

Lactobacillus brevis FSB-1의 균체성분에 의한 면역증진 활성

김성영 · 신광순 · 이 호[†]

경기대학교 식품생물공학과

Immunopotentiating Activities of Cellular Components of Lactobacillus brevis FSB-1

Seong-Yeong Kim, Kwang-Soon Shin and Ho Lee[†]

Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Gyeonggi 442-760, Korea

Abstract

In order to evaluate the potential utilization value as a novel probiotic strain, the immunopotentiating activities of the cellular components from *Lactobacillus brevis* FSB-1 were examined. *L. brevis* FSB-1 isolated from kimchi were fractionated into the whole cell, cell wall, cytosol and extracellular preparation, and each fraction was examined on intestinal immune system modulating activity *in vitro*. The cell wall and cytosol preparation showed the relatively high bone marrow cell proliferating activity through Peyer's patch cell in a dose-dependent manner. But these preparations did not directly stimulate the bone marrow cell proliferation. The whole cell, cell wall and cytosol preparation also induced considerable levels of macrophage activation and mitogenicity of murine splenocytes *in vitro*. The anti-complementary activity (ITCH₅₀) of the cytosol fraction of *L. brevis* FSB-1 was the most potent in the cellular components, and the activity showed dose dependency. The complement activation by the cytosol fraction of *L. brevis* FSB-1 occurs *via* both alternative and classical pathways, which confirmed by the crossed immunoelectrophoresis using anti-human C3.

Key words: *Lactobacillus brevis*, immunopotentiating activity, intestinal immune system, macrophage, splenocyte

서 론

유산균은 19세기 중반 Pasteur에 의해서 그 존재가 밝혀진 이래 Metchnikoff의 장수설로 관심이 집중되어 왔으며(1), 건강한 사람의 장내 상재 미생물로서 대표적인 균으로는 *Bifidobacterium*속과 *Lactobacillus*속이 있다(2). 유산균은 오래전부터 yoghurt, cheese 등 발효 유제품과 김치, 간장 등 전통 발효식품에 이용되어 왔으며, 식품산업에 있어 중요한 역할을 담당해 왔다. 최근에는 유산균을 생균제제로 섭취하는 probiotics로서의 개념이 대두되고 있는데, 이에 따라 유산균이 갖는 성장작용 외에 항암효과, 항균작용, 항콜레스테롤, 항변이원 작용, 면역 증진효과 등(3-5) 생리활성에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(2,3,6-9). 항암 및 면역활성의 증진에 대한 연구는 유산균체의 섭취 또는 세포성분 및 이들의 대사산물에 의한 것으로서(8,10), 예를 들어 세포벽 성분(capsular polysaccharides, peptidoglycans, lipoteichoic acids)에 의한 대식세포의 사이토카인 유도(9,11) 및 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*에 의한 항암효과, 대식세포 활성화 및 사이토카인의 유도가 보고되고 있다(10,12,13). 또한 *Lactobacillus plantarum*에 의한 대식세포의 사이토카인 유

도(14) 및 이 균체의 세포벽 성분에 의한 보체 활성화도 보고되고 있다(15). 유산균이 이러한 면역 활성화 기능을 발휘하기 위해서는 유산균이 소화기관을 거쳐 장내까지 생존하여야 하며 장내표면이나 상피세포에 어떠한 형태로든 결합하여 지속적으로 살아갈 수 있는 능력이 있어야 한다. 즉 장내 상재성을 갖는 유산균 및 이들이 생산하는 세포성분과 산물 등이 Gut Associated Lymphoid Tissue(GALT)를 자극시키고, Peyer's patch 내의 면역세포의 분열 및 증식을 증가시키며, antibody(IgA의 분비)와 사이토카인의 생산을 유도하여, 결과적으로 인체의 전신 면역계에 공헌하게 된다(8).

Lactobacillus brevis ATCC 14869T와 ATCC 8287은 *in vitro* 실험결과 human Caco-2 및 Intestine 407 cells에 대해(16), *L. brevis* PEL1은 human intestinal mucus model에 대하여 각각 매우 높은 장내 점착능을 보이고 있으며(17), 낮은 pH와 담즙산, 체장액에 대한 저항성이 보고되고 있다(16). 또한 *L. brevis*는 우유, 치즈, 인간의 분변 및 입과 장내에서 분리되며(16-18), Generally Recognized As Safe(GRAS) status로써 여겨져 probiotics로서의 잠재성에 대한 연구가 이루어져 왔다(16,19,20).

따라서 본 연구에서는 본 균주의 안전성과 우수한 장내 점

[†]Corresponding author. E-mail: hlee@kyonggi.ac.kr
Phone: 82-31-249-9653, Fax: 82-31-249-9650

착능 그리고 probiotics로의 잠재성을 기초로 하여, 본 실험실에서 김치로부터 분리한 *Lactobacillus brevis* FSB-1의 각 균체성분(전균체, 세포벽, 세포질 및 균체의 획분)이 갖는 장관면역 활성, 대식세포 활성화능, splenocyte mitogen 활성, 보체 활성화능 및 보체 활성화 경로에 대한 전반적인 면역 활성화능을 측정하였다. 따라서 본 균주의 균체 분획물이 면역증진 활성을 가지고 있는지 검토함으로써, 향후 probiotics 또는 의약품으로써의 응용 가능성을 제시할 수 있는 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 *Lactobacillus brevis* FSB-1은 경기대학교 대학원 식품미생물학 실험실에서 김치로부터 분리 및 동정하여 보관 중인 균주로서, 본 실험의 면역활성 측정에 사용되었다.

