

김치에서 분리한 *Lactobacillus sakei* proBio65의 면역 조절 특성

임정희¹ · 서병주¹ · 김정은² · 채창석² · 임신혁³ · 한윤수³ · 박용하^{1*}
¹영남대학교 생명공학부, ²광주과학기술원 생명과학부, ³충북대학교 의과대학

Received : August 12, 2011 / Revised : September 5, 2011 / Accepted : September 6, 2011

Characteristics of immunomodulation by a *Lactobacillus sakei* proBio65 isolated from Kimchi. Lim, Jeongheui¹, Byoung-Joo Seo¹, Jung-Eun Kim², Chang-Suk Chae², Sin-Hyeog Im², Youn-Soo Hahn³, and Yong-Ha Park^{1*}. ¹Department of Applied Microbiology and Biotechnology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea, ²School of Life Sciences, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju 500-712, Korea, ³Department of Pediatrics, College of Medicine and Medical Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea – We isolated and identified a novel probiotic strain, *Lactobacillus sakei* proBio65 from Kimchi. To determine whether *L. sakei* proBio65 has an immunomodulatory effect, we investigated cells via an *in vitro* screening system which co-cultured freshly isolated mesenteric lymphocyte with probiotics. A significant increase of Foxp3⁺ transcription regulatory factor expression was observed, followed by an increase in anti-inflammatory cytokines transcription regulatory factor. *L. sakei* proBio65 exhibited high levels of the IL-10/IL-12 production ratio and enhanced Foxp3 expression *in vitro*. *L. sakei* proBio65 may thus be therapeutically useful for the modulation of inflammatory immune disorders.

Key words: *Lactobacillus sakei* proBio65, regulatory T cell, anti-inflammation, interleukin-10, interleukin-12

유산균(probiotics)은 숙주가 적정한 양을 섭취하였을 경우, 숙주에게 긍정적인 영향을 줄 수 있는 미생물로 *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* 등이 비교적 잘 알려져 있으며, 각 균 주마다 여러 메커니즘을 통해 면역체계를 조절한다고 알려져 있다[1].

면역 체계(Immune system)는 면역 반응(Immune response)과 면역 관용(Immune tolerance)의 균형을 이룸으로써 유지된다. 면역 반응은 질병을 유발할 수 있는 병원체 등을 제거하는 과정이며, 면역 관용은 체내에 존재하는 물질 혹은 생명체가 필요로 하는 외부 물질 등에 과잉 면역을 억제하는 기작이다. 이러한 면역 반응과 면역 관용이 균형을 이루는 상태를 면역 항상성(Immunological homeostasis)라고 하며, 이러한 균형이 한 쪽으로 치우치게 되면, 여러 질병들이 나타날 수 있다. 여러 종류의 면역 세포들이 면역 관용에 기여하고 있는데, 이 중 면역 조절 T 세포(regulatory T cell)이 중요한 역할을 담당하고 있다. 이 세포는 세포 내에 Forkhead domain protein family의 한 종류인 Foxp3⁺ 전사조절인자를 특이적으로 발현하고 있으며, 흉선에서 자연적으로 생성되거나 말초 면역계에서 effector T 세포가 면역 조절 T 세포의 성격을 갖게 될 수도 있다. 이 때문에 면역 조절 T 세포는 CD4⁺Foxp3⁺의 형질을 가지며, B7-H4 co-stimulatory

molecule과의 상호작용을 통해 tolerogenic dendritic cell을 생성하거나, immune suppressive cytokine인 interleukin-10(IL-10), tumor growth factor-β(TGF-β) 등을 분비하여 면역 관용 반응을 일으킬 수 있다. 이러한 면역 조절 T 세포의 중요성을 인간 질병 및 Knock-out 생쥐를 통해 면역조절 T 세포 특이적으로 발현하는 Foxp3 단백질의 변형이 Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome 환자에서 특이적으로 발견되며, Foxp3 Knock-out 생쥐의 경우 역시 인간 IPEX와 동일한 다발성장기 염증 현상을 보인다. 또한 다양한 염증성 면역질환에서 면역조절 T 세포의 수가 정상에 비해 감소되어 있다는 보고가 많으며, 면역조절 T 세포의 염증성 질환 환자 및 생쥐로의 입양 전이 (Adoptive transfer)가 염증질환에 큰 치료 효능 보이는 것을 통해 면역관용에 있어 면역조절 T 세포의 중요 위치를 확인할 수 있다. 최근 들어 면역조절 T 세포의 강력한 면역억제 기능을 이용한 면역 치료 시도가 활발하게 이루어지고 있다[2, 5].

