

# **IgA 항체 합성에 대한 초유 함유 TGF- $\beta$ 와 Bifidobacteria의 영향 평가**

김평현 · 고준수<sup>1</sup>

(강원대학교 자연대학 생명과학부 ·  
동물자원대학 축산가공학과<sup>1</sup>)



# IgA 항체 합성에 대한 초유 함유 TGF- $\beta$ 와 bifidobacteria의 영향 평가

김평현 · 고준수<sup>1</sup>

강원대학교 자연대학 생명과학부, 동물자원대학 축산가공학과<sup>1</sup>

## Abstract

Colostrum contains various kinds of cytokines including TGF- $\beta$  which is known to be multifunctional in immune response and act as an anti-inflammatory agent. First, we measured the amount of TGF- $\beta$  in bovine and human colostrum. Expression pattern of TGF- $\beta$  isotypes was dramatically different between human and bovine colostrum samples. Bovine colostrum collected on day 1 post-delivery retained  $41.79 \pm 16.96$  ng/ml of TGF- $\beta$  1 and  $108.4 \pm 78.65$   $\mu$ g/ml of TGF- $\beta$  2 while in human,  $284 \pm 124.75$  ng/ml of TGF- $\beta$  1 and  $29.75 \pm 6.73$  ng/ml of TGF- $\beta$  2. Thus, TGF- $\beta$  2 is the predominant TGF- $\beta$  isotype in bovine colostrum and vice versa in human colostrum. Both TGF- $\beta$  isotypes diminished significantly in human and bovine colostrum with time. Next, biological activity of colostrum samples was examined in vitro. Both human and bovine colostrum increased IgA synthesis by LPS-activated mouse spleen B cells, which is a typical effect of TGF- $\beta$  on the mouse B cell differentiation. Furthermore, we found that anti-proliferative activity in MV1LU cells by colostrum samples disappeared by addition of anti-TGF- $\beta$  1 and anti-TGF- $\beta$  2 antibody. In conclusion, there are substantial amounts of biologically active TGF- $\beta$  1 and TGF- $\beta$  2 in bovine and human colostrum. The results that the colostrum can increase IgA expression has important implications since IgA is the major Ig class produced in the gastrointestinal tract.

We have previously shown that the stimulatory effect of *Bifidobacteria bifidum* on spleen B cells was quite similar to that of LPS which is a well-known polyclonal activator for murine B cells. In the present study, we further asked whether *B. bifidum* regulate the synthesis of IgA by mucosal lymphoid cells present in Peyer's patches (PP) and mesenteric lymph nodes (MLN). *B. bifidum* alone, but not *C. perfringens*, significantly induced overall IgA and IgM synthesis by both MLN and PP cells. This observation indicates that *B. bifidum* possesses a modulatory effect on the mucosal antibody production *in vivo*. We, therefore, investigated the mucosal antibody production following peroral administration of *B. bifidum* to mice. Ingested *B. bifidum* significantly increased the numbers of Ig (IgM, IgG, and IgA)

secreting cells in the culture of both MLN and spleen cells, indicating that perorally introduced *B. bifidum* enhances mucosal and systemic antibody response. Importantly, however, *B. bifidum* itself does not induce the own specific antibody responses, implying that *B. bifidum* do not incite any unwanted immune reaction. Subsequently, it was found that encapsulation of *B. bifidum* further augments the total IgA production by increasing the number of IgA-secreting cells in the culture of both MLN and spleen cells. Finally, we found that the immuno-stimulating activity of *B. bifidum* is due to its cell wall components but not due to any actively secreting component(s) from bacteria. Thus our data reveal that peroral administration of *B. bifidum* can enhance intestinal IgA production and that encapsulation of *B. bifidum* further reinforces the IgA production.

## I. 서 론

인체 내에 존재하는 항체의 절대량으로 보면 IgA가 전체 항체 class 중 80% 정도이며 이들은 대부분 점액 분비 조직 (mucosal secretions)에 존재한다. IgA는腸內에서 일반적인 감염에 대한 면역 방어에 가장 중요한 성분으로 인식되고 있다. IgA의 기능적 특징의 하나는腸內에서 염증반응 없이 항원을 제거할 수 있는데, IgA 결핍증은 사람에게 가장 흔한 면역 결핍증으로 알려져 있다. cytokine의 일종인 TGF- $\beta$  1은 IgA 합성을 선택적으로 증가시킬 수 있는데 (Kim and Kagnoff 1990; Kim et al., 1998), 초유, 모유에 다량의 TGF- $\beta$  가 존재한다는 보고되고 있기 때문에 장내 면역방어에 결정적인 역할을 담당하는 IgA 항체의 합성에 TGF- $\beta$  가 중요한 유도인자로 작용한다는 사실은 매우 흥미롭고 시사하는 바가 크다.

TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ )는 세포의 형질전환을 촉진하는 인자로 발견되었는데 이체는 다양한 면역조절 기능, 특히 염증작용을 강력하게 억제하는 물질로 잘 알려져 있다. 이와 같은 작용을 포함한 다기능적 특성으로 90년대 들어 가장 주목받고 있는 cytokine 중의 하나이다. TGF- $\beta$ 는 만성 염증 작용을 억제하며, 특히 자가면역질환의 염증반응을 억제하는 치료기능도 보고되었다. 항염 효과에 주효하다는 직접적인 증거로는 TGF- $\beta$  1 결핍 마우스 (TGF- $\beta$  1 knock-out mouse)의 경우 심한 염증 질환으로, 생후 3주 이상 생존하지 못한다 (Shull et al., 1992). 그런데 TGF- $\beta$  1 결핍 마우스의 경우, TGF- $\beta$  1를 포함한 정상적인 모유를 통해 공급되면 maternal rescue가 된다고 보고되었다 (Letterio et al., 1994). TGF- $\beta$ 는 상처치유에도 놀라운 효과를 보여 현재 치료제로서 개발되고 있다. 이와같이 TGF- $\beta$ 는 생체 전반적인 항상성 (homeostasis) 유지에 필수적 인자임이 밝혀지고 있다.

