

유산균 Cell Wall 성분이 Murine Macrophage의 Nitric Oxide와 Cytokine 생성에 미치는 영향

김현주·양희진·이수원
성균관대학교 식품생명공학과

서 론

각종 발효식품 등 우리 일상생활에 유익한 유산균은 세포벽의 성분의 90% 이상이 peptidoglycan으로 구성되어 있는 그람양성균에 속한다. 이 peptidoglycan은 *N*-acetylglucosamine과 *N*-acetylmuramic acid의 2종류의 당 유도체와 L-Alanine, D-Alanine, D-Glutamic acid, Lysine 등의 아미노산으로 구성되어 있다. Okitsu-Negishi등⁽¹⁾에 의하면 cell wall은 그람 음성세균의 LPS(lipopolysaccharide)와 비슷하게 macrophage와 polymorphonuclear leukocytes(PMN)등을 활성화시켜 interleukin 1 α (IL-1 α), interleukin 1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 6(IL-6), granulocyte-stimulating factor(GM-CSF) 등과 같은 cytokine을 유도한다고 한다. 따라서 본 연구의 목적은 유산균의 cell wall을 분리하여 murine macrophage에 미치는 면역 활성화 기능을 연구하는데 있다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 유산균은 요구르트 starter에서 분리하여 API kit를 이용하여 동정하였다. 분리·동정한 유산균은 Lehman 등⁽²⁾의 방법에 따라 cell wall을 분리한 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

Macrophage의 분리는 5주령된 수컷 ICR mouse에 thioglycollate을 주사하여 분리한 대식세포는 Klimet and Remond⁽³⁾의 방법에 따라 복강대식세포를 분리하였다. 분리한 복강 대식세포는 원심분리한 후 RPMI 1640 medium에 현탁한 후 culture dish에 넣어 37 $^{\circ}$ C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 부착된 세포는 분리시킨 후 적정 농도로 조절하여 각 실험에 사용하였다.

Nitric oxide 생성능 측정은 복강대식세포 중 유산균 cell wall으로부터 분비 유도된 NO 생성량은 Ding 등⁽⁴⁾ 및 Green 등⁽⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다. 대식세포를 1 \times 10⁵cells/well의 농도로 96 well plate에 부착시킨 후 sample을 각 농도별로 첨가한 후 20시간동안 배양한 후 배양 상등액을 취하여 Griess reagent I액과 II액을 각각 50 μ l씩 첨가하고 실온에서 10분간 반응시킨 후 540nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

TNF- α 생성능 측정은 TNF- α 에 민감한 L929 fibroblast cell을 이용하여 Flick and Gifford⁽⁶⁾의 방법에 대식세포의 TNF- α 의 활성을 측정하였다. sample으로 자극된 대식세포의 배양 상등액을 취하여 L929 cell에 대한 생존율을 측정하였다. 즉 대식세포를 1 \times 10⁵cells/well의 농도로 96 well plate에 37 $^{\circ}$ C, CO₂

incubator에서 2시간동안 부착시킨 후 sample을 농도별로 첨가하여 20시간동안 배양하였다. 대식세포 배양 상등액을 부착된 L929 cell에 넣은 후 4 μ g/ml 농도의 actinomycin D 25 μ l를 가하여 총 volume이 200 μ l되도록 조절한 다음 18시간 동안 배양한 후 MTT assay하였다.

IL-1 β , IL-2, IL-6 생성능 측정은 대식세포에서 생성되는 사이토카인의 일종인 IL-1 β , IL-2, IL-6을 측정하기 위하여 sandwich ELISA를 이용하여 측정하였다. 먼저 분리한 대식세포를 1 \times 10⁵cells/well의 농도로 96 well plate에 37 $^{\circ}$ C, CO₂ incubator에서 2시간 동안 부착시킨 후 sample을 각 농도별로 첨가한 후 20시간동안 배양 후 배양 상등액을 취하여 sandwich ELISA 하였다.

결과 및 고찰

API kit 동정 결과

API 50 CHL Carbohydrate Test Kit (bioMerieux Co., France)를 이용하여 간이 동정하였다. 그 결과 *Lactobacillus helveticus* SGU 0011, *Lactobacillus plantarum* SGU 0010, *Streptococcus thermophilus* SGU 0021, *Lactobacillus casei* SGU 0020를 분리하였다.