균체성분의 분획물 조제

MRS 액체배지(Difco Co., USA) 300 mL에 *L. brevis* FSB-1의 전 배양액 1%를 접종한 후, 37°C에서 48시간 동안 혐기적으로 배양하였다. 배양액 전체를 100°C에서 10분간 처리하여 균체를 사멸시킨 후, 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수균체를 생리식염수로 3회 세척한 후 증류수에 현탁하고, 초음파 분쇄기(Ultrasonic processor, Sonics and Materials Inc., USA)를 이용하여 4°C에서 5분간 세포벽을 파쇄한 다음, 6,000 rpm에서 원심분리하여 미파쇄 균체를 제거하였다. 상등액을 재차 4°C, 25,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액과 침전물로 분리하고, 각각을 세포질 획분(cytosol fraction)과 세포벽 획분(cell wall fraction)으로 하였다. 또한 배양상등액에 4배 부피의 에탄올(시약 1급)을 첨가하여 상온에서 하룻밤 동안 방치시킨 후, 원심분리하여 침전물을 회수하고 배양상등액을 균체의 획분(extracellular fraction)으로 하였다. 이렇게 얻어진 각 분획물을 동결건조한 다음 보관하면서, 일정농도의 용액으로 조제한 후 활성 측정용으로 사용하였다.

장관면역 활성측정

장관면역 활성은 Hong 등(21)의 방법에 의거하여 Peyer's patch 세포를 매개로 한 골수세포 증식정도를 측정함으로써 평가되었다. 즉 C₃H/HeN mouse(7주령, female)를 경추탈구하여 치사시킨 후, 복부를 절개하여 소장을 적출하고 소장벽에 붙어 있는 Peyer's patch를 떼어낸 다음, 7% FBS(Sigma Chemical Co., USA)를 함유한 RPMI 1640(Gibco BRL, USA) 배지(RPMI 1640-FBS)가 든 petri dish에 옮겼다. Patch위에 멸균된 금속체(100 mesh)를 올려놓고 주사기의 고무 부분을 이용하여 조직을 파피시킴으로써 Peyer's patch로부터 세포를 방출시켰다. 세포 현탁액을 멸균된 금속체(200 mesh)

를 이용하여 재차 여과한 후 RPMI 1640-FBS 배지로 세척하였다. 세척 후 동일배지로 세포수를 2.0×10^6 cells/mL가 되도록 조절한 후, microtiter plate(Becton Dickinson Lab., USA)에 180 μ L씩 분주하고 각 시료를 20 μ L씩 분주한 다음, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 골수세포 증식활성 측정용으로 사용하였다.

한편 골수세포액의 조제는 동일종의 마우스 대퇴부 뼈를 적출한 후, 주사기 바늘을 이용하여 RPMI 1640-FBS 배지를 뼈 속으로 넣어 골수세포를 회수하였다. 골수세포를 위와 같이 여과 및 세척하고, 세포농도를 2.5×10^5 cells/mL로 조정하여 microtiter plate에 100 μ L씩 분주하였다. 그 후 Peyer's patch 세포와 시료를 반응시킨 배양 상등액(간접자극) 또는 시료 용액(직접자극) 50 μ L와 RPMI 1640-FBS 배지 50 μ L를 각각 plate에 분주한 다음, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 6일간 배양하였다. 골수세포 증식활성 측정은 Alamar Blue™ assay법(22)이 이용되었다. 즉, 골수세포의 배양 종료 18시간 전에 Alamar Blue™ 용액(Biosource Co., USA) 20 μ L를 첨가하여 반응시킨 후에, 골수세포의 증식도를 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 형광분석기(Luminescence spectrophotometer, Perkin Elmer Ltd., UK)로 측정하였다. 골수세포 증식활성화 정도는 시료 대신 생리 식염수를 사용한 대조구와 시료 처리구의 골수세포의 증식도를 비교하여 측정하였다.

마크로파지 활성화능 측정

마크로파지 활성화능 측정은 Suzuki 등(23)의 방법을 실험실 여건에 맞게 다소 변형하여 사용하였다. 즉, ICR mouse(6주령, 웅성)에 5% thioglycollate(TG, Sigma Chemical Co., USA) 배지 2 mL를 복강에 주사하고, 3일 후 유도된 복강내 마크로파지를 RPMI 1640-FBS 배지를 이용하여 회수하고 2~3회 세척하였다. 회수한 마크로파지를 1.0×10^6 cells/mL가 되도록 동일 배지를 이용하여 세포수를 조절한 후, microtiter plate에 200 μ L를 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 동안 배양하여 세포를 well 표면에 부착시켰다. 부착되지 않은 여분의 마크로파지를 RPMI 1640-FBS 배지를 이용하여 세척하고, 동일 배지 180 μ L를 분주하였다. 여기에 각 농도별 시료 20 μ L를 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액은 상등액을 제거한 후 RPMI 1640-FBS 배지로 세척하였으며, 각 well에 0.1% Triton X-100(Sigma Chemical Co., USA)을 25 μ L씩 분주하여 세포막을 용해시켰다. 마크로파지로부터 유리된 lysosomal phosphatase의 활성 측정을 위해, 기질인 p-NPP(p-nitrophenylphosphate, 1 mg/mL of 0.025 M citrate buffer, pH 5.0, Sigma Chemical Co., USA) 200 μ L를 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 후 0.2 M borate buffer(pH 9.8) 50 μ L를 넣어 발색시킨 후, Microtiter Reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Splenocyte mitogen 활성능 측정

