

청국장이 난소적출 마우스의 면역 기능에 미치는 영향

박현진¹ · 윤이나² · 김현숙^{1,2*}

¹숙명여자대학교 생활과학대학 식품영양학과
²숙명여자대학교 대학원 생명시스템학과 식품생명시스템 전공

Effects of Fermented Soybean Paste *Chungkukjang* on the Immunoreactivity in Ovariectomized Mice

Hyunjin Park¹, Leena Yoon², and Hyun-Sook Kim^{1,2*}

¹Div. of Food and Nutrition, College of Human Ecology and ²Div. of Food and Nutritional Science & Life Systems, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

ABSTRACT It has been reported that *Chungkukjang*, one of Korean traditional fermented soybean products, may improve hypertension, diabetes, and hyperlipidemia. In this study, we sought to investigate the immunoenhancing effects of *Chungkukjang* in ovariectomized mice. For the first period, female SLC ddy mice were either sham-operated (Sham; n=27) or ovariectomized (OVX; n=27). As a basal diet, ovariectomized mice were fed low-calcium diet for faster induction of osteoporosis for six weeks, and those in the Sham group were fed AIN-76 diet. For the second period, half of the OVX group (n=9) and the Sham group (n=9) were fed a *Chungkukjang*-based diet (CKJ); whereas the other half (OVX; n=9/ Sham; n=9) were fed a casein-based diet (CSI) for 8 weeks. After a second period, we collected the blood via heart puncture and measured the splenocytes proliferation, T lymphocyte subsets by flowcytometry, and levels of serum cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α) by ELISA assay. The OVX+CKJ group showed higher splenocytes proliferation, higher ratio of CD4/CD8, and lower levels of IL-6 and TNF- α cytokines compared to the OVX+CSI group. The Sham+CKJ group showed cytokine productions, such as higher levels of IL-10 and IFN- γ , and lower levels of IL-6 and TNF- α compared to the Sham+CSI group. The result of this study suggests that *Chungkukjang* may lower the proinflammatory cytokine levels in both the OVX and Sham groups. In addition, *Chungkukjang* could make a balance of T cell subset proliferations and enhance the splenocyte proliferations in the OVX group.

Key words: *Chungkukjang*, ovariectomized mice, splenocytes proliferation, T lymphocyte subsets, cytokine production

서 론

예로부터 우리나라 전통 식단에서 콩을 발효시켜 만든 장류는 조미를 위한 수단뿐만 아니라, 육류 섭취량이 많지 않은 우리 민족에게 중요한 단백질 공급원이었다(1). 이 중 청국장은 발효 기간이 짧은 장류로서 잘 씻어 18시간 이상 불려 익힌 대두를 40~45°C에서 바실러스(bacillus) 계통의 미생물을 이용하여 48시간 발효시키는 과정을 거쳐 만들어진다. 청국장에는 식이섬유소가 12%(수용성 식이섬유소 2.3%, 불용성 식이섬유소 9.7%) 함유되어 있고 일반 콩 섭취 시보다 소화 흡수율이 높다(2). 그러나 청국장은 간장, 된장, 고추장과 달리 제조 과정에서 염을 첨가하지 않기 때문에 장기 보존이 어려울 뿐 아니라, 먹기에 거부감을 주는 불쾌취로 인하여 생청국장의 수요가 점점 줄어들고 있는 현실이다

(3,4). 따라서 이러한 문제점을 보완하기 위한 방법으로 청국장환, 청국장 캡슐, 청국장 분말과 같은 제품들이 대량 생산되어 소비가 증가하는 추세에 있다. 아울러 청국장에는 이소플라본(isoflavone), 피틴산(phytic acid), 사포닌(sapoin), 트립신 저해제(trypsin inhibitor), 토코페롤(tocopherol), 불포화지방산, 식이섬유, 올리고당 등의 각종 생리활성 물질과 항산화 물질 및 혈전 용해 효소가 다량 함유되어 있는 것으로 밝혀져(5,6), 기능성 식품으로서의 청국장 관련 제품의 소비가 더욱 증가하고 있다. 뿐만 아니라 발효 식품 중 청국장의 이소플라본 함량이 가장 높은 것으로 보고된 바 있으며(7), 이 중 많은 양의 이소플라본이 아글리콘(alycone) 형태로 존재한다고 하였다(8). 이 아글리콘으로 인하여 청국장이 콩 자체보다 높은 생리활성을 갖는 것으로 밝혀진 바 있다(9). 또한 청국장에 풍부한 콩 이소플라본은 골다공증을 예방하는 효과가 있는 것으로 보고되어 있으며(10-12), 제니스틴(genistein), 다이드제인(daidzein), 글리시테인(glycitein) 등의 성분은 항암, 항산화, 항염증 작용을 하는 것으

Received 20 August 2013; Accepted 11 November 2013

*Corresponding author.

E-mail: hskim@sookmyung.ac.kr, Phone: 82-2-710-9469

로 알려져 있다(13). 뿐만 아니라 난소적출 마우스를 이용한 연구에서 콩 이소플라본 보충이 노화 진행에 수반되는 항산화능 감소와 만성 염증 진행 등을 개선하는 것으로 보고된 바 있다(14). 하지만 콩 자체보다 높은 생리활성을 갖는 것으로 알려진 청국장이 난소적출 동물 모델의 면역계에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 난소적출로 성호르몬 결핍 상태인 마우스에게 저칼슘 식이를 공급하여 골대사 약화 상태를 유도한 후 청국장 배합 식이를 공급하여 우리나라 전통 발효 식품인 청국장 분말이 난소적출 마우스의 면역능에 미치는 효과를 검색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 식이

실험동물은 일본 SLC사(Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan)에서 공급된 ddY 마우스 암컷을 사용하였다. 공급받기 전, 전문가에 의해 난소적출(n=27) 혹은 sham 수술(n=27)을 시행 받고, 수술 후 치료가 끝난 체중 22~25 g의 6주령 ddY 마우스를 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 난소적출 마우스의 회복술에 대한 스트레스 변인을 제어하고자 대조군으로 난소적출을 시행하지 않고 회복술만 시행한 sham 수술 마우스를 선택하였다. 골대사 약화 실험군을 설정하기 위해 난소적출과 동시에 저칼슘 식이를 6주간 공급하였다. 대조군으로는 난소적출 수술과 동일한 스트레스를 주기 위하여 회복 수술을 시행한 Sham군에게 실험군 식이와 동일한 칼로리 및 3대 영양소 함량의 AIN-76 식이를 공급하였다. 6주간의 실험동물 형성 시기 후, 의도했던 골대사 상태가 유발되었는지 확인하기 위하여 혈중 ALP(alkaline phosphatase)를 측정하였다. 이후 8주간 두 군을 난괴법(randomized complete block design)으로 각 군당 9마리씩 나누는 뒤, 실험군에는 청국장 배합 식이를, 대조군에게는 카제인 배합 식이를 공급하였다(Fig. 1).

처음 6주 식이로 Sham군을 위한 AIN-76 사료와 난소적출군을 위한 저칼슘 식이 사료를 제조하였으며, 이후 8주의 식이로 대조군을 위한 카제인 배합 식이와 실험군을 위한 청국장 배합 식이를 제조하였다(Table 1). 청국장 배합 사료의 원료인 청국장 가루는 (주)메주와 첼리스트(Yeoncheon, Korea)에서 공급된 것을 사용하였으며, 그 외 사료 배합을 위한 각 원료 파우더는 미국 Dyets사(Bethlehem, PA, USA)에서 공급한 것을 수입하여 사용하였다. 네 종류의 식이 모두 약 3,800 kcal/kg의 열량을 갖도록 구성되어 있으며, 청국장 배합 사료와 카제인 배합 사료는 Kim 등(15)의 연구에서 사용된 바 있는 식이로서 열량뿐 아니라, 단백질, 지방, 총 식이섬유 함량을 동량으로 하고 복합당과 단순당의 비율도 유사하도록 조제하였다.