NO (nitric oxide) 생성능 측정

NO는 혈관계에서 혈관 이완과 혈류를 조절하는 신호 전달자로서 작용하며 면역계에서는 외부 침입한 미생물이나 내부 종양세포의 사멸에 영향을 주는 면역 방어 분자로서 인식되고 있다. 따라서 본 연구에서는 분리한 murine macrophage로부터 nitric oxide의 분비량을 측정한 결과 대조군은 4.4 μ M의 nitric oxide를 분비하는데 비하여 cell wall 5mg/ml의 농도에서 *S. thermophilus* SGU 0021에서는 7.7 μ M, *L. helveticus* SGU 0011에서는 6.2 μ M, *L. casei* SGU 0020에서는 5.8 μ M를 분비하였고, *L. plantarum* SGU 0010에서는 3.8 μ M 을 분비하였다(Fig. 1). 4가지 균주중 *S. thermophilus* SGU 0021이 murine macrophage로부터 가장 많은 양의 NO를 생성하는 것으로 나타났다.

TNF- α 생성능 측정

TNF- α 를 분비량을 측정한 결과, 분리한 유산균 cell wall 5mg/ml의 농도에서 *L. casei* SGU 0020에서는 82.7%, *L. helveticus* SGU 0011에서는 79.3%, *L. plantarum* SGU 0010에서는 62.0%, *S. thermophilus* SGU 0021에서는 81.6%의 L929 생존율은 보였다(Fig. 2). 4균주 모두 LPS와 비슷한 수준의 TNF- α 를 분비함을 하였다. Fang 등⁽⁷⁾에 따르면, 10⁸CFU/ml의 농도의 heat-inactivated *Bifidobacteria adolescentis* 균주에서도 TNF- α 의 분비량을 ELISA로 측정된 결과 약 4.06ng 정도의 분비 유도능력이 있다고 보고된 바 있다.

IL-1 β 생성능 측정

Fang 등⁽⁷⁾의 연구 결과에 따르면, 10⁸CFU/ml의 농도의 heat-inactivated *Bifidobacteria breve* 균주에서 IL-1 β 의 분비량을 ELISA로 측정된 결과 19.4pg라고 보고하였다. 이에 비하여 유산균으로부터 분리한 cell wall 5mg/ml의 농도에서 분비한 IL-1 β 의 분비량은 *L. casei* SGU 0020에서는 7.0ng, *L. helveticus*

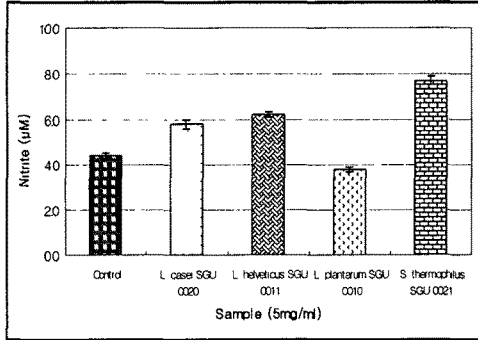


Fig. 1. *In Vitro* effect of cell wall on NO production from Macrophages.

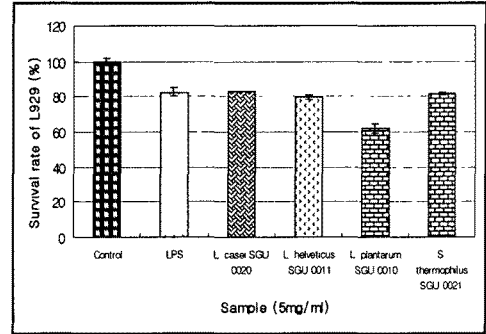


Fig. 2. *In Vitro* effect of cell wall on TNF- α production from Macrophage.

SGU 0011에서는 6.3ng, *L. plantarum* SGU 0010에서는 6.3ng 분비하였고, *S. thermophilus* SGU 0021에서는 5.1ng으로 대조군에서 4.0ng을 분비하였는데 비하여 분리한 유산균의 cell wall을 처리한 군에서 IL-1 β 분비량이 많았다(Fig. 3).

IL-2 생성능 측정

T cell의 분화 및 증식은 cytokine의 생성에 의해 좌우되는데 특히 T cell 성장인자인 IL-2가 대표적이다. 따라서 본 연구에서는 유산균 cell wall의 자극으로 murine macrophage에서 분비되는 IL-2를 정량한 결과, 대조군에서 1.6ng의 IL-2를 분비하였고, 유산균으로부터 분리한 cell wall 5mg/ml의 농도에서 분비한 IL-2의 분비량은 *L. casei* SGU 0020에서는 1.9ng, *L. helveticus* SGU 0011에서는 1.6ng, *L. plantarum* SGU 0010에서는 1.6ng 분비하였고, *S. thermophilus* SGU 0021에서는 1.6ng을 분비하였다(Fig. 4). 균주에 따른 murine macrophage로부터 분비되는 IL-2의 분비량을 측정된 결과 균주 간 미미한 차이는 있었으나 큰 차이가 없었다.

