

# Lactoferrin이 설사병 유발 Bovine Rotavirus 국내분리주의 MA104 세포 감염에 미치는 영향

박범석\* · 유제현\* · 이종기\*\*

(\*건국대학교 동물생명과학부 · \*\*대구가톨릭대학교 의대 미생물학교실)

## Effects of Lactoferrin on MA-104 cells infected with a bovine rotavirus isolated from Korea

Bum-suk Park\* · Jae-Hyeun Yu\* · Chong-Kee Lee\*\*

\*School of Animal Life Science, Konkuk University.

\*\*Dept. of Microbiology, School of Medicine, Catholic University of Taegu

### 적 요

Lactoferrin은 생리활성물질로서 항균 및 여러 바이러스들의 세포감염에 억제 효과가 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 락토페린(Lactoferrin)이 설사를 유발하는 국내분리주 로타바이러스의 세포감염에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 소 유래 락토페린(BWLF)은 6.5  $\mu$ M 농도에서 국내 분리형 bovine rotavirus(BRV)SH97과 표준형 BRV NCDV의 MA-104 세포의 감염을 60% 이상 억제하였으며 207.5  $\mu$ M 농도에서는 감염을 95% 이상 막았다. 또한, 소화효소 분해형인 hydrolyzed 된 LF(BHLF)도 억제효과가 BWLF 보다는 다소 낮았지만 로타바이러스 감염에 효과가 있었다. 따라서, 락토페린의 활성도는 소화효소에 의하여 구조가 파괴되어도 바이러스 감염에 억제 효과가 있는 것으로 사려된다.

### I. 서론

로타바이러스(rotavirus)는 유아와 소, 돼지, 말 등의 경제적으로 중요한 어린 포유동물과 조류 등에서 위장염 설사 질환의 주요 원인이 되고 있으며 특히, 송아지 설사병을 유발하는 bovine rotavirus(BRV)는 전 세계적으로 산재된 소 설사병 유발의 중요 원인체로서 설사에 의한 급성 폐사, 임신우의 유산 또는 사산, 호흡장애, 백혈병과 유사한 증상 등을 유발하며 막대한 경제적 손실을 초래하고 있다(Ebina and Tsukada, 1991; Estes and Cohen, 1989). 또한 사람의

경우도, 선·후진국을 가리지 않고 발발하는 위장염의 주된 바이러스임이 규명되면서 세계보건기구(WHO)는 로타바이러스 감염의 보다 효율적인 억제 및 예방을 최우선 연구 과제로 삼고 있다(Cook et al., 1990; Kapikian and Chanock, 1990).

로타바이러스는 바이러스 구성 단백질중의 하나인 VP6 단백질의 항원형에 따라 현재 A에서 G까지의 7개의 혈청 군으로 분류되며 A군은 다시 VP4와 VP7에 의해 각각 G와 P 혈청형으로 분류된다. 현재 A군 로타바이러스는 14종류의 G형과 18종류의 P형이 사람을 포함하는 동물계에 분포되어 있는데, 소에서는 G6, G10, P1, P5, P11 등이 흔히 분리된다(Estes

and Cohen, 1989; Gentsch et al., 1992). 알려진 혈청형 외에도 로타바이러스는 사람과 동물 로타바이러스간에 일어나는 빈번한 유전자 교환으로 인해 새로운 변이형 로타바이러스가 생성되고 있는데, 이에 따라 야기되는 새로운 항원적 변이는 백신개발을 한층 어렵게 하고 있다. 게다가 로타바이러스에서 각 혈청형간은 서로 교차방어가 되지 않으므로 한 혈청형의 로타바이러스에 감염되었다 회복되더라도 다른 혈청형의 감염에 대한 방어능이 형성되지 않아 (Conner et al., 1994) 보다 폭넓고 효율적인 백신 개발이 절실한 실정이다. 그러므로 지역간 또는 국가간에 지속적인 바이러스 유전자의 규명 노력이 요구되며 새로운 변이형에 대한 정확한 정보분석을 필요로 하고 있다.

최근에는 로타바이러스 백신이 가지는 전반적인 문제점들을 해결하기 위해 포유동물의 초유(Ebina et al., 1992), 녹차추출물(Ebina and Tsukada, 1991) 난황(Koketsu et al., 1993; Koketsu et al., 1995) 등의 식품성분들을 이용하여 로타바이러스의 감염을 막고자 하는 노력들이 활발히 진행 중이다. 특히, 포유동물의 젖은 다양한 생리활성 물질을 포함하고 있으며 이 중에서도 Lactoferrin(LF, Goldman and Smith, 1973; Schanbacher and Smith, 1975)과 같은 물질은 human immunodeficiency virus(HIV) 및 human cytomegalo virus 의 T4 임파구 세포 감염을 저해한다고 보고되었다(Hamsen et al., 1995).

본 연구는, 항생제로 치료가 잘 되지 않는 송아지 설사병 피해 지역의 목장에서 송아지 설사 변을 수집하여, 분리된 BRV SH97과 표준 BRV NCDV가 MA-104 세포 감염시, 락토페린이 세포감염에 미치는 영향을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. LF

Bovine whole lactoferrin(BWLF), Bovine hydrolysed lactoferrin(BHLF: Morinaga milk industry Co. Ltd, Japan) 각각 415 $\mu$ M을 무혈청 배지 199 (M199: No. 9466: Irvine scientific, Santa Anna, CA.)에 용해하여

0.45 $\mu$ m filter로 여과한 후 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

### 2. 배지

M199를 10 l 멸균 증류수에 22g의 sodium bicarbonate와 함께 용해하여 0.22 $\mu$ m pore-size filter (Sartorius AG, 37070 Goettingen, Germany)로 여과하여 멸균된 병에 500ml씩 분주 후 냉장보관하면서 사용하였다.

### 3. 세포배양

로타바이러스를 증식시키기 위해 사용된 MA-104 세포는 조직 배양용 T-flask에서 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 37°C 배양기에서 배양하였고, 단층이 형성되면 Trypsin-EDTA(JRH Biosciences, USA) 처리 후 7% fetal bovine serum(FBS: Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah,)과 1% L-glutamin penicillin streptomycin(L-GPS: Irvine scientific, Santa Anna, CA.)이 첨가된 M199를 첨가하여 세포의 계대배양에 사용하였다.

