

## 경구투여된 김치 유산균 파쇄액이 쥐의 면역활성에 미치는 효과

채 옥 화 · 신 경 섭 · 정 호 권 · 최 태 부 †

건국대학교 미생물공학과

(접수 : 1998. 3. 21., 게재승인 : 1998. 4. 28.)

### Immunostimulation Effects of Mice Fed with Cell Lysate of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Kimchi

Okwha Chae, Kyungsup Shin, Hokwon Chung, and Taeboo Choe†

Department of Microbial Engineering, Konkuk University, 93-1, Mojin-dong, Seoul 143-701, Korea

(Received : 1998. 3. 21., Accepted : 1998. 4. 28.)

Immunostimulation effects of the mice fed with the cell lysate of *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi were studied. The mice group fed with cell lysate was different from the control group on the degree of immune responses, e.g. 1) proliferation of splenocytes and Peyer's patch cells, 2) production of nitric oxide (NO) by peritoneal macrophages, 3) production of intestinal secretory IgA (sIgA), 4) variation of TNF- $\alpha$  and IL-2 concentration in blood, 5) production of specific IgG against sheep red blood cells. A general enhancement in enteric and systemic immune responses was observed with a simple oral administration of immunostimulators. With the oral feeding of *L. plantarum*, not only the total amount of gut secretion antibody, but also the binding capacity of antibodies to the enteric microorganisms including *L. plantarum* was increased. These experimental results clearly showed that the oral feeding of immunostimulators gave multifunctional effects on the mucosal and systemic immune systems of mice.

Key Words : *Lactobacillus plantarum*, Kimchi, immunostimulation effect, oral administration

### 서 론

식품으로부터 유발될 수 있는 면역반응은 일차적으로 장내 면역반응을 들 수 있다. 장내 면역계는 외부항원에 대한 1차적 방어벽으로 위장, 소장, 회장, 대장, 직장에 이르는 소화계 전반에 걸쳐 존재하며, 이에 관련된 면역 세포수는 전신면역 세포수의 약 1/3 이나 되고, 특히 항체생산 전구세포인 B세포는 70 - 80%가 소화관 점막에 존재한다고 알려져 있다(1). 소화계에 이처럼 많은 면역세포가 존재하는 이유는 소화계가 외부로부터 열려져있는 상태로 언제든지 오염원이 출입할 수 있어 신체의 건강에 커다란 영향을 미칠 수 있기 때문이다. 따라서 소화기관을 건강하게 유지한다는 것은 건강한 신체를 유지하는데 가장 기본적인 요건이 되며, 이를 위해 소화기관에 많은 양의 면역세포들이 필요하게 된 것이다. 장내 면역기관(enteric immune system)은 장내 상피세포(gut epithelial)와 소장의 Peyer's patch, 그리고 대장, 직장에 분포하는 lymphoid follicle들의 상호작용에 의해 전신면역으로 이어진다. 소장에 존재하는 면역기관은 면역반응을 유도하는 Peyer's patch와 면역반응에 직접 참여하는 lamina propria,

