

Bifidobacterium bifidum SL-21의 세포벽 조제성분에 의한 *in vitro* 골수세포 증식활성

신명숙 · 유광원¹ · 신광순 · 이 호*

경기대학교 식품생물공학과, ¹청주과학대학 김치식품과학과

In vitro Bone Marrow Cell Proliferation of Cell Wall Preparation from *Bifidobacterium bifidum* SL-21

Myong-Sook Shin, Kwang-Won Yu¹, Kwang-Soon Shin, and Ho Lee*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University

¹Department of Kimchi and Food Science, Chongju National College of Science and Technology

Bifidobacterium species isolated from infant feces were fractionated into cell wall, cytosol, and extracellular preparations of culture broth, and each fraction was examined for Peyer's patch-mediated bone marrow cell proliferation activity *in vitro*. Cell wall preparation of *B. bifidum* SL-21 (CWP) showed the highest bone marrow cell proliferating activity dose dependently, and enhanced production of cytokines, such as hematopoietic growth factor (GM-CSF), IL-2, and IL-6, in culture supernatant of Peyer's patch cells. After treatment with lysozyme, CWP was fractionated, among which intermediate molecular-weight fraction (30-50 kDa) showed significantly high bone marrow cell proliferating activity. These results suggest CWP of *B. bifidum* SL-21 effectively activates lymphocytes in Peyer's patch, and several cytokines, possibly playing important role in enhancement of systemic immune system, were produced by activated lymphocytes.

Key words: *Bifidobacterium bifidum*, bone marrow cell proliferation, Peyer's patch, cell wall preparation, immune system

서 론

*Bifidobacterium*은 모유를 섭취하는 유아의 장내 90% 이상을 차지하는 대표적인 장내 상재세균이지만 숙주의 영양상태, 연령 및 질병의 유무에 따라 그 분포에 영향을 받으며 일반적으로 연령의 증가와 함께 그 수가 감소하는 장내 유용균으로서 (1), 숙주에 유해한 대사산물을 생성하지 않고 다양한 장내 환경의 변화를 통하여 유해 세균의 증식을 억제함으로써 장내 균총을 개선시키는 역할을 한다고 알려져 있다(2,3). 이들의 대사산물로서 생성된 젖산, 초산 등과 같은 유기산은 인체에 해로운 부패균, 병원성 세균 등의 성장을 억제하는 역할을 하며 이들이 생성한 독소를 무독화시키는 것으로 알려져 있다(4,5). 따라서 모유 영양아에 있어 설사 등의 질병 이환율이 낮은 까닭은 *Bifidobacterium*이 장내 우세 균총으로 자리 잡아 장내의 유익균으로 작용함으로써 감염의 영향을 덜 받는 것으로 추정되고 있다(2). 이들은 또한 일반적인 유산균처럼 비타민의 합성

(6), 혈중 콜레스테롤의 저하작용(7), 면역증강작용 및 항암효과 등(8,9)의 다양한 생리활성을 나타내고 있어 그 기능적 측면으로 인하여 넓은 의미에서 유산균 범주에 포함시키기도 한다.

한편, *Bifidobacterium*의 면역증강 효과에 관한 최근의 연구에 의하면, *Bifidobacterium adolescentis* M101-4의 수용성 획분이 비장세포와 Peyer's patch 세포에 대해 높은 mitogen 활성을 유발하는 것으로 보고 되고 있으며(10), 유제품 발효 시 이용되는 상업적인 *Bifidobacterium*에 의해 림프질의 항체생산 증강 및 IL-6, TNF- α 같은 cytokine 생산 증가를 유도한다는 보고도 있다(11). 또한 Park 등(12)은 인간 유래의 *Bifidobacterium*에 의해 마크로파지의 hydrogen peroxide, nitric oxide 생산 및 cytokine 생산 증가 등을 보고한 바 있어 *Bifidobacterium*에 의한 다양한 면역 증강 효과가 점차 증명되고 있으며 *Bifidobacterium*의 기능성 측면에 대한 연구에 많은 관심이 모아지고 있다. 이와 같은 연구결과로부터 *Bifidobacterium*이 선천성 면역계(백혈구, 대식세포 탐식능 증가 및 자연살해세포 활성화)와 후천성 면역계(림프구 증식 및 항체생산 증가)의 증강작용 등 다양한 면역작용(13)을 나타내어 인체의 전체 면역계 활성화에도 중요한 기여를 한다고 판단되었으며, 특히, *Bifidobacterium*이 유제품 및 생균 형태로 구강을 통해 인체에 공급되어지므로 장관면역계를 자극할 수 있다는 충분한 가능성이 예견되었다.