### 4. 로타바이러스 분리 및 배양

본 실험에서 사용된 바이러스는 충남 태안반도의 서화목장에서 채취 냉동보관 시킨 한우 송아지 설사 변을 이용하여 Paul 등(1988)의 방법에 따라 분리되었다. M199를 이용한 설사 변 현탁액을 초음파 처리하고 2,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층 액만을 뽑아 0.45 $\mu$ m filter로 여과시킨 것을 trypsin으로 37°C에서 1시간 동안 활성화시켰다. 그후, 단층이 형성된 MA-104 세포를 무혈청 M199로 세척하여 바이러스를 감염시켜 37°C에서 1시간 흡착시켰다. 현미경으로 cytopathic effect(CPE)를 관찰하여 로타바이러스 감염을 확인하였으며 CPE가 완전히 일어난 것은 -80°C에서 3번의 동결과 해동을 반복하여 vial에 담아 -20°C에서 보관하며 사용하였다. 그 중 하나를 plaque assay를 거친 후 BRV-SH97로 명명하고 본 실험에

이용하였다. 표준 바이러스로는 미국 Stanford 의과대학의 Greenberg 연구실에서 분양 받은 NCDV를 사용하였다. 로타바이러스의 증식 및 배양은 주로 Chiarini 등(1983)의 방법을 이용하였다.

## 5. 바이러스 역가분석

로타바이러스의 역가분석은 Kaljot 등(1988)과 Ruggeri와 Greenberg(1991)의 방법에 따라 6-well plate를 이용한 plaque assay로 수행하였다. 바이러스 ml당 trypsin 5 $\mu$ l를 첨가하여 37°C 배양기에서 1시간 동안 활성화시킨 후 활성화된 바이러스를 무혈청 M199로 10<sup>8</sup>에서 10<sup>6</sup>까지 희석하였고, MA-104 세포의 단층이 형성된 6-well plate는 무혈청 M199로 2번 세척 후 각 well에 희석한 바이러스 액을 0.5ml씩 넣어 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 37°C 배양기에서 1시간 동안 흡착시켰다. 이때 1.4% agarose(Seakem ME agarose: FMC Corp., Philadelphia)와 2×M199를 42°C water bath에 넣어 두었다.

바이러스를 흡착시킨 후 water bath에 넣어 두었던 1.4% agarose와 2×M199를 1:1로 섞어 trypsin(0.5 $\mu$ l/ml)을 첨가하여 혼합하였고, agarose가 첨가된 배지 온도가 37°C로 낮아졌을 때 각 well에 남아있는 바이러스를 제거한 후 well마다 agarose가 첨가된 배지를 4ml씩 중층하여 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 42°C 배양기에서 3~4일간 배양하였다. 배양 후 neutral red(GIBCO BRL, Grand Island, N.Y.)와 무혈청 M199를 1:20으로 희석한 다음 각 well에 1ml씩 넣어 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 37°C 배양기에서 7시간 동안 염색하였으며 light box위에서 plaque를 관찰하였다.

## 6. Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA)에 의한 G-typing

Taniguchi 등(1992)의 방법에 의해 monoclonal antibodies(MAbs: Yo-156, S2-37, Yo-5, G6, G10)를 10mM phosphate-buffered saline solution(PBS, pH 7.4)에 희석하여 96-well plate의 각 well에 100 $\mu$ l씩 넣어 4°C에서 하루 동안 coat하였다. 0.05% Tween-20을 포

합하는 PBS-Tween으로 2번 세척하고 1%-BSA (PBS-Tween)를 각 well에 200 $\mu$ l씩 넣어 4°C에서 5시간 동안 blocking시킨 후 10mM PBS-Tween으로 2회 세척하고 PBS-Tween과 바이러스를 1:1로 희석하여 각 well에 50 $\mu$ l씩 넣어 4°C에서 다시 하루 동안 반응시켰다. PBS-Tween으로 3회 세척한 후 각 well에 anti-Rotavirus hyperimmune rabbit serum을 PBS-Tween으로 희석하여 각 well에 50 $\mu$ l씩 넣어 37°C에서 1시간 동안 배양 후 다시 3회 세척하였다. Peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG는 PBS-Tween으로 희석하여 각 well에 50 $\mu$ l씩 넣어 37°C에서 다시 1시간 동안 배양하였다. 이것을 PBS-Tween으로 4회 세척하여 substrate solution[0.1M citrate-phosphate buffer(pH 5.0) 25ml, o-phenyldiamine 2·HCl 10mg, 30%-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 $\mu$ l]을 각 well에 100 $\mu$ l씩 넣어 발색하고, 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 각 well마다 25 $\mu$ l씩 첨가하여 발색을 중지시켰다. 반응의 정도는 ELISA reader (Model : EL311, Bio-TEK Instruments, USA)로 490nm에서 optical density를 측정하였다.

## 7. LF이 BRV의 MA-104 세포 감염에 미치는 영향분석

Kaljot 등(1988)의 방법을 응용하여 96-well plate에 MA-104 세포를 배양하였고, 바이러스는 0.25 $\mu$ l/ml의 trypsin을 넣은 후 37°C 배양기에서 30분 동안 활성화시켰으며 0.25 $\mu$ l/ml의 trypsin이 첨가된 M199에 활성화된 바이러스를 10,000배 희석하여 다시 30분 동안 활성화시켜 사용하였다. 96-well plate에서 MA-104 세포의 단층이 형성된 세포는 무혈청 M199로 2번 세척하였고 BWLF과 BHLF은 무혈청 M199에 용해시킨 후 0.45 $\mu$ m filter로 여과하였다. 먼저 각 well에 무혈청 M199 50 $\mu$ l를 넣고 첫 번째 well에 여과된 LF 50 $\mu$ l를 넣어 계단 희석하고 바이러스를 100 $\mu$ l씩 각 well에 넣고 CO<sub>2</sub> 배양기에서 하루 배양하였다. 배양 후 바이러스를 제거한 다음 TNC(10mM Trizma base, 100mM NaCl, 15mM CaCl<sub>2</sub> pH7.4)로 2번 세척하였고 10%-formalin을 각 well에 60 $\mu$ l씩 넣어 상온에서 30분 동안 세포를 고정하였다. 다시 TNC로 2번