ICR mouse(6주령, 웅성)를 처사시킨 후 비장을 적출하여 RPMI 1640-FBS 배지가 들어 있는 petri dish에 담긴 후, 주사기의 고무마개와 화염 멸균한 100 및 200 mesh 금속망을 이용하여 마쇄 및 여과를 실시하여 비장세포액을 얻었다. 이 세포액을 저장액 용혈법(0.2% NaCl 용액, 3 mL로 약 20초간 처리)을 이용하여 적혈구를 제거한 다음, RPMI 1640-FBS 배지로 2~3회 세척한 후 세포수가 5.0×10^6 cells/mL가 되도록 조절하였다. 이 세포액을 microtiter plate에 90 μ L씩 분주하고 각 시료를 10 μ L씩 첨가하여 37°C, CO₂ incubator에서 3일 동안 배양하였다. 비장 림프구의 증식정도는 MTT법(24)을 이용하여 측정하였다. 즉, 각 well의 세포배양액에 발색시약 MTT(Methylthiazolotetrazolium, Sigma Chemical Co., USA) 용액 50 μ L를 첨가하여 CO₂ incubator에서 5시간 동안 배양하였다. 형성된 MTT-formazan 침전물을 회수한 후, 0.04 N HCl/isopropanol(시약 1:1) 100 μ L를 이용하여 재차 용해시킨 다음, Microtiter Reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

보체계 활성화능 측정

항보체 활성은 Kabat와 Mayer법(25)에 근거하여, 시료에 의해 보체를 활성화한 후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 활성에 근거를 둔 complement fixation test를 이용하여 측정하였다. 즉, 정상인의 혈청과 500 μ M Ca⁺⁺, 2 mM Mg⁺⁺이 함유된 gelatin veronal buffered saline(GVB⁺⁺ buffer, pH 7.4, (주)일본동결건조연구소) 및 시료를 각각 50 μ L씩 혼합하여 37°C에서 30분간 1차 반응시킨 후, 이 반응액에 GVB⁺⁺ buffer를 350 μ L씩 첨가하고 이를 10~160배까지 연속하여 희석하였다. 여기에 GVB⁺⁺ buffer 750 μ L와 양혈(Komed, Co., Ltd., Korea)과 hemolysin(Sigma Chemical Co., USA)으로 제조된 양의 감작적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocyte, EA Cell, 1×10^8 cells/mL)를 각각 250 μ L씩 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 4°C의 phosphate buffered saline(PBS) 2.5 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 각 반응액을 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 Microtiter Reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항보체 활성은 50% 총보체용혈에 대한 저지율(ITCH₅₀, inhibition of 50% total complement hemolysis)로 나타내었다.

보체계 활성화 경로 검토

보체계 활성화: 보체계 활성화 경로를 조사하기 위하여 GVB⁺⁺ buffer(classical 및 alternative pathway 경우), GVB⁺⁺에서 Ca⁺⁺만을 선택하여 제거하기 위해 2 mM MgCl₂ 및 10 mM EGTA가 함유된 Mg⁺⁺-EGTA-GVB⁺⁺ buffer(alternative pathway 경우), 그리고 금속이온을 모두 제거하기 위하여 10 mM EDTA가 함유된 EDTA-GVB⁺⁺ buffer에 시료 및 정상인의 혈청을 각각 첨가하고, 상기 방법과 같이 총보체용혈의

저지율을 측정함으로써 시료의 보체계 활성화 경로를 비교 검토하였다.

2차원 면역 전기영동(Crossed Immunoelectrophoresis)

: GVB⁺⁺ buffer(classical 및 alternative pathway 경우), Mg⁺⁺-EGTA-GVB⁺⁺ buffer(alternative pathway 경우), EDTA-GVB⁺⁺ buffer(lectin pathway 경우)에 각각 정상인의 혈청과 시료를 혼합하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, pH 8.6의 barbital buffer(ionic strength, 0.025)를 사용하여 조제한 1% agarose gel상에서 1차 전기영동을 실시하였다(3 mA/cm). 이후 0.5%의 anti-human C3 serum(Sigma Chemical Co., USA)이 함유된 1% agarose gel상에서 약 15시간 동안 2차 전기영동을 실시하였다(1 mA/cm). 전개된 gel은 bromophenol blue(Sigma Chemical Co., USA)로 염색시켜 항체와 반응하여 형성된 침강선을 관찰함으로써 C3의 분해산물을 확인하였다(26).

통계처리

실험결과는 평균값 \pm SD로 나타내었고, Student *t*-test를 이용하여 통계처리한 후 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

골수세포 증식에 의한 장관면역 활성

L. brevis FSB-1에서 분리한 전균체, 세포벽, 세포질 및 균체의 획분을 대상으로 Peyer's patch 세포를 매개로 한 골수세포의 증식도를 측정함으로써 장관면역 활성을 검토하였다. 그 결과 Fig. 1-A에 나타난 바와 같이 모든 획분에서 무첨가 대조군에 비해 상대적으로 높은 활성을 보였으며, 특히 세포벽과 세포질 획분에서 약 30%이상 증가된 활성경향을 나타내었다. 그러나 이들 활성은 양성 대조군인 LPS보다는 전반적으로 낮은 활성이었다. 골수는 1차 림프조직계로서 미성숙 림프구를 포함하여 순환계 내에 있는 모든 혈구세포들이 동일한 전구세포에서 생성 및 분화되는 부위으로써, 이들 세포들이 전신을 순환하며 각종 생체반응을 수행하므로 골수세포 증식은 면역계에 있어 매우 중요한 위치를 차지하고 있다고 할 수 있다(27-29). 그러나 본 실험에 사용된 활성 측정법의 특성상 Peyer's patch 배양 상등액으로 골수세포의 증식을 유도하므로, Peyer's patch 배양 상등액에 존재했던 시료가 직접 골수세포를 증식시킬 가능성이 있다. 따라서 본 실험에서는 골수세포의 증식활성이 시료가 직접 작용하여 나타난 결과(직접 자극)인지 또는 소장 내에 존재하는 Peyer's patch 세포의 활성화에 기인한 간접적인 골수세포 증식활성인지를 확인하고자 하였다. 그 결과 Fig. 1-B에 나타난 바와 같이 Peyer's patch 세포를 매개로 한 활성 Fig. 1-A보다 직접 골수세포를 자극한 경우가 낮은 결과를 보였으며, 특히 모든 시료의 활성은 무첨가 대조군보다 낮은 경향을 나타냈다. 이러한 사실로부터 *L. brevis* FSB-1의 각 균체성분