따라서 본 연구에서는 유아의 분변으로부터 분리한 6종의 *Bifidobacterium*속을 대상으로 장관면역 활성화를 통한 골수세

*Corresponding author: Ho Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, San 94-6 Ewi-dong, Youngtong-gu, Suwon, Gyeonggi-do 442-760, Korea
Tel: 82-31-249-9653
Fax: 82-31-253-1165
E-mail: hlee@kyonggi.ac.kr

포 증식활성을 세포벽, 세포질 및 배양 상등액의 조제성분으로 분획하여 측정하고 가장 활성이 높은 균주를 분리, 동정하였다. 그리고 골수세포 증식에 관여하는 다양한 cytokine을 측정하여 장관면역계를 경유한 전신면역계 활성화에 미치는 영향을 간접적인 방법으로 살펴봄으로써 Bifidobacterium속의 세포 성분이 향후 기능성 식품 및 의약품 등으로 이용할 수 있는 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

골수세포 증식활성을 측정하기 위한 시약으로서 RPMI 1640 배지, funzone®, penicillin/streptomycin은 Gibco BRL(Grand Island Co., NY, USA), Hank's balanced salt solution(HBSS), fetal bovine serum(FBS), p-nitrophenylphosphate disodium salt (p-NPP) 및 lipopolysaccharide(LPS from Escherichia coli O127:B8)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 골수세포 증식활성 측정 시 사용된 Alamar Blue™는 Biosource사(Sacramento, CA, USA), IL-2, IL-6, GM-CSF 등 cytokine 측정 시 사용된 OptEIA™은 PharMingen사(San Diego, CA, USA)의 제품을 사용하였다. 세포벽 획분의 수용화 후 분자량별 분획의 조제에 사용된 한외여과막은 Millipore사(Billerica, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 그밖에 시약은 시판되는 1급 이상의 분석용 시약을 사용하였다. 한편, 본 실험에 사용된 기기는 한외여과장치(Ultrafree-15, Millipore), 초음파 분쇄기(Ultrasonic Processor, Sonics and Material Inc., Newtown, CT, USA), 형광분석기(Luminescence Spectrophotometer, Perkin Elmer Limited, Surrey, UK) 및 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)였다.

사용균주 및 실험동물

본 실험에 사용한 Bifidobacterium균주 6종은 모두 20-30개월의 건강한 유아의 분변 기원의 종으로 균주의 분리를 거친 후 사용하였다. 한편 본 실험에 사용된 실험동물은 7주령의 웅성 C3H/He계 마우스를 (주)대한바이오텍(충북)로부터 구입하여 사용하였으며, 24±1°C 및 55% 상대습도로 조절된 사육조 내에서 24-48시간 적응토록 하였다. 이때 사료(대한바이오텍사)와 물은 자유 급식시켰다.

Bifidobacterium species의 세포벽, 세포질 및 배양 상등액 획분의 조제

6종의 Bifidobacterium을 MRS 액체 배지에서 혐기적 조건으로 37°C, 24시간 배양한 후 4°C, 5,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 균체를 회수하고, 생리식염수(0.85% NaCl)용액으로 3회 세척한 후 증류수로 현탁하였다. 현탁한 균체를 초음파 분쇄기를 이용하여 세포벽을 파괴한 후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여, 세포질(cytosol preparation)과 세포벽 획분(cell wall preparation, CWP)을 얻었다. 또한 배양 상등액 성분은 부피 비율 4배의 에탄올을 첨가하여 교반하면서 실온에서 하룻밤 방치하였으며, 형성된 침전물들을 4°C, 8,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 회수하고 배양 상등액 중 고분자 물질 획분(extracellular preparation)으로 조제하였다. 이렇게 얻어진 각 조제물은 동결건조한 후 이들을 일정 농도의 용액으로 제조하여 골수세포 증식활성 측정용 시료로 사용하였다.

균주의 동정

유아의 분변으로부터 분리된 6종의 Bifidobacterium속 중에서 가장 활성이 높은 Bifidobacterium속에 대하여 SEM(scanning electron microscope)의 전자현미경에 의한 형태학적인 관찰(14), 그람염색, 산소요구성, 운동성, 발효학적 특성 및 다양한 기질에 대한 효소가수분해 활성 등의 생화학적 특성을 검사하였다. 그리고 최종적으로 16S rDNA를 분리한 후 836 bp에 해당하는 rDNA의 부분적인 염기서열을 분석하여 상동성을 확인하였다(15).

Bifidobacterium bifidum SL-21 세포벽 획분의 수용화 및 분자량별 분획

가장 높은 활성을 보인 불용성인 B. bifidum SL-21의 세포벽 성분을 수용화시키기 위하여 회수한 세포벽 조제물을 lysis buffer(25% sucrose, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 현탁시킨 후, 1% 농도로 lysozyme을 첨가하였다. 37°C에서 16시간 동안 반응시켜 수용성 획분만을 회수하였고, 한외여과 장치를 이용하여 30 kDa 이하, 30-50 kDa 및 50 kDa 이상의 분자량별 획분으로 분획하였다.