세척하여 1%-triton을 각 well에 60 $\mu$ l씩 넣었고 상온에서 4분간 정치 후 TNC로 2번 세척한 다음 1차 항체 (1B2)를 FBS가 1% 첨가된 TNC로 15,000배 희석하여 각 well에 125 $\mu$ l씩 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 1시간 동안 배양시켰다. 다시 TNC로 2번 세척하여 2차 항체 affinity purified antibody peroxidase HRP Goat anti-mouse(IgG: Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.)를 FBS가 1% 첨가된 TNC로 4,000배가 되도록 희석하여 75 $\mu$ l씩 각 well에 넣어 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 1시간 동안 배양시켰다. AEC staining은 N, N-dimethylformamide(Sigma, No. D-4254) ml당 4mg의 3-amino-9-ethylcarbazole(Sigma, No. A-5754)이 첨가된 것과 0.05M-sodium acetate buffer(pH 5.2), hydrogen peroxide(300:700:1)를 혼합하여 각 well에 60 $\mu$ l씩 첨가하였고 상온에서 10분간 염색시킨 후 TNC로 2번 세척하여 염색을 중지시키고 현미경 상에서 사진 촬영하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 로타바이러스 역가측정

송아지 설사 변과 MA-104세포에서 배양, 분리, 계대배양한 바이러스 BRV SH97과 표준 BRV NCDV

의 감염가를 측정하기 위해 로타바이러스를 10<sup>-8</sup>까지 희석하여 0.7% agarose 배지에 3~4일간 배양한 후 0.7% agarose 배지로 중층하여 neutral red staining에 의해 원형 탈색된 부분의 plaque forming unit(PFU) 수를 관찰하였다. 그 결과 BRV SH97은 2.3X10<sup>7</sup> PFU/ml이었고, NCDV는 1.8X10<sup>7</sup> PFU/ml이었다. 참고로, 송아지 설사 변에서 분리 MA-104세포에서 배양된 바이러스에서 분리한 dsRNA의 전기영동 양상은(Data not shown) 표준 bovine 로타바이러스인 NCDV, B223, KK3, JBR과 같은 A군의 전형적인 RNA 전기영동 양상인 4:2:3:2 pattern이었으며 11개의 dsRNA 분절 각각의 위치는 표준 바이러스와 약간 다른 양상의 새로운 바이러스였다.

#### 2. ELISA에 의한 G typing

분리된 로타바이러스의 형을 구분하기 위하여 A군 항원 단클론성 항체를 이용하였다. Inner capsid, VP6의 group A 항원 결정기와 반응하는 YO-156과 VP6와 반응하여 subgroup I과 II를 결정하는 S2-37, YO-5 MAbs를 사용하였으며 Capture antibody로서는 VP7 serotype을 결정하는 G-6, G-10 MAbs를 사용하여 표준바이러스 NCDV, B223, KK3, JBR과 SH97 바이러스를 비교하였다(Table 1). 그 결과 분리 (SH97)

Table 1. ELISA serotyping of bovine rotavirus in culture fluids

Sample Name	Anti-VP6			Anti-VP7		Ascribed serotype
	YO-156 (Group A)	S2-37 (Subgroup I)	YO-5 (Subgroup II)	G-6 (Serotype 6)	G-10 (Serotype 10)	
NCDV	2,032	0.093	1,966	2,010	0.136	G6
B223	1,878	0.020	1,288	0.062	1,198	G10
KK3	1,716	0.046	1,872	0.127	1,853	G10
JBR	1,446	0.054	1,068	0.877	0.039	G6
SH97	1,399	0.038	1,782	0.042	1,720	G10

Parentheses show the specificity of the monoclonal antibodies : YO-156, commonly reactive to group A rotavirus ; S2-37, subgroup I-specific ; YO-5, subgroup II-specific ; G-6, serotype 6-specific ; G-10, serotype 10-specific. Values >0.300 in each ELISA test were considered to show positive reactions.