bifidobacteria는 혐기성 세균으로, 젖산을 생산하며 모유를 먹인 유아의 장내에서 발견되었다. Elie Metchnikoff는 *Bifidobacteria*가 건강에 유익한 효과를 줄 수 있다고 처음으로 제안하였으며, 발효된 유제품내에 있는 bifidobacteria는 건강과 영양학적인 면에서 유익하다고 잘 알려져 있다. 이들의 특성은 유아나 성인의 장내 microflora의 균형을 유지할 수 있으며, mitogenic 반응의 강화, 병원균에 의한 감염의 저항성을 개선할 수 있다. 또한 혈청내 콜레스테롤 수치를 줄이는 효과도 있다. 이와 같은 기능은 bifidobacteria를 섭취한 숙주의 면역계를 조절할 수 있다고 예측된다. 또한 bifidobacteria는 macrophage와 lymphocyte의 활성화, 항체 합성, spleen과 Peyer's patch에서 mitogenic response와 natural killer cell의 기능을 증진시켜 전체적인 숙주의 면역기능을 향상시킨다. 이러한 면역반응의 촉진효과는 병원체의 감염에 대한 저항성이 증가되고 잠정적으로는 암을 예방할 수 있다고 추측된다. Perdigon

등 (1991)은 젖산 생성 bacteria를 구강으로 면역시켰을 때 숙주의 점막면역을 강화시킨다고 보고하였다. 또한 유아가 *Lactobacillus GG*, human *Lactobacillus strain*을 포함하고 있는 발효 유제품을 섭취하였을 때, rotavirus에 대한 특정 IgA response가 대조군에 비해 증가하였다. 지금까지 살펴본 바와 같이 bifidobacteria는 전반적인 점막면역기능을 향진시키는 효과가 있다고 추정되고 있지만 아직까지 IgA 항체를 비롯한 장내 점막면역에 미치는 구체적인 기능에 대해서는 연구된 바 없다.

본 연구에서는 점막면역 중 특히 IgA 항체 합성에 중요한 역할을 담당할 것으로 추정되는 초유에 포함된 TGF- $\beta$  와 Bifidobacteria의 특성을 조사하였다.

## II. 결과 및 고찰

### 1. 초유 함유 TGF- $\beta$ 의 특성 조사

#### 1) TGF- $\beta$ 1과 TGF- $\beta$ 2의 면역정량법 확립

TGF- $\beta$  는 5 종류의 isotype이 존재하는데 사람의 모유나 우유에는 주로 TGF- $\beta$  1과 TGF- $\beta$  2가 존재한다고 알려져 있다. 초유 및 우유의 특성연구를 성공적으로 수행하기 위한 첫째 조건은 두 cytokine을 정량하는 방법을 정착하는 일이다. 면역화학적인 방법으로 TGF- $\beta$  1과 TGF- $\beta$  2에 각각 특이적이고 민감한 ELISA를 정착시키고자 하였다 (Fig. 1). Fig. 1A에서 보듯이 600 pg/ml 정도의 민감도로 TGF- $\beta$  1이 확인되었다. 또한 Fig. 1B에서 보듯 TGF- $\beta$  2의 경우는 1 ng/ml 정도의 민감도를 보였다. 이와 같은 정도의 민감도는 초유나 모유에 존재하는 TGF- $\beta$  를 양호하게 정량할 수 있었다 (Fig. 2~5). 다음은 개발된 정량법이 각각 TGF- $\beta$  1과 TGF- $\beta$  2를 선택적으로 검출하는지를 조사하였다. 특이도는 TGF- $\beta$  2 ELISA가 TGF- $\beta$  1에 대한 cross-reactivity를 보이는지를 통해 알아보았다. Figure 1C에서 보듯, TGF- $\beta$  2 ELISA는 실제로 TGF- $\beta$  1에 대해 거의 반응하지 않았다. 즉, 높은 농도 (10 ng/ml)의 TGF- $\beta$  1에 대해서도 거의 background에 해당되는 OD 값만을 나타내었다. 이상의 결과는 두 종류의 ELISA가 만족할 만한 특이도를 보임을 의미하며, 정착된 ELISA는 다음 단계의 시료분석에 사용하였다.

#### 2) 소의 초유에 존재하는 TGF- $\beta$ 의 정량

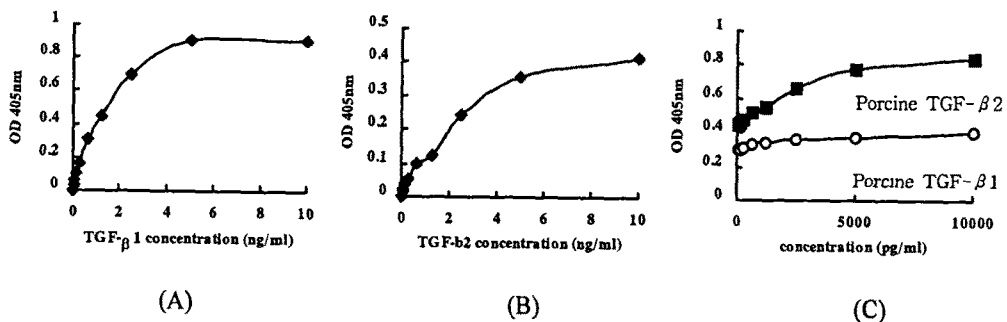


Fig. 1. ELISA specific to TGF- $\beta$  isotypes. (A) and (B), Standard curve of porcine TGF- $\beta$  1 and TGF- $\beta$  2 obtained by TGF- $\beta$  ELISA, respectively; (C), Measurement of cross-reactivity of TGF- $\beta$  1 by TGF- $\beta$  2 ELISA.