본 연구진들은 한국의 전통발효식품인 김치로부터 유래한 유산균 *L. sakei* proBio65의 항 염증성 유산균주의 선별 표지 물질로 조절 T 세포의 master 전사조절인자로 알려진 Foxp3를 선정하였다. *L. sakei* proBio65가 Foxp3 전사조절인자를 증가시키는지 확인하기 위하여 세포기반 screening system을 이용하여 면역 조절 메커니즘을 규명해 보았다.

*Corresponding author

Tel: +82-53-810-3055, Fax: +82-53-813-4620

E-mail: peter@ynu.ac.kr

L. sakei proBio65에 의한 Foxp3+ 전사조절인자 발현 증가능 평가

Foxp3 전사조절인자에 GFP 형광표지 단백질이 표지된 형질전환 생쥐(Foxp3⁻GFP KI 생쥐, 광주과학기술원)를 이용하였다. 생후 6-8주령 Foxp3⁻ GFP KI 생쥐로부터 장간막 림프절을 분리한 후 장간막 림프구와 MRS 고체배지(Difco, USA)를 이용하여 37°C, 20시간 배양한 *L. sakei* proBio65 (1×10⁹ CFU/mL)와 공동배양을 수행하였다. 72시간 동안 생쥐의 장간막 림프구와 *L. sakei* proBio65를 1:1 공동배양(장간막 림프구의 개수를 측정하며, *L. sakei* proBio65는 장간막 림프구의 개수와 동일한 균수를 접종) 후 유세포 분석기를 이용하여 GFP⁺ 신호를 측정함으로써 *L. sakei* proBio65가 Foxp3 전사조절인자를 증가시킬 수 있는 능력을 평가하였다(Fig. 1).

대조군으로 사용한 PBS와 부용제의 Foxp3⁺ 전사조절인자 발현은 높지 않았으며, *L. sakei* proBio65의 생균과 사균에서는 Foxp3⁺ 전사조절인자 발현이 높게 나타난 결과를 보였다. 이는 Foxp3 세포의 수를 증가시키는 결과를 보여준다.

L. sakei proBio65에 의한 항염증성 사이토카인 Interleukin 10(IL-10) 발현능 평가

IL-10은 TGF-β와 더불어 대표적인 항 염증성 사이토카인이다. IL-10은 초기 생쥐의 Th2 세포에서 분비되어 Th1 세포의 IFN-γ 분비를 억제하는 것으로 알려져 있다. 이후 T 세

포에 뿐 아니라, 대식세포(macrophage), 수지상세포(Dendritic cells), CD8⁺ T 세포, B 세포, 비만세포(mast cells) 등에서도 생성되는 것이 밝혀졌으며, 그 중에서도 대식세포와 T 세포가 많은 양의 IL-10을 분비한다고 알려져 있다. IL-10은 Th1 세포의 IFN-γ 생성을 억제할 뿐만 아니라 여러 가지 다른 세포의 사이토카인 분비를 억제한다. 즉, T 세포에 작용하여 Th1 세포의 IL2, IFN-γ 형성을 억제하여 세포성 면역을 억제하고 대식세포, 자연사 세포에서의 염증성 사이토카인 생성을 억제하여 항염증 작용을 한다[3]. 따라서 유산균의 투여를 통해 면역세포에서 IL10의 생성을 증가시키는 유산균의 경우 강력한 항염증성 기능을 가질 수 있다. 이를 위해 *L. sakei* proBio65와 장간막 림프구와 공동배양을 통해서 분비되는 상층액에 존재하는 IL-10 단백질의 양을 측정함으로써 *L. sakei* proBio65에 의한 항염증성 기능을 평가 할 수 있다.