골수세포 증식활성

장관면역 활성은 Hong 등(16)의 방법에 의거하여 다음과 같이 측정하였다. 7주령 C3H/He 마우스를 경추탈구하여 치사시킨 후 소장벽에 부착되어 있는 Peyer's patch를 잘라내어 Hank's balanced salt solution(HBSS)이 담겨져 있는 세포배양용 petridish에 옮기고, 금속체(100 mesh)를 Peyer's patch 위에 놓은 다음, 주사기 고무마개로 누르면서 Peyer's patch의 조직 내 면역세포를 방출시켰다. 이 세포 현탁액을 금속체(200 mesh)로 여과시키고, HBSS로 세척한 후 RPMI 1640 배지를 이용하여 세포 농도를 2.0×10^6 cells/mL로 조정하여 세포용액을 조제하였다. 이를 96 well plate에 200 μ L 씩 분주한 후 일정 농도의 시료를 20 μ L 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 5일간 배양하였다. 이 배양 상등액을 취하여 골수세포 증식활성 측정용으로 사용하였다. 한편, 골수세포액의 조제는 동일종의 마우스 대퇴부 뼈를 적출한 후 주사기 바늘을 이용하여 HBSS를 뼈 속으로 넣어 골수세포를 회수한 후, 위와 같이 여과, 세척하고 세포농도를 2.5×10^5 cells/mL로 조정하여 96 well plate에 100 μ L 씩 분주하였다. 그 후 Peyer's patch cell과 시료와 반응시킨 배양상등액 50 μ L와 RPMI 1640 배지를 50 μ L를 각각 plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 6일간 배양하였다. 골수세포 증식활성 측정은 Alamar Blue™ assay 법(17)을 이용하였다. 즉, 골수세포의 배양 종료 18시간 전에 Alamar Blue™ 용액 20 μ L를 첨가하여 반응시킨 후에, 골수세포의 증식도를 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 형광분석기로 측정하였다. 골수세포 증식활성화 정도는 시료 대신 생리 식염수를 사용한 대조구와 시료 처리구의 골수세포의 증식도를 비교하여 측정하였다.

Cytokine류 측정

Cytokine 측정은 sandwich ELISA법(18)을 이용하였다. 방법을 간단히 요약하면, 분석 하루 전, anti-mouse IL-2, IL-6 및 GM-CSF mAb(monoclonal antibody)를 coating buffer(0.1 M Carbonate, pH 9.5)에 섞어 96 well ELISA plate(Nunc-Immuno™ 96 Microwell™ plate, Nunc™, Roskilde, Denmark)에 100 μ L씩 분주하고 4°C에서 하룻밤 반응시켜 well 표면에 부착시켰다. 다음 날 plate를 PBST(PBS-0.05% Tween 20)로 3회 세척 후,

assay diluent(PBS-10% FBS)를 200 μ L씩 분주하고 실온에서 1 시간 방치하여 항체가 붙지 않은 well 표면을 blocking하였다. 이후 PBST로 각 well을 3회 세척하고 표준물질인 recombinant mouse IL-2, IL-6 및 GM-CSF를 연속 희석한 용액 또는 5일간 배양한 Peyer's patch 반응 상등액인 시료와 assay diluent를 50 μ L씩 분주하여 실온에서 90분 동안 배양시켰다. 반응 상등액을 제거하고 assay diluent를 50 μ L씩 분주하여 well 표면을 30분 동안 blocking시킨 후, PBST로 5회 세척하였다. 이렇게 처리된 plate에 biotinylated anti-IL-2, IL-6 및 GM-CSF mAb와 avidin-horseradish peroxidase의 conjugate를 assay diluent에 희석하여 분주하고 1시간 동안 반응시켰다. 이후 각 well에 존재하는 상등액을 제거하고 PBST로 7회 세척한 후 TMB substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-hydrogen peroxide, Pharmingen) 첨가하여 30분 배양하였으며, 50 μ L의 2 N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중지하고 405 nm에서 Microplate Reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

골수세포 증식 균주 분리, 동정 및 활성화 획분의 분리

발효 유제품 및 생균 형태로 인체에 공급되어 다양한 생체 조절효과를 나타낸다고 알려진 유아의 분변으로부터 분리한 6종의 *Bifidobacterium*속을 대상으로 골수세포 증식활성화 여부

Table 1. Bone marrow cell proliferating activities of cell wall, cytosol and extracellular preparation of culture broth from *Bifidobacterium* species

Microorganism	Fraction	Fluorescence intensity ¹⁾
Control ²⁾	Saline	61 \pm 7
	LPS	223 \pm 15 ^{*,3)}
	CWP ⁴⁾	568 \pm 48*
<i>B. SL-21</i>	CS	100 \pm 18
	EC	98 \pm 4*
	CWP	270 \pm 22*
<i>B. SL-22</i>	CS	80 \pm 12
	EC	109 \pm 15
	CWP	178 \pm 28
<i>B. SL-23</i>	CS	79 \pm 2*
	EC	66 \pm 4*
	CWP	127 \pm 19
<i>B. SL-24</i>	CS	81 \pm 2*
	EC	76 \pm 4*
	CWP	241 \pm 14*
<i>B. SL-25</i>	CS	80 \pm 4*
	EC	101 \pm 5*
	CWP	154 \pm 27
<i>B. SL-26</i>	CS	83 \pm 8*
	EC	88 \pm 7*

¹⁾The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay. Each value was expressed as the mean \pm SE of quadruplicate assays.

²⁾For the control, saline without sample, and LPS as the positive control (100 μ g/mL).

³⁾*, p<0.05: Significant difference between the saline control and the sample.

⁴⁾CWP: cell wall preparation, CS: cytosol preparation, EC: extracellular preparation, and each final concentration was 100 μ g/mL.