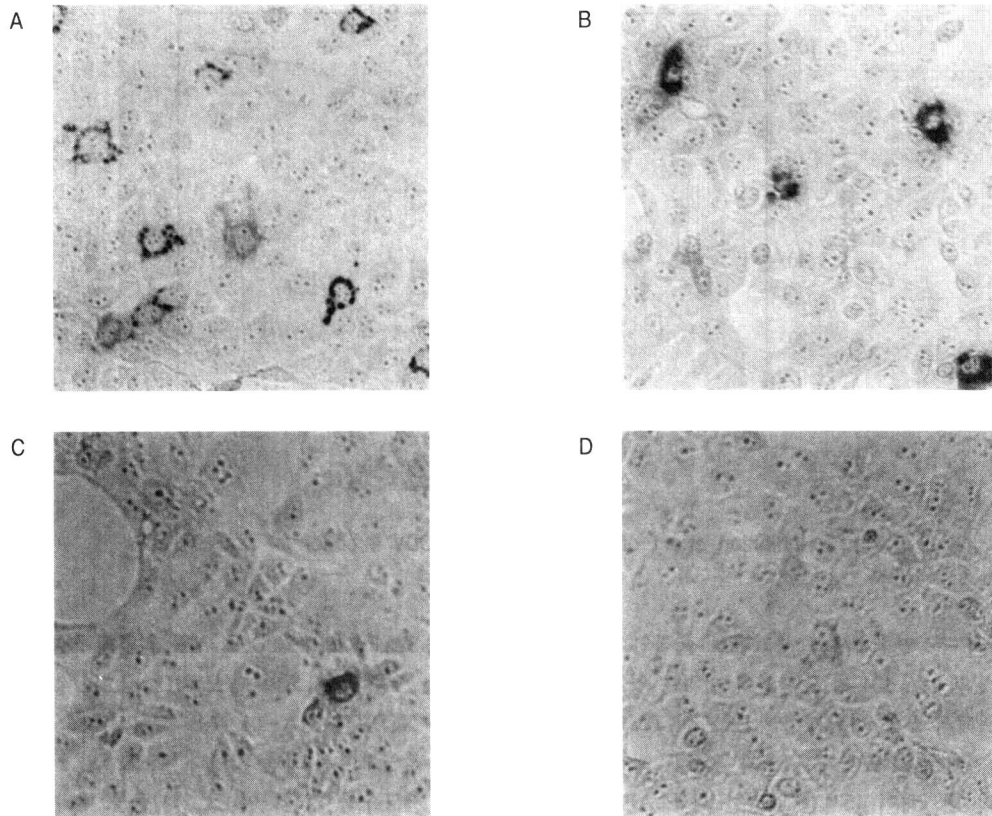


Fig. 1. AEC staining of the BRV NCDV infected cells, treated with BWLF(X200; Olympus TE 3000).  
 A: Virus control without LF, B: LF concentration (con) 3.2  $\mu\text{M}$ , C: LF con. 51.9  $\mu\text{M}$ , D: LF con. 415  $\mu\text{M}$

바이러스는 표준바이러스 B223, KK3와 같은 group A, subgroup II, G10으로 나타났다.

### 3. LF이 BRV의 세포감염에 미치는 영향

세계적으로 로타바이러스 예방을 위한 백신 개발에 많은 노력이 진행되고 있으나 아직 성공적이지 못하다. 한 가지 중요한 장애 요인은 로타바이러스들의 부위에 나타난 제한된 면역반응 때문이기도 하다. 따라서 이러한 백신 개발의 어려움을 극복하기 위한 노력의 일환으로, 식품성분을 이용하여 로타바이러스 감염을 방어하고자 하는 연구들이 진행되고 있다. 조유(Ebina et al., 1992), 모유의 mucin(Yolken, 1992), 난황(Koketsu et al., 1993; Koketsu et al., 1995) 또는

난백(Yolken et al., 1987) 중에 있는 성분들, 녹차 추출물(Ebina and Tsukada, 1991) 등을 이용한 로타바이러스 감염 억제에 관한 연구 등이 좋은 예라 하겠다. 특히 젖, 타액, 눈물, 정액, 점액분비물등에 함유되어 있는 철 결합단백질인 락토페린(Goldman and Smith, 1973; Schanbacher and Smith, 1975)은 미생물 감염에 대한 방어작용(Arnold et al., 1977), 유아의 장내에서 철흡수 촉진작용(Nemet and Simonovits, 1985), 항암작용(Bezault et al., 1994), 골수세포형성 조절작용(Broxemeyer et al., 1980), 염증반응 조절작용(Oseas et al., 1981), 임파구의 성장촉진(Hashizume, et al., 1983), 대식세포 및 백혈구의 조절작용(Ambruso and Johnston, 1981) 등의 다양한 생리적 기능이 알려져 있다.

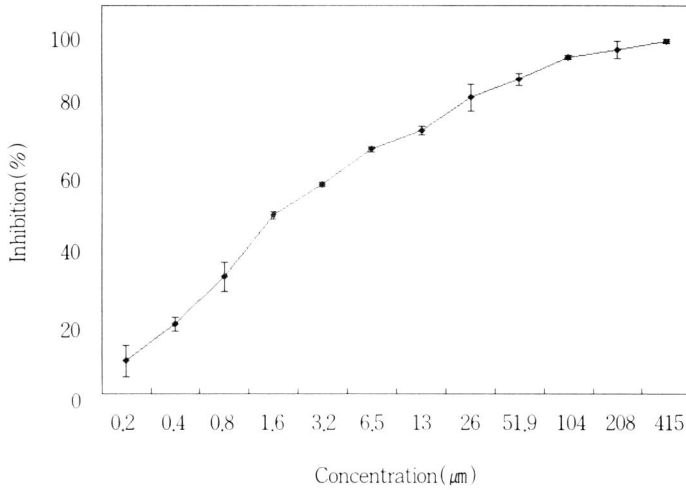


Fig. 2. Inhibition effect of BWLF on BRV NCDV infection of MA-104 cells

따라서 본 연구에서는 생리활성 물질인 락토페린 이 BRV의 MA-104 세포 감염에 미치는 영향을 조사 하기 위해서 표준 바이러스인 BRV NCDV와 분리한 로타바이러스 SH97에 BWLF과 BHLF 각각을 농도 에 따라 첨가하여 15시간 배양한 다음 AEC stain법 으로 염색시켜 현미경 상에서 염색된 세포수를 계산 하여 바이러스의 세포감염 저해율을 관찰하였다.

(1) BWLF이 BRV NCDV의 세포 감염에 미치는 영향

Fig. 1은 BWLF의 농도 3.2, 51.9와 415μM에서 BRV NCDV의 MA-104 세포 감염상태를 현미경 상에서 촬영하여 나타낸 것이다. Table 2와 Fig. 2는 감 염된 세포수를 계산하여 그 억제율을 나타낸 것으로 BWLF의 농도 3.2, 51.9와 415μM에서 각각 59.4±0.01, 89.2±0.02 그리고 100%였으며 BWLF의 농도가 증가 함에 따라 비례하여 억제율도 높아져 103.8 μM에서부

Table 2. Inhibition effect of lactoferrin on bovine rotaviral infection of MA-104 cells(Unit : %)