식이 섭취량은 매일 측정하였으며 체중은 1주일마다 한 번 측정하였다. 사육실의 환경은 온도 약 22±2°C, 습도 40~60%, 명암주기(light and dark cycle) 12:12 시간으로 조절된 실험동물 사육실에서 사육하였고, 실험 전 기간 동안 고정 사료 및 음용수를 자유 공급하였다. 모든 실험동물은 Institute of Laboratory Animal Resources의 “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”(1996, USA)에 준하여 취급하였다.

혈중 ALP(alkaline phosphatase) 측정

제 1단계 식이 6주가 완료된 후, 각 군에서 9마리씩 희생하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 전혈을 4°C, 3,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 혈청만을 얻어 Kind-King법을 이용하여 ALP 측정 실험에 이용하였다. ALP 활성 측정은 kit(Siemans, Tarrytown, NY, USA)을 이용하였고 ELISA reader(Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아래의 식에 따라 검량선에서 ALP 값을 구하여 ALP 활성치를 계산하였다.

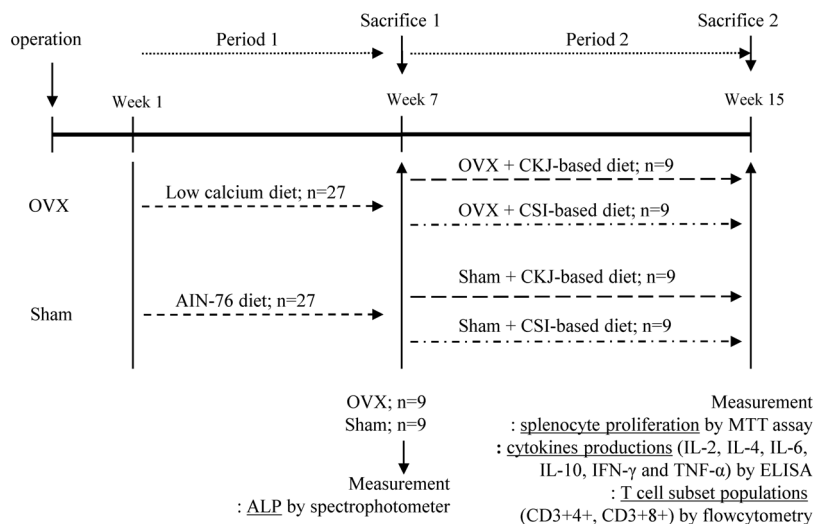


Fig. 1. Experimental design. OVX, ovariectomized; Sham, sham-operated; CKJ, *Chungkuk-jang*-based diet; CSI, casein-based diet.

Table 1. Composition of diet

Ingredients (g/kg)	Period I		Period II ¹⁵⁾	
	AIN-76 diet	Low calcium diet	Casein-based diet	Chungkukjang-based diet
Casein high nitrogen ¹⁾	200	200	200	—
Chungkukjang powder ²⁾	—	—	—	401
Sucrose ³⁾	500	508.4	440	393
Cornstarch ⁴⁾	150	150	150	150
Corn oil ⁵⁾	50	50	—	—
Soybean oil ⁶⁾	—	—	83	—
Cellulose ⁷⁾	50	50	77	4
DL-methionine ⁸⁾	3	3	3	5
Choline bitartrate ⁹⁾	2	2	2	2
Mineral mixture #200000 ¹⁰⁾	35	—	35	35
Mineral mixture #213260 ¹¹⁾	—	17.5	—	—
Vitamin mixture #300050 ¹²⁾	10	10	10	10
Potassium phosphate ¹³⁾	—	6.6	—	—
Potassium citrate ¹⁴⁾	—	2.5	—	—
Total (g)	1,000	1,000	1,000	1,000

¹⁾Protein 87.0%, fat 1.1%, ash 1.9%, moisture 10.0%, fiber 0.0%, energy 3.58 kcal/g; Dyets (Bethlehem, PA, USA).

²⁾Meju and Cellist Co. (Yeoncheon, Korea).

³⁾Protein 0.0%, fat 0.0%, fiber 0%, moisture 0.04%, ash 0.02%, carbohydrate 99.94%, energy 4.0 kcal/g; Dyets.

⁴⁾Protein 0.4%, fat 0.4%, ash 0.1%, moisture 8.5%, carbohydrate 90.6%, energy 3.6 kcal/g; Dyets.

⁵⁾Fat 100.0%, cholesterol 0.0%, melting point -13.00°C, density 0.92, energy 9 kcal/g; Dyets.

⁶⁾Samyang Co. (Seoul, Korea).

⁷⁾Protein 0.0%, fat 0.0%, moisture 5.0%, ash 0.1%, araban 0.2%, xylan 8.0%, mannan 1.7%, galactan 0.8%, glucan 89.2%; Dyets.

⁸⁾Dyets.

⁹⁾Dyets.

¹⁰⁾Calcium phosphate dibasic 500.00 g/kg, sodium chloride 74.00 g/kg, potassium citrate H₂O 220.00 g/kg, potassium sulfate 52.00 g/kg, magnesium oxide 24.00 g/kg, manganous carbonate 3.50 g/kg, ferric citrate U.S.P 6.00 g/kg, zinc carbonate 1.60 g/kg, cupric carbonate 0.30 g/kg, potassium iodate 0.01 g/kg, sodium selenite 0.01 g/kg, chromium potassium sulfate 12 H₂O 0.55 g/kg, sucrose (finely powdered) 118.03 g/kg; Dyets.

¹¹⁾Sodium chloride 74.00 g/kg, potassium sulfate 52.00 g/kg, magnesium oxide 24.00 g/kg, manganous carbonate 3.50 g/kg, ferric citrate U.S.P 6.00 g/kg, zinc carbonate 1.60 g/kg, cupric carbonate 0.30 g/kg, potassium iodate 0.01 g/kg, sodium selenite 0.01 g/kg, sodium selenite 0.01 g/kg, chromium potassium sulfate 0.55 g/kg, sucrose (finely powdered) 338.03 g/kg; Dyets.

¹²⁾Thiamine HCl 0.60 g/kg, riboflavin 0.60 g/kg, pyridoxine HCl 0.70 g/kg, niacin 3.00 g/kg, calcium pantothenate 1.60 g/kg, folic acid 0.20 g/kg, biotin 0.02 g/kg, vitamin B₁₂ (0.1%) 1.00 g/kg, vitamin A palmitate 0.80 g/kg, vitamin D₃ 0.25 g/kg, vitamin E acetate 10.00 g/kg, menadione sodium bisulfite 0.08 g/kg, sucrose (finely powdered) 981.15 g/kg; Dyets.

¹³⁾Astaris Inc. (St. Louis, MO, USA).

¹⁴⁾Jungbunzlauer Inc. (Newton, MA, USA).