에 대하여 세포벽, 세포질, 배양 상등액으로 분획하여 검토하였다. MRS 배지에서 배양한 각각의 *Bifidobacterium*속을 초음파 분쇄기로 처리하여 세포벽을 파쇄한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액과 침전물로 분리하였으며 각각을 세포질 획분과 세포벽 획분으로 사용하였다. 또한 각 *Bifidobacterium*속을 배양하여 얻어진 배양 상등액 중 고분자 물질을 분리하여 배양 상등액 획분으로 사용하였다. 각 획분들을 동결건조 한 후, 100 μ g/mL 농도로 시료 용액을 조제하고 골수세포 증식 활성화 정도를 측정하였다. 그 결과, Table 1에 나타난 바와 같이 세포질이나 배양 상등액 획분에서는 골수세포 증식활성이 거의 관찰되지 않은 반면 각 균주의 세포벽 획분에서는 종에 따른 차이가 있었으나 상대적으로 높은 골수세포 증식활성을 보였다. 특히 *Bifidobacterium SL-22*와 *Bifidobacterium SL-25*의 세포벽 획분의 경우에는 각종 면역 활성화능이 우수하다고 알려진 LPS 수준과 유사한 높은 활성을 보였으며, *Bifidobacterium SL-21* 세포벽 획분의 경우에는 LPS보다 매우 높은 골수세포 증식활성을 보임으로써 골수세포 증식 활성화에 중요하게 관여함을 알 수 있었다.

가장 우수한 활성을 보였던 *Bifidobacterium SL-21*의 균주를 대상으로 그래프염색, 산소요구성, 운동성, 발효학적 특성 및 다양한 기질에 대한 효소가수분해 활성 등의 생화학적 관찰(결과 생략)과 SEM에 의한 전자현미경 관찰을 통하여 *B. bifidum*의 전형적인 분기된 형태를 갖는 유사성을 확인하였으며(결과 생략) 보다 정확하게 균주를 확인하기 위하여 활성화균주의 16S rDNA를 분리하여 부분적으로 836 bp에 해당하는 염기배열을 분석한 결과, *B. bifidum* ATCC 29521과 99%의 상동성을 보여 주어(결과 생략) 유아의 분변으로부터 분리된 골수세포 증식활성의 *Bifidobacterium SL-21*의 균주는 *B. bifidum*임을 알 수 있었다.

6종의 *Bifidobacterium*속 획분들의 골수세포 증식활성 결과 가장 높은 활성을 보인 *B. bifidum SL-21*의 균주 배양 시간에 따른 세포벽 획분의 활성과의 상관관계를 알아보기 위하여 배양 시간에 따른 세포벽 획분을 조제하고 동일 농도에서 활성을 측정 한 결과, 균체 성장 여부와 유사하게 배양 24시간 이후부터

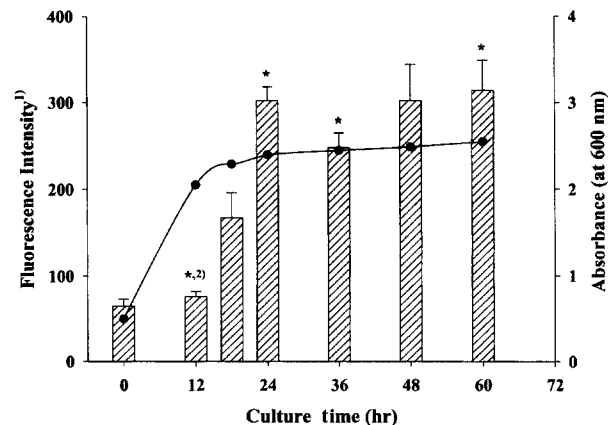


Fig. 1. Effect of the cell wall fractions prepared by culture time of *B. bifidum* SL-21 on bone marrow cell proliferating activity.

¹⁾The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay. Each value was expressed as the mean \pm SE of quadruplicate assays (sample: 100 μ g/mL). ²⁾*, p<0.05: Significant difference between 0 hr and the other culture time sample.

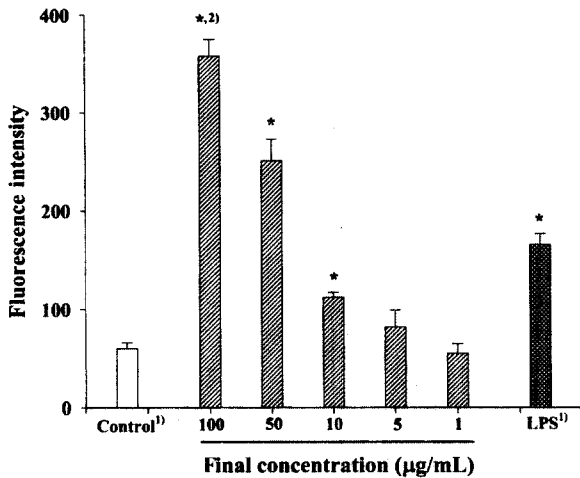


Fig. 2. Effect of the CWP concentration on bone marrow cell proliferating activity.

¹⁾For the control, saline without sample, and LPS (lipopolysaccharide *Escherichia coli* from O127:B8) as the positive control. ^{2)*}, $p < 0.05$: Significant difference between the control and the sample.

