

## RAW 264.7 대식세포에서의 유산균에 의한 Nitric Oxide와 TNF- $\alpha$ 의 생성 증가 효과

박소희 · 정명준\* · 김수동\* · 백대헌\* · 강병용\*\* · 하남주#  
삼육대학교 대학원 약학과, \*(주)셀바이오텍, \*\*삼육대학교 생명과학연구소  
(Received September 7, 2005; Revised November 11, 2005)

### Effect of Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*) on the Enhancement of the Production of Nitric Oxide and TNF- $\alpha$ in RAW 264.7 Macrophage Cell

So Hee Park, Myung Jun Chung\*, Soo Dong Kim\*, Dae Heoun Baek\*, Byoung Yong Kang\*\* and Nam Joo Ha#  
Dept. of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea  
\*Cellbiotech, Co.Ltd., Seoul 157-030, Korea  
\*\*Research Institute for Life Science, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

**Abstract** — The immune reinforcement of the probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum* was studied in RAW 264.7 cell line treated with diluted solution (dilution to 2<sup>5</sup>) of the supernatants of lactic acid bacteria. RAW 264.7 cell line was used as a macrophage model to assess the effects of lactic acid bacteria on the production of nitric oxide (NO) and cytokine tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and cell morphological changes. The production of NO and TNF- $\alpha$  were largely affected by lactic acid bacteria in dose-dependent manner in 24 or 48 hr cultures and cell morphological changes were also largely affected by lactic acid bacteria. Especially, *Bifidobacterium bifidum* differentially stimulated the production of NO and TNF- $\alpha$ . NO production was increased by *Bifidobacterium bifidum* 25  $\mu$ l/ml more than LPS (20 ng/ml) control, and TNF- $\alpha$  by *Bifidobacterium bifidum* 6.25  $\mu$ l/ml more than LPS (10 ng/ml) control. The *in vitro* approaches employed here should be useful in further characterization of the effects of lactic acid bacteria on systemic immunity.

**Keywords** □ lactic acid bacteria, macrophage, nitric oxide, TNF- $\alpha$

유산균(lactic acid bacteria)은 탄수화물을 분해하고 이를 이용하여 유산을 만드는 세균으로서, 산소가 적은 곳에서 잘 증식하는 통성 혐기성균 또는 편성 혐기성균이다.<sup>1)</sup>

유산균은 현재까지 5개의 속으로 구성되어 있는 것으로 알려져 있는데, *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Bifidobacteria* spp. 및 *Pediococcus* spp.으로 분류되어 있다. 이들 중에서 사람의 장내에 가장 많은 유산균(lactic acid bacteria)은 편성 혐기성 유산균(lactic acid bacteria)인 *Bifidobacteria* spp.로, *Streptococcus* spp. 및 *Lactobacillus* spp.와 같은 통성 혐기성 유산균보다 약 1백배 내지 1천배 이상 더 많이 존재하는

것으로 알려져 있다. 유산균은 장내 *Clostridium* spp.과 같은 유해균의 번식을 억제하고 설사와 변비를 개선시킬 뿐 아니라, 비타민 합성, 항암작용, 혈청 콜레스테롤 저하 등의 역할을 수행하고 있다. 특히, 유산균은 장의 점막과 상피세포에 강하게 결합할 수 있는 특정 단백질을 가지고 있어 유해 세균의 성장을 막는 정상 작용에 많은 도움을 준다. 또한, 유산균은 대식세포의 증식을 촉진하여 대식세포(macrophage)의 장내 유해 세균에 대한 인지 능력, 살균능력 등을 강화시키고, 면역 관련 물질의 분비를 촉진하여 면역증강 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup>

위장관내의 상피세포에는 영양분의 흡수를 위해 광범위한 표면이 존재하고 위장관을 통해 잠재된 수많은 외부 항원이 존재한다. 잠재적인 외부 항원의 제거는 위장관의 면역 체계에 의해 매개된다. 장내 상피세포는 또한 다양한 cytokine을 분비 할 수 있는 많은 수의 lymphocyte를 포함한다.<sup>3,4)</sup> 그러므로 유산균이

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-3399-3653 (팩스) 02-948-5370  
(E-mail) hanj@syu.ac.kr