¹⁵⁾Kim et al. (15).

$$\text{ALP 활성치(A-K 단위)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준의 흡광도}} \times 20$$

시료 수집 및 전처리

총 14주간 사육한 마우스를 희생하여 혈청과 비장을 취하여 분석에 사용하였다.식이실험 종료 후 실험동물은 12시간 절식시킨 후 에테르 마취하에 개복하여 심장 천자(heart puncture)에 의해 채혈하고 비장을 채취하였다. 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후 전혈을 4°C, 3,000 rpm에서 30분간 원심분리를 하여 혈청을 분리한 뒤 분석 시까지 -70°C에 보관하였다.

비장세포 증식능 측정

비장세포 증식능 측정은 MTT assay(16)를 변형하여 이용하였다. 각 군별로 마우스 비장세포 현탁액을 5.0×10⁶ cell/mL가 되도록 희석하여 96 well plate의 각 well에 90

μL씩 분주하였다. 또한 미토젠으로 Con A(5 μg/mL)(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)와 LPS(15 μg/mL)(Sigma-Aldrich Co.)를 10 μL씩 분주하고 이에 대한 대조군으로는 미토젠 대신 세포 배양액(10% FBS-RPMI 1640)을 동량 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator(SANYO Electric Co., Osaka, Japan)에서 44시간 배양 후 MTT(Sigma-Aldrich Co.)를 10 μL 가하고, 암조건에서 4시간 동안 다시 배양하여 formazan crystal 형성을 유도하였다. 4시간 후 상층액을 제거하고 각 well에 150 μL의 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich Co.)를 가하여 10분간 방치한 후 ELISA reader(Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 마우스 비장세포의 증식능은 다음의 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{Proliferation index} = \frac{\text{Sample의 흡광도}}{\text{Media control의 흡광도}}$$

혈중 T 림프구 아형(CD3+4+, CD3+8+) 측정

면역세포 및 면역세포 아형을 분류하고 정량하는데 주로 사용되고 있는 방법은 유세포 분석 기술(fluorescence activated cell-sorted technology)을 이용하였으며, 이는 분석하고자 하는 세포에 형광 물질을 부착시켜 정량 및 정성하는 방법이다(17). 형광 물질은 FITC(CD4)와 PE(CD8)를 사용하였다. 식이종료 후 얻은 혈청을 100 µL를 넣고 4°C에서 보관된 단클론 항체(monoclonal antibody)(BD Bioscience, San Jose, CA, USA) CD3+, CD4+, CD8+ 를 각각 20 µL씩 넣어 섞은 후 실온 암소에서 15분간 방치하였다. 방치 후 OptiLyse C solution 500 µL를 넣고 잘 섞은 후 실온 암소에서 다시 10분간 방치하고, lyse가 완료되면 PBS(0.1% Na₃ 함유) 3 mL를 넣고 잘 섞은 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 버린 후 PBS(0.1% Na₃ 함유) 500 µL를 넣어 잘 섞은 후 flow-cytometer (Coulter Epics XL, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA)를 이용하였고 분석은 FCAP Array™ software(BD Bioscience)를 이용하여 진행하였다.

혈중 사이토카인 분비능 측정

식이종료 후 얻은 혈청으로 혈중 사이토카인 IL(interleukin)-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN(interferon)-γ, TNF(tumor necrosis factor)-α 분비량을 cytokine ELISA kit (BioSource International Inc., Camarillo, CA, USA)의 각 사이토카인 별 프로토콜을 따랐고 흡광도는 450 nm 파장에서 ELISA reader(Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments)를 이용하여 측정하였다.

통계처리

모든 연구 결과의 자료는 통계 프로그램인 SAS 9.1(Statistical Analysis System, Cary, NC, USA)을 이용하여 평균 및 표준편차를 계산하였으며, 각 군 간의 비교에서 각각의 요인은 t-test를 사용하여 분석하였고, α=0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

체중 변화 및 장기 무게

실험 기간 동안 마우스의 체중 증가량 및 체중 변화를 Fig. 2(a), (b)에 제시하였다. 제 1단계에 해당하는 첫 6주간의 체중 증가량은 Sham군이 9.6±3.4 g이었고, 난소적출군은 16.4±3.4 g으로 나타났다. 초기 체중은 각 군간 유의적인 차이가 없었으나, 6주차부터 난소적출군의 체중이 Sham군에 비하여 유의적으로 증가하기 시작하였다. 이러한 유의성은 제 1단계 완료 시점까지 지속되었으며, 제 2단계 사료 투여에 앞서 각 군을 청국장 배합 사료군(CKJ군)과 카제인 배합 사료군(CSI군)으로 분리하였다. 제 2단계에 해당하는 8주의 사료 투여 종료 후 각 군의 체중 변화를 살펴보면, Sham군은 CKJ군과 CSI군 간의 체중의 유의적 차이가 없었던 것에 반하여, 난소적출군에서는 CKJ군의 체중 증가량이 청국장사료 투여 4주 후부터 유의적으로 낮았다. 이러한 체중 증가량의 차이는 제 2단계 완료 시점까지 지속되었으나, 완료 시점에서 통계적 유의성은 없었다. 장기 무게의 경우 제 2단계 완료 후 간, 신장, 비장 등 장기 무게를 측정할 결과 각 군 간의 장기 무게의 유의적 차이는 없었다.

혈중 ALP 농도

혈중 ALP 수치는 제 1단계 완료 후, 난소적출과 저칼슘 식이를 통해 유도했던 골대사 변화가 유발되었는지 확인하기 위하여 난소적출군과 Sham군에서 각 9마리씩 희생시켜 흡광도를 통해 측정하였다. 측정 결과, 난소적출군의 혈중 ALP 수치가 10.72±4.57 K-A단위, Sham군의 수치가 5.57±1.18 K-A단위로 난소적출군의 혈중 ALP 수치가 유의적으로 높았다(P=0.0096).

비장세포 증식능

본 연구에서는 난소적출 유무 하에서 CKJ군과 CSI군의 비장세포 증식능 비교를 목적으로 하고 있으므로, 비장세포 증식능 관련 데이터를 (CKJ군/CSI군)의 형태로 변환하여

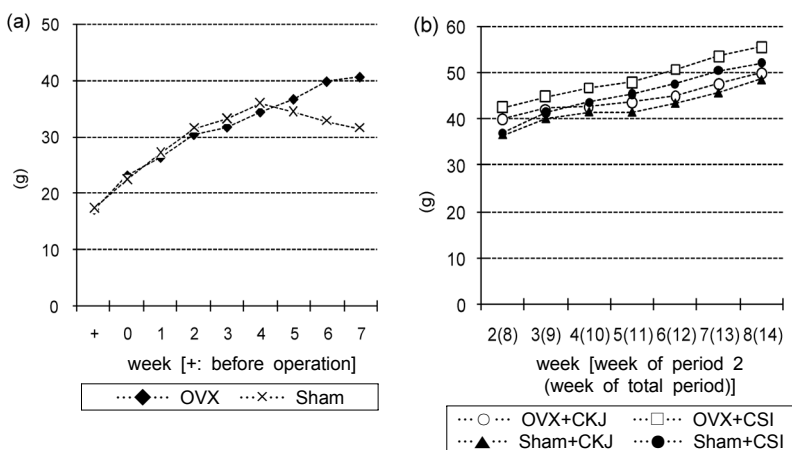


Fig. 2. Body weight of mice orally provided with (a) low calcium diet for ovariectomized group or for AIN-76 diet Sham-operated group for 6 weeks and (b) *Chungkukjang*-based diet or casein-based diet for 8 weeks. OVX, ovariectomized; Sham, sham-operated; CKJ, *Chungkukjang*-based diet; CSI, casein-based diet.