L. sakei proBio65에 의한 IL-10을 증가능을 평가하기 위해 sandwich ELISA 방법을 사용하였다. plate에 IL-10과 결합할 수 있는 항체를 붙인 후 장간막 림프구와 *L. sakei* proBio65를 공동배양 후 얻어진 상층액을 첨가하였다. 항체와 결합한 상층액을 인식하는 또 다른 항체(detection 항체)와 결합하게 한 후 secondary 항체에 결합되어 있는 효소에 의해 기질이 분해되면서 신호가 나오는 원리를 이용하여 각 상층액에 존재하는 IL-10의 양을 비교 분석하였다(Fig. 2).

L. sakei proBio65와 장간막 림프구를 공동배양 후 얻어진 상층액으로 IL-10의 발현량을 측정된 결과 PBS에 비해 *L. sakei* proBio65 생균 또는 사균을 공동배양 하였을 때 IL-10의 발현량이 증가되는 것으로 나타났다.

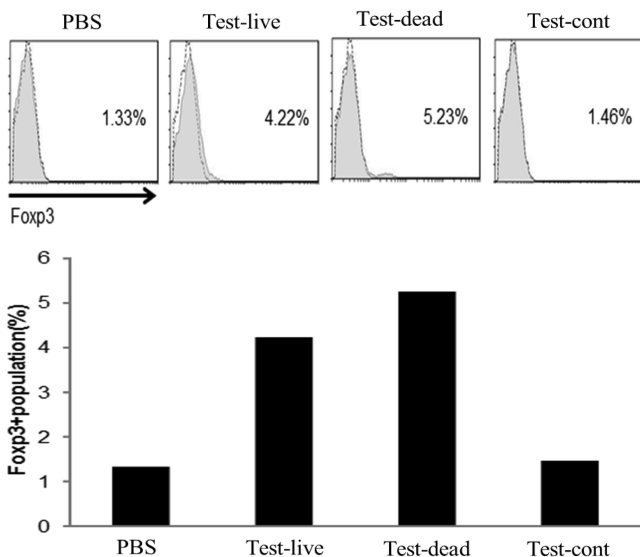


Fig. 1. Increased population of Foxp3⁺ cells from mesenteric lymphocytes after co-culture with *L. sakei* proBio65. PBS (phosphate buffered saline), Test-live (*L. sakei* proBio65 live bacteria), Test-dead (*L. sakei* proBio65 dead bacteria), Test-cont (supplement).

L. sakei proBio65에 의한 염증성 사이토카인 Interleukin 12(IL-12) 발현능 평가

대표적 염증성 사이토카인으로 알려진 IL-12는 바이러스의 감염에 의한 세포내외의 외부 병원성 물질이 침입하였을 시

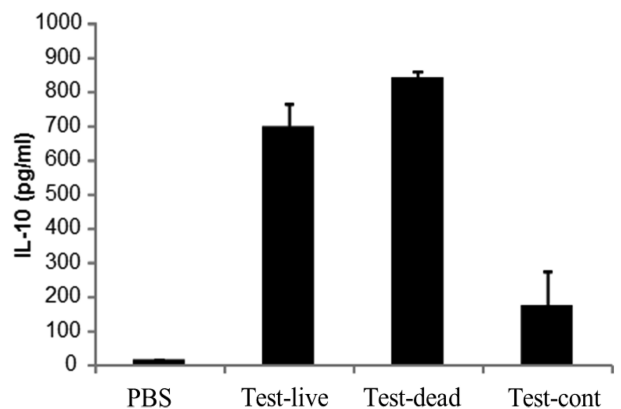


Fig. 2. Detection of IL-10 secreted by mesenteric lymphocytes after co-culture with *L. sakei* proBio65.

항원제시세포에서 주로 생성되며 Th1 면역 반응을 일으키고 발달시키는데 중요한 역할을 한다. IL-12는 Th1 세포의 IFN- γ 와 TNF- α 생성을 유도 하고 Th2 세포 발달은 억제한다. IL-12는 CD8 T⁺ 세포와 자연사 세포의 cytotoxic 능력을 증강시킨다. 따라서 유산균의 투여를 통해 면역세포에서 IL-12의 생성을 감소 또는 억제시키는 유산균의 경우 강력한 항염증성 기능을 가질 수 있다[4]. *L. sakei* proBio65와 장간막 림프구와의 공동배양을 통해서 분비되는 IL-12 단백질의 양을 비교하여, 항염증성 기능을 평가 할 수 있다.