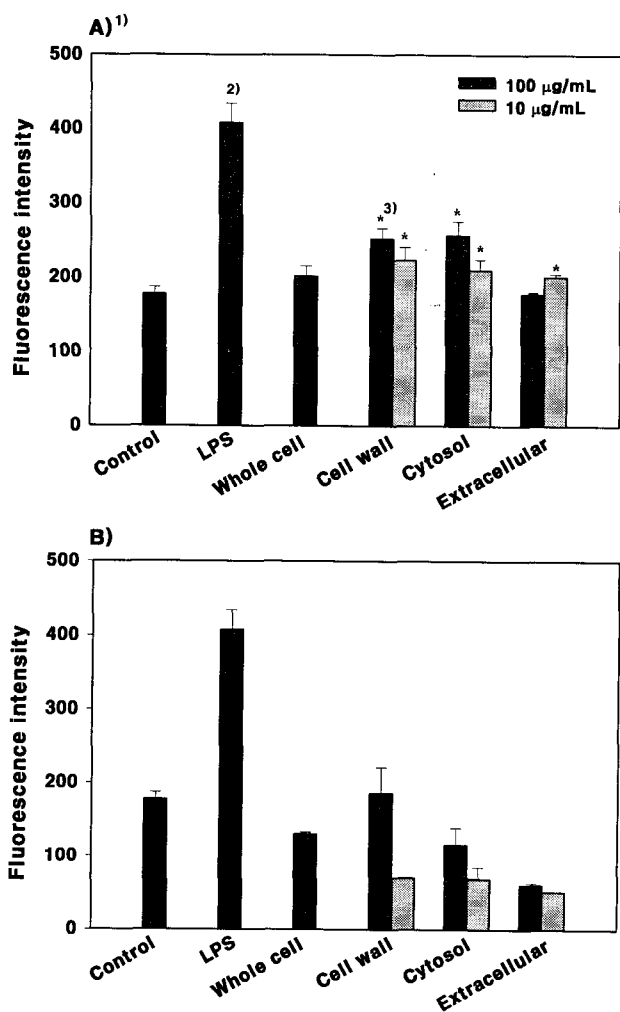


Fig. 1. Comparison of A) Peyer's patch-mediated effect and B) direct effect of the cellular components of *Lactobacillus brevis* FSB-1 on bone marrow cell proliferation.

¹⁾A) After Peyer's patch cells were incubated with the sample, the resulting supernatant was incubated with bone marrow cells, B) The sample was directly incubated with bone marrow cells without reaction with Peyer's patch cells. ²⁾LPS, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 was used as a positive control. ³⁾*p<0.05; Significant difference between control (saline only) and sample.

이 직접 골수세포증식에 관여하는 것이 아니라 Peyer's patch의 면역세포들을 활성화시킴으로써 골수세포 증식을 유발시키는 특정물질을 생성한다는 사실을 추론할 수 있었다. 이와 유사한 결과로써 Yasui와 Ohwaki(30)는 유산균의 일종인 *Bifidobacterium breve*의 세포벽 획분을 첨가한 균에서 높은 Peyer's patch 세포의 증식이 일어났다고 보고하였으며, Shin 등(31)은 *Bifidobacterium bifidum* SL 21의 세포벽 성분이 Peyer's patch의 림프구를 활성화시켰다고 보고하였다.

마크로파지 활성화능

마크로파지는 체내로 이물질(감염성 미생물 등)이 침입하였을 때 이들을 초기에 비특이적으로 제거시키는 탐식세포

로서, 세포 매개성 면역에 중요한 역할을 담당하는 면역세포로 알려져 있으며, 염증반응(inflammation)이나 종양치사작용(tumoricidal effect) 등 다양한 기능을 수행하고 있다고 보고되고 있다(14). 또한 마크로파지는 항원을 탐식 및 분해(processing)하여 그 일부를 자신의 세포 표면에 부착 및 제시(presentation)함으로써 T 림프구에 의한 면역반응을 유도하여 후천성 면역계가 작동할 수 있도록 해 주는 effector cell로서 작동한다(28,32). *L. brevis* FSB-1 균체 분획물을 대상으로 마크로파지 활성화능을 검토한 결과, 전균체, 세포벽 및 세포질 획분을 1과 10 µg/mL의 농도로 처리한 균에서 대조군보다 높은 활성의 증가가 관찰되었다(Fig. 2). 이 결과는 강력한 면역 조절인자로 알려진 LPS의 활성에는 미치지 못하는 결과이지만, 본 균주의 다양한 균체성분이 마크로파지를 자극하여 활성화시킴을 알 수 있었다. 한편 균체의 획분은 마크로파지 활성화에 거의 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다. 본 실험결과와는 다르지만, Kitazawa 등(12)과 Uemura 등(13)은 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL 1073R-1의 경우, 이들이 생산하는 균체의 다당이 마크로파지의 기능을 향상시키고, 특히 이들 균주에 의해 생산된 phosphopolysaccharide가 활성의 본체이며, 이들 중 phosphate group이 마크로파지 기능 향상에 중요한 역할을 담당한다고 보고한 바 있다.