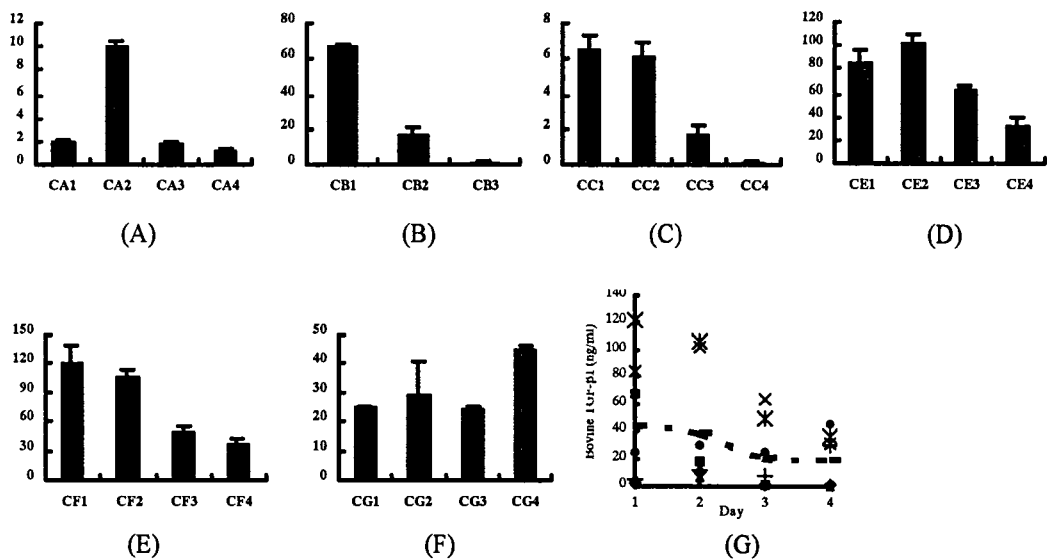


Fig. 2. Detection of TGF- $\beta$  1 retained in bovine colostrums by ELISA. (A)~(F) samples were acquired from different individuals. Colostrial samples were collected up to the 3~4 day of the delivery. (G), kinetics of TGF- $\beta$  1 retained in bovine colostrial samples. Dotted lines are the average amounts of bovine TGF- $\beta$  1 from (A)~(F) samples, respectively.

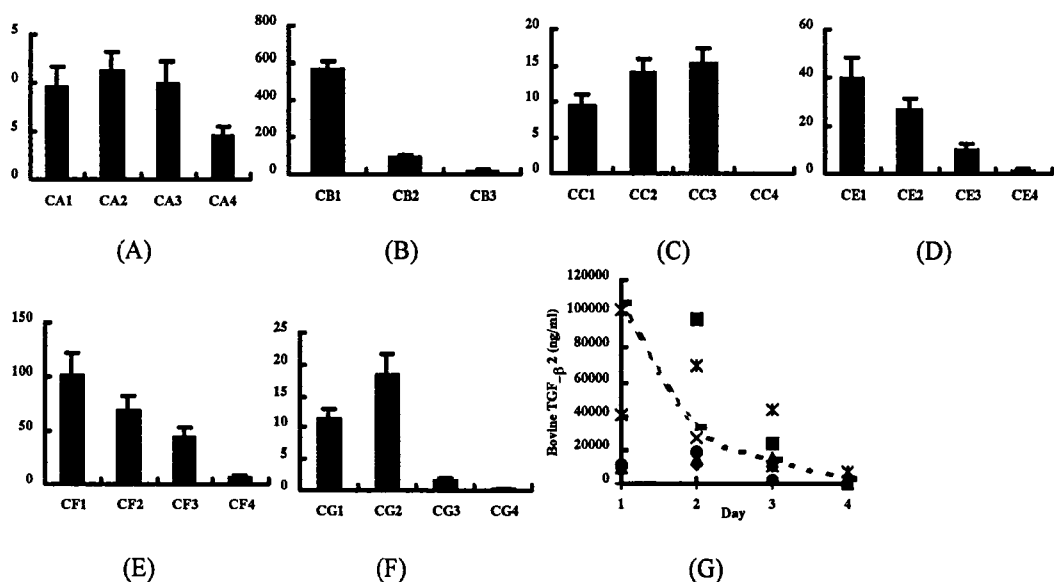


Fig. 3. Detection of TGF- $\beta$  2 retained in bovine colostrums by ELISA. (A)~(F) samples were acquired from different individuals. Colostrial samples were collected up to the 3~4 day of the delivery. (G), kinetics of TGF- $\beta$  2 retained in bovine colostrial samples. Dotted lines are the average amounts of bovine TGF- $\beta$  2 from (A)~(F) samples, respectively.

출산일로부터 소 초유를 얻어 whey를 분리하여 whey내의 TGF- $\beta$  1과 TGF- $\beta$  2를 정량해 본 결과 분만 첫날의 whey에 TGF- $\beta$  1이 최고 121.6 ng/ml 정도의 높은 농도로 검출되었고 TGF- $\beta$  2는 574  $\mu$ g/ml 정도의 높은 농도로 검출되었다 (Fig. 2, 3). 그런데 흥미롭게도 시간이 지날수록 그 양이 감소하였다 (Figure 2G, Figure 3G). 본 결과는 소 초유에는 TGF- $\beta$  2가 TGF- $\beta$  1보다 훨씬 많은 양이 존재하며 두 TGF- $\beta$  isotype 모두 시간이 지남에 따라 감소됨을 보여준다.

### 3) 사람의 초유에 존재하는 TGF- $\beta$ 의 정량

6명의 산모로부터 초유를 얻고 whey를 분리하여 TGF- $\beta$  1과 TGF- $\beta$  2의 양을 측정해 본 결과 개인마다 약간의 차이는 있었으나 소 초유와 비슷하게 첫날에 가장 많이 포함되어 있었으며 날이 지날수록 감소하였다 (Fig. 4, 5). 첫날의 whey내에 존재하는 TGF- $\beta$  1은 약 100 ng/ml에서 900 ng/ml 정도였으며 (Fig. 4), TGF- $\beta$  2는 약 16 ng/ml에서 35 ng/ml 정도였다 (Fig. 5). TGF- $\beta$ 의 isotype이 소의 초유와는 다르게 분포하였다. 즉, 사람의 초유에는 TGF- $\beta$  1이 TGF- $\beta$  2보다 다량 함유되어 있음을 본 연구에서 알 수 있었다.