intraepithelium, salivary glands들로 이루어져 있다(2). 면역반응은 주로 장내세포(enterocyte)에 존재하는 epithelial M cell을 통해 인지된 항원이 T cell과 B cell이 풍부한 Peyer's patch에서 특이적인 항체를 생산하는 plasma cell과 cytokine을 유도하면서 이루어진다. 이때 생산되는 항체는 IgG가 약 3 - 5%, IgA는 80% 정도로 분포한다. 그 밖에 cytotoxic T lymphocyte(CTL), memory B cell들이 형성되고 이들은 다시 2차 림프계를 통해 전신 면역반응으로 이어진다. 따라서 음식물은 이차적으로 전신 면역계에도 영향을 미칠 수 있다. 전신 면역작용은 크게 둘로 나누어 체액성 면역과 세포성 면역으로 구분될 수 있는데, 전자는 다양한 항원에 대하여 비장의 B세포가 항체를 생산하여 항원에 대처하는 것이고, 후자는 항원에 감염된 T세포가 cytokine을 분비하거나 virus에 감염된 세포의 제거, 혹은 tumor cell에 직접 작용하여 암세포를 파괴하는 기능등을 의미한다. 세망내피계(reticuloendothelial system)에 넓게 퍼져있는 macrophage나 monocyte 등은 항원에 대한 탐식기능을 가지고 방어 작용을 하게되며 natural killer cell들은 종양이나 virus 감염세포 등에 대하여 비특이적인 방어 공격을 하게된다. 따라서 식품의 면역활성 기능을 잘 이용한다면 신체의 방어기작을 강화시켜 여러가지 질병을 예방하는데 도움을 줄 수 있으며 현재 이러한 가능성에 근거하여 면역활성 작용이 큰 여러가지 건강보조 식품들이 개발되고 있다. 지금까지의 연구결과에 의하면 내산성, 혐기성 미생물과 버섯의 균사체로부터 많은 면역활성물질들이 발견되었으며 이들은 주로 exopolysaccharide,

† Corresponding Author : Dept. of Microbial Eng., Konkuk Univ., 93-1 Mojin-dong, Seoul 143-701  
Tel : 02-450-3523. Fax : 02-3436-5594.  
e-mail: tbchoe@kkucc.konkuk.ac.kr

peptidoglycan (세균 세포벽), glucan(효모 세포벽) 등으로 이루어져 있다(3-5). 김치는 한국 고유의 발효식품으로 김치에 존재하는 유산균은 김치의 숙성과정에 따라 다양하게 존재하게 된다. 본 연구실에서는 다양한 김치에 존재하는 유산균들로 부터 비교적 면역활성 효과가 높은 균주, *Lactobacillus plantarum* 1종을 선별한바 있는데(6) 이렇게 선별된 *L. plantarum*의 세포 파쇄액을 쥐에게 경구투여한 다음 쥐가 보여주는 장내 및 전신 면역활성 효과들을 재조사하였다. 즉 유산균 파쇄액을 경구투여한 쥐의 면역활성 효과를 측정하기 위하여 1) 비장세포(SPC)와 Peyer's patch cell(PPC)의 증식 효과(7), 2)복강 마크로파지가 phagocytosis 과정중 분비하는 중간 대사산물인 NO 생성량 변화(5,8), 3) mouse 장내 분비항체(sIgA) 생성량 변화(2,9), 4) 혈액내 TNF- $\alpha$  및 IL-2 생성량 변화(10,11), 5) 특이항체의 생성 세포수의 변화(12) 등을 조사 하였다.

**재료 및 방법**

**유산균 파쇄액의 준비와 경구투여**

멸균된 MRS 배지 500mL을 2리터 삼각 flask에 넣고 유산균 전배양액을 접종하여 30℃에서 혐기적 상태로 3일간 정지배양 하였다. 배양한 유산균을 4000rpm에서 15분간 원심분리 하여 배양액 중의 균체를 회수하고 다시 phosphate-buffered saline (PBS)으로 3회 세척한 후 50mL PBS에 현탁시켰다. 현탁되어진 유산균을 초음파 분쇄기를 이용하여 25분 간격으로 1시간동안 균체를 파쇄한 후 5,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상청액(supernatant)을 회수하였고 파쇄되지 않아 침전된 균체(cell debris)는 동일조건하에서 초음파 파쇄를 재 실시하여 균체를 완전히 파쇄한 후 상청액을 회수하였다. Perchloric acid와 sodium periodate의 처리에 의해 nucleic acid와 exopolysaccharide가 제거되어진 용액을 12시간 정도 동결건조하여 최종적으로 실험에 사용할 시료를 powder 형태로 얻을 수 있었다 이를 경구투여할 때에는 4-6주 자성(male) Balb/C mouse를 대조군, 유산균 경구투여군 등 각각 6마리씩 나누고 2주동안 유산균 파쇄액을 자유 급식시켰다. 유산균 파쇄액은 2mg/mL의 농도로 만들어 이것을 식수 100mL에 희석시켜 10 혹은 40mg/kg/day의 양으로 급식시켰다.