거의 일정한 활성을 보였다(Fig. 1). 한편 *B. bifidum* SL-21 세포벽 획분의 농도별 장관면역 활성을 측정된 결과, 5 µg/mL의 저농도에서도 대조군보다 높은 활성의 증가가 관찰되었으며 시료의 농도에 따라 활성이 증가하는 농도 의존적인 활성 경향을 나타냄을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 또한 Yasui와 Ohwaki (19)는 *B. breve*의 세포벽 획분을 첨가한 균에서 높은 Peyer's patch cell의 증식이 일어났다고 보고하였는데, 본 실험에서는 *B. bifidum* SL-21의 세포벽 획분이 대조군인 LPS보다도 매우 높은 활성을 보여 다른 결과를 나타내었다.

B. bifidum SL-21 세포벽 획분의 수용화에 의한 골수세포 증식활성

B. bifidum SL-21의 세포벽 획분은 높은 골수세포 증식활성을 보였으나, 대부분 물에 녹지 않는 불용성 획분으로 이후의 화학적 성분 규명 실험에 다소 문제가 있을 것으로 사료되어 세포벽 획분의 수용화를 실시하였다. *B. bifidum* SL-21의 세포벽 획분을 lysozyme 처리하여 세포벽을 구성하는 peptidoglycan의 주쇄를 절단시켜 수용성 획분을 회수하였다. 회수한 수용성 획분을 한외여과 장치를 이용하여 분자량별로 30 kDa 이하, 30-50 kDa 및 50 kDa 이상의 획분으로 분획하였다. 각 분자량별 획분을 대상으로 골수세포 증식활성을 측정된 결과, 분자량 30-50 kDa인 획분에서 가장 높은 골수세포 증식활성을 나타냈고 나머지 획분은 상당히 낮은 활성이 관찰되었다(Table 2). 최근 Hosono 등(10)은 *B. adolescentis* M101-4를 수용화시켜 얻은 분자량 60-2,460 kDa 물질에서 가장 높은 splenocyte 증식을 나타낸다고 보고한 바 있다. 또한 본 실험에서는 가용화 후 분획한 30-50 kDa의 획분이 불용성의 세포벽 조제성분 보다 낮은 활성을 나타내고 있는데 이것은 아마도 세포벽의 solid state 시료가 Peyer's patch를 자극하는데 있어 더 유효하지 않나 추정되며 이것과 비슷한 예로 담자균류 세포벽인 β-glucan의 경우 solid state로 훨씬 더 면역세포를 활성화한다는 보고를 들 수 있다(20). 따라서 불용성 세포벽에 비해 활성은 낮지만 대조군보다 높은 활성을 보인 30-50 kDa의 수용성 획분은 향후 *B. bifidum* SL-21 세포벽의 활성성분 정제 및 활성성분의 분석을 가능케

Table 2. Bone marrow cell proliferating activities of the different molecular-weight range fractions prepared after solubilization from the CWP

Molecular-weight range fraction	Fluorescence intensity (Mean ± SE)
Saline control	77 ± 9
LPS control ¹⁾	298 ± 20 ^{2)*}
CWP ³⁾	539 ± 40 [*]
>50 kDa	146 ± 22
30-50 kDa	276 ± 30 [*]
<30 kDa	88 ± 9 [*]

¹⁾For the control, saline without sample, and LPS as the positive control (100 µg/mL). ^{2)*}, $p < 0.05$: Significant difference between the saline control and the sample. ³⁾CWP: cell wall preparation, and the final concentrations of CWP and other fractions were 100 µg/mL.

하는 수용성 획분으로서 의의를 가지고 있어, 향후 활성본체의 구조적 규명에 유용할 수 있으리라 기대된다.

B. bifidum SL-21 세포벽 획분의 장관면역계-경유 골수세포 증식활성의 특성

골수는 다양한 면역세포들이 유래하고 성숙하는 장소이며, 면역계의 백혈구를 포함한 적혈구, 혈소판 등 혈액 내 대부분의 세포들은 궁극적으로 골수 내 조혈모세포(hematopoietic stem cell)라는 동일한 전구세포에서 생성되어 전신을 순환하며 각종 생체반응을 수행하므로, 골수세포의 증식은 면역계에서 매우 중요하다고 할 수 있다(21). 그러나 본 실험방법의 특성상 Peyer's patch 배양 상등액으로 골수세포의 증식을 유도하므로 Peyer's patch 배양 상등액에 존재한 시료가 직접 골수세포를 증식시킬 수 있다. 따라서 본 실험 결과에서 나타난 골수세포 증식이 직접적인 시료와의 반응에서 기인된 것인지, 장관면역계를 통한 증식활성인지를 알아보기 위하여 *Bifidobacterium*속의 세포벽 획분을 직접 골수세포와 반응시켜 보았다. 그 결과, 시료가 Peyer's patch를 매개로 한 것이 직접 골수세포와 반응시킨 것에 비하여 높은 골수증식 활성을 나타냈다. 따라서 골수세포 증식활성은 *B. bifidum* SL-21 세포벽이 직접 골수세포에 작용한 것이 아니고, 장관점막림프조직 Peyer's patch를 통해 골수세포 증식이 이루어짐을 확인하였다(Fig. 3).