나 유산균 제품들은 이러한 lymphocyte를 직접적으로 활성화 시키고 면역반응을 자극한다. 게다가 유산균은 non-specific 과 receptor-mediated 기작을 통해 우리 몸에 이용 될 수 있다. 몇몇 유산균의 *in vitro*에서 장내 상피 세포에 부착하고 *in vivo*에서 장내 점막에 부착하는 능력은 잘 기록되어 있다.<sup>5,6)</sup> 유산균은 macrophage나 T cell과 같은 immunocompetent cell과 상호작용하며 면역세포와 비 면역세포 모두에게 많은 영향을 미치는 다양한 cytokine을 분비한다.<sup>7)</sup>

이러한 유산균 중 *Bifidobacterium*속 세균들은 면역기능의 활성화에 특히 좋은 기능을 나타내어 대식세포(macrophage)와 natural killer cell과 같은 면역세포의 활성화 및 항암효과까지 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>8)</sup>

체내 이물질에 대해 초기 면역 반응을 담당하는 대식세포는 활성화와 함께 일련의 면역 반응을 유도한다. 대식세포는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 여러 가지 자극물(stimuli)에 의해 활성화 되는데, 지금까지 보고된 대식세포 활성화인자로는 그람음성균의 lipopolysaccharide(LPS), adjuvant,<sup>9)</sup> *Mycoplasma* spp.,<sup>10)</sup> lymphokine류,<sup>11)</sup> interferon,<sup>12)</sup> 및 tumor-cell membrane<sup>13)</sup> 등이 있다. 특히 cytokine 가운데 가장 일반적인 대식세포 활성화인자는 IFN- $\gamma$ 이며, LPS 역시 대식세포를 활성화하여 종양세포나 체내 기생체에 대항할 수 있는 면역 활성을 유발시키는 가장 잠재력 있는 활성물질로 밝혀졌다.<sup>14)</sup> Cui *et al.*<sup>15)</sup>은 활성화된 대식세포가 암세포를 인식하고 파괴시킬 수 있는 능력이 있다고 보고하였다.

활성화된 대식세포는 표적세포 살해뿐만 아니라, 세포 독성능이 있는 TNF,<sup>16)</sup> IL-1,<sup>17)</sup> ROI,<sup>18)</sup> NO<sup>19)</sup> 및 cytolytic protease<sup>20)</sup> 등과 같은 물질을 분비한다. 특히 대식세포에 의해 생성된 nitric oxide(NO)는 종양세포나 세균, 곰팡이 및 기생충의 성장을 억제하거나 살해시킬 수 있는 것으로 보고되었다.<sup>21)</sup>

Nitric oxide(NO)는 NOS에 의해 생성된다. Constituted neuronal NOS(nNOS)와 endothelial NOS(eNOS)와는 다르게 inducible isoform NOS(iNOS)를 통해 활성화된 염증세포들은 nitric oxide를 생성한다.<sup>22)</sup> 낮은 농도에서의 NO는 혈관을 조절하고 면역 체계를 조절하는 중요한 역할을 한다.<sup>23)</sup> 면역세포에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 다량으로 외부의 자극에 의해 유전자수준에서 발현되고 주로 침입한 미생물이나 종양세포에 대해 독성을 갖는 방어물질로서 작용하는 것으로 알려져 있다.<sup>24)</sup>

대식세포는 또한 tumor necrosis factors(TNF)- $\alpha$ 와 같은 몇몇 mediator의 생성을 증가 시키는 등 면역기능을 조절한다.<sup>25)</sup>

이러한 mediator들은 적혈구 생성, 임파구 생성, 혈소판 생성을 조절하고,<sup>26)</sup> 항상성 조절을 하는데 중요한 역할을 함으로써,<sup>27-29)</sup> 이러한 mediator의 조절은 정상적인 생리 면역 상태를 위해 결정적인 역할을 한다.

이 연구에서 우리는 NO와 TNF- $\alpha$  생성에 따른 유산균(lactic acid bacteria)의 효과를 알아보기 위하여 murine macrophage 모

델로서 RAW 264.7 cell을 사용하여 유산균(lactic acid bacteria) 투여에 의한 NO와 TNF- $\alpha$  생성 등에 대한 영향을 조사하여 이를 보고하고자 하였다.