Splenocyte mitogen 활성

비장(spleen)은 혈액으로부터 항원을 수집하며, B 및 T 림프구의 성숙과 항원에 의해 자극을 받은 후에 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프기관으로 비장 내 림프구의 증식은 면역시스템에서 매우 중요한 의미를 갖는다(33). *L. brevis*

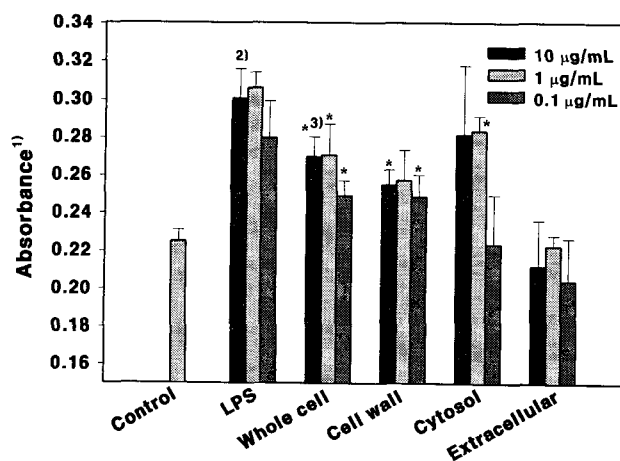


Fig. 2. Macrophage-stimulating activities of the cellular components of *Lactobacillus brevis* FSB-1.

TG-elicited macrophages were cultured with each cellular component and control. ¹⁾The macrophage-stimulating activity was measured by lysosomal phosphatase activity, and expressed as mean ± SD of quadruplicate cultures. ²⁾LPS, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 was used as a positive control. ³⁾*p<0.05; Significant difference between control (saline only) and sample.

FBS-1의 각 균체성분에 대한 splenocyte mitogen 활성을 측정 한 결과, 전균체, 세포벽 및 세포질 획분에서 무침가 대조군에 비해 약 150~250%의 높은 활성 증가가 관찰되었다. 특히 이들 증가된 활성은 시료농도에 따라 활성이 높아지는 농도 의존적인 경향을 보여주었다(Fig. 3). 한편 균체의 획분의 경우, 마크로파지 활성화 경향과 유사하게 mitogen 활성도 거의 없는 것으로 나타났다.

본 실험과는 상반된 결과로 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*의 경우, 이들이 생산한 균체의 산성 다당인 phosphopolysaccharide가 비장림프구의 증식을 유도하고 phosphopolysaccharide가 잠재적인 B-cell dependent mitogen으로 작용하며, 그 중 phosphate기가 중요한 역할을 담당한다는 결과가 발표된 바도 있다(11).

한편 Wright 등(34)은 *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC

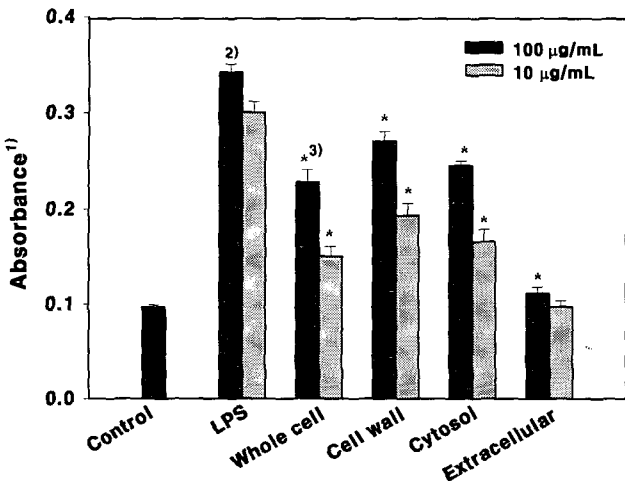


Fig. 3. Splenocyte mitogenic activities of the cellular components of *Lactobacillus brevis* FSB-1.

Splenocytes were cultured with each cellular component and control. ¹⁾Splenocyte mitogenic activity was measured by MTT assay as described in 'Materials and Methods' and expressed as mean \pm SD of quadruplicate cultures. ²⁾LPS, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 was used as a positive control. ³⁾ $p < 0.05$; Significant difference between control (saline only) and sample.

53103을 mouse에 viable probiotics로서 투여한 결과, T-와 B-cell mitogenesis를 향상시킨다고 보고한 바 있으며, Kitazawa 등(35)은 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6은 splenic B cells를 유도할 수 있는 oligonucleotide를 가지고 있어서, 비장을 활성화시킬 수 있다고 보고하였다. 이 결과는 향후 *L. brevis* FBS-1의 면역증진 활성물질 규명에 대한 연구의 필요성을 제기하였다.

보체계 활성화능

L. brevis FSB-1의 각 균체성분에 대한 보체계 활성화능을 측정 한 결과, 균체의 획분을 제외한 각 획분의 경우 1,000 µg/mL 농도에서 ITCH₅₀, 100%의 매우 우수한 보체계 활성화능을 보였다(Table 1). 이는 보체계의 강력한 활성인자로 알려져 있으며, 본 실험에서 양성대조군으로 사용한 구름버섯(*Coliolius versicolor*, 운지) 기원의 Polysaccharide-K (PSK)보다도 높은 활성이었다. 특히 세포질 획분의 경우, 100 µg/mL의 저농도에서도 약 69%의 항보체 활성화능을 나타냄으로써 가장 높은 보체계 활성화능을 보였다. 따라서 이들 세포질 획분에 대하여 농도 증가에 따른 보체계 활성을 재차 측정 한 결과, 보체계 활성이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 또한 세포질 획분 500 µg/mL의 농도에서도 100%의 항보체 활성화능을 보였으며, 양성대조군인 PSK 500 µg/mL와 세포질 획분 100 µg/mL에서 비슷한 항보체 활성화능을 나타냄으로써, *L. brevis* FSB-1의 세포질 획분은 보체계의 강력한 활성인자임을 재차 확인할 수 있었다.

한편 Kim 등(15)은 *Lactobacillus plantarum*의 경우, 세포질 획분보다는 세포벽 획분에서 분리한 것이 높은 보체계 활성화능을 보인다고 보고한 바 있는데, 본 실험에 사용한 *L. brevis* FSB-1의 경우, 세포질 획분에서 보다 양호한 활성을 보이는 상반된 결과를 나타냈다.