B. bifidum SL-21 세포벽 획분의 Peyer's patch에서의 cytokine 생산

Cytokine은 면역세포에서 분비되는 용해성 단백질로 자신이나 타 세포의 특성과 작용을 변화시킬 수 있는 활성물질이다(21). 면역세포에서 분비되는 각종 cytokine은 타 면역세포의 기능조절과 신호전달에 중요한 역할을 하며 면역세포 상호간에 복잡한 cytokine network을 형성하여 전체 면역계의 반응과 효율화에 공헌한다고 알려져 있다. 최근 한약재로부터 추출한 면역 활성성분에 의해 Peyer's patch의 T cell을 활성화시켜 IL-6 및 GM-CSF 같은 조혈계 세포의 성숙 및 분화에 필요한 cytokine을 생산함으로써 골수세포를 증식시킨다는 연구결과(16) 등에서 장관면역 활성을 통한 전신 면역계 활성화에 대한 예측과 가능성을 제시할 수 있는 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 실험에서도 골수세포 증식활성의 원인을 밝히기 위하여 Peyer's patch 세포와 시료와의 반응을 통해 얻어진 배양상등액의 cytokine을 분석하고자 하였다.

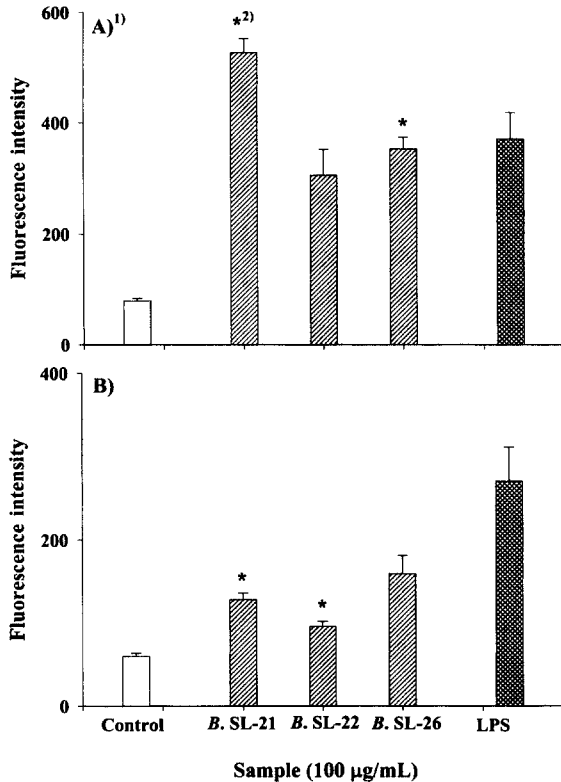


Fig. 3. Comparison of A Peyer's patch-mediated effect and B direct effect of the cell wall preparations from *Bifidobacterium* sp. on bone marrow cell proliferation.

¹⁾A after Peyer's patch cells incubated with the sample, the resulting supernatant incubated with bone marrow cells, B: the sample directly incubated with bone marrow cells without reaction with Peyer's patch cells. ²⁾*, p<0.05: Significant difference between the control and the sample.

이전의 결과에서 *B. bifidum* SL-21 세포벽 획분과 반응시킨 Peyer's patch 배양 상등액이 높은 골수세포 증식능력을 보인 것은 시료와 반응한 Peyer's patch 세포가 골수세포의 증식을 유도하는 특정 cytokine들을 분비하였음을 의미하는 것으로 이를 확인하기 위해 Peyer's patch 배양 상등액 중에 존재하는 각종 cytokine류의 함량을 sandwich ELISA 방법(16)으로 측정하였다. 그 결과, 골수세포 증식인자인 GM-CSF는 *B. bifidum* SL-21 세포벽 획분 100 µg/mL 농도에서 양성 대조군인 LPS에 비해 3배 이상의 매우 높은 생산 증가가 관찰되었다(Fig. 4). 한편, Peyer's patch 내 T cell 등 면역세포의 자극에 의해 분비될 것으로 기대되는 IL-2와 IL-6 역시 *B. bifidum* SL-21 세포벽 획분 첨가에 의해 높은 생산이 유도되었다. 또한 GM-CSF, IL-2 및 IL-6의 생산은 모두 *B. bifidum* SL-21 세포벽 성분내 대해 농도 의존적인 생산 경향을 나타내었다(Fig. 4). *B. bifidum* SL-21 세포벽의 수용성 획분에 의한 cytokine은 불용성인 *B. bifidum* SL-21 세포벽 성분보다는 낮은 활성을 나타내지만, 분자량 30-50 kDa 획분에서 비교적 높은 GM-CSF, IL-6 및 IL-2 생산 증가가 확인됨으로서 Peyer's patch에 의한 골수세포 증식활성 결과(Table 2)와 일치하였다(Table 3).