LF & virus	Lactoferrin concentration(μM)											
	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.5	13.0	26.0	51.9	103.8	207.5	415.0
BHLF +NCDV	6.4* ±0.01	11.4 ±0.04	22.9 ±0.01	34.8 ±0.06	48.1 ±0.06	61.4 ±0.01	69.1 ±0.01	73.3 ±0.03	83.7 ±0.01	88.9 ±0.01	95.6 ±0.01	99.6 ±0.00
BWLF +NCDV	9.4 ±0.04	19.8 ±0.02	33.3 ±0.04	50.8 ±0.01	59.4 ±0.01	69.4 ±0.01	74.6 ±0.01	84.0 ±0.04	89.2 ±0.02	95.4 ±0.01	97.5 ±0.02	100.0 ±0.01
BHLF +SH97	6.4 ±0.03	16.8 ±0.03	26.8 ±0.03	38.0 ±0.01	52.1 ±0.02	62.5 ±0.01	70.0 ±0.02	78.2 ±0.01	83.9 ±0.04	90.5 ±0.02	97.0 ±0.02	100 ±0.00
BWLF +SH97	11.6 ±0.04	21.7 ±0.03	33.9 ±0.04	49.2 ±0.06	60.2 ±0.04	70.6 ±0.00	76.0 ±0.01	83.2 ±0.03	90.5 ±0.02	94.5 ±0.02	97.3 ±0.01	99.5 ±0.01

\*Mean±SD

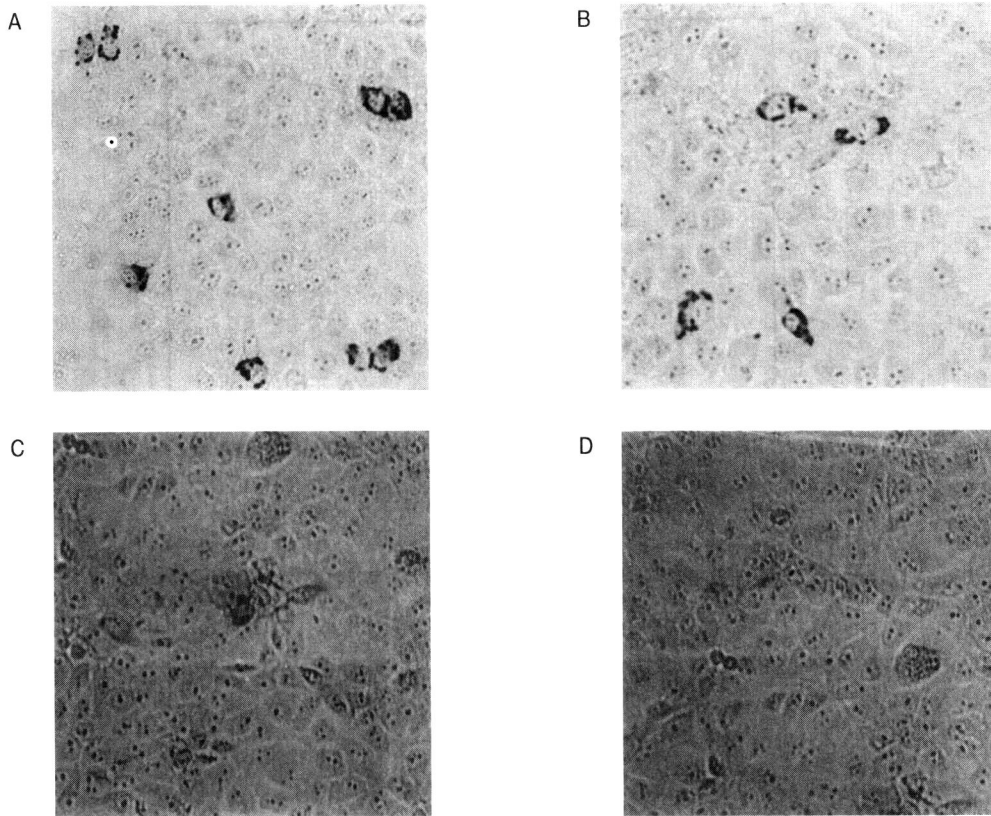


Fig. 3. AEC staining of the BRV SH97 infected cells, treated with BWLF (X200; Olympus TE 3000).  
 A: Virus control without LF, B: LF concentration (con) 3.2  $\mu$ M, C: LF con. 51.9  $\mu$ M, D: LF con. 415  $\mu$ M

터는 95% 이상의 억제율을 나타내었다.

(2) BWLF이 BRV SH97의 세포 감염에 미치는 영향

BWLF의 농도 3.2, 51.9와 415 $\mu$ M에서 BRV SH97의 MA-104 세포 감염상태는 Fig. 3과 같으며 감염된 세포수를 계산하여 그 억제율을 나타낸 결과는 Table 2와 Fig. 4에서 보는 바와 같이 BWLF의 농도 3.2, 51.9와 415 $\mu$ M에서 각각 60.2 $\pm$ 0.04, 90.5 $\pm$ 0.02 그리고 99.5 $\pm$ 0.01% 이었으며 BWLF의 농도가 증가함에 따라 억제율이 높게 나타났다. BWLF의 각 농도별로 국내 분리 BRV SH97과 표준 로타바이러스 NCDV에 대한 억제율을 비교해 보면 0.2 $\mu$ M에서 가장 큰 2.2% 차이를 보였지만 전체적으로 유사한 억제율을 나타냈다.

(3) BHLF이 BRV NCDV의 세포 감염에 미치는 영향

BHLF 농도 3.2, 51.9와 415 $\mu$ M에서 BRV NCDV의 MA-104 세포 감염상태는 Fig. 5와 같으며 감염된 세포수를 계산하여 그 억제율을 나타낸 결과는 Table 2와 Fig. 6에서 보는 바와 같이 BHLF의 농도 3.2, 51.9와 415 $\mu$ M에서 각각 48.1 $\pm$ 0.06, 83.7 $\pm$ 0.01 그리고 99.6 $\pm$ 0.00% 이었으며 BHLF의 농도가 증가함에 따라 억제율이 높게 나타났다. BWLF와 BHLF가 표준 BRV NCDV의 세포감염에 미치는 영향을 비교해보면 각 농도별로 0.4%~ 11.3%정도 BWLF의 억제율이 높게 나타났으나 농도의 증가에 따른 억제율의 증가 pattern은 유사했다.