## 실험 방법

### 시약

DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지 및 fetal bovine serum(FBS), penicillin(10000 U/ml)/streptomycin(10000 U/ml)(P/S), LPS(*Escherichia coli*, 0127:B8 Westphal type)는 Sigam Chemical Co(St. Louis, Mo. USA)에서 구입하였다.

### 균배양

유산균인 *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*은 (주)셀바이오택으로부터 분양받았다. 균체의 배양용 배지는 Nissui Pharm. Co. Ltd.(Japan)의 General Anaerobic Medium(GAM) 배지를 사용하였고, *Bifidobacterium bifidum*은 Bactron Anaerobic Chamber(Sheldon Manufacturing Inc., USA)를 이용하여 혐기 배양하였으며, *Lactobacillus acidophilus*와 *Streptococcus thermophilus*는 호기 배양하였다. 세 가지 균체를 24시간 동안 배양한 후에 이를 원심분리하여 상등액을 얻은 후, 그 상등액을 syringe filter를 이용하여 여과멸균하여 본 실험에 이용하였다.

### RAW 264.7 세포

RAW 264.7 대식세포주는 삼육대학교 약학과 대학원의 생화학실험실로부터 분양받아서 이를 nitrogen tank에 보관하였고, 실험에 사용할 세포는 10% fetal bovine serum(FBS), 1% streptomycin(10000 U/ml) 및 penicillin(10000 U/ml)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)을 이용하여 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### 대식세포 활성화

RAW 264.7 cell을 sterile glass-slide chamber(Nunk)에서  $1 \times 10^3$  cells/well이 되도록 분주하여 48시간 동안 배양하였다. 48시간 배양 후 배지를 제거하고, LPS(100 ng/ml), *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* 및 *Bifidobacterium bifidum*의 세 균주를 각 농도별로 처리하여 48시간 배양하였다.

처리 후 상등액을 제거하여 세포를 고정시킨 후, Diff-Quick Solution(Sysmex corporation, Japan)으로 염색하여 이를 현미경으로 관찰하였다.

### NO(Nitric Oxide) 측정

대식세포가 생성하는 NO는 6~8초간 존재하며 그 후 자발적

으로 산화되어 NO<sub>2</sub>와 NO<sub>3</sub> 상태로 전환되어 측정된다. 따라서 생성되는 reactive nitrogen intermediate(RNI)양은 NO<sub>3</sub>를 환원 요소로 전환시켜야 정확하지만 보통 NO<sub>2</sub>가 대부분이기 때문에 이를 발색시켜 Stuehr and Nathan의 방법에 따라 간접적으로 정량하는 방법을 이용한다.<sup>30)</sup>

이 실험을 위하여 96well, LPS(20 ng/ml), *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, DMEM 배지, Griess reagent(stock-I: 0.2% naphylenediamine HCl, stock-II: 2% sulfanilamide in 5% H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)가 사용되었다.

실험방법은 대식세포를 24시간 배양 후 1×10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 96-well plate에 200  $\mu$ l씩 넣고 LPS를 20 ng/ml 농도로 첨가하고 syringe filter로 여과한 *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* 및 *Bifidobacterium bifidum*을 2배씩 희석하여 상등원액에서 2<sup>5</sup>까지의 희석하여 희석액을 첨가 한 후, 이를 18시간 동안 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 37°C로 배양하였다.

18시간 배양 후 상등액 100  $\mu$ l를 새로운 plate로 옮기고 여기에 동량의 Griess reagent를 가하여 실온에서 10분 동안 방치시킨 후에, 이를 ELISA reader를 이용해서 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

NO<sub>2</sub>의 농도는 sodium nitrate를 희석시킨 용액에 대한 흡광도를 측정하여, 이를 토대로 표준곡선을 작성하여 그 결과를 산출하였다.

### TNF- $\alpha$ 정량

RAW 264.7 세포주에 세 가지 균주(*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*)를 각각의 농도별로 처리한 후에, 이를 48시간 동안 배양시켰다.

배양 후 배양액에 분비된 TNF- $\alpha$ 를 정량하기 위해서 Mouse TNF- $\alpha$  Immunoassay Kit(BioSource International, Inc., Camarillo, California, USA)를 이용하였다.

*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* 및 *Bifidobacterium bifidum*을 농도별로 처리한 RAW 264.7 세포의 배양액을 수확하고, 수확한 배양액과 standard를 각각의 well에 100  $\mu$ l씩 첨가한 후에 biotin conjugate를 50  $\mu$ l 첨가하여 실온에서 90분 동안 배양시켰다.