**면역세포의 분리**

**비장세포의 분리**

Balb/C mouse를 희생시킨 후 해부용 가위로 복부부터 흉부까지 절개한 다음 비장을 분리하고 비장의 표면을 2-3회 PBS로 세척한 후 RPMI-1640 배지 5mL이 든 주사기를 비장에 찔러 넣은 후 압력을 가하여 비장세포를 유출시킨다. 유출된 비장세포를 mesh opening이 각각 100, 70, 30 $\mu$ m인 nylon filter를 사용하여 여과한 다음 여과된 여액을 1,500 rpm 15분간 원심분리한 후 회수한 비장세포에 ammonium chloride-K buffer (pH 7.3)를 가한 다음 37℃에서 5분간 반응시킴으로써 적혈구를 용해시켰다 FBS 10%가 첨가된 RPMI-1640배지로 2회 세척한 후 96-well microplate에 well당 3.5 $\times$ 10<sup>6</sup> 세포수로 조정하여 150 $\mu$ L씩 분주하였다.

**복강 대식세포의 분리**

Balb/C mouse의 복강에 15mL의 Hank's balanced salt

solution (HBSS)를 주입하고 복부를 가볍게 자극시킨 후 복강으로부터 PEC (peritonium exudate cell)를 분리하여 1,500 rpm에서 15분가량 원심분리를 하여 HBSS를 제거하였다. FBS 10%가 포함된 RPMI 1640 배지로 2회정도 세척한 후 96-well plate에 3.6 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/well가 되게 분주하여 5% CO<sub>2</sub>, 37℃에서 2시간 정도 전배양 하였다. PEC 중 대식세포는 강한 부착력을 가지므로 plate를 약간 흔든다음 상청액 속의 부착되지 않은 세포를 제거하고 assay well에 fresh RPMI 1640 배지를 분주함으로써 대식세포만을 분리, 배양하였다.

**Peyer's Patch Cell의 분리**

Peyer's patch cell은 gut associated lymphoid tissue (GALT)의 주된 면역기관으로 소화기관 전면에 걸쳐 존재한다. Balb/C mouse를 희생시켜 복부를 소독한 후 절개하고 십이지장에서부터 회장까지 소화장기를 분리한 후 PBS로 절개한 소화장기 표면을 2-3회 세척한 다음 핀셋과 수술용칼을 이용하여 장기에서 Peyer's patch cell을 분리한 다음 조직에서 세포를 분리시키고 mesh opening이 각각 100, 70, 30 $\mu$ m인 nylon filter를 이용하여 조직을 제거하고 cell을 모아 RPMI-1640배지로 3회 세척한 후 96-well microplate에 4 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well이 되게 분주하였다.

**면역세포의 증식효과 측정**

분리한 비장세포를 96-well plate에 35 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/well이 되게 한 후 150 $\mu$ L씩 분주하고 T-cell stimulator와 B-cell stimulator로 알려진 concanavalin A (conA)와 lipopolysaccharide (LPS) 각각을 1mg/mL의 stock solution을 만들어 희석하여 실험에 사용하였고 영지버섯 균사체의 정제물질인 GLG(*Ganoderma lucidum* glucan, 일약약품으로 부터 분양받음)도 유산균 파쇄액과 같은 농도인 2mg/mL으로 stock solution을 만든후 희석하여 실험하였다. 면역활성에 의해 증식된 세포의 농도는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 이용하여 측정하였다. MTT는 살아있는 세포내부로 흡수 되어진 다음 mitochondrial enzyme인 dehydrogenase에 의해 환원된 후 formazan crystal을 형성하여 세포내부에 축적된다. 그러나 죽은세포는 세포내 환원력이 부족함으로 MTT로부터 formazan crystal을 형성하지 못하는 반면 활발히 증식하는 세포는 더 많은 양의 MTT를 formazan으로 전환시킬 수 있다. MTT를 PBS에 5 mg/mL로 녹인 후 용해되지 않은 잔여물질은 filter를 사용하여 제거한다. MTT 용액을 50 $\mu$ L를 cell assay plate에 분주한 다음 37℃에서 4시간 이상 반응시키고 acidic isopropanol (0.04N HCl in isopropanol)을 첨가함으로 형성된 purple formazan crystal을 녹여내어 wavelength 570nm (measurement), 630nm (reference)에서 optical density를 측정함으로써 살아있는 세포수와 세포활성을 정량적으로 측정할 수 있다. 소화기관에서 분리한 Peyer's patch cell이나 비장에서 분리한 spleen cell을 96-well plate에 4 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well로 분주한 다음 대조물질로 conA, LPS, GLG와 유산균 파쇄액(LP)을 stimulator로 이용하여 면역세포 증식효과를 실험하였다. 증식효과를 유산균을 경구투여하지 않은 그룹에서 분리한 면역세포에 LP를 125  $\mu$ g/well로 첨가하여 구한 세포농도를 1로 하여 stimulation index로 표시하였다.