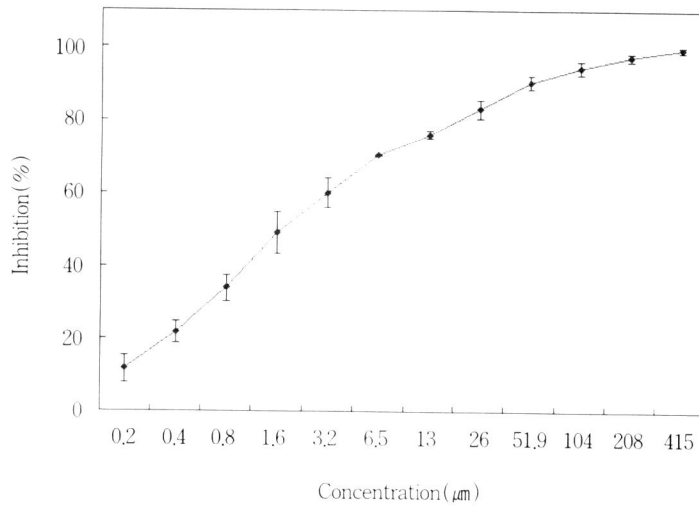


Fig. 4. Inhibition effect of BWLF on BRV SH97 infection of MA-104 cells

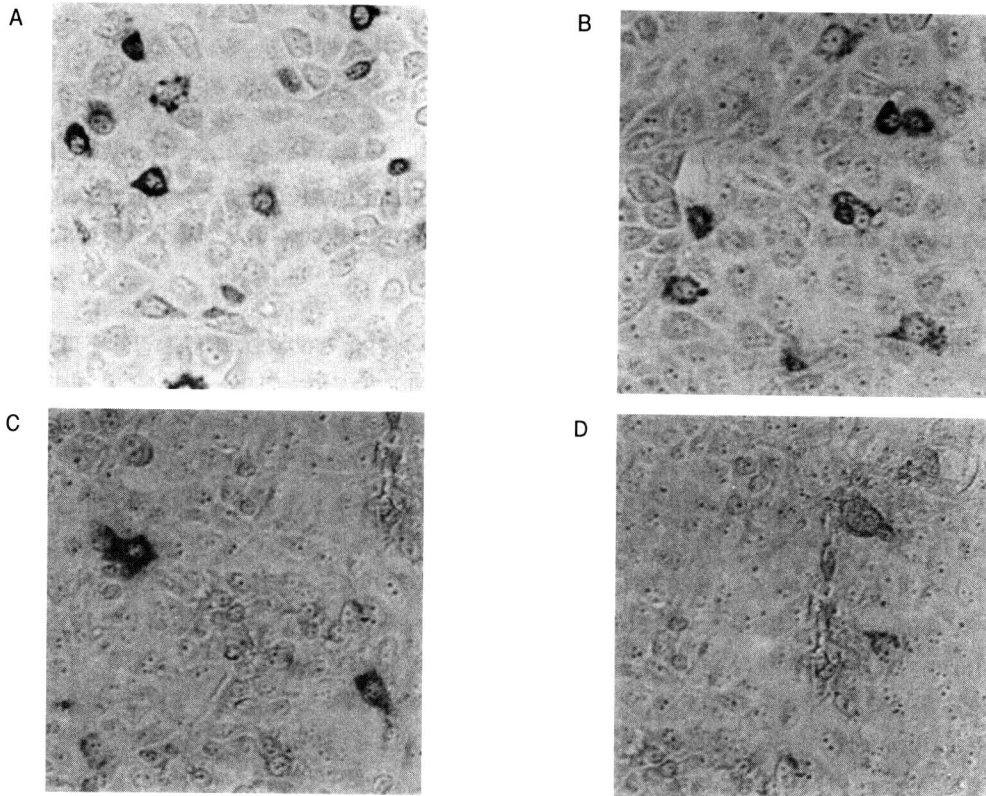


Fig. 5. AEC staining of the BRV NCDV infected cells, treated with BHLF (X200; Olympus TE 3000).  
A: Virus control without LF, B: LF concentration (con) 3.2  $\mu\text{M}$ , C: LF con. 51.9  $\mu\text{M}$ , D: LF con. 415  $\mu\text{M}$