4번에 걸쳐 세척한 후에, Streptavidin-HRP Working Solution을 100  $\mu$ l 첨가하여 실온에서 30분 동안 정치시켰다. 그 후 4차례 더 세척한 후에 stabilized chromogen 100  $\mu$ l을 첨가하여 다시 30분 동안 암소에서 실온상태로 정치시키고, 여기에 stop solution 100  $\mu$ l을 가한 후에 ELISA 분석을 수행하였다.

### 통계처리

연구 결과는 각 군 간의 유의성 검증을 위해 Student's t-test를 사용하였으며, 유의수준이 P<0.05일 경우 그 결과에 유의성

이 있는 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 유산균(Lactic acid bacteria)의 NO(Nitric oxide) 생성능

NO는 대식세포의 중요한 mediator이기 때문에, NO 생성에 미치는 유산균의 영향은 Griess assay를 통해 확인하였다. Raw 264.7 세포에서 NO 생성에 미치는 유산균의 효과를 조사한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 배지만 처리한 group에서는 NO를 거의 방출하지 않았음을 확인할 수 있다. 이 연구에서 LPS는 대식세포 활성화의 positive control로서 이용되었다. 세 가지 유산균(*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*)의 상등액을 처리한 group은 Raw 264.7 세포에 배지만 처리한 control group과 비교하였을 때 상대적으로

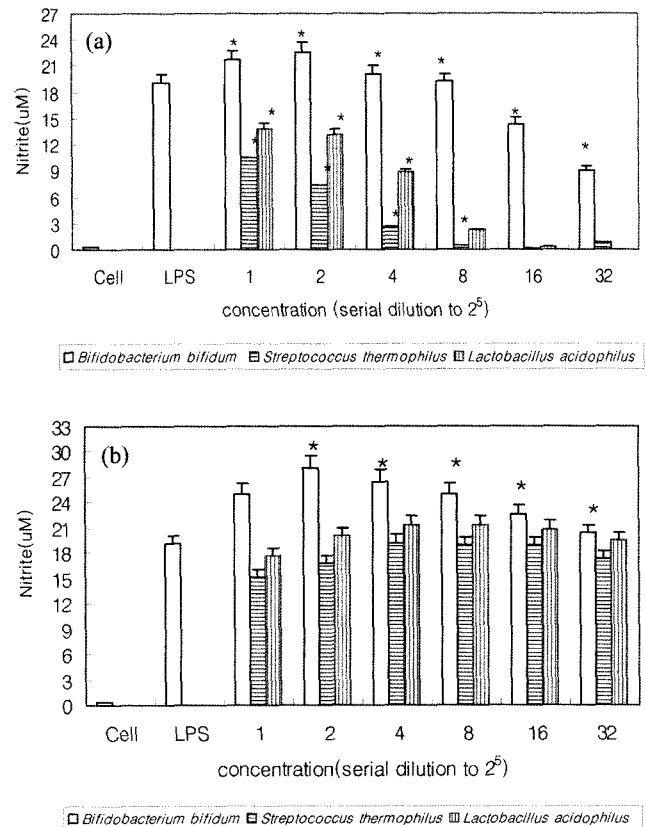


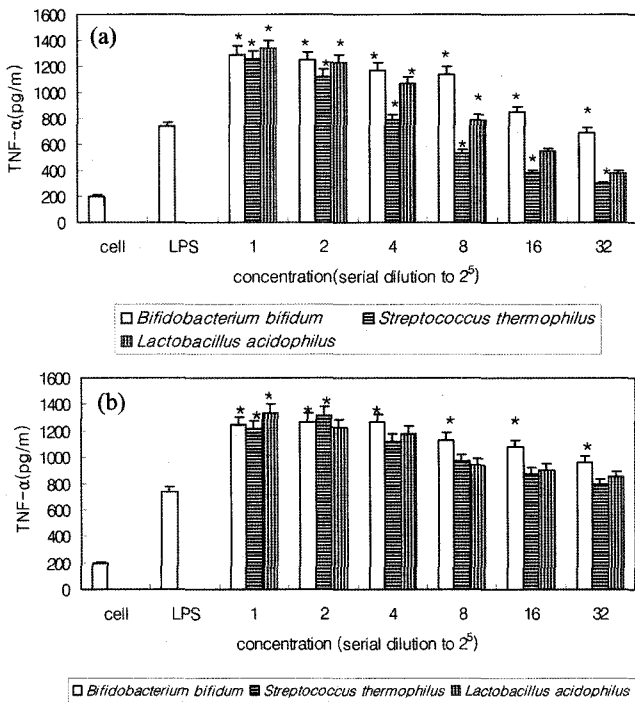
Fig. 1 - Effect of supernatants of *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* on NO production in the LPS (lipopolysaccharide)-stimulated RAW 264.7 cells. The cultures were incubated with 20 ng/ml of LPS in the presence of supernatants of *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*. NO production by supernatants of *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* were assessed by Griess reaction. (a) without LPS \*p<0.05, compared with cells. (b) with LPS \*p<0.05, compared with LPS.