이 같은 결과로부터 *B. bifidum* SL-21 세포벽 획분은 장관면역계 Peyer's patch로부터 GM-CSF와 IL-6 등의 hematopoietic growth factor로서의 cytokine류의 분비를 촉진한다는 결과를 얻을 수 있었다. 또한 Peyer's patch는 주로 T 세포와 B세포로 구

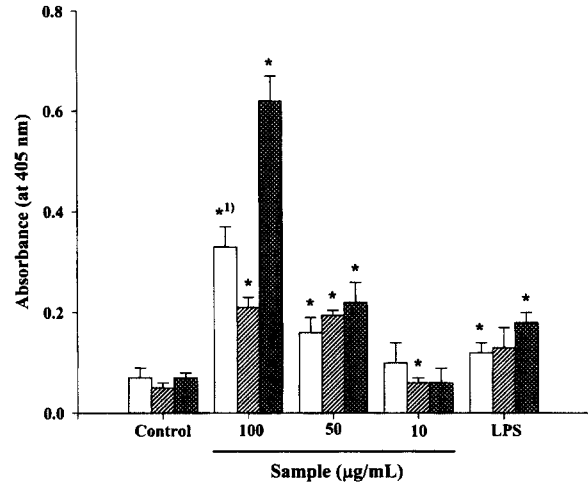


Fig. 4. Effect of the CWP on cytokines production in the culture supernatant of Peyer's patch cells.

Peyer's patch cells were obtained from C3H/He mice (n=4), and pooled and cultured at a density of 4×10^5 cells/mL with different concentrations of the cell wall fraction from *B. bifidum* SL-21 for 5 days *in vitro*. Each resulting cell-free supernatant was subjected to ELISA for IL-2, IL-6, and GM-CSF. ¹⁾*, p<0.05: Significant difference between the control and the sample. □: Content of interleukin-2 (IL-2), ▨: Content of IL-6, ▩: Content of GM-CSF (granulocyte and monocyte-colony stimulating factor).

성되어져 있고 특히, T 세포는 colony-stimulating factor(CSF)와 다양한 cytokine의 중요한 공급원으로 알려져 있기 때문에(22), *B. bifidum* SL-21 세포벽 획분에 의한 Peyer's patch의 활성화는 주로 T 세포의 활성화에 기인하는 것으로 보이며 결론적으로 Peyer's patch로부터 IL-6와 GM-CSF 등의 hematopoietic growth factor의 분비에 중요하게 관여되어 있음을 추정할 수 있었다. 또한 IL-6와 같은 cytokine류의 분비는 순환계 면역세포에서도 중요한 역할을 하기 때문에(23), Peyer's patch의 활성화는 골수세포 증식을 유도할 뿐 아니라 이들 cytokine이 전신을 순환하며 타 면역세포를 자극하여, 결국 전신면역계의 활성화에도 기여할 것으로 예상되며, 이러한 추정은 Fig. 3의 결과에서 제시한 것처럼 시료를 Peyer's patch와 반응시켜 회수한 상등액을 통하여서만 골수세포가 증식되고 상등액에 포함될 수 있는 시료와 골수세포의 직접적인 반응으로서 골수세포가 증식되지 않기 때문에 결국 시료의 자극으로 생산된 cytokine류, 특히 확인된 cytokine류가 전신순환 면역계에 영향을 줄 수 있는 종류라는 점과 전신순환 면역계의 일종인 조혈세포를 자극하였다는 점에서 전신순환 면역계에 상당한 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

인간의 장내 상재 세균이며 인간에게 다양한 건강 증진 효과를 부여하는 것으로 알려진 *Bifidobacterium*속을 유아의 분변으로부터 분리하여 세포질, 세포벽 및 배양액의 고분자 획분을 대상으로 *in vitro*에서 장관면역계를 경유한 골수세포 증식활성을 검토하였다. 분리한 6종의 *Bifidobacterium*속 중에서 *Bifidobacterium* SL-21의 세포벽 성분(CWP)이 농도 의존적으로 가장 높은 골수세포의 증식을 나타내었다. 한편, 골수세포 증식은 Peyer's patch를 매개로 일어나는 반응이므로 Peyer's patch에 의

Table 3. Effect of the different molecular-weight ranges fractions prepared after solubilization from the CWP on cytokines production in the culture supernatant of Peyer's patch cells

Cytokines	Fractions (100 µg/mL)	Absorbance (at 405 nm)
IL-2	Control	0.08 ± 0.02
	CWP ¹⁾	0.48 ± 0.08* ²⁾
	>50 kDa	0.11 ± 0.06
	30-50 kDa	0.27 ± 0.04*
	<30 kDa	0.09 ± 0.03
IL-6	LPS	0.10 ± 0.02*
	Control	0.05 ± 0.01
	CWP	0.18 ± 0.03*
	>50 kDa	0.07 ± 0.01*
	30-50 kDa	0.12 ± 0.01*
GM-CSF	<30 kDa	0.05 ± 0.03
	LPS	0.19 ± 0.13
	Control	0.05 ± 0.01
	CWP	0.35 ± 0.02*
	>50 kDa	0.05 ± 0.04
	30-50 kDa	0.13 ± 0.02*
	<30 kDa	0.05 ± 0.03
	LPS	0.09 ± 0.01*

Peyer's patch cells were obtained from C₃H/He mice (n=4), and pooled and cultured at a density of 4 × 10⁵ cells/mL with the cell wall fraction from *B. bifidum* SL-21 for 5 days *in vitro* (sample, 100 µg/mL). Each resulting cell-free supernatant was subjected to ELISA for IL-2, IL-6, and GM-CSF. ¹⁾CWP: cell wall preparation. ²⁾*, p<0.05: significant difference between the control and sample.