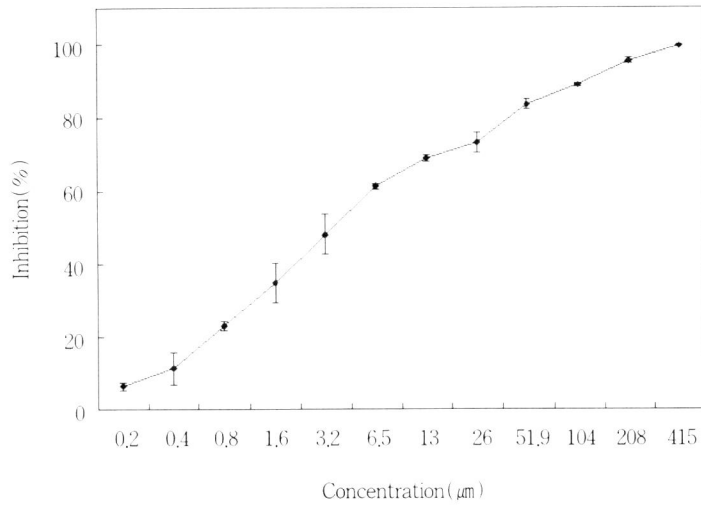


Fig. 6. Inhibition effect of BHLF on BRV NCDV infection of MA-104 cells

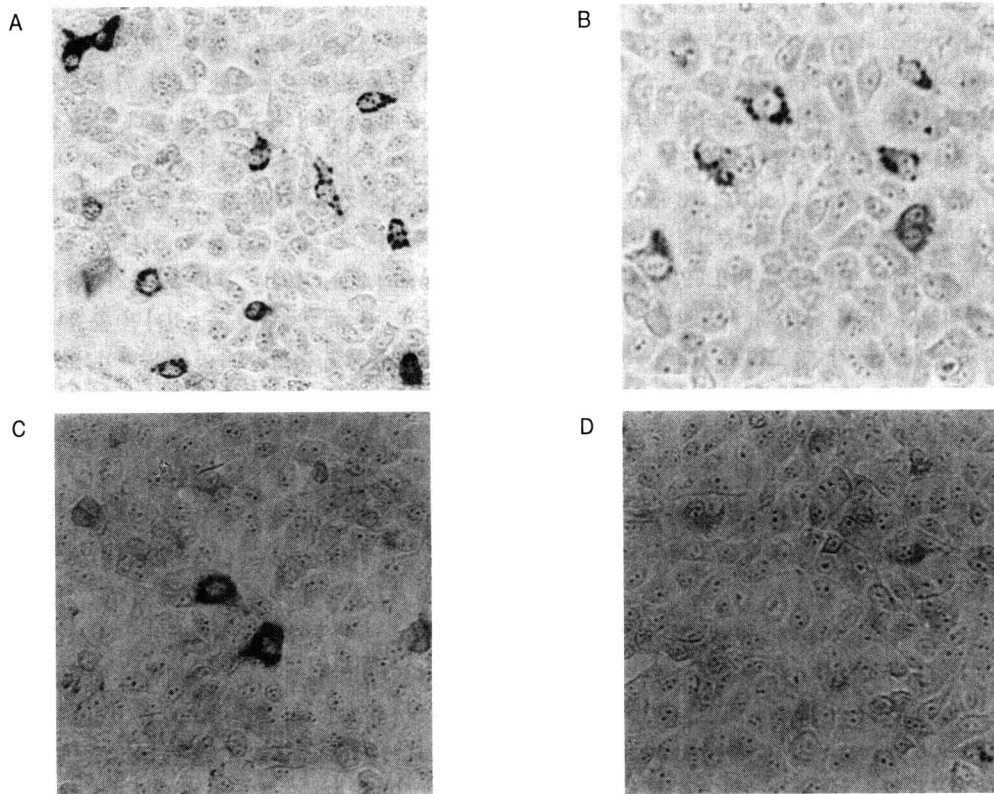


Fig. 7. AEC staining of the BRV SH97 infected cells, treated with BHLF (X200; Olympus TE 3000).  
A: Virus control without LF, B: LF concentration (con)  $3.2 \mu\text{M}$ , C: LF con.  $51.9 \mu\text{M}$ , D: LF con.  $415 \mu\text{M}$

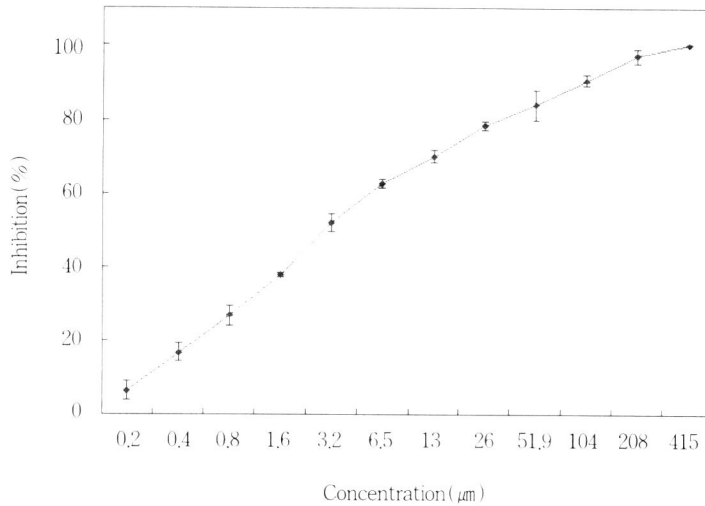


Fig. 8. Inhibition effect of BHLF on BRV SH97 infection of MA-104 cells

#### (4) BHLF이 BRV SH97의 세포 감염에 미치는 영향

BHLF의 농도 3.2, 51.9와 415 $\mu$ M에서 BRV SH97의 MA-104 세포 감염상태는 Fig. 7과 같으며 감염된 세포수를 계산하여 그 억제율을 나타낸 결과는 Table 2와 Fig. 8에서 보는 바와 같이 BHLF의 농도 3.2, 51.9와 415 $\mu$ M에서 각각  $52.1 \pm 0.02$ ,  $83.9 \pm 0.04$  그리고 100%였으며 BHLF의 농도가 증가함에 따라 억제율이 높게 나타났다. BWLF와 BHLF가 국내 서화목장에서 분리해낸 BRV SH97의 세포감염에 미치는 영향을 비교해보면 각 농도별로 0.5%~8.1% 정도 BWLF의 억제율이 높게 나타났으나 농도의 증가에 따른 억제율의 증가 유형은 유사했다. 또 BHLF의 각 농도별로 BRV SH97과 표준 로타바이러스 NCDV에 대한 억제율을 비교해 보면 0~5.4% 정도의 차이를 나타내지만 전체적으로 유사한 저해율을 나타냈다.

BWLF은 herpes simplex virus(HSV)의 vero 세포 감염과 HIV의 MT4 세포와 섬유아세포의 감염을 억제한다(Harmsen et al., 1995). 또한, 최근에는 Superti 등(1997)이 bovine apo-LF 25 $\mu$ M은 rotavirus SA11의 HT-29 세포감염을 억제할 수 있다고 보고하였다. 이러한 LF의 억제 효과는 본 결과에서도 입증되었다.

BWLF와 BHLF 26 $\mu$ M은 bovine rotavirus NCDV와 SH97의 MA-104세포 감염을 70% 이상 억제하였다. 게다가 본 실험은 완전한 LF가 가수분해된 LF보다 bovine rotavirus의 세포감염에 보다 높은 억제 효과가 있음을 보여주었다. 그러나 항균작용에 있어서는 펩신에 의해 가수분해된 LF 생성물이 완전한 LF에 비해 훨씬 더 높은 효과가 있다고 알려져 있다(Tomita et al., 1994). 그러므로 유전전환동물을 이용하여 LF를 대량생산할 수 있다면 분유나 이유식에 첨가해 동물뿐 아니라 유아 로타바이러스 감염 예방에 이바지할 수 있으리라 사료된다.