### 대식세포의 Nitric Oxide(NO) 생성 측정

활성화된 대식세포에 의해 생성되는 NO는 배양액 속에 6~8 초 정도 존재하며 그후 자연 산화되어 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 와 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 상태로 전환되어 측정된다. 따라서 생성되는 reactive nitrogen intermediate (RNI) 양은 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>는 환원 요소로 전환 시켜야 정확 하지만 보통은 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>가 대부분이기 때문에 이를 발색시켜 간접적으로 정량하였다. 배양액 100 $\mu$ l과 동량의 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylen diamine dihydrochloride, 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 가하여 실온에서 10분동안 반응시킨 후 540nm에서 ELISA를 이용하여 측정하였다. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 농도는 sodium nitrite를 이용하여 얻어진 흡광도로 부터 표준 곡선을 작성하여 측정하였다(8).

### 장내 분비 Immunoglobulin A(IgA) 변화량 측정(13)

Balb/C mouse를 희생시킨 다음 십이지장에서 맹장까지의 장기를 절개하고 양쪽 끝부분을 봉합한 다음 PBS에서 2회 정도 장기표면을 세척한다. 제조한 lavage solution(Table 1 참조)

Table 1. The composition of lavage solution of intestine.

NaCl	25 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	110 mM
KCl	10 mM <sup>++</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	20 mM
EDTA	20 mM
Soybean trypsin inhibitor	0.1 mg/mL
Polyethylene glycol (MW 4,000)	162 mg/mL
DW	100 mL

2mL을 26 1/2 gage needle을 사용하여 장기표면의 2-3 곳에 주입한다. 실온에서 10분정도 경과시킨 후 장기 내용물을 부드럽게 압착하여 원심분리용 tube에 짜낸다음 강렬하게 교반한 후 원심분리를 행한다(4 $^{\circ}$ C, 700 $\times$ g, 10분). 분리 되어진 상청액 속에 1 mM의 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 한다 다시 상청액을 취한 후 1 mM PMSF를 첨가하고 얼음속에 15분간 방치한 후 3.5%  $\gamma$ -globulin free bovine serum albumin 50 $\mu$ l을 첨가하여 동일하게 원심분리를 실시한다 얻어진 시료는 -20 $^{\circ}$ C에 보관하며 실험에 사용하였다. Lavage solution을 사용하여 얻어진 장내시료를 500배 희석한 후 연속적으로 2배씩 희석하여 96-well plate에 100 $\mu$ l씩 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 정도 방치한다. Tween-20 0.05%가 포함된 PBS (T<sub>20</sub>-PBS)로 assay well을 3회 세척한 다음 1% bovine serum albumin으로 blocking시킨 후 실온에서 1시간 정도 방치시킨 다음 T<sub>20</sub>-PBS로 3회 세척한다. Alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgA를 1000배 희석하여 각 assay well에 100 $\mu$ l씩 분주하고 10시간 후 3회 세척하고 p-nitrophenol phosphate substrate solution (PNPP)을 각 assay well에 분주한 다음 암 상태에서 30분간 실온에서 반응시켜 발색시키고 405 nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다.