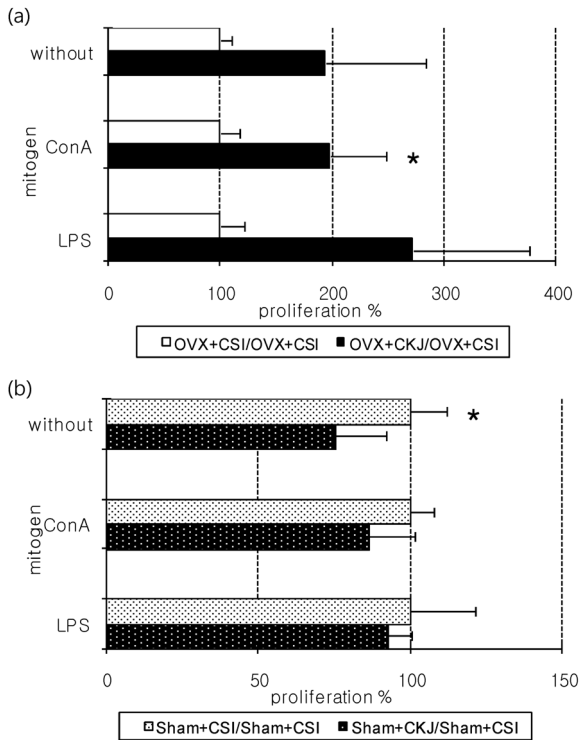


Fig. 3. Splenocyte proliferation of (a) OVX+CKJ compared to that of OVX+CSI orally provided with *Chungkukjang*-based diet or casein-based diet for 8 weeks and (b) Sham+CKJ compared to that of sham+CSI orally provided with *Chungkukjang*-based diet or casein-based diet for 8 weeks. OVX, ovariectomized; Sham, sham-operated; CKJ, *Chungkukjang*-based diet; CSI, casein-based diet. * $P < 0.05$.

비교하였다. 각 군 간의 비교 데이터는 Fig. 3(a), (b)에 제시되어 있으며, 100%를 기준으로 하여 작성되었다.

먼저 난소적출군에 청국장 배합 사료를 투여한 경우와 카제인 배합 사료를 투여한 경우의 비장 증식능을 비교해보면 (Fig. 3(b)) 미토젠 자극이 없을 경우와 ConA 혹은 LPS로 자극하였을 경우 모두 CKJ군의 비장 증식능이 높은 경향을 나타내었다. 특히, ConA로 자극한 경우 CKJ군(198.02±50.92%)이 CSI군(100±17.2%)에 비하여 유의적으로 높은 비장 증식능을 보였다($P=0.0143$). 이에 반하여 Sham군에서는 CKJ군의 비장 증식능이 CSI군에 비하여 대체로 낮았다(Fig. 3(a)). 특히 미토젠 자극이 없는 경우 CSI군의 비장 증식능인 100±12.03%를 기준으로 했을 때 CKJ군(75.54±16.75%)이 유의적으로 낮은 분비량을 보였다($P=0.02$).

혈중 T 림프구(CD3+4+, CD3+8+) 아형 분포

혈중 T 림프구 아형 분포화 CD3+4+/CD3+8+의 비율은 Table 2에 나타내었다. 조력 T 세포(helper T cell; CD4 T cell)는 난소적출군 중 CKJ군이 24.09±6.08%, CSI군이 22.80±6.94%로 두 군간 유의적 차이가 관찰되지 않았다($P=0.7382$). 그러나 Sham군 내 비교 분석에서 CKJ군의 조력 T 세포 분포가 48.74±3.55%로 CSI군의 39.90±10.13

Table 2. The percentages and ratio of lymphocyte CD3+4+ and CD3+CD8+ of mice orally provided with *Chungkukjang*-based diet or casein-based diet for 8 weeks

Group ¹⁾	CD3+CD4+ (%) ²⁾	CD3+CD8+ (%)	CD4+/CD8+ ratio
OVX+CKJ	24.09±6.08	9.95±3.50	3.56±1.80
OVX+CSI	22.80±6.94	10.48±4.86	2.62±1.20
Sham+CKJ	48.74±3.55*	15.55±2.40	3.19±0.28
Sham+CSI	39.90±10.13	13.95±2.00	2.84±0.16

¹⁾OVX, ovariectomized; Sham, sham-operated; CKJ, *Chungkukjang*-based diet; CSI, casein-based diet.

²⁾Data are mean values±SD from 9 mice in each group.

* $P < 0.05$.

%에 비하여 유의적으로 높은 분포를 나타내었다($P=0.0313$). 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell; CD8 T cell)의 경우 난소적출군, Sham군 모두에서 CKJ와 CSI 간 유의적 차이를 보이지 않았다. 조력 T 세포와 세포독성 T 세포의 비율(CD4/CD8 ratio)을 분석한 결과, 통계적 유의성은 없었으나 난소적출군과 Sham군 모두 CKJ군이 CSI군보다 높은 경향의 CD4/CD8의 비율을 보였다.

혈중 사이토카인 분비능(IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TNF- α 분비량)

각 군 마우스 혈중 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 분비량은 Fig. 4(a), (b), (c), (d), (e), (f)에 나타내었다. 혈중 IL-2와 IL-4 분비량은 난소적출, Sham군 모두 유의성이 관찰되지 않았다. 혈중 IL-6 분비량은 난소적출군 내의 비교 분석 결과 CKJ군 30.86±3.11 pg/mL, CSI군 39.65±1.73 pg/mL로 CKJ군이 유의적으로 낮은 IL-6 분비량을 보였으며($P < 0.0001$), Sham군 내 비교에서도 CKJ군 31.01±4.65 pg/mL, CSI군 39.42±2.45 pg/mL로 CKJ군에서 유의적으로 낮은 IL-6 분비량이 관찰되었다($P=0.0002$). 혈중 IL-10 분비량은 난소적출군 내에서는 유의적 차이가 관찰되지 않았으나, Sham군 내에서는 CKJ군 57.60±8.92 pg/mL, CSI군 42.20±3.85 pg/mL로 CKJ군의 IL-10 분비량이 유의적으로 높은 것으로 나타났다($P=0.0006$). 혈중 IFN- γ 분비량은 난소적출군 내 비교에서는 CKJ군 15.07±0.85 pg/mL, CSI군 11.83±0.50 pg/mL로 CKJ군이 유의적으로 높은 분비량을 보였으며($P < 0.0001$), Sham군 내에서 또한 CKJ군 5.10±0.17 pg/mL, CSI군 3.70±0.67 pg/mL로 통계적 유의성이 관찰되었다($P=0.0002$).

혈중 TNF- α 분비량은 난소적출군 내의 비교 분석 결과 CKJ군 27.08±6.50 pg/mL, CSI군 40.88±4.52 pg/mL로 CKJ군이 유의적으로 낮은 분비량을 보였으며($P < 0.0001$), Sham군 내 비교에서도 CKJ군 29.38±4.09 pg/mL, CSI군 38.44±2.47 pg/mL로 CKJ군에서 통계상 유의적으로 낮게 관찰되었다($P < 0.0001$).