#### IV. 결론

생리활성물질 락토페린은 항균 및 여러 바이러스들의 세포감염에 억제 효과가 있다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 락토페린이 설사를 유발하는 로타바이러스의 세포감염에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 소 유래 락토페린(BWLF)은 6.5  $\mu$ M 농도에서는 국내 분리형 BRV SH97과 표준형 BRV NCDV의 MA-104 세포의 감염을 60% 이상 억제하였으며 207.5  $\mu$ M 농도에서는 감염을 95% 이상 막았

다. 또한, 소화효소 분해형인 hydrolyzed된 LF (BHLF)도 억제효과가 BWLF보다는 다소 낮았지만 로타바이러스 감염에 효과가 있었다. 따라서 락토페린의 활성도는 소화효소에 의하여 구조가 파괴되어도 바이러스 감염에 억제 효과가 있는 것으로 사려된다.

### 참고문헌

1. Ambruso DR, Johnston RB(1981), Lactoferrin enhances hydroxy radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions and an enzymatic generating system, *J Clin Invest* 67: 352~355.
2. Arnold RR, Cole MF, McGhee JR(1977), A bacteriocidal effect for human LF, *Science* 197: 263~265.
3. Bezault J, Bhimani R, Wiprovnick J, Furmanski P(1994), Human LF inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice, *Cancer Res* 54: 2310~2312.
4. Broxmeyer HE, De Sousa M, Smithyman A, Ralph P, Amilton J, Kurland J, Bognacki J(1980), Specificity and modulation of the action of LF, a negative feedback regulator of myeopiesis, *Blood* 55: 324~333.
5. Chiarini A, Arista S, Giammanco A, Sinatra A(1983), Rotavirus persistence in cell culture: select of resistant cells in the presence of fetal calf serum, *J gen Virol* 64: 1101~1110.
6. Conner ME, Madson DO, Estes ME(1994), Rotavirus vaccines and vaccination potential, *Curr Top Microbial Immunol* 105: 253.
7. Cook SM, Glass RI, Le Baron CW, Ho MS(1990), Global seasonality of rotavirus infections, *Bull WHO* 68: 171~177.
8. Ebina T, Ohta M, Kanamaru Y, Yamamoto-Osumi Y, Baba K(1992), Passive immunization of suckling mice and infants with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus, *J Med Virol* 38: 117~123.
9. Ebina T, Tsukada K(1991), Protease inhibitors prevent the development of human rotavirus induced diarrhea in suckling mice, *Microbiology and Immunology* 35: 583~588.
10. Estes MK, Cohen J(1989), Rotavirus gene structure and function, *American Soci Microbiol* 53(4): 410~449.
11. Gentsch JR, Glass RI, Woods P(1992), Identification of group A rotavirus gene 4types by polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol* 30: 1365~1373.
12. Goldman AS, Smith CW(1973), Host resistance factors in human milk, *J Pediatr* 82: 1082~1087.
13. Harmsen MC, Swart PJ, de-bethune MP, Pauwels R, de-Clercq E, Meijer DK(1995), Antiviral effects of plasma and milk protein: LF shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro, *J Infect Dis* 172: 380~388.
14. Hashizume S, Kuroda K, Murakami M(1983), Identification of LF as an essential growth factor for human lymphatic cells lines in serum free medium, *Biochim Biophys Acta* 763: 377~382.
15. Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB(1988), Infectious rotavirus enter cells direct cell membrane penetration, not by endocytosis, *J Virol* 62(4): 1136~1144.
16. Kapikian AZ and Chanock RM(1990), Rotaviruses, *Virology* 2, 2nd., Raven press, p. 1353~1404.
17. Koketsu M, Juneja LR, Kim M, Ohta M, Matsuura F, Yamamoto T(1993), Sialyloligosaccharides of egg yolk fraction, *J Food Sci* 58: 743~747.
18. Koketsu M, Nitoda T, Juneja LR, Kim M, Kashimura N, Yamamoto T(1995), Sialyloligosac-

- ccharides from egg yolk as an inhibitor of rotaviral infection, *J Agric Food Chem* 43: 858 ~ 861.
19. Nemet K, Simonovits I(1985), The biological role of LF, *Haematologia* 18: 3~12.
20. Oseas R, Yang HH, Baehner RLM, Boxer LA(1981), A promoter of polymorpho-nuclear leukocyte adhesiveness, *Blood* 57: 939 ~ 945.
21. Paul PS, Lyoo YS, Woode GN, Zheng S, Greenberg HB, matsui S, Schwartz KJ, Hill HT(1988), Isolation of bovine rotavirus with a super-short RNA electrophoretic pattern from a calf with diarrhea, *J Clin Microbiol* 26(10): 2139 ~ 2143.
22. Ruggeri FM, Greenberg HB(1991), Antibodies to the trypsin cleavage peptide Vp8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture, *J Virol* 65(5): 2211 ~ 2219.
23. Schanbacher FL, Smith KL(1975), Formation and role of unusual whey proteins and enzymes: Relation to mammary function, *J Dairy Sci* 58: 1048 ~ 1052.
24. Superti F, Ammendolia MG, Valenti P, Seganti L(1997), Antiroviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29, *Med microbiol Immunol* 186: 83~91.
25. Taniguchi K, Wakasugi F, Pongsuwanna Y, Uraswa T, Ukae S, Chiba S, Urasawa S(1992), Identification of human and bovine rotavirus serotypes by polymerase chain reaction, *Epidemiol Infect* 109: 303~312.
26. Tomita M, Takase M, Wakabayashi H, Bellamy W(1994), Antimicrobial peptides of LF, *Adv Exp Med Biol* 357: 209 ~ 218.
27. Yolken RH, Peterson JA, Vonderfecht SL, Fouts ET, Midthun K, Newburg DS(1992), Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis, *J Clin Invest* 90: 1984 ~ 1991.
28. Yolken RH, Willoughby R, Wee SB, Miskuff R, Vonderfecht SR(1987), Sialic acid glycoproteins inhibit in vitro and in vivo replication of rotaviruses, *J Clin Invest* 79: 148 ~ 154.