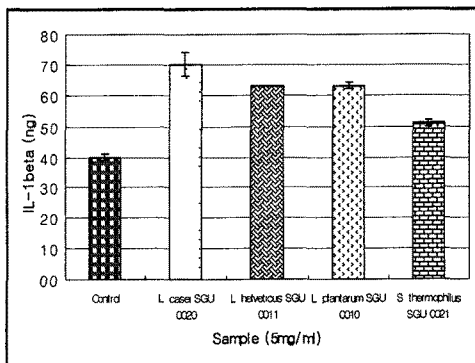


Fig. 3. *In Vitro* effect of cell wall on IL-1 β production from Macrophages.

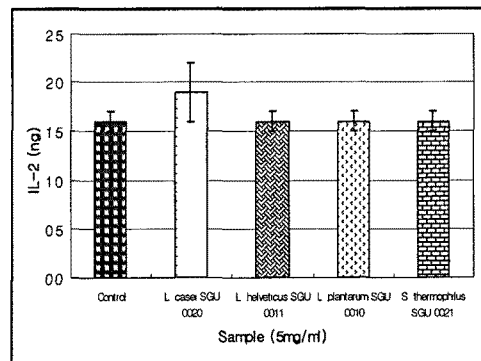


Fig. 4. *In Vitro* effect of cell wall on IL-2 production from Macrophages.

IL-6 생성능 측정

균주에 따른 murine macrophage로부터 분비되는 IL-6의 분비량을 측정한 결과 대조군에서 1.4ng의 IL-6를 분비하였고, 유산균으로부터 분리한 cell wall 5mg/ml의 농도에서 분비한 IL-2의 분비량은 *L. casei* SGU 0020에서는 2.2ng, *L. helveticus* SGU 0011에서는 2.1ng, *L. plantarum* SGU 0010에서는 2.0ng 분비하였고, *S. thermophilus* SGU 0021에서는 1.7ng으로 분비하였다(Fig. 5). Miettinen 등⁽⁸⁾에 의하면 IL-6의 분비량은 2ng에서 6ng로 유산균 균주에 따라 다르다고 보고하였다.

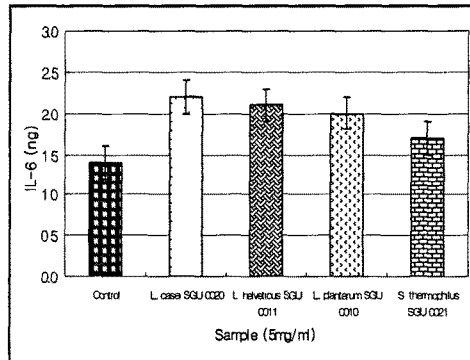


Fig. 5. *In Vitro* effect of cell wall on IL-6 production from Macrophage.

요 약

분리동정한 유산균의 cell wall은 murine macrophage를 활성화 시켜 NO와 cytokine을 생성함을 확인하였다. 그 결과 NO 생성량에 있어서는 *L. casei* SGU 0020에서 가장 높은 분비를 유도하였으며, TNF- α 의 분비량은 *S. thermophilus* SGU 0021의 균주에서 가장 높았다. 그러나 cytokine인 일종인 IL-1 β , IL-2, IL-6에 있어서는 *L. casei* SGU 0020에서 가장 많은 IL의 분비를 유도하였다.

참고문헌

1. Okitsu-Negishi, S. et al. (1996) *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **78**(1) : 30-40.
2. Lehman T. J. et al. (1983) *Arthritis Rheum.*, **26**(10) : 1259-65.
3. Klimetzek, V. and Remold H. G. (1980) *Cell Immunol.*, **53**(2) : 257-66.
4. Ding, A. H. et al. (1998) *J. Immunol.*, **141**, 2407-2412.
5. Green L. C. et al. (1982) *Anal. Biochem.*, **126**, 131-136.
6. Flick, D. A. and Grifford, G. E. (1984) *J. Immunol.*, **68**, 167-175.
7. Fang, He. et al. (2002) *Microbiol. Immunol.*, **46**(11). 781-785.
8. Miettinen, M. et al. (1996) *Infect Immun.*, **64**(12) : 5403-5405.