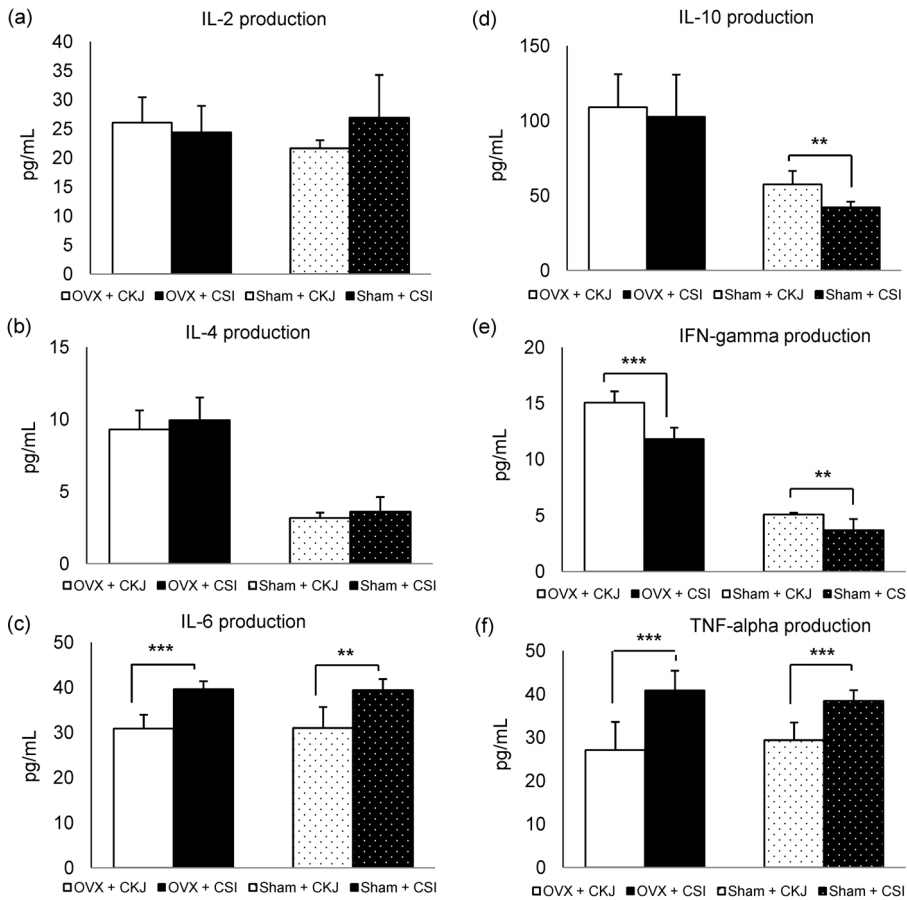


Fig. 4. Cytokine production in serum of mice orally provided with *Chungkukjang*-based diet or casein-based diet for 8 weeks. (a) IL-2 production, (b) IL-4 production, (c) IL-6 production, (d) IL-10 production, (e) IFN- γ production and (f) TNF- α production. OVX, ovariectomized; Sham, sham-operated; CKJ, *Chungkukjang*-based diet; CSI, casein-based diet. Data are mean values \pm SD from 9 mice in each group. ** P <0.001, *** P <0.0001.

고찰

본 연구에서는 난소적출과 저칼슘 식이 공급으로 골대사 약화가 유발된 마우스를 이용하여 청국장이 세포성 면역능에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

1단계 식이의 6주차부터 난소적출군의 유의적인 체중 증가가 나타나기 시작하여 1단계 완료 시점까지 지속되었다. 이는 실험동물의 난소적출 후 체중의 현저한 증가를 나타낸다는 기존의 보고(18-21)와 일치하는 경향을 보이는 것으로 폐경기 이후 여성들의 체중이 체지방 증가로 인하여 연간 0.8 kg 정도씩 증가하는 현상을 보이는 것과 유사하다고 할 수 있다(22). 폐경 후 난소에서 합성하는 여성 호르몬의 양이 감소하면서 이를 보상하기 위해 지방조직을 포함한 말초조직에 의해 순환되는 안드로겐이 대사되어 폐경기의 에스트로겐 호르몬인 에스트라디올(estradiol)과 에스트론(estrone)이 합성된다. 그러므로 체지방의 증가는 폐경 후 난소에서 생산되는 에스트로겐 농도 감소를 보상하기 위한 것으로 알려져 있다(23,24). 제 2단계 식이에 들어가면서 난소적출군과 Sham군을 난괴법으로 두 군으로 나누어 각각 청국장 배합 사료와 카제인 배합 사료를 8주간 공급하였다. Fig. 2(b)에서 볼 수 있는 바와 같이 네 군 모두 지속적인 성장을 보였으며 특히 난소적출을 시행한 후 CSI군의 체중

증가량에 비해 CKJ군의 체중 증가량이 유의적으로 낮았다. 이러한 경향은 제 2단계 종료 시점까지 지속되었으나, 종료 시점에서의 유의성은 없었다. 이는 난소적출 CKJ군의 개체 편차가 5.15 g으로 크게 나타났기 때문으로 사료된다. 이러한 결과를 통하여 난소적출 시 청국장이 체중 증가를 억제하는데 도움이 될 것으로 기대할 수 있으나, 개체별 수용 및 적응의 여부에는 차이가 있을 것으로 생각된다. 이에 반하여 Sham군의 경우 CKJ군과 CSI군의 체중 증가가 비슷하게 이루어졌으며 난소적출군에서 나타난 청국장 사료의 체중 증가 억제 효과는 관찰되지 않았다. 따라서 청국장 배합 사료의 체중 증가 억제 효과는 정상군보다 난소적출술을 시행한 군에서 더 효과적으로 나타나는 것으로 사료된다. 난소적출술과 저칼슘식이를 통한 골대사 약화 상태를 검증하기 위하여 1단계 식이 종료 후 ALP 수치를 측정하였다. 일반식이를 섭취한 sham군에 비하여 저칼슘식이를 섭취한 OVX군의 ALP 수치가 유의적으로 관찰되었다. 이는 Lee 등(25)의 연구와 같은 경향을 나타낸 것으로, 본 연구에서는 뼈 무기질 함량이나 대퇴골 파단력 등의 지표는 측정하지 않았으나 ALP 수치로 보아 골대사 약화상태가 유도된 것으로 판단된다.