L. sakei proBio65에 의한 IL-12의 발현 억제 능력을 평가하기 위해 IL-10과 동일한 sandwich ELISA 방법을 시행하였다.

L. sakei proBio65와 장간막 림프구를 공동배양 후 얻어진 상층액으로 IL-12의 발현량을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 *L. sakei* proBio65의 생균 및 사균이 PBS에 비해 IL-12의 발현량을 증가 시키고 있으나 그 정도가 크지 않았다.

L. sakei proBio65은 mesenteric lymphocyte와 공동 배양하였을 경우, 항염증성 사이토카인인 IL-10과 염증성 사이토카인인 IL-12의 발현을 모두 증가시키나 IL-12의 경우보다 IL-10의 경우에 *L. sakei* proBio65에 의한 발현 증가가 더 크게 나타나는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 IL-10:IL-12 비율을 계산하였을 때, 생균과 사균을 처리한 경우 IL-10:IL-12 비율이 PBS에 비해 높음을 확인하였다(Fig. 4).

***L. sakei* proBio65 에 의한 Th1, Th17 관련 염증성 사이토카인의 발현능 평가**

IL-12와 더불어 Th1 세포의 대표적인 사이토카인으로 알려진 IFN- γ 의 발현능과 최근 자가면역질환에서 중요한 병인으로 작용하는 것으로 알려진 Th17 세포의 대표적인 사이토카인인 IL-17의 발현을 조사하였다. *L. sakei* proBio65와 장간막 림프구를 1:1 공동배양을 하여 세포의 mRNA를 분리 한 후 real-time PCR 실시간 증폭기를 이용하여 PBS와

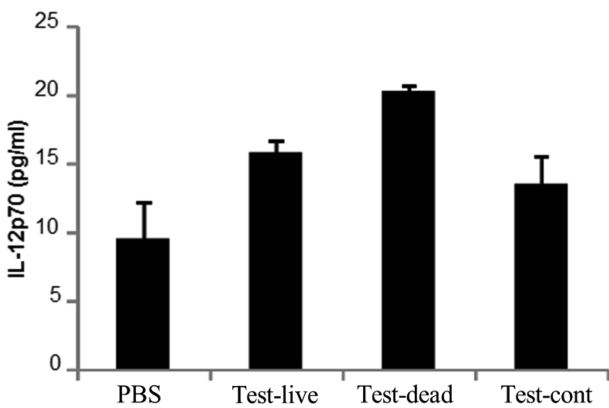


Fig. 3. Detection of IL-12 secreted by mesenteric lymphocytes after co-culture with *L. sakei* proBio65.

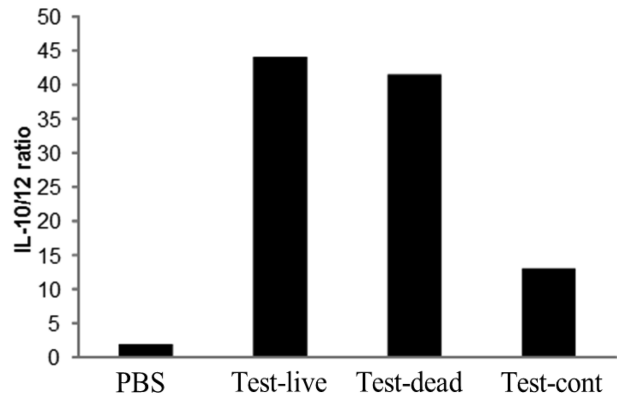


Fig. 4. The ratio of IL-10 to IL-12 from mesenteric lymphocytes after co-culture with *L. sakei* proBio65.