### 4) 항체합성에 대한 초유에 포함된 TGF- $\beta$ 의 영향

지금까지의 연구를 통해서 소의 초유와 사람의 초유에는 상당량의 TGF- $\beta$ 가 존재함을 확인할 수 있었다. 초유에 포함된 TGF- $\beta$  1과 TGF- $\beta$  2가 면역세포에 대해서 어떠한 영향을 미치는지 알기 위해서 mouse spleen B cell과 mesenteric lymph node B cell을 이용하여 항체합성 실험을 수행하였다. Fig. 6A에서 보듯, 점막 면역에 중요한 기능을 담당하는 항체인 IgA의 분비는 TGF- $\beta$ 가 가장 많이 함유된

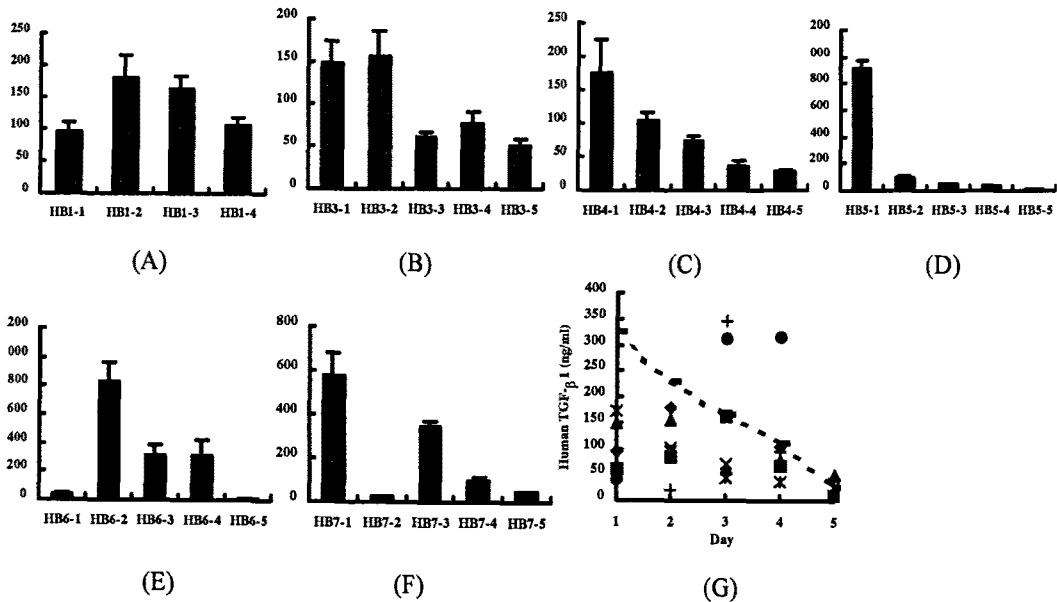


Fig. 4. Measurement of TGF- $\beta$  1 in human colostrums by ELISA. (A)~(F) samples were acquired from different individuals. Colostrial samples were collected up to the 4~5 day of the delivery. (G), kinetics of TGF- $\beta$  1 retained in human colostrial samples. Dotted lines are the average amounts of human TGF- $\beta$  1 from (A)~(F), respectively.

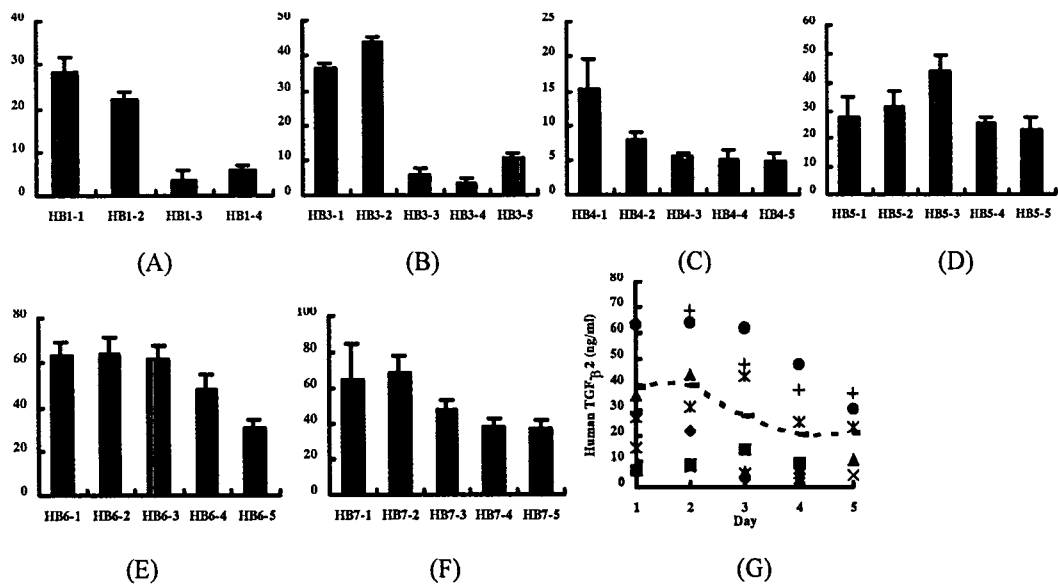


Fig. 5. Measurement of TGF- $\beta$  2 in human colostrums by ELISA. (A)~(F) samples were acquired from different individuals. Colostrial samples were collected up to the 4~5 day of the delivery. (G), kinetics of TGF- $\beta$  2 retained in human colostrial samples. Dotted lines are the average amounts of human TGF- $\beta$  2 from (A)~(F), respectively.