청국장 배합 식이가 비장 세포의 증식능에 어떠한 영향을 미치는지 규명하기 위하여 제 2단계 식이가 끝난 후, MTT

assay를 이용하여 비장증식능을 측정하였다. 골대사와 면역능은 상호 작용이 있는 것으로 예상되는데, 예를 들어 염증성 사이토카인 분비와 같은 경우 사이토카인의 분비량이 높아지면서 골대사 약화 상태를 초래할 수 있는 가능성이 제시된 바 있다. 비장 세포 증식능의 경우, 골대사와 어떠한 영향을 서로 주고받는지에 관해 거의 알려진 바 없으며, 본 연구에서는 골대사 약화 상태 자체가 비장 세포 증식능에 영향을 미칠 것으로 가정하여 본 지표를 측정하였다. 본 연구에서는 난소적출 혹은 Sham군 내에서 CKJ군과 CSI군의 비장세포 증식능 비교를 목적으로 하고 있으므로, 비장세포 증식능 관련 데이터를 (CKJ군/CSI군)의 형태로 변환하였다. CKJ군의 비장 증식능 촉진 효과는 Sham군에 비하여 적출군에서 더 크게 나타났다. 난소적출군의 CKJ군과 CSI군의 비장 증식능을 비교해보면(Fig. 3(b)) 미토젠 자극이 없을 경우, ConA 혹은 LPS로 자극하였을 경우 모두 CKJ군의 비장 증식능이 상당히 높은 경향을 나타내었다. 특히 ConA로 자극한 경우 CKJ군($198.02 \pm 50.92\%$)이 CSI군($100 \pm 17.2\%$)에 비하여 유의적으로 높은 비장 증식능을 보였다($P=0.0143$). 이는 난소적출군에서 청국장을 단백질 급원으로 공급한 청국장 배합 사료가 카제인 배합 사료에 비하여 비장 세포 증식을 더 활발하게 유도하여 면역 세포를 성숙 변환시키고 면역활성을 촉진시킬 수 있을 것으로 예측된다. 그러나 Sham군의 경우, 미토젠 자극이 없을 때 CSI군의 비장 증식능이 CKJ군에 비하여 더 높은 비장 증식능을 보이는 것으로 관찰되었다(Fig. 3(a)). 이는 난소적출군의 비장 증식능 결과와 비교해 볼 때 비적출군의 경우 동물성 단백질인 카제인이 식물성 단백질 급원인 청국장, 즉 콩 단백질보다 비장 증식능에 대해 더 높은 효율을 보인 것으로 볼 수 있다. 다시 말하여 난소적출로 인하여 골대사 약화 상태가 유발된 경우에는 콩 단백질 급원으로서의 청국장이 더 효과적으로 작용할 수 있는 것으로 사료되는 바이다.

다음으로 청국장 배합 식이가 T 림프구 분포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 $CD3+4+$ T 림프구와 $CD3+8+$ T 림프구의 분포를 측정하고 $CD4/CD8$ 의 비율을 계산하였다. 최근 골대사와 노화, 면역 연구에서 새롭게 대두되고 있는 분야 중 하나로 노화로 인한 골대사에 T 림프구가 미치는 영향에 관한 것이다(26). 특히 면역계에 의해 골형성과 골재흡수가 영향을 받는다는 사실(27)이 밝혀지면서 더 주목을 받고 있다. 이 면역계에서 T 림프구는 핵심적인 역할을 담당할 뿐 아니라 골수 자체에 존재하기 때문에(28,29) 골대사와 관련된 연구의 이슈가 된다고 할 수 있다. 특히, $CD8$ T 림프구는 골 재흡수(30,31)와 골다공증성 골절(32)에 연관 있는 지표이다. 노인 여성들을 대상으로 한 Pietschmann 등(32)의 연구에서 $CD8$ T 림프구 분포의 증가와 골다공증성 골절과 연관이 있다고 보고된 바 있다. 또한 T 림프구는 사이토카인 분비를 통해 골대사에 영향을 미치기도 하는데, TNF- α 나 IL-6과 같은 사이토카인이 과량 분비되면 파골세포의 성숙을 촉진하고 노화와 관련된 골 대사 변화에 영향을

미친다(26). 본 연구에서 유의성은 없었으나 CKJ군이 CSI군보다 높은 경향의 $CD4+8+$ 의 비율을 보였으며, 이러한 경향은 특히 난소적출군에서 뚜렷하게 나타났다. Teitelbaum(33)은 T 림프구가 전반적으로 폐경기 여성의 골손실과 에스트로겐에 의한 골 조절에 영향을 미치는 면역 시스템이라고 보고한 바 있다.

마지막으로 사이토카인 분비 양상에 청국장 배합 사료가 미치는 영향에 대하여 살펴보았다. 사이토카인 중 특히 IL-6, IL-1 β , TNF- α 등의 염증성 사이토카인은 골대사 측면에서 다양하게 연구되어 왔다. 마우스를 이용한 동물 실험에서 성 스테로이드의 결핍으로 인해 파골세포와 조골세포의 형성이 가속화되고 파골작용 혹은 조골작용에 관여하는 사이토카인 분비에 변화를 초래한다고 보고되어 있다(34-36). 특히 사이토카인 중 IL-6은 에스트로겐 혹은 안드로겐(androgen)과 같은 성 호르몬과 밀접한 관련이 있는데, 에스트로겐이나 안드로겐은 IL-6의 분비를 억제하고 IL-6 수용체(IL-6 receptor)의 발현을 억제하는 역할을 한다(37). 따라서 에스트로겐의 결핍은 이 IL-6의 과다한 분비를 초래하며, 이러한 이유로 과다 IL-6 분비량은 골 대사와 면역 연구 분야의 생화학적 지표가 되기도 한다. TNF- α 는 조골세포의 기능을 방해하여 파골작용을 촉진시키는 것으로 보고되어 있다. 에스트로겐 결핍 상황에서 이러한 염증성 사이토카인의 분비가 증가하면 골 손실을 초래할 수 있다(38). 특히 T 림프구에서 분비된 TNF- α 는 직·간접적으로 파골 신호에 영향을 미쳐 RANK(receptor activator of NF κ B)와 RANKL(receptor activator of NF κ B ligand)을 통해 파골을 촉진하는 것으로 알려져 있다(39-43). 본 연구에서도 골대사와 밀접한 연관을 보이는 대표적 염증성 사이토카인 IL-6과 TNF- α 의 마우스 혈중 분비량을 측정하였다. 난소적출군 내 비교에서(IL-6, Fig. 4(c); TNF- α , Fig. 4(f)) CSI군에 비하여 CKJ군의 IL-6과 TNF- α 의 분비량이 유의적으로 낮게 관찰되었다. 난소적출군 내에서 청국장 식이로 인해 두 염증성 사이토카인의 분비가 유의적으로 줄어든 것은 청국장이 염증성 사이토카인의 분비를 억제함으로써 하여 골대사에 직·간접적으로 영향을 미쳤음을 알 수 있다. IL-6과 TNF- α 외에도 IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ 등 네 가지 사이토카인을 측정하였다. 먼저 IL-2는 T 림프구 성장인자이자 B 림프구, NK cell, 단핵구(monocytes), lymphokine activated killer cell(LAK cell)의 증식과 분화에 영향을 준다(44). IL-2의 분비는 난소적출 유무에 관계없이 CKJ군과 CSI군 간의 유의성이 관찰되지 않았으며(Fig. 4(a)), 이러한 분비 양상을 보완하기 위해 CD56을 이용한 NK 세포의 측정이 병행되었다면 청국장 배합 사료가 초기 면역능에 미치는 영향에 대해 더 효과적으로 판단할 수 있었으리라 여겨진다. 다음으로, Th2림프구에서 분비되는 대표적 사이토카인인 IL-4는 알레르기 염증 반응, 천식, 림프구의 성장, 활성화(45) 및 대식세포 기능 조절과 염증성 사이토카인의 분비 조절에 관여하는 것으로 보고된 바 있다(46-49). 골대사의