로 많은 양의 NO를 생성하였는데, 특히 세 가지 유산균 중 *Bifidobacterium bifidum* 처리군에서 NO 생성이 가장 많았던 것으로 나타났다.

Raw 264.7 세포의 배양액에 처리한 각각의 유산균 농도를 달리 하였을 때 Fig. 1과 같이 NO 생성이 농도 의존적으로 증가하였다. 2<sup>2</sup>배 희석한 *Bifidobacterium bifidum*을 처리하였을 때 positive control group인 LPS(20 ng/ml)만 첨가한 group 보다 NO의 양이 현저히 많이 생성되었음을 확인 할 수 있었다. LPS와 세 가지 유산균(*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*)을 함께 처리한 group은 대식세포의 NO 생성에서 상승 효과(synergic effect)를 나타내어 세 가지 균주(*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*)각각을 처리한 group보다 더 많은 양의 NO가 생성됨을 확인할 수 있었다.

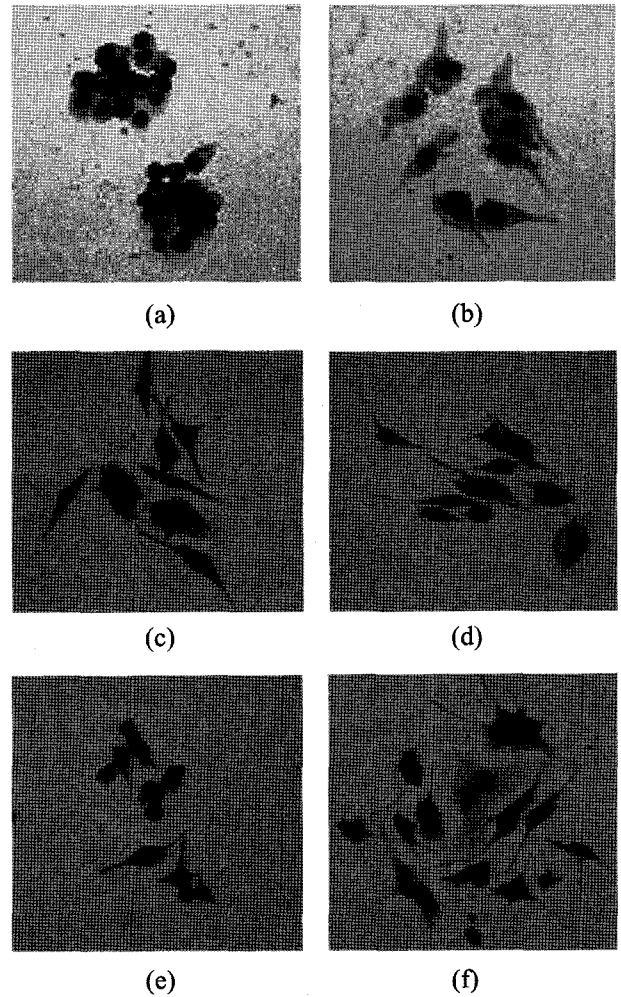
**TNF-α 정량**

Raw 264.7 세포에 의한 TNF-α의 생성에서 유산균이 미치는 효과를 조사하기 위하여 LPS의 존재에 따라 각 균주(*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*)를 Raw 264.7세포에 농도별로 처리하여 배양시켰으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다.