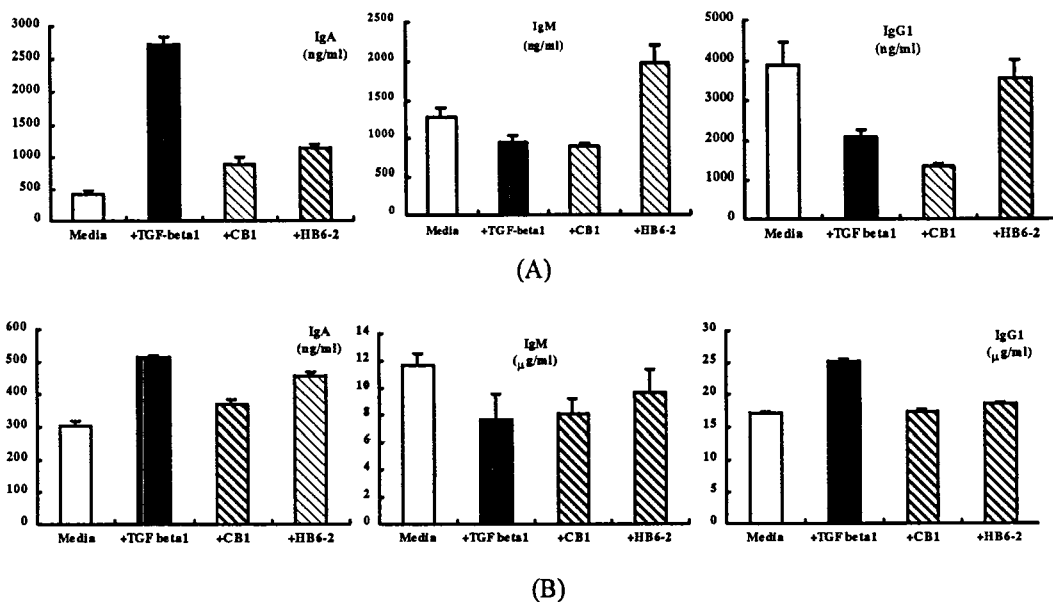


Fig. 6. Measurement of antibody secretion by LPS-stimulated spleen cells (A) and mesenteric lymph node cells (B). 1 ng/ml of purified porcine TGF- $\beta$  1 was used as positive control, and samples were diluted in PBS before added. Cells were cultured in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C and supernatants were collected at day 8. CB1, bovine colostrum (TGF- $\beta$  1, 67.20 ng/ml; TGF- $\beta$  2, 574  $\mu$ g/ml); HB6-2, human colostrum (TGF- $\beta$  1, 810.89 ng/ml; TGF- $\beta$  2, 63.77 ng/ml). Data represents triplicate wells  $\pm$  SEM.



소의 초유시료인 CB1 (TGF- $\beta$  1: 67.20 ng/ml, TGF- $\beta$  2: 574  $\mu$ g/ml)이나 사람의 초유 HB6-2 (TGF- $\beta$  1: 810.89 ng/ml, TGF- $\beta$  2: 63.77  $\mu$ g/ml)에 의해서 증가되었고 약 1~1.5  $\mu$ g/ml의 IgA가 합성되었다. IgA의 분비와 달리, IgM과 IgG<sub>1</sub>의 분비는 CB1에 의해서 억제되었고, HB6-2에 의해서는 변화가 없거나 약간 증가되었다 (Fig. 6A). 이러한 결과는 MLN을 이용해서 실험할 때도 비슷한 경향성을 보였다 (Fig. 6B). 따라서 초유 내에 포함된 TGF- $\beta$ 는 선택적으로 IgA의 분비를 촉진할 수 있음을 보여준다. 본 연구는 의미하는 바가 크다. 즉 초유를 통해 유아에 유입된 TGF- $\beta$ 는 장내 림프조직인 MLN을 자극하여 IgA 항체합성을 촉진시킬 수 있음을 시사하기 때문이다.

### 5) 초유에 함유된 TGF- $\beta$ 의 생물학적 활성 조사

소와 사람의 초유내에 존재하는 TGF- $\beta$ 가 실제로 생물학적 활성을 나타내는지 알아보기 위해

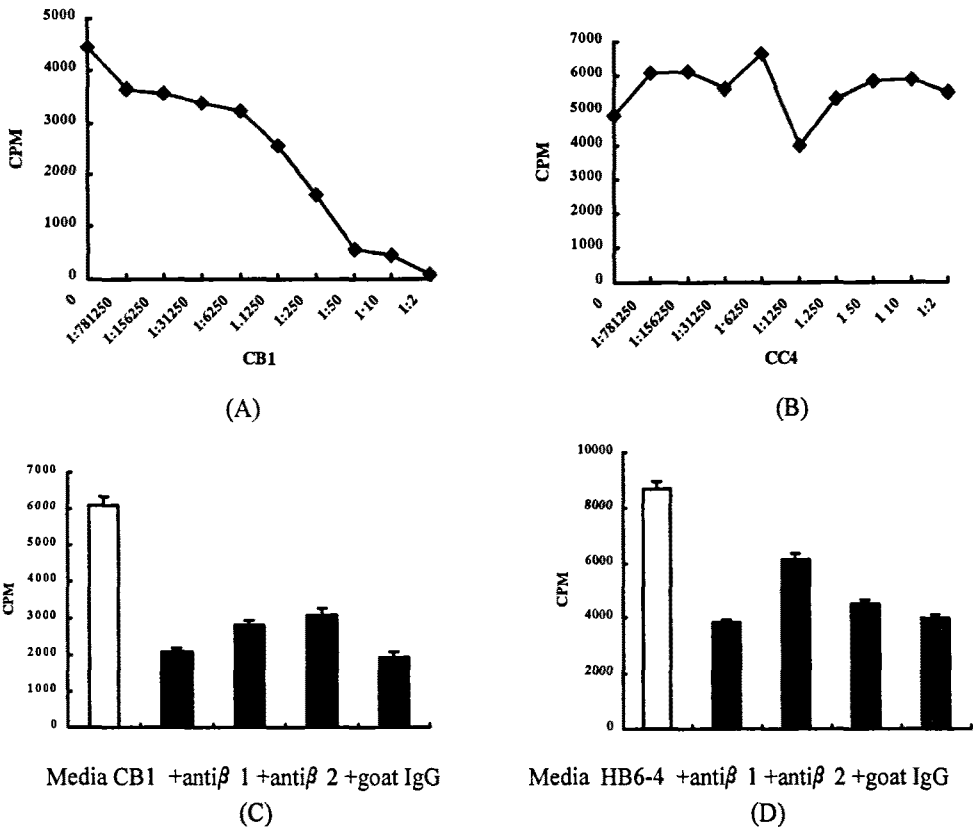


Fig. 7. Bioassay of TGF- $\beta$  in bovine colostrums by MV1LU cells. CB1 (A) is a bovine colostrum sample which contains the greatest amount of TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  1: 67.20 ng/ml, TGF- $\beta$  2: 574  $\mu$ g/ml), whereas CC4 (B) contains the smallest amount of TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  1: 0.11ng/ml, TGF- $\beta$  2: not detectable) among colostrums examined. To determine whether the inhibition effect of MV1LU cells is due to the TGF- $\beta$  contained in colostrums, bovine (C) and human (D) colostrum samples were incubated with anti-TGF- $\beta$  1 antibody and anti-TGF- $\beta$  2 antibody before addition to MV1LU cells. goat IgG antibody was used as negative control.