### 분비항체 IgA를 이용한 immunoblotting

장내 분비항체인 IgA를 이용하여 immunoblotting을 실시하

였다. 먼저 *L. plantarum*과 기타 장내 미생물인 *E. coli*, *Helicobacter pylori*와 *Pseudomonas aeruginosa*의 세포막 단백질을 초음파 파쇄방법으로 분리하였다. 이들 단백질을 SDS-PAGE를 수행한후 gel을 electroblotter (Hofer Scientific Instruments, San Francisco)를 사용하여 nitrocellulose paper에 electroblotting한다. Transfer가 끝난 nitrocellulose paper를 20% methanol에 세척 후, 5% skim milk로 실온에서 30분간 blocking한다. PBS로 희석한 장내 분비항체액(1:10 dilution)으로 실온에서 1시간동안 교반하면서 반응시킨다. Triton X-100 0.2%가 함유된 PBS로 3회 세척 후, 1,000배 희석한 anti-mouse IgA alkaline phosphatase conjugate로 실온에서 1시간동안 반응시킨다. 발색시키기 위해 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate(BCIP)와 Nitro Blue Tetrazolium (NBT) mixture (in 100mM Tris, pH 9.5)를 반응시킨다.

### 혈액내 TNF- $\alpha$ 및 IL-2 농도의 측정

혈액내의 TNF- $\alpha$  혹은 IL-2 정량은 R & D systems사의 측정 kit를 구입하여 사용하였다. 유산균 파쇄액을 2주간 경구투여한 쥐의 혈액을 채취하고 1시간동안 방치한후 원심분리하여 혈청을 분리한다. Monoclonal anti-mTNF- $\alpha$ 가 미리 coating 되어 있는 96-well microtiter plate에 50  $\mu$ l의 희석용 완충액을 넣고 분리된 혈청 50  $\mu$ l를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시킨후 수세용 완충액으로 4회 수세한다. 여기에 peroxidase-conjugated anti-mTNF- $\alpha$ 를 첨가하여 이미 결합된 TNF- $\alpha$ 와 반응시키고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 다시 반응시킨후 4회 수세하고 기질용액 hydrogen peroxide와 발색제인 tetramethylbenzidine (TMB)를 가하여 발색시킨다. 여기에 sulfuric acid 100  $\mu$ l를 가하여 반응을 정지시키고 실온에서 10분간 방치한후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한다. IL-2의 측정도 위의 방법에 준한다.

### 특이항체 생성능 측정

특이항체 생성능을 조사하기위하여 sheep red blood cell (SRBC)를 항원으로 하고 여기에 대해 얻어진 항체를 이용하여 용혈반 형성 세포수를 측정하는 방법을 사용하였다. Balb/C mouse에 유산균 파쇄액을 2주간 경구투여한 후 SRBC 1 $\times$ 10<sup>7</sup> 혹은 5 $\times$ 10<sup>7</sup> 을 복강주사로 면역시켰다. 주사 5일후 쥐를 희생시켜 비장세포를 분리하고 생존 세포수를 측정한다. 비장세포 0.1 mL(1 $\times$ 10<sup>8</sup> cells/mL) 과 SRBC 0.1mL(10%) 그리고 0.7% agar용액 2 mL을 혼합하여 1.5% agar 기저 평판에 균일하게 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 감작시켰다. 여기에 2.5mL guinea pig serum을 가하여 30분간 반응시킨후 용혈반 형성 세포수를 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 유산균 파쇄액의 경구투여에 따른 쥐의 면역세포 증식 효과

유산균 파쇄액을 Balb/C mouse에 2주간 경구투여한후 비장세포와 Peyer's patch cell(PPC)을 분리하여 *in vitro*에서 배양하였을때 유산균 투여가 세포증식에 미치는 영향을 살펴 보았다. Table 2는 유산균 파쇄액을 경구투여하지 않은 그룹과 투여한 그룹으로부터 각각 비장세포와 PPC를 분리하고 이들을 *in*

Table 2. Effect of feeding of *L. plantarum* cell lysate on the proliferation of immune cells.