**Fig. 2** – Effect of supernatants of *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* on TNF-α production in the LPS (lipopolysaccharide)- stimulated RAW 264.7 cells. (a) without LPS \*p<0.05, compared with cells. (b) with LPS. \*p<0.05, compared with LPS.

본 연구 결과, LPS를 처리 하지 않은 세포에서의 TNF-α의 생성이 가장 낮았으며 2<sup>4</sup>배 희석한 *Bifidobacterium bifidum*을 처리한 group에서부터는 positive control로써 LPS(10 ng/ml)를 처리한 group보다 TNF-α의 생성이 농도 의존적으로 점차 증가하는 것으로 나타났다. *Lactobacillus acidophilus*와 *Streptococcus thermophilus* 역시 2<sup>2</sup>배 희석한 농도에서는 LPS(10 ng/ml)만 처리한 group보다 TNF-α 생성이 증가된 것을 확인 할 수 있었다. 유산균과 LPS(10 ng/ml)를 함께 처리한 세포는 유산균만 처리한 세포들보다 TNF-α의 생성이 크게 증가하였다.



**Fig. 3** – Characterization of RAW 264.7 cell change in response to supernatants of *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. The RAW 264.7 cells were cultured on cover slips in the presence of different concentration of supernatants of *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. (a) only cells (b) with LPS (10 ng/ml). (c) *Bifidobacterium bifidum* (diluted solution to 2<sup>2</sup>). (d) *Lactobacillus acidophilus* (diluted solution to 2<sup>3</sup>). (e) *Streptococcus thermophilus* (diluted solution to 2<sup>4</sup>). (f) *Bifidobacterium bifidum* (diluted solution to 2<sup>3</sup>) with LPS (10 ng/ml)

### 세포 형태 변화(Cell morphological change)

배지만 처리한 정상적인 RAW 264.7 세포는 표면에 아무것도 나타나지 않은 Round 형태로 나타났으며(Fig. 3a), 10 ng/ml의 LPS(Fig. 3b)를 처리한 group과 세 가지 유산균(*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*)의 상등액만 처리한 group에서는 세포 형태에서 약간의 변화가 관찰되었다. 이들은 배지만 처리한 정상적인 RAW 264.7세포와 비교하였을 때, 그 크기가 더 크고 round 형태가 아닌 매끄럽지 못하고 거친 표면을 가진 것으로 확인되었다. LPS와 유산균을 같이 처리한 group은 LPS나 유산균만 처리한 group에 비해서 RAW 264.7 세포의 형태가 더 커지고 더 거칠어져서 이들이 더 많이 활성화되었음을 짐작할 수 있었다.

### 결 론

*Bifidobacteria*를 포함한 유산균은 면역기능을 활성화 시키며,<sup>31-33</sup> 이러한 활성화는 대식세포와 임파구의 활성을 포함한 몇 가지 면역 기능을 향상시키는 것으로 나타났다.<sup>34-36</sup>

대식세포는 면역 반응의 초기 반응과 비 특이적 면역반응을 담당하며, LPS 및 IFN- $\alpha$ 와 같은 물질에 의하여 특이적 활성화 유도된다. 본 연구는 유산균의 대식세포 활성화 여부를 확인하고자 혈관 확장, 신경 전달 및 숙주 방어와 같은 다양한 기능을 갖는 NO의 생성 정도와 대식세포의 mediator인 TNF- $\alpha$ 의 생성 정도를 조사하였다.

IFN- $\gamma$ 와 LPS 등의 물질들은 대식세포를 활성화하여 배지 내에 NO를 생성하는 것으로 알려졌으나<sup>37</sup> 유산균 역시 대식세포를 활성화시켜서 NO 생성과 TNF- $\alpha$ 의 생성을 촉진하는 것으로 나타났다.

*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* 및 *Streptococcus thermophilus*의 세 가지 유산균 모두 농도 의존적으로 NO와 TNF- $\alpha$ 의 생성 증가에 관여함을 확인할 수 있었고, RAW 264.7 세포의 형태 역시 농도 의존적으로 활성화되어 형태가 변화된 것을 관찰할 수 있었다. 식세포의 활성인자인 그람 음성균의 LPS만 첨가한 group보다 유산균 첨가군에서는 NO와 TNF- $\alpha$ 의 생성양이 현저히 많았으며, LPS와 세 가지 유산균(*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*)을 함께 처리한 group은 대식세포의 NO와 TNF- $\alpha$  생성에 상승 효과를 나타내어, 세 가지 균주(*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*)만 처리한 group보다 많은 양의 NO와 TNF- $\alpha$ 를 생성하는 것으로 나타났다.