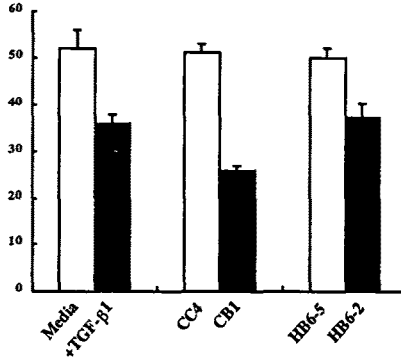


Fig. 8. Viable cells at 4th day after culture with TGF- $\beta$  1 and colostrum samples. 0.2 ng/ml of porcine TGF- $\beta$  1 was used as positive control and media was added as negative control. CB1 (TGF- $\beta$  1: 67.20 ng/ml, TGF- $\beta$  2: 574  $\mu$ g/ml) and CC4 (TGF- $\beta$  1: 0.11 ng/ml, TGF- $\beta$  2: not detectable) present the bovine colostrum samples which contains the greatest and the smallest samples, respectively. Whereas HB6-2 (TGF- $\beta$  1: 810.89 ng/ml, TGF- $\beta$  2: 63.77 ng/ml) and HB 6-5 (TGF- $\beta$  1: 9.66 ng/ml, TGF- $\beta$  2: 30.52 ng/ml) present the human colostrum samples which contains the greatest and the smallest samples, respectively. All of colostrum samples were 1:125 diluted before added to spleen cells.

MVILU cell을 이용하여 성장저해 정도를 확인하였다. TGF- $\beta$  는 이 세포의 성장을 억제하는 특성을 가지고 있다. Fig. 7A에서 보듯, TGF- $\beta$  2가 가장 많이 함유된 소 초유 CB1의 농도가 증가함에 따라 세포의 성장은 일관성 있게 감소하였다. 그러나 TGF- $\beta$  가 거의 포함되지 않는 소 초유 CC4에 의해서 세포의 성장은 억제되지 않았다 (Fig. 7B). 이러한 성장억제 현상이 과연 초유 내에 포함된 TGF- $\beta$  에 의해서 일어난 현상인지 확인하기 위해서 anti-TGF- $\beta$  1과 anti-TGF- $\beta$  2 antibody로 TGF- $\beta$  를 중화시킨 다음에 같은 실험을 수행하였다. 소 초유시료인 CB1에 의한 MVILU 세포의 성장 억제 능력은 anti-TGF- $\beta$  2 antibody에 의해서 부분적으로 중화되었고 anti-TGF- $\beta$  1에 의해서는 거의 변화가 없었다 (Fig. 7C). 이와 반대로 사람 초유 HB6-4에 의한 성장억제현상은 anti-TGF- $\beta$  1에 의해서 중화되었다 (Fig. 7D). 이러한 결과는 소와 사람 초유 내에 함유된 TGF- $\beta$  1과 TGF- $\beta$  2의 다른 발현양상과 일치함을 보여준다.

#### 6) 초유가 면역세포의 성장에 미치는 영향

순수분리된 TGF- $\beta$  는 면역세포의 성장을 억제하는 특징이 있다. 초유 내에 포함된 TGF- $\beta$  도 이러한 특징을 지니는지 mouse spleen cell을 이용해서 확인하였다. Fig. 8에서 보듯, TGF- $\beta$  가 가장 적게 함유된 소와 사람의 초유 (CC4와 HB6-5)가 spleen cell의 성장을 억제하지 못하였다. 이와 반대로 TGF- $\beta$  가 많이 함유된 소와 사람의 초유 (CB1과 HB6-2)에 의해서 spleen cell의 성장은 억제되었다. 이러한 성장억제 현상은 spleen cell을 배양한 후 4일째에 가장 뚜렷하였다. 이와 같은 결과는 초유나 모유 속에 있는 TGF- $\beta$  이 온전한 활성을 지니고 있음을 보여준다.

## 2. Bifidobacteria의 점막항체 합성 항진효과 평가

### 1) 장내 점막 B cell의 항체합성에 미치는 *B. bifidum*의 효과 조사

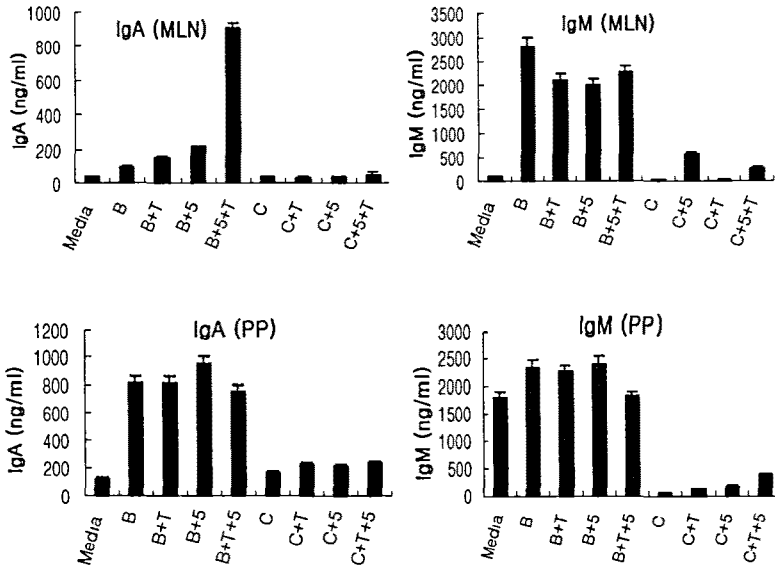
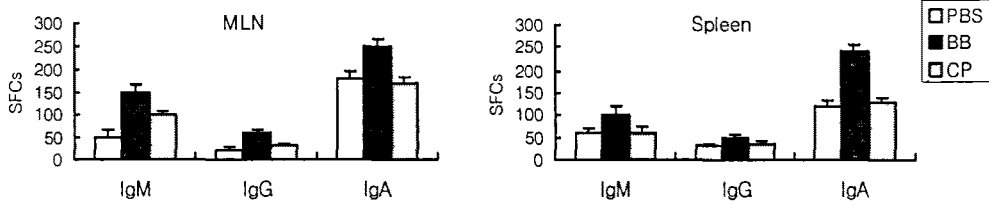


Fig. 9. Effect of *B. bifidum* on antibody synthesis by mucosal B cells. Mesenteric lymph nodes B cells or Peyer's patches ( $5 \times 10^5$  cells/well) were cultured with *B. bifidum* or *C. perfringens* ( $1 \times 10^7$  bacteria/well). Cells were stimulated with TGF- $\beta$  1 (0.2 ng/ml) or IL-5 (0.5 ng/ml) on day 0. After 7 days of culture, supernatants were obtained and total IgA and IgM were measured by ELISA. Data are means of three independent samples  $\pm$  SEM. MLN, Mesenteric lymph nodes; PP, Peyer's patches; B, *B. bifidum*; C, *C. perfringens*; T, TGF- $\beta$  1; 5, IL-5.