Immune cell type	LP lysate feeding (10mg/kg/day)	Stimulators added	Stimulation index
Spleen cell	-	-	0.11
	+	-	0.16
	-	LP (125 µg)	1.0
	+	LP (125 µg)	1.26
	-	LPS (25 µg)	1.20
	+	LPS (25 µg)	1.49
	-	ConA (20 µg)	1.12
	+	ConA (20 µg)	1.38
	-	GLG (125 µg)	1.08
	+	GLG (125 µg)	1.33
Peyer's patch cell	-	-	0.12
	+	-	0.45
	-	LP (125 µg)	1.0
	+	LP (125 µg)	2.33
	-	LPS (25 µg)	1.26
	+	LPS (25 µg)	2.85
	-	ConA (20 µg)	1.17
	+	ConA (20 µg)	2.51
	-	GLG (125 µg)	1.19
	+	GLG (125 µg)	2.42

LP, cell lysate of *L. plantarum*  
 LPS, lipopolysaccharide of *E. coli*,  
 ConA; concanavalin A  
 GLG; *Ganoderma lucidum* glucan

*in vitro*에서 배양하면서 배양액에 여러가지 면역활성 물질 (stimulator)을 첨가하였을 때 세포 증식효과를 나타낸 것이다. 증식효과는 유산균을 경구투여하지 않은 그룹의 면역세포를 유산균 파쇄액(LP)으로 활성화시켰을 때 얻은 세포 농도를 1로 하고 각 stimulator의 첨가효과를 stimulation index로 표시하였다. 비장세포의 경우 유산균을 경구투여한 그룹이 투여하지 않은 그룹에 비해 stimulator에 따라 약 1.2 ~ 1.3배 정도의 세포증식 효과가 나타나 유산균의 경구투여가 비장세포의 활성화에 미치는 효과는 그리 크지않음을 알 수 있다. 그러나 PPC의 경우 유산균 경구투여 그룹은 비투여군에 비해 세포증식이 2.0 ~ 2.3배 가량 증가되었다. 또 유산균을 경구투여한 그룹에서 분리한 PPC는 별다른 stimulator의 첨가없이도 stimulation index가 0.45로 나타나 비투여 그룹의 0.12에 비해 *in vitro*에서의 증식이 활발함을 보였다. 이로부터 유산균을 경구투여 하면 장내에 있는 PPC를 상당수준까지 활성화 시킬 수 있고 이러한 효과는 이 세포를 *in vitro*에서 배양했을 때 stimulator의 첨가와 함께 활발한 세포증식으로 이어짐을 알 수 있다. Peyer's patch는 전신 면역계의 비장에 해당하는 면역기관으로써 소장주요 분포하며 장내에서의 면역반응을 주도한다. 따라서 PPC의 활성

화는 감염 세균에 대한 항체생산으로 이어지며 이러한 일련의 반응은 소화기관을 외부의 감염원으로 부터 보호하는 중요한 작용이라고 사료된다.

**복강 대식세포의 NO 생산량 변화**

대식세포는 외부 항원물질에 대한 1차방어를 담당하는 면역세포로서 반응 중간대사물질, cytokine 및 phagocytosis를 통해 숙주내 항원물질을 제거할 수 있다. 대식세포가 분비하는 반응 중간대사 산물은 화학적으로 반응성이 매우 높은 2가지의 무기 성분으로 나눌 수 있는데 이들은 RNI (reactive nitrogen intermediates)와 ROI (reactive oxygen intermediates) 등이다. 첫번째 반응 대사경로인 RNI는 최근 포유류에서 발견된 것으로 현재까지 잘 알려지지 않은 효소에 의해 합성되거나 정확한 면역반응에 의해 생산되며 항암·항균작용 등에 중요한 역할을 한다고 알려지고 있다. 한편 활성화된 대식세포에 의해 생성되는 ROI는 phagocytosis 과정에서 생성되는데 다른 분비성 물질 및 효소들과 함께 세균, 바이러스, mineral particle 등을 제거할 수 있는 대사산물이다(8,14). NO는 암세포와 세균에 대하여 세포독성 능력을 가지며 이에대한 생화학적 기작은 mitochondria의 호흡계에 중심적인 역할을 하는 효소와 DNA 합성에 관여하는 주요한 효소들에 존재하는 iron을 포함하는 잔기들과 NO가 결합하여 효소적 반응을 저지시키는 것으로 보고있다.