측면에서는 IL-4가 *in vitro*와 *in vivo* 연구에서 골 재흡수를 막을 수 있다는 결과가 제시된 바 있으며(50,51), 골라겐으로 유도된 류머티스 관절염 모델에서 IL-4가 골 침식(bone erosion)을 예방했다는 보고(52)도 있다. 이에 반하여 *lck*-IL-4 마우스를 이용한 동물실험에서 IL-4의 과다 분비는 암컷, 수컷 마우스에게 심각한 골다공증을 일으켰다는 연구 결과도 있다(53). 본 연구에서 측정된 IL-4의 분비 양상은 절대 분비량 수치 비교 시 난소적출군의 IL-4 분비가 비적출군에 비하여 높은 것을 알 수 있다(Fig. 4(b)). 향후 난소적출 자체가 IL-4 분비에 미치는 영향을 알아보기 위한 연구를 진행한다면 충분히 유사한 결과가 나타날 것으로 예상된다. 마지막으로 IL-10(Fig. 4(d))과 IFN- γ (Fig. 4(e))의 분비 양상을 살펴보면, 두 사이토카인은 난소적출군 내 비교에서는 유의적 차이를 보이지 않았으나, Sham군에서는 CKJ군이 CSI군에 비하여 유의적으로 높은 분비 양상을 보였다. IFN- γ 는 최근 골대사와 면역의 측면에서 새롭게 주목 받고 있는 사이토카인으로 에스트로겐 결핍으로 인한 파골 작용이 촉진되는 것과 과다한 IFN- γ 의 분비가 관련이 있다고 보는 연구도 있다. IFN- γ 수용체가 결핍된 마우스를 이용한 실험에서 LPS 등을 이용한 염증 자극을 가했을 때 파골세포의 수가 증가했다(54). 본 연구에서 난소적출군 내에서 식이의 종류에 따라서 IL-10 분비량의 차이는 보이지 않았으나, IL-4와 유사하게 난소적출 자체가 분비량에 영향을 미칠 것으로 예상되며, Takayanagi 등(54)의 연구에서 나타난 바와 같이 IL-10, IFN- γ 분비량과 난소적출로 인한 골대사 간의 관계가 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 난소적출군 내 혹은 Sham군 내 비교 분석을 통하여 청국장 배합 사료와 카제인 배합 사료가 미치는 면역 활성능의 차이를 살펴보았다. 본 연구에 이어 난소적출 자체가 면역능 변화에 미치는 영향을 알아보기 위한 연구가 진행될 필요가 있다. 본 연구를 통하여 난소적출 자체가 유발할 수 있는 면역학적 변화를 예측해 보면, 비장 세포 증식능 저하, T 림프구 아형(CD3+ 4+, CD3+ 8+) 분포의 변화, 사이토카인 IL-10, IFN- γ 의 분비량 증가 등이 관찰될 것으로 예상된다. 이와 더불어 호르몬 결핍을 동반하지 않은 골대사 약화 상태에서 청국장의 섭취가 골대사 개선 및 면역능 증진에 미치는 영향을 관찰하기 위한 연구와 청국장에 의한 RANK의 활성 평가 연구가 진행될 필요가 있다. 청국장 자체뿐 아니라 청국장에서 추출된 개별 성분이 면역능에 미치는 영향에 대한 연구 또한 추후 연구될 필요가 있을 것으로 사료된다. 아울러 청국장 혹은 특정 성분의 기능성 식품으로서의 인정 가능성을 탐색하기 위하여 골대사 약화 혹은 골다공증 증상을 보이는 사람들을 대상으로 한 인체 연구를 진행할 필요가 있을 것이다.

요 약

본 연구에서는 천연 식품으로부터 면역증진능을 갖는 식품

소재를 검색하기 위한 연구의 일환으로 골대사 약화 상태의 마우스에게 청국장 배합 사료를 투여했을 때 카제인 배합 사료에 비하여 가질 수 있는 세포 매개성 면역능의 증강 효과를 규명하기 위한 목적으로 실시되었다. 제 1단계로서 난소적출군은 저칼슘 식이, Sham군은 AIN-76 식이를 6주간 공급한 후, 각 군을 청국장 배합 사료군 혹은 카제인 배합 사료군으로 나누어 8주간 제 2단계의 식이를 공급하였다. 면역 지표로는 비장세포 증식능, 혈중 T 림프구 아형수와 혈중 사이토카인(IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α)의 분비량을 측정하였다. 그 결과 난소적출군에서 청국장 배합 사료군의 비장 세포 증식능이 카제인 배합 사료군보다 유의적으로 높았으며, 혈중 T 림프구 아형 비율인 CD4/CD8의 비율도 청국장 배합 사료군에서 더 높았다. 혈중 사이토카인 분비량을 측정한 결과 난소적출군에서 청국장 배합 사료 투여군의 IL-6와 TNF- α 분비량이 카제인 배합 사료 투여군에 비해 유의적으로 낮았다. 난소적출 마우스의 면역능에 청국장 배합 사료가 미치는 영향으로 카제인 배합 사료에 비하여 비장 세포 증식능 활성화, 골 대사와 연관 있는 대표적 사이토카인인 IL-6와 TNF- α 분비 억제 및 조절 등을 들 수 있다. 뿐만 아니라, 체중 증가량을 조절하는 역할을 하는 것으로 관찰되었다. 따라서 청국장 배합 사료는 난소적출 마우스 면역계의 조절 기전에 작용하여 면역세포 활성을 촉진시키고 효과적으로 작용할 수 있으리라 사료된다. 이러한 연구 결과를 토대로 기능성 식품 개발에 기초 연구 자료가 될 것으로 기대되며 향후 청국장의 면역 활성 물질의 분리 및 동정을 위한 연구의 뒷받침이 될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 숙명여자대학교 2012학년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Lee BK, Jang YS, Yi SY, Chung KS, Choi SY. 1997. Immunomodulators extracted from Korean-style fermented soybean paste and their function. 1. Isolation of B cell mitogen from Korean-style fermented soybean paste. *Korean J Immunol* 19: 559-570.
2. Adlercreutz H, Mazur W. 1997. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29: 95-120.
3. Ko HS, Cho DH, Hwang SY, Kim YM. 1999. The effect of quality improvement by Chungkuk-jang's processing methods. *Korean J Food & Nutr* 12: 1-6.
4. Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM, Byun MW. 2002. Quality characteristics of the chungkook-jang fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 204-210.
5. Kim J, Yoo S, Choe J, Park HJ, Hong S, Chang C. 1998. Physicochemical properties of traditional *Chonggugiang* produced in different regions. *Agric Chem Biotechnol* 41:

- 377-383.
6. Joo EY, Park CS. 2011. Antioxidant and fibrinolytic activities of extracts from soybean and *Chungkukjang* (fermented soybean paste). *Korean J Food Preserv* 18: 930-937.
 7. Lee KH, Rye SH, Lee YS, Kim YM, Moon GS. 2005. Changes of antioxidative activity and related compounds on the *Chungkukjang* preparation by adding drained boiling water. *Korean J Food Cookery Sci* 21: 163-170.
 8. Choi YB, Sohn HS. 1998. Isoflavone content in Korean fermented and unfermented soybean foods. *Korean J Food Sci Technol* 30: 745-750.
 9. Chung WY, Kim SK, Son JY. 2008. Isoflavones contents and physiological activities of soybeans fermented with *Aspergillus oryzae* or *Bacillus natto*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 141-147.
 10. Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. 2000. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 72: 844-852.
 11. Tsuchida K, Mizushima S, Toba M, Soda K. 1999. Dietary soybeans intake and bone mineral density among 995 middle-aged women in Yokohama. *J Epidemiol* 9: 14-19.
 12. Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW Jr. 1998. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 68: 1375S-1379S.
 13. Masilamani M, Wei J, Sampson HA. 2012. Regulation of the immune response by soybean isoflavones. *Immunol Res* 54: 95-110.
 14. Baeza I, De Castro NM, Arranz L, De la Fuente M. 2010. Soybean and green tea polyphenols improve immune function and redox status in very old ovariectomized mice. *Rejuvenation Res* 13: 665-674.
 15. Kim JI, Kang MJ, Kwon TW. 2003. Antidiabetic effect of soybean and *Chongkukjang*. *Korea Soybean Digest* 20: 44-52.
 16. Makino T, Ono T, Muso E, Honda G. 1998. Inhibitory effect of *Perilla frutescens* and its phenolic constituents on cultured murine mesangial cell proliferation. *Planta Med* 64: 541-545.
 17. Coligan EJ, Kruisbeek MA, Margulies HD, Shevach ME, Strober W. 1993. *Current protocols in immunology*. Wiley Interscience, New York, NY, USA. p 532-534.
 18. Kurachi H, Adachi H, Ohtsuka S, Morishige K, Amemiya K, Keno Y, Shimomura I, Tokunaga K, Miyake A, Matsuzawa Y. 1993. Involvement of epidermal growth factor in inducing obesity in ovariectomized mice. *Am J Physiol* 265: E323-E331.
 19. Bray GA. 1992. Genetic, hypothalamic and endocrine features of clinical and experimental obesity. *Prog Brain Res* 93: 333-340.
 20. Lorden JF, Caudle A. 1986. Behavioral and endocrinological effects of single injections of monosodium glutamate in the mouse. *Neurobehav Toxicol Teratol* 8: 509-519.
 21. Wegorzewska IN, Walters K, Weiser MJ, Cruthirds DF, Ewell E, Larco DO, Handa RJ, Wu TJ. 2008. Postovariectomy weight gain in female rats is reversed by estrogen receptor α agonist, propylpyrazoletriol. *Am J Obstet Gynecol* 199: e1-e5.
 22. Lee DJ, Kim SM. 2001. Correlation of the bone mineral density and weight reduction therapy in estrogen replaced obese postmenopausal women. *Korean J Obes* 10: 306-313.
 23. Turcato E, Zamboni M, De Pergola G, Armellini F, Zivelonghi A, Bergamo-Andreis IA, Giorgino R, Bosello O. 1997. Interrelationships between weight loss, body fat distribution and sex hormones in pre- and postmenopausal obese women. *J Intern Med* 241: 363-372.
 24. Haffner SM, Katz MS, Dunn JF. 1991. Increased upper body and overall adiposity is associated with decreased sex hormone binding globulin in postmenopausal women. *Int J Obes* 15: 471-478.
 25. Lee MR, Park MN, Mun JY, Lee YS. 2011. Effects of a low calcium diet and oxalate intake on calcium deposits in soft tissues and bone metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 44: 101-111.
 26. Effros RB. 2004. Replicative senescence of CD8 T cells: effect on human ageing. *Exp Gerontol* 39: 517-524.
 27. Arron JR, Choi Y. 2000. Bone versus immune system. *Nature* 408: 535-536.
 28. Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, Pacifici R. 2001. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13960-13965.
 29. Weitzmann MN, Cenci S, Rifas L, Brown C, Pacifici R. 2000. Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines. *Blood* 96: 1873-1878.
 30. Buchinsky FJ, Ma Y, Mann GN, Rucinski B, Bryer HP, Romero DF, Jee WS, Epstein S. 1996. T lymphocytes play a critical role in the development of cyclosporin A-induced osteopenia. *Endocrinology* 137: 2278-2285.
 31. John V, Hock JM, Short LL, Glasebrook AL, Galvin RJ. 1996. A role for CD8+ T lymphocytes in osteoclast differentiation *in vitro*. *Endocrinology* 137: 2457-2463.
 32. Pietschmann P, Grisar J, Thien R, Willheim M, Kerschenschindl K, Preisinger E, Peterlik M. 2001. Immune phenotype and intracellular cytokine production of peripheral blood mononuclear cells from postmenopausal patients with osteoporotic fractures. *Exp Gerontol* 36: 1749-1759.
 33. Teitelbaum SL. 2004. Postmenopausal osteoporosis, T cells, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16711-16712.
 34. Jilka RL. 1998. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone* 23: 75-81.
 35. Pacifici R. 1998. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis—the second decade. *Endocrinology* 139: 2659-2661.
 36. Manolagas SC. 1995. Role of cytokines in bone resorption. *Bone* 17: 63S-67S.
 37. Manolagas SC. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21: 115-137.
 38. McCormick RK. 2007. Osteoporosis: integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Altern Med Rev* 12: 113-145.
 39. Zou W, Amcheslavsky A, Takeshita S, Drissi H, Bar-Shavit Z. 2005. TNF- α expression is transcriptionally regulated by RANK ligand. *J Cell Physiol* 202: 371-378.
 40. Kudo O, Fujikawa Y, Itonaga I, Sabokbar A, Torisu T, Athanasou NA. 2002. Proinflammatory cytokine (TNF α /IL-1 α) induction of human osteoclast formation. *J Pathol* 198: 220-227.
 41. Komine M, Kukita A, Kukita T, Ogata Y, Hotokebuchi T, Kohashi O. 2001. Tumor necrosis factor- α cooperates with receptor activator of nuclear factor κ B ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell

- culture. *Bone* 28: 474-483.
42. Pacifici R. 1996. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 11: 1043-1051.
 43. Manolagas SC, Jilka RL. 1995. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 332: 305-311.
 44. Brubaker JO, Thompson CM, Morrison LA, Knipe DM, Siber GR, Finberg RW. 1996. Th1-associated immune responses to beta-galactosidase expressed by a replication-defective herpes simplex virus. *J Immunol* 157: 1598-1604.
 45. Snapper CM, Paul WE. 1987. B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 139: 10-17.
 46. Sugiyama E, Taki H, Kuroda A, Mino T, Yamashita N, Kobayashi M. 1996. Interleukin-4 inhibits prostaglandin E2 production by freshly prepared adherent rheumatoid synovial cells via inhibition of biosynthesis and gene expression of cyclo-oxygenase II but not of cyclo-oxygenase I. *Ann Rheum Dis* 55: 375-382.
 47. Suzuki H, Sugiyama E, Tunru IS, Yamashita N, Matsuno H, Hamazaki T, Kobayashi M. 1993. Suppressive effect of interleukin-4 (IL-4) on IL-6 production by adherent rheumatoid synovial cells. *Clin Immunol Immunopathol* 66: 67-72.
 48. Hart PH, Cooper RL, Finlay-Jones JJ. 1991. IL-4 suppresses IL-1 beta, TNF-alpha and PGE2 production by human peritoneal macrophages. *Immunology* 72: 344-349.
 49. te Velde AA, Huijbens RJ, Heije K, de Vries JE, Figdor CG. 1990. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood* 76: 1392-1397.
 50. Miossec P, Chomarat P, Dechanet J, Moreau JF, Roux JP, Delmas P, Banchereau J. 1994. Interleukin-4 inhibits bone resorption through an effect on osteoclasts and proinflammatory cytokines in an ex vivo model of bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37: 1715-1722.
 51. Riancho JA, Zarrabeitia MT, Gonzalez-Macias J. 1993. Interleukin-4 modulates osteoclast differentiation and inhibits the formation of resorption pits in mouse osteoclast cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 678-685.
 52. Joosten LA, Lubberts E, Helsen MM, Saxne T, Coenen-de Roo CJ, Heinegård D, van den Berg WB. 1999. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res* 1: 81-91.
 53. Lewis DB, Liggitt HD, Effmann EL, Motley ST, Teitelbaum SL, Jepsen KJ, Goldstein SA, Bonadio J, Carpenter J, Perlmutter RM. 1993. Osteoporosis induced in mice by overproduction of interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11618-11622.
 54. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. 2000. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature* 408: 600-605.