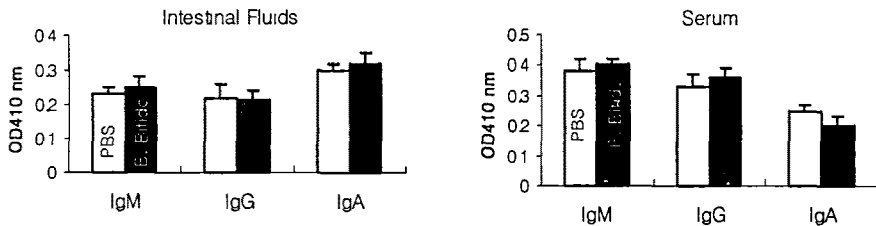
본 연구 이전에 본인들은 *B. bifidum*이 비특이적으로 spleen B cell을 활성화시켜 Ig 합성을 증가시키는 것을 관찰한 바 있다 (Ko et al., 1999). *B. bifidum*은 장내에 머무는 유익세균이므로 본 연구에서는 장내 면역에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 MLN B cell의 항체 합성에 미치는 영향을 조사하였다. spleen B cell과 유사하게 IgA나 IgM 합성량을 증가시켰다 (Fig. 9). 그러나 *C. perfringens*는 어떤 영향도 주지 않았다. TGF- $\beta$  1과 IL-5의 반응성에 대해서는 spleen B cell과 유사하게 IgA 합성을 증가시켰고, IgM 합성은 변화가 없었다 (Fig. 9). *B. bifidum*은 PP B cell의 경우에도 IgA 합성을 현저히 증가시켰다. 그러나 이 때 *B. bifidum*은 IgM의 합성에는 별 다른 영향을 주지 않았다. 한편 *B. bifidum*에 의해 활성화된 PP B cell의 경우 TGF- $\beta$  1과 IL-5에 의해 첨가적인 IgA 합성 상승이 관찰되지 않았다 (Fig. 9). 이와 같은 현상은 어느 정도 예상되었다. 일반적으로 PP에 존재하는 B cell은 대부분 IgA를 합성할 수 있는 세포로 운명이 결정되어 있기 때문에 TGF- $\beta$  1에 의한 IgA isotype switching 유도과정이 불필요하기 때문이다. 결론적으로, 이와 같은 결과는 *B. bifidum*이 장내에서도 B cell을 직접 영향을 주어 IgA 항체 합성에 기여할 수 있음을 시사한다.

## 2) *B. bifidum*의 경구투여 효과 조사

*Bifidobacteria*의 구강투여가 항원 비특이적인 항체 합성에 미치는 영향을 조사하였다. 항체 합성 세포 수는 ELISPOT assay를 통해 결정하였다. spleen과 MLN에서는 IgA 합성세포수가 의미있게 증가하였고



**Fig. 10.** Peroral administration of *B. bifidum* increases numbers of total Ig-secreting cells. *B. bifidum* ( $1 \times 10^9$ /mouse) was administered orogastrically to mouse every other day for 4 weeks. Spleen or MLN B cells were incubated with *B. bifidum* ( $1 \times 10^7$  cells/well) for 5 days. Cultured B cells were incubated for 4 h for the secretion of IgM, IgG, and IgA isotypes in nitrocellulose-bottomed plates. Number of Ig secreting cells were enumerated by ELISPOT assay. Data are means of three independent samples  $\pm$  SEM. SFCs represents Ig spot-forming cells from  $10^7$  cultured cells. BB, *B. bifidum*; CP, *C. perfringens*.

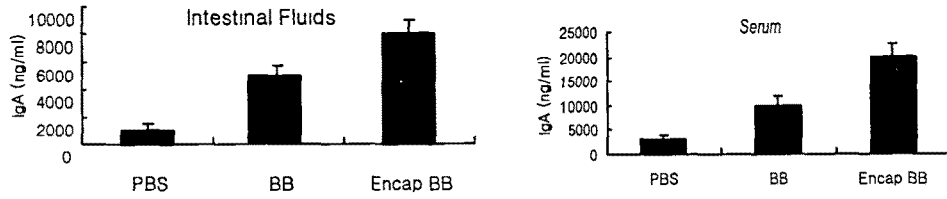


**Fig. 11.** Peroral administration of *B. bifidum* does not increase *B. bifidum*-specific antibody responses in the intestines and the sera. *B. bifidum* ( $1 \times 10^9$ /mouse) was administered orogastrically to mouse every other day for 4 weeks. *B. bifidum*-specific antibodies were determined by ELISA as described in Materials and Methods. Samples were obtained from 4 mice. Data are means of four independent samples  $\pm$  SEM.

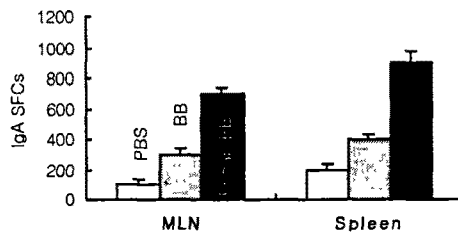
IgM과 IgG1 항체 합성수도 약간 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 10). 다음은 *B. bifidum*의 경구투여가 *B. bifidum*에 대한 항체가 형성되었는지 조사하였다. 경구 투여된 *B. bifidum*의 항원성을 알아보기 위해서 *B. bifidum*을 마우스에 4주간 2일 간격으로 투여하였고 4주 후 장액과 혈청에서의 BB 특이적인 항체 합성을 ELISA로 조사하였다. *B. bifidum*을 투여한 마우스에서 *B. bifidum* 특이적인 항체 합성 정도는 PBS를 투여한 마우스의 장액과 혈청에서 의미있는 차이가 없었다 (Fig. 11). 이와 같은 결과는 *B. bifidum* 자체는 면역성이 약하며 체내에서 단지 면역활성보조제 (adjuvant)로만 작용함을 시사한다.

