk

등(1991)은 모유에서 hIL-6를 확인하였고, Katsuro 등(2000)

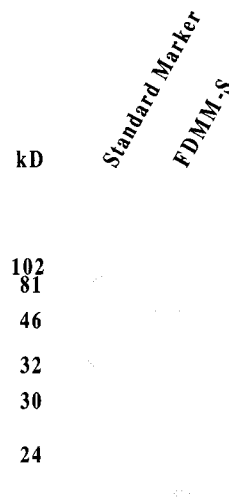


Fig. 5. Western blotting of freeze dried skim mare's milk with IL-1 receptor accessory antibody. The analysis was performed as described in the experimental section. The membrane was incubated with anti pep-3 (IL-1 receptor accessory antibody) antibody. The bound antibody was detected by addition of alkaline phosphatase conjugated rabbit-IgG.

FDMM-S : freeze dried skim mare's milk

이 젖소 초유에서 IL-6를 확인하였다.

5) IL-1 Receptor Accessory의 확인

냉동건조 탈지마유를 전기영동하여 Western blotting한 다음 IL-1 receptor accessory 항체인 anti-pep3를 사용한 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 탈지냉동건조 마유에서 IL-1 receptor accessory가 분자량 약 55 kD의 물질이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구는 몽고 마유에서 pro-inflammatory cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-18)과 IL-1 receptor accessory를 Western blotting 방법으로 확인하여 기능성 식품과 의약품 소재로 이용하기 위한 기초 자료를 얻고자 실시하였다. 몽고 마유의 4 개군 모두에서 IL-1, TNF- α 가 17 kD에서 확인되었다. IL-18은 6~7 kD에서 확인할 수 있었다. 그리고, IL-1 receptor accessory를 55 kD에서 확인하였다. 그러나 탈지분유(Difco)에서는 IL-1 β , TNF- α 를 확인할 수 없었으나, IL-6는 탈지분유(Difco) 및 몽고 마유에서 모두 60 kD에서 확인하였다. 이와 같이 몽고 마유는 다양한 cytokine을 함유하고 있어서 기능성 식품 및 의약품 소재로 이용가치가 있다고 사료된다.

참고문헌

1. Bell, K., Mckenzie, H. A., Muller, V., and Rogers, C. (1981) Equine whey proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* **68B**, 225-231.
2. Burnette, W. H. (1981) Western blotting. *Anal. Biochem.* **112**, 195-202.
3. Cogourdant, B. and Drogoul, C. (1988) Projet de l'EA RL des Monts Feuillets Met tre en place une jumenterie laitier avec commercialisation de produits a base de lait de jument: lait de jument fermente et produits cosmetiques", Corcelles les Monts, Dijon, France. 123-129.
4. Doreau, M. and Boulot, S. (1989) Methods of measurement of milk yield and composition in nursing mares. *Lait.* **69**, 159-166.
5. Drogoul, C. and Monotenot, C. (1990) Document d'information CE, Direction Generale VI, n. FRA1201348, "Diversification des productions agricoles par la valorisation du lait et du colostrum des juments de races lourdes dans le but de sauvegarder ces races de chevaux", pp.63-90.
6. Kalliala, H., Selesté, E., and Hallman, N. (1951) On the use of mare's milk in infant feeding. *Acta Paediatrica* **40**, 94-102.
7. Katsuro, H., Satoshi, K., Hitoki, Y., Rikio, K., and Hiroshi, I. (2000) Detection of cytokines in bovine colostrum. *Ver. Immunol.* **76**, 183-190.
8. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-688.
9. Nassal, J. and Rembalski, C. (1980) Hygienische Forderungen bei der Produktion von Stutenmilch und Kумыß. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **31**(6), 209-216.
10. Pitruzzella, E. (1990) "L'Alimentazione nel bambino Sano e Malato" 1st ed., Medical books. Palermo, Italy, pp. 131-140.
11. Rudloff, H. E., Schmalstieg, F. C., Mushtaha, A. A., Palkowetz, K. H., Liu, S. K., and Goldman, A. S. (1992) Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in human milk. *Pediatr. Res.* **31**, 29-33.
12. Saito, S., Maruyama, M., Kato, Y., Moriyama, I., and Ichijo, M. (1991) Detection of IL-6 in human milk and its involvement in IgA production. *J. Reprod. Immunol.* **20**, 267-276.
13. Servetnik-Chalaya, G., and Maltseva, L. (1981) Characteristics of the vitamin composition of mare's milk and koumiss depending on the season. *Vopr. Pitan.* **4**, 46-53.
14. Soder, O. (1987) Isolation of interleukin-1 from human milk. *J. Appl. Immunol.* **83**, 19-23.
15. Solaroli, G. (1992) Caratterizzazione chimico-fisica e valutazione della resistenza termica del latte di cavalla. Ph.D. Thesis, Univ. of Milan, Italy, pp. 13-27.
16. Towin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350-4356.
17. Welsch, U., Buchheim, W., Schumacher, U., Schinko, I., and Patton, S. (1988) Structural histochemical and biochemical observation on horse milk fat globule membranes and casein micelles. *Histochemistry* **88**, 357-365.
18. Yasushi, T., Hidetoshi, T., Akihiko, N., Koichi, O., Hideki, N., Tomoteru, T., Hito, N., and Toshiro, H. (2001) Interleukin-18 in human milk. *Pediatric Res.* **50**, 268-272.
19. Yoon, D. Y. and Dinarello, C. A. (1998) Antibodies to domain II and III of the IL-1R accessory protein inhibit IL-1 β activity but not binding: Regulation of IL-1 responses is via IL-1RI but not IL-1RAcP. *J. Immunol.* **160**, 3170-3179.

(2003. 1. 24 접수 ; 2003. 3. 3 채택)