이와 같은 결과는, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* 및 *Bifidobacterium bifidum*의 세 가지 유산균이 대식세포를 자극하여 NO와 TNF- $\alpha$ 를 생성시켜서 면역 기능을 증

진시킨다는 사실을 시사하고 있는 것으로 사료된다.

### 문 헌

- 1) Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. : Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Micro. Reviews* **60**, 407 (1996).
- 2) Perdigon, G., de Macías, M. E., Alvarez, S., Oliver, G. and de Ruiz Holgado, A. A. : Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun.* **53**, 404 (1986).
- 3) Lefrancois, L. : *Basic aspects of intraepithelial lymphocyte immunobiology*. In Handbook of Mucosal Immunology eds P. L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. R. McGhee and J. Bienenstock, Academic Press, San Diego pp. 287 (1994).
- 4) Taguchi, T., Aicher, W. K., Fujihashi, K., Yamamoto, M., McGhee, J. R., Bluestone, J. A. and Kiyono, H. : Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes: murine CD<sup>3</sup><sup>+</sup>,  $\gamma/\delta$  TCR<sup>+</sup> T cells produce IFN- $\gamma$  and IL-5. *Journal of Immunology* **147**, 3736 (1991).
- 5) Johansson, M. L., Molin, G., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrne, S. and Bengmark, S. : Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: *in vivo* colonisation of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 15 (1993).
- 6) Schiffrin, E. J., Brassart, D., Servin, A., Rochat, F. and Dommet Hughes, A. : Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *American Journal of Clinical Nutrition* **66**, 515S (1997).
- 7) Nussler, A. K. and Thomson, A. W. : Immunomodulatory agents in the laboratory and clinic. *Parasitology* **105**, S5. (1992)
- 8) Sekine, K., Watanabe-Sekine, E., Ohta, J., Toida, T., Tatsuki, T., Kawashima, T. and Hashimoto, Y. : Induction and activation of tumoricidal cells *in vivo* and *in vitro* by the bacterial cell wall of *Bifidobacterium infantis*. *Bifidobact. Microfl.* **13**, 65 (1994).
- 9) Hibbs, J. B., Lambert, L. H. and Remington, J. S. : *In vitro* nonimmunological destruction of cells with abnormal growth characteristics by adjuvant activated macrophages. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **139**, 1049 (1972).
- 10) Loewenstein, J., Rottem, S. and Gallily, R. : Induction of macrophage-mediated cytotoxicity of neoplastic cells by mycoplasmas. *Cell. Immunol.* **77**, 290 (1983).
- 11) Pissens, W. F., Churchill, W. H. and David, J. R. : Macrophages activated *in vitro* with lymphocyte mediators kill neoplastic but not normal cells. *J. Immunol.* **114**, 293 (1975).
- 12) Schultz, R. M., Chirigos, M. A. and Heine, U. I. : Functional and morphological characteristics of interferon-treated macrophage. *Cell. Immunol.* **35**, 84 (1978).
- 13) Adams, D. O. and Marini, P. A. : Evidence for a multistep