보체계 활성화 경로 검토

보체계는 C1~C9의 활성 단백질과 조절인자를 포함하여 약 20여종의 혈중 순환 단백질들로 구성되어 있으며, 외부감염 병원체 등 침입인자를 항체의 존재 또는 비존재 하에 비

Table 1. Anti-complementary activities of the cellular components of *Lactobacillus brevis* FSB-1

Samples	Concentration (µg/mL)	Anti-complementary activity ¹⁾ (ITCH ₅₀ , %)	Samples	Concentration (µg/mL)	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %)
Whole cell Fr.	1,000	100.0 \pm 0.0 ³⁾	Cytosol Fr.	1,000	100.0 \pm 0.0
	100	0.1 \pm 2.2		500	100.0 \pm 6.0
Cell wall Fr.	1,000	100.0 \pm 0.0	Extracellular Fr.	1,000	61.9 \pm 3.5
	100	11.9 \pm 4.0		100	28.1 \pm 1.7
Cytosol Fr.	1,000	100.0 \pm 0.0	PSK ²⁾	1,000	99.2 \pm 11.9
	100	69.1 \pm 4.0		500	76.2 \pm 1.4

¹⁾The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method.

²⁾Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coliolius versicolor* was used as a positive control.

³⁾The data were expressed as mean \pm SD of three separate experiments.

특이적으로 제거하는 생체의 주요 방어기구이다(36). 보체계가 활성화되면 연속적인 cascade반응에 의하여 보체 단백질이 활성 분자로 분해되고, 이들이 침입인자의 표면에 부착되어 최종적으로 MAC(membrane attack complex)를 형성하여 감염 병원체 등을 제거하는 것으로 알려져 있다(37). 또한 보체 활성화 과정 중 생성되는 여러 보체 분해산물은 각종 생리반응을 매개한다고 알려져 있으며, 특히 마크로파지와 lymphocyte의 활성화, 면역증강 등과 밀접한 상관관계가 있다고 보고되고 있다(37). 보체계 활성화 경로는 보체의 중요 성분인 C3의 활성화방법에 따라 구분되어진다(36). 즉 classical pathway는 면역복합체 존재 하에 C1q성분이 항체의 CH₂(IgG)나 CH₄(IgM) 영역에 결합함으로써 개시되며, 이후에 C1r, C1s들이 Ca⁺⁺존재 하에 C1qrs복합체를 형성하고, C4, C2와 반응하여 C4b와 C2a를 유리시키고 Mg⁺⁺존재 하에 C3 convertase 활성을 갖는 C4b2a를 형성한다. Alternative pathway는 면역복합체의 관여 없이 보체가 활성화되는 경로로, 혈중 미량 생성되는 C3i에 factor B, factor D가 관여하며, Mg⁺⁺존재 하에 C3 convertase(C3iBb)가 형성된다(28). 또한 lectin pathway는 mannose binding lectin(MBL), MBL-associated serine protease의 작용으로 C4와 C2를 비특이적으로 활성화시키고 C3를 활성화한다. 따라서 활성화에 관여하는 금속이온의 존재여부에 따라 반응계를 조절하면 보체계 활성화 경로를 예측할 수 있게 된다. 보체계에 대해 높은 활성을 나타내었던 세포질 획분을 대상으로, GVB⁺⁺ 기본 반응계와 2가 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB⁻⁻ 반응계 및 Ca⁺⁺이온만을 선택적으로 제거한 Mg⁺⁺-EGTA-GVB⁻⁻ 반응계로 나눈 다음, 농도별로 항보체 활성(ITCH₅₀)을 비교 측정하였다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 *L. brevis* FSB-1의 세포질 획분의 경우, Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺이 모두 존재하는 기본 반응계에서의 활성과 비교할 때 2가 금속이 모두 제거된 반응계에서는 대조군에 비해 거의 완전한 활성의 감소를 관찰할 수 있었으나, Mg⁺⁺ 이온만 존재하는 반응계에서는 활성이 상당량 유지(약 20~40% 수준)되는 결과를 보였다. 이러한 사실은 *L. brevis* FSB-1의 세포질 획분이 보체계의 classical pathway와 alternative pathway 양 경로를 모두 활성화시킬 수 있음을 의미하는 것으로, 특히 alternative pathway는 항체에 의한 면역반응이 일어나기 전에 활성화되기 때문에 항원에 의해 감작되지 않은 숙주에 있어 중요한 1차적 방어기작이므로 그 의미가 크다고 할 수 있다(38).

2차원 면역전기영동에 의한 C3산물의 동정

Kabat와 Mayer법(25)에 의한 항보체 활성측정법은 1차 반응단계에서 시료성분의 보체계 활성화에 의한 보체의 소모 정도를 측정하는 방법으로, 단일 시료 중 보체의 활성도가 아닌 특정한 저해성분이 존재할 경우에도 높은 항보체 활성을 보일 수 있는 문제점을 갖고 있다(15). 따라서 *L. brevis* FSB-1의 세포질 획분의 항보체 활성이 보체계 활성화에 기

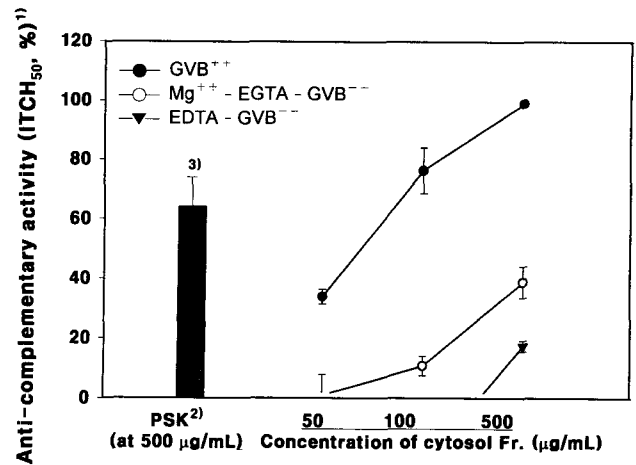


Fig. 4. Effect of calcium and magnesium ions on anti-complementary activity by cytosol fraction of *Lactobacillus brevis* FSB-1.