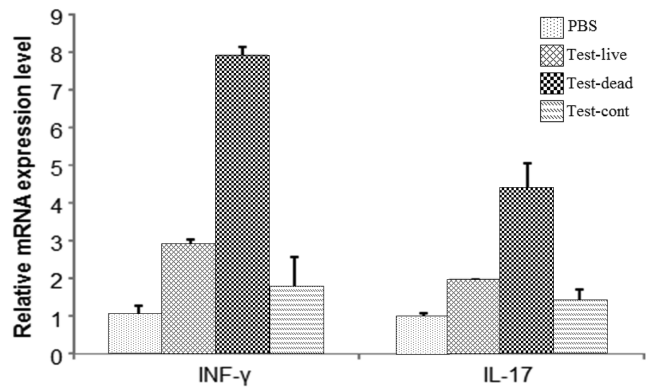


Fig. 5. Measurement of pro-inflammatory cytokine from mesenteric lymphocytes after co-culture with *L. sakei* proBio65.

공동배양 한 샘플과 비교를 통하여 *L. sakei* proBio65의 IFN- γ 와 IL-17발현 조절능을 평가하였다(Fig. 5).

L. sakei proBio65의 생균 보다 사균을 공동배양 하였을 시 IFN- γ 및 IL-17의 발현이 더 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

면역 조절 물질의 분석을 통하여 *L. sakei* proBio65는 면역증강 보다는 면역조절이나 면역억제(과다면역억제)에 대한 사용 가능성이 높다고 사료된다.

요 약

김치로부터 새로운 프로바이오틱균주인 *Lactobacillus sakei* proBio65를 분리하고 명명하였다. 형질전환 생쥐 (Foxp3-GFP KI 생쥐)를 이용하여 *L. sakei* proBio65의 면역조절 메커니즘 규명 및 면역 조절능을 확인하고 *in vivo* 적용 질환제어 응용 가능성을 평가하였다. 조절 T 세포의 master 전사조절인자로 알려진 Foxp3⁺를 선정하고, *L. sakei*가 Foxp3⁺전사조절인자를 증가시키는지 확인하기 위해 확립된 세포기반 screening system을 이용하였다. 항 염증성 사이토카인 전사조절인자의 증가에 이어 Foxp3⁺ 전사조절

인자발현의 상당한 증가를 확인하였다. *L. sakei* proBio65는 염증성면역 장애의 조절에 치료적으로 유용할 것이다.

REFERENCES

1. Kleerebezem, M. and E. E. Vaughan. 2009. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria molecular approaches to study diversity and activity. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 269-290.
2. Leavy, O. 2007. Regulatory T cells in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 322-323.
3. Margarida Saraiva¹ and Anne O'Garra. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* **10**: 170-181.
4. Langrish, C. L., B. S. McKenzie, N. J. Wilson, R. de Waal Malefyt, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2004. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **202**: 96-105.
5. Ziegler, S. F. 2006. FOXP3: Of mice and men. *Annu. Rev. Immunol.* **24**: 209-226
6. Marteau, P. 2006. Probiotics, prebiotics, synbiotics: Ecological treatment for inflammatory bowel disease. *Gut.* **55**: 1692-1693.
7. Sudo, N., X. N. Yu, Y. Aiba, N. Oyama, J. Sonoda, Y. Koga, and C. Kubo. 2002. An oral introduction of intestinal bacteria prevents the development of a long-term Th2-skewed immunological memory induced by neonatal antibiotic treatment in mice. *Clin. Exp. Allergy.* **32**: 1112-1116.
8. Kim, C. H. 2006. Migration and function of FoxP3+ regulatory T cells in the hematolymphoid system. *Exp. Hematol.* **34**: 1033-1040.
9. Macpherson, A. J. and Uhr, T. 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science.* **303**: 1662-1665.
10. Maul J., C. Loddenkemper, P. Mundt, E. Berg, T. Giese, A. Stallmach, M. Zeitz, and R. Duchmann. 2005. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25 (high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* **128**: 1868-1878.
11. Bouma, G. and W. Strober. 2003. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 521-533.
12. Collado, M. C., J. Meriluoto, and S. Salminen. 2007. Development of new probiotics by strain combinations: Is it possible to improve the adhesion to intestinal mucus?. *J. Dairy. Sci.* **90**: 2710-2716.