### 3) 초미세구 Bifidobacteria의 구강투여가 항체 합성에 미치는 효과

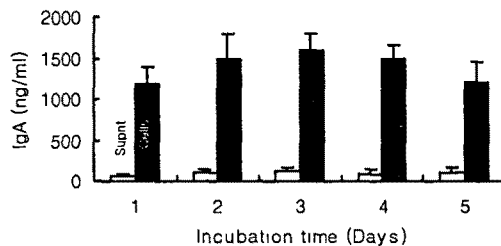
내장까지 살아있는 bacteria의 수를 증가시키기 위해서 본 연구진이 제조한 alginate로 미세구화된 *B. bifidum* (Cui et al., 2000)과 *B. bifidum* 세포를 마우스에게 4주간 2일 간격으로 구강 투여하였다. 투여량은 1회  $500 \mu\text{l}$  ( $1 \times 10^8$  cells/day)로 하였다. 4주 후 장액과 혈액에서의 항체 합성을 ELISA를 통해 관찰하였다. Fig. 12에서 보듯 혈청에서 초미세구 *B. bifidum*의 효과는 *B. bifidum* cell, 대조군 (non-feeding)에 비해 IgA의 분비량이 각각 2.5배, 5배의 증가를 보였으며 장액에서의 IgA 분비량에 대한 영향도 혈청의 경우와 유사하였다. 이상의 결과는 초미세구 *B. bifidum*의 투여가 전신면역과 점막면역에서 IgA



**Fig. 12.** Effect of peroral administration of encapsulated *B. bifidum* on intestinal and systemic IgA production. Encapsulated *B. bifidum* or intact *B. bifidum* ( $1 \times 10^9$  cells) was administered orogastrically to mouse every other day for 4 weeks. The amount of total IgA isotype was determined by ELISA as described in Materials & Methods. Samples were obtained from 4 mice. Data are means of four independent samples  $\pm$ SEM. BB, *B. bifidum*; Encap BB, Encapsulated *B. bifidum*



**Fig. 13.** Effect of peroral administration of encapsulated *B. bifidum* on numbers of total IgA-secreting cells. Encapsulated *B. bifidum* or intact *B. bifidum* ( $1 \times 10^9$  cells) was administered orogastrically to mouse every other day for 4 weeks. Number of IgA spot-forming cells were enumerated by ELISPOT assay as described in Fig. 3. Samples were obtained from 4 mice. Data are means of four independent samples  $\pm$ SEM. BB, *B. bifidum*; Encap BB, Encapsulated *B. bifidum*



**Fig. 14.** Cell wall components mediates *B. bifidum*-induced Ig secretion by MLN B cells. *B. bifidum* was cultured in MRS broth at 37°C in an anaerobic jar up to 5 days. Bifidobacteria cells and supernatants were harvested separately as indicated at X-axis. MLN B cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were cultured with bifidobacteria cells ( $1 \times 10^7$  cells/well) or the supernatants (1:5 diluted) for 7 days. Total IgA secretion was measured by ELISA. Data are means of three independent samples  $\pm$ SEM. Supnt, Supernatants from bifidobacterial culture; Cells, Cells from bifidobacterial culture.

항체 합성에 항진 효과가 있음을 보여 준다.

다음 단계에서는 초미세구 *B. bifidum*의 구강투여가 항체합성에 미치는 영향을 조사하였다. 항체합성 세포수는 역시 ELISPOT assay를 통해 결정하였다 (Fig. 13). 장액과 혈청에서의 IgA 항체량의 분비 유형과 유사하게 MLN과 spleen B cell의 경우, 초미세구 *B. bifidum*은 *B. bifidum* cell, 대조군에 비해 IgA 항체합성수를 높게 증가시켰다. 이상의 결과는 초미세구 *B. bifidum*이 항체합성 세포수를 증가시키는 기작을 통해 전체 IgA 항체 합성량을 증가시키기를 시사한다.

B cell을 자극하고 경구 투여시 IgA 합성을 자극할 수 있는 *B. bifidum*의 구체적인 특성을 알아보기 위한 일환으로 *B. bifidum*의 자극효과가 *B. bifidum* 세포자체에 의해서인지 또는 배양상등액에 의해서인지를 알아보았다. *B. bifidum* cell과 함께 배양된 spleen cell은 IgA 항체합성을 증가시켰지만 어떤 경우에도 배양상등액과 함께 배양된 spleen cell은 IgA 합성을 증가시키지 않았다 (Fig. 14). 이와 같은 결과는 *B. bifidum*에 의한 항체합성의 자극효과는 배양상등액보다는 세포자체 즉 세포막이나 세포벽의 효과가 결정적임을 보여준다.

### Ⅲ. 결 론

소와 사람의 초유에 함유된 TGF- $\beta$ 의 특성을 조사한 바, 초유에는 다량의 TGF- $\beta$ 를 함유하고 있으며 온전한 활성을 유지하고 있었다. 또한 초유 함유 TGF- $\beta$ 는 비교적 선택적으로 IgA 항체 합성을 증가시켰다. 한편 유아의 장내세균총으로 중요한 위치를 차지하고 있는 bifidobacteria는 B cell의 polyclonal activator로 작용하여 장내 IgA 항체 합성을 자극할 수 있으며 특히 TGF- $\beta$ 가 존재할 때 IgA 합성을 현저히 증가시켰다. 이와 같은 결과는 유아의 장내에서 bifidobacteria와 함께 초유나 모유를 통해 유입된 TGF- $\beta$ 는 장내 IgA 합성을 항진시킬 수 있는 등 점막면역 기능을 활성화시킬 수 있음을 시사한다.

### Ⅳ. 참고문헌

1. Cui, JH, Goh, JS, Kim, PH, Choi, SH, and Lee, BJ. (2000) Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-l-lysine microparticles. Int. J. Pharm. 210:51-59.
2. Letterio, J. J., Geiser, A. G., Kulkarni, A. B., Roche, N. S., Sporn, M. B., and Roberts, A. B. (1994). Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice. Science 264:1936-8.
3. Kim, Pyeung-Hyeun, Lars Eckmann, Wha Jung Lee, Wonkyo Han, and Martin F. Kagnoff. (1998) Cholera Toxin and Cholera Toxin B Subunit Induce IgA Switching Through the Action of TGF- $\beta$  1 J. Immunol. 160: 1198-1203.
4. Kim, Pyeung-Hyeun, and Martin F. Kagnoff. (1990) Transforming growth factor- $\beta$  1 is a costimulator for IgA production. J. Immunol. 144(6): 3411-3416.
5. Ko, EJ, Goh, JS, Lee, BJ, Choi, SH, Ki, Kim, PH. (1999) Bifidobacterium bifidum Exhibits a Lipopolysaccharide-like Mitogenic Activity for Murine B Lymphocytes J. Dairy Science 82:1869-1876.
6. Shull, M. M., I. Ormsby. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. Nature 359:693-9.