- mechanism of cytolysis by G-activated macrophages: the interrelationship between the capacity for cytolysis, target binding, and secretion of cytolytic factor. *J. Immunol.* **126**, 981 (1981).
- 14) Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B. : An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3666 (1975).
  - 15) Cui, S., Jonathan, S., Reichner, Romeo, B., Mateo. and Albina, J. E. : Activated murine macrophage induce apoptosis in tumor cells through ntric oxide-dependent or independent mechanism. *Cancer Res.* **54**, 2462 (1994).
  - 16) Ichinose, Y., Bakouche, O., Tsao, J. Y. and Fidler, I. J. : Tumor necrosis factor and IL-1 associated with plasma membrane of activated human monocytes lyse monokine-sensitive but not monokine-resistant tumor cells whereas viable activated monocytes lyse both. *J. Immunol.* **141**, 512 (1988).
  - 17) Suttles, J., Giri, J. G. and Mizel, S. B. : IL-1 secretion by macrophages. Enhancement of IL-1 secretion and processing by calcium inophores. *J. Immunol.* **144**, 175 (1990).
  - 18) Halliwell, B. and Cuttidge, J. M. C. : Oxygen toxicity, Oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical. J.* **219**, 1 (1984).
  - 19) Moncada, S. and Higgs, A. : The arginine-nitric oxide pathway. *New Engl. J. Med.* **329**, 2002 (1993).
  - 20) Johnson, W. J., Somers, S. D. and Adams, D. O. : Activation of macrophage for tumor cytotoxicity. *Contemp. Top. Immunobiol.* **14**, 127 (1983).
  - 21) Lorsbach, R. B., Murphy, W. J., Lowenstein, C. J., Snyder, S. H., and Russell, S. W. : Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synerge between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **268**, 1908 (1993).
  - 22) Bor-Sen Wang, Jia-Huey Chen, Yu-Chih Liang and Pin-Der Duh : Effects of Welsh onion on oxidation of low-density lipoprotein and nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7. *Food Chemistry* **91**, 147 (2005).
  - 23) Md, S., Moochhala, S. M. and Siew-Yang, K. L. : The role of inducible nitric oxide synthase inhibitor on the arteriolar hyporesponsiveness in hemorrhagic-shocked rats. *Life Science* **73**, 1825 (2003).
  - 24) Oshima, H. and Bartsch, H. : Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors; possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.* **305**, 253 (1994).
  - 25) Marin, M. L., Lee, J. H., Murtha, J., Ustunol, Z. and Pestka, J. J. : Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with *Bifidobacteria*. *J. Dairy Sci.* **80**, 2713 (1997).
  - 26) Ulch, T. T., Shin, S. S. and del Castillo, J. : Haematologic effects of TNF. *J. Res. Immunol.* **144**, 347 (1993).
  - 27) Fukuo, K., Inoue, T., Morimoto, S., Nakahashi, T., Yasuda, O., Kitano, S., Sasada, R. and Oigigara, T. : Nitric oxide mediates cytotoxicity and basic fibroblast growth factor release in cultured vascular smooth muscle cells. A possible mechanism of neo vascularization in atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **95**, 668 (1995).
  - 28) Laskin, D. L. and Pendino, J. : Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 655 (1995).
  - 29) Sarih, M., Souvannavong, V. and Adam, A. : Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 503 (1993).
  - 30) Stuehr, D. J. and Nathan, C. F. : Nitric oxide, a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* **169**, 1543 (1989).
  - 31) Lee, J., Amentani, A., Enomoto, A., Sato, Y., Motoshima, H., Ike, F. and Kaminogawa, S. : Screening for the immunopotentiating activity of food microorganism and enhancement of the immune response by *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. *Siosci. Biotech. Biochem.* **57**, 2127 (1993)
  - 32) Kado-Oka, Y., Fujiwara, S. and Hirota, T. : Effects of bifidobacterial cells on mitogenic response of splenocytes and several functions of phagocytes. *Milchwissenschaft* **46**, 626 (1991).
  - 33) Gomez, E., Melgar, M. M., Silva, G. P., Portoles, A. and Gil, I. : Exocellular products from *Bifidobacterium adolescentis* as immunomodifiers in the lymphoproliferative response of mouse splenocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**, 47 (1988).
  - 34) Hatcher, G. E. and Lambrecht, R. S. : Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid- producing bacteria. *J. Dairy Sci.* **76**, 2485 (1993).
  - 35) Sekine, K., Watanabe-Sekine, E., Ohta, J., Toida, T., Tatsuki, T. K., Kawashima, T. and Hashimoto, Y. : Induction and activation of tumoricidal cells *in vivo* and *in vitro* by the bacterial cell wall of *Bifidobacterium infantis*. *Bifidobact. Microfl.* **13**, 65 (1994).
  - 36) Sekine, K., Watanabe-Sekine, E., Toida, T., Kasashima, T. and Hashimoto, Y. : Adjuvant activity of the cell wall of *Bifidobacterium infantis* for *in vivo* immune responses in mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **16**, 589 (1994).
  - 37) Chun, Q. C., Assreuy, J., Xu, D., Charles, I., Liew, F. Y. and Moncada, S. : Repeated induction of nitric oxide synthetase and leishmanicidal activity in murine macrophage. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1385 (1993).