¹⁾The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. ²⁾Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Colioltus versicolor* was used as a positive control. ³⁾The data were expressed as mean ± SD of three separate experiments.

인한 것인지, 혹은 시료의 보체 저해활성에 의한 것인지를 확인하기 위하여, 보체계 활성화에서 가장 중요한 성분으로 알려진 C3의 활성화 여부를 조사하였다. 일반적으로 보체계가 활성화되면 C3는 C3a와 C3b로 분해되므로(38,39), 시료와 정상인 혈청을 반응시킨 후 1차 전기영동을 실시하고 anti-human C3를 이용하여 2차 면역전기영동을 행함으로써 C3분해산물을 동정하고자 하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 시료의 첨가 없이 정상인의 혈청만을 반응시킨 후 면역전기영동한 결과는 C3의 활성화가 이루어지지 않아 단일 침강선(precipitation line)이 나타나는 반면(Fig. 5-A), *L. brevis* FSB-1의 세포질 획분과 혈청을 기본 반응계에서 반응시킨 경우는 C3의 활성화가 일어나 두개의 침강선이 형성된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5-B). 따라서 본 균주의 세포질 획분의 항보체 활성은 보체계의 저해가 아닌 직접 활성화에 기인함을 확인할 수 있었다.

L. brevis FSB-1의 세포질 획분을 Mg⁺⁺-EGTA-GVB⁻⁻ 및 EDTA-GVB⁻⁻ 반응계에서 반응시킨 후 그 분해 산물을 관찰한 결과는 Fig. 5-C 및 Fig. 5-D항에 나타난 바와 같다. 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB⁻⁻ 반응계에서는 C3의 활성화가 진행되지 않아 1개의 침강선이 관찰된 반면, Ca⁺⁺ 이온을 선택적으로 제거한 Mg⁺⁺-EGTA-GVB⁻⁻ 반응계에서는 2개의 침강선이 관찰되었다. 따라서 *L. brevis* FSB-1의 세포질 획분은 보체계의 classical pathway와 alternative pathway의 두 경로를 모두 활성화시킬 수 있음을 재차 확인할 수 있었다.

*L. brevis*는 현재 probiotics로써 잠재성이 제시되고 있는 균주로서, 본 실험에서는 장관면역활성, 마크로파지 활성화 및 splenocyte mitogen 활성 등 다양한 면역활성이 관찰되었

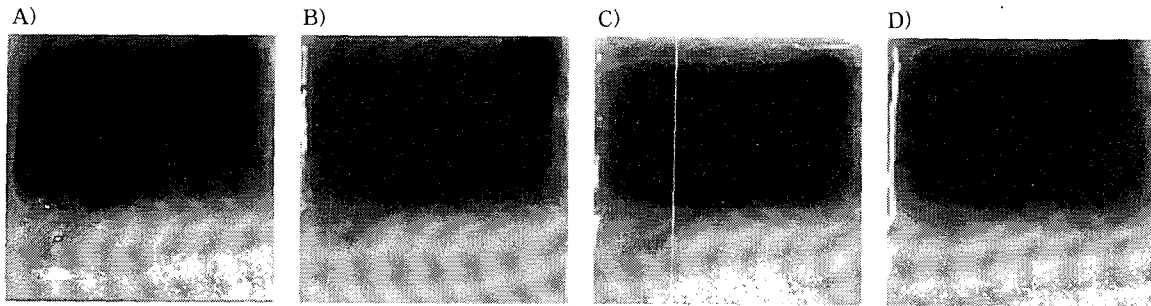


Fig. 5. Crossed immunoelectrophoretic patterns of C3 converted by cytosol fraction of *Lactobacillus brevis* FSB-1. Normal human serum was incubated without (A) or with the samples in GVB⁺ (B), Mg⁺⁺-EGTA-GVB⁻ (C) and EDTA-GVB⁻ (D) at 37°C for 30 min. The sera were then subjected to immunoelectrophoresis using anti-human C3 antibody to locate C3 cleavage products. The anode is to the left.

고 특히 강력한 보체 활성화능이 관찰되었다. 따라서 향후 식품의 첨가제 및 probiotics로의 이용 가능성이 더욱 높은 것으로 여겨진다.

요 약

새로운 probiotic 유산균으로써의 잠재적 이용가능성을 평가할 목적으로, 김치로부터 분리한 *Lactobacillus brevis* FSB-1을 대상으로 각종 면역증진활성의 특성이 조사되었다. *L. brevis* FSB-1을 전균체, 세포벽, 세포질 및 균체의 획분으로 각각 분리하고 장관면역 활성을 측정된 결과, Peyer's patch 세포를 매개로 한 골수세포 증식활성의 경우, 세포벽 및 세포질 획분에서 상대적으로 높은 활성을 농도 의존적으로 보인 반면, 직접적인 골수세포 증식활성은 나타내지 않았다. 마크로파지의 활성화능은 전균체, 세포벽 및 세포질 획분에서 상대적으로 높은 활성을 보였으며, splenocyte mitogen 활성의 경우, 이들 획분에서 공히 대조군의 약 200%이상의 활성 증가가 관찰되었다. 그러나 양성대조군인 LPS의 활성에는 다소 미치지 못하였다. 한편 보체계 활성화능을 검토한 결과, 균체의 획분을 제외한 모든 획분에서 높은 활성을 보였으며, 특히 세포질 획분에서 농도 의존적으로 매우 강력한 활성을 나타냈다. 또한 세포질 획분에 의한 보체계 활성화는 anti-human C3를 이용한 2차원 면역전기영동에 의해 classical 및 alternative pathway 양 경로를 경유함을 확인할 수 있었다.