해 생성되는 cytokine류의 활성을 측정하였다. *B. bifidum* SL-21의 세포벽 성분과의 반응에 의해 GM-CSF, IL-2 및 IL-6 등의 cytokine류의 생산 증가가 확인되었으며 cytokine의 생산은 반응한 세포벽 성분에 농도 의존적 경향을 보였고 골수세포 증식이 증가할수록 높은 cytokine 생산 증가를 나타냈다. 불용성인 *B. bifidum* SL-21 세포벽을 lysozyme 처리하여 수용화시켜 분자량에 따른 활성을 검토한 결과, 분자량 30-50 kDa의획분에서 가장 높은 골수세포 증식활성이 측정되었다. 이와 같은 결과를 토대로 하여 *B. bifidum* SL-21 세포벽 성분이 Peyer's patch의 림프구를 활성화시키고 이들 활성화된 림프구에서 생성되는 cytokine류에 의해 골수세포 증식이 이루어짐을 확인할 수 있었다. 또한 이들 활성화된 면역세포는 GM-CSF, IL-2 및 IL-6 등의 전신순환 면역계의 증강에 중요한 역할을 갖는 cytokine류를 생산하였다.

문 헌

- Hopkins MJ, Macfarlane GT. Changes in predominant bacterial populations in human feces with age and with *Clostridium difficile* infection. *J. Med. Microbiol.* 51: 448-454 (2002)
- Amital H, Gilburd B, Shoenfeld Y. Intelligent nutrition: health-promoting mechanisms of probiotics. *Isr. Med. Assoc. J.* 5: 767-769 (2003)
- Laura JF, Glenn RG. Mixed culture fermentation studies on the effects of symbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. *Anaerobe* 9: 231-242 (2003)
- Samona A, Robinson RK, Marakis S. Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiol.* 13: 275-280 (1996)
- Sakata T, Kojima T, Fujieda M, Takahashi M, Michibata T. Influ-

- ences of probiotic bacteria on organic acid production by pig caecal bacteria *in vitro*. *Proc. Nutr. Soc.* 62: 73-80 (2003)
- Crittenden RG, Martinez NR, Playne MJ. Synthesis and utilization of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 217-222 (2003)
- Rhee YK, Han MJ, Choi EC, Kim DH. Hypocholesterolemic activity of bifidobacteria isolated from a healthy Korean. *Arch. Pharm. Res.* 25: 681-684 (2002)
- Kim JH, Shin KS, Lee H. Characterization and action modde of anti-complementary substance prepared from *Lactobacillus plantarum*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 290-295 (2002)
- Shin MS, Yu KW, Shin KS, Lee H. Enhancement of immunological activity in mice with oral administration of cell wall components of *Bifidobacterium bifidum*. *Food Sci. Biotechnol.* 13: 85-89 (2004)
- Hosono A, Lee J, Ametani A, Natsume M, Hirayama M, Adachi T, Kaminogawa S. Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 312-316 (1997)
- He F, Morita H, Hashimoto H, Hosoda M, Kurisaki J, Ouwehand AC, Isolauri E, Benno Y, Salminen S. Intestinal *Bifidobacterium* species induce varying cytokine production. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109: 1035-1036 (2002)
- Park SY, Ji GE, Ko YT, Jung HK, Ustunol Z, Pestka JJ. Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide, and cytokine production in RAW 264.7 macrophage cell exposed to human and commercial isolates of *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.* 46: 231-241 (1999)
- Akio H, Hideaki S, Kazuhiko F, Takeaki M, Joji K, Shigeo I, Woodae K, Hirokazu N. Oral administration of *Bifidobacterium longum* culture condensate in a diet-restricted murine peritonitis model enhances polymorphonuclear neutrophil recruitment into the local inflammatory site. *Nutrition* 19: 270-274 (2003)
- Shen P, Fan XR, Li GW. The SEM study. pp. 52-63. In: Laboratory Experiments in Microbiology, High Education Press, Beijing, China (1999)
- Catherine M, Marie-Francoise O, Elisabeth S, Marie-Benedicte R, Daniel I. Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 222: 129-136 (2003)
- Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo(Japanese herbal) medicine "Juzen-Taiho-To". *Phytomedicine* 5: 353-360 (1998)
- Page B, Page M, Noel C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *Int. J. Oncol.* 3: 473-476 (1993)
- Akiba H, Miyahira Y, Atsuta M, Takeda K, Nohara C, Futagawa T, Matsuda H, Aoki T, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 191: 375-380 (2000)
- Yasui H, Ohwaki M. Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. *J. Dairy Sci.* 74: 1187-1195 (1991)
- Lee JN, Lee DY, Ji IH, Kim GE, Kim HN, Sohn J, Kim S, Kim CW. Purification of soluble beta-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 837-841 (2001)
- Charles AJ, Paul T, Mark W, Mark JS. The immune system in health and disease. Part. V. In: Immunobiology. Penelope A, Eleanor L. (eds). Garland Publishing Co., New York, NY, USA (1994)
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7: 145-173 (1989)
- Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T, Carson DA. B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 167: 1253-1258 (1988)