문 헌

1. Metchnikoff E. 1907. *The prolongation of life. Optimistic studies*. Wiliam Heinemann, Ltd., London.
2. Fang H, Elina T, Heikki A, Salminen S. 2000. Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29: 47-52.
3. Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. 1999. Probiotics: How should they be defined? *Trends Food Sci Technol* 10: 107-110.
4. Arthur C, Ouwehand PV, Kirjavainen CS, Salminen S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J* 9: 43-52.
5. Sherwood L, Gorbach MD. 2000. Probiotics and gastrointestinal health. *Am J Gastroenterol* 95: 2-4.
6. Jung CM, Kang KH. 1999. Industrial utilization and future prospect of lactic acid bacteria. *Bioindustry News (Korea)* 12: 16-22.
7. Fernandes CF, Shahani KM. 1990. Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli. *J Food Prot* 53: 704-710.
8. Meydani SN, Ha WK. 2000. Immunologic effects of yogurt. *Am Soc Clin Nutr* 71: 861-872.
9. Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Riva I, Di Fronzo G. 1997. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutr Cancer* 28: 93-99.
10. Kitazawa H, Harata T, Uemura J, Saito T, Kaneko T, Itoh T. 1998. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Int J Food Microbiol* 40: 169-175.
11. Keller R, Fischer W, Keist R, Bassetti S. 1992. Macrophage response to bacteria. Induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect Immunol* 60: 3664-3672.
12. Kitazawa H, Ishii Y, Uemura J, Kawai Y, Saito T, Kaneko T, Noda K, Itoh T. 2000. Augmentation of macrophage function by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Food Microbiol* 17: 109-118.
13. Uemura JN, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T, Oda M, Saito T. 2003. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Food Microbiol* 20: 267-273.
14. Haza AI, Zabala A, Morales P. 2003. Protective effect and cytokine production of a *Lactobacillus plantarum* strain isolated from ewes' milk cheese. *Int Dairy J* 29: 1-10.
15. Kim JH, Shin KS, Lee H. 2002. Characterization and action mode of anti-complementary substance prepared from *Lactobacillus plantarum*. *Kor J Food Sci Technol* 34: 290-295.
16. Elina R, Erja M, Maria S, Merja RK, Johannes A, Airi P. 2003. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int J Food Microbiol* 83: 63-74.
17. Ouwehand AC, Tuomola EM, Tolkkio S, Salminen S. 2001. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol* 64: 119-126.

18. Kandler O, Weiss N. 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore. Vol 2, p 1208-1260.
19. Kishi A, Kazuko U, Matsubara Y, Okuda C, Kishida T. 1996. Effect of oral administration of *Lactobacillus brevis* subsp. Coagulans on interferon- α producing capacity of humans. *J Am Coll Nutr* 15: 408-412.
20. Playfair JHL. 1987. *Immunology at a glance*. 4th ed. Blackwell scientific publications, London.
21. Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. 1998. 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". *Phytomed* 5: 353-360.
22. Page B, Page M, Noel C. 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *Int J Oncol* 3: 473-476.
23. Suzuki I, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M, Yadomae T. 1990. Effects of orally administered β -glucan on macrophage function in mice. *Int J Immunopharmacol* 12: 675-684.
24. Zheng WH, Bastianetto S, Mennicken F, Ma W, Kar S. 2002. Amyloid β -peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neurosci* 115: 201-211.
25. Kabat EA, Mayer MM. 1971. Complement and complement fixation. In *Experimental Immunology*. 2nd ed. Charles, C, ed. Thomas Publisher, Illinois, USA. p 133-240.
26. Shimura K, Ito H, Hibasami H. 1983. Screening of host-mediated antitumor polysaccharides by crossed immunoelectrophoresis using fresh human serum. *Jpn J Pharmacol* 33: 403-408.
27. Benedetti R, Massouh E, Flo J. 1995. The bone marrow as a site of antibody production after a mucosal immunization. *Immunol Lett* 48: 109-115.
28. Kim DS, Kim SY, Kim CC, Min CG, Park SJ, Seo YH, Yeum HS, Jung NG, Jung DC, Jung TJ, Jin JY, Han CH. 2000. *Immunological biotechnology*. 4th ed. Lifescience, Oxford.
29. Janeway CA, Travers P, Walport M. 1994. *The immune system in health and disease*. Garland Publisher, New York.
30. Yasui H, Ohwaki M. 1991. Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. *J Dairy Sci* 74: 1187-1195.
31. Shin MS, Yu KW, Shin KS, Lee H. 2004. *In vitro* bone marrow cell proliferation of cell wall preparation from *Bifidobacterium bifidum* SL 21. *Kor J Food Sci Technol* 36: 484-489.
32. Benjamini EG, Lesrowitz S. 1996. *Immunology a short course*. 3th ed. Wiley-liss, New York.
33. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*. 4th ed. WB Saunders, London.
34. Wright PFA, Kirjavainen PV, Ahokas JT, Salminen SJ. 1998. Effect of orally-dosed viable probiotics on mouse lymphocyte proliferation. *Toxicol Lett* 95: 157.
35. Kitazawa H, Watanabe H, Shimosato T, Kawai Y, Itoh T, Saito T. 2003. Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6. *Int J Food Microbiol* 85: 11-21.
36. Kwon MH, Sung HJ. 1997. Characteristics of immune response by polysaccharides with complement system activity. *Food Sci Indus* 30: 30-43.
37. Jung YJ, Chun H, Kim KI, An JH, Shin DH, Hong BS, Cho HY, Yang HC. 2002. Purified polysaccharide activating the complement system from leaves of *Diospyos kaki* L. *Kor J Food Sci Technol* 34: 879-884.
38. Whaley K. 1986. The complement system. In *Complement in health and disease*. Whaley K, ed. MTP Press, Lancaster, USA. p 1-35.
39. Shin KS. 1999. Potential utilization and medical activity of pectic substance. *Food Sci Indus* 32: 91-101.

(2004년 7월 21일 접수; 2004년 10월 25일 채택)