Table 3은 유산균 경구투여 그룹과 비투여 그룹간의 NO 생성량을 비교한 것으로 투여그룹의 NO 생성량이 1.2 ~ 1.4배 가량 증가하는 것으로 나타났다. 이 결과는 유산균을 복강주사가 아닌 경구투여에 의해서도 복강에 있는 매크로파지를 활성화시킬수 있음을 보여준다. 또 유산균 투여량을 10mg/kg/day에서 40mg/kg/day로 증가시켰을 때에는 대식세포에 의한 NO 생성량도 23%가량 증가되어(data not shown) NO 생성의 증가가 유산균 투여에 의한 것임을 알 수 있었다.

Table 3. Effect of feeding of *L. plantarum* cell lysate on the production of NO by peritoneal macrophages.

Cell type	Cell lysate feeding (10mg/kg/day)	Stimulators added	Stimulation index
peritoneal macrophage	-	-	0.23
	-	LP (125 µg)	1.0
	-	LPS (25 µg)	1.52
	-	ConA (20 µg)	1.66
	-	GLG (125 µg)	1.04
	+	-	0.32
	+	LP (125 µg)	1.42
	+	LPS (25 µg)	1.87
	+	ConA (20 µg)	1.75
	+	GLG (125 µg)	1.46

**장내 분비 IgA의 변화 측정**

IgA는 미생물과 같은 외부항원의 침입에 대항하기위해 눈물,

침, 초유 등과 같은 외부비성 물질과 점액질이 많은 호흡기관 및 소화기관에서 분비되는 항체로 주로 점막 면역계(mucosal immune system)에서 많이 분비되고 있다. 따라서 장내에 분비되는 IgA는 장내 감염세균에 대한 주된 방어작용이라고 볼 수 있으며 특이항체의 생성량은 장내 면역반응의 중요한 지표로 볼 수 있다. Figure 나타낸대로 유산균을 투여 한 군의 분비 Ig A양은 대조군에 비해 각각 25%(그룹 I; 10mg/kg/day)와 46%(그룹 II; 40mg/kg/day)씩 증가되었음을 확인 할 수 있었는데 이는 앞서 관찰한대로 유산균 파쇄액에 의해 PPC와 같은 장내 면역세포가 활성화 되었고 따라서 분비 IgA양도 증가 되었을 것이라고 사료 된다. 분비항체의 항원 특이성을 알아보기 위하여 여러

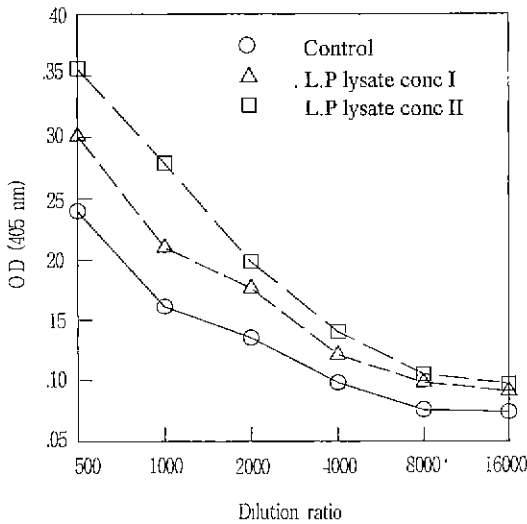


Figure 1. Determination of intestinal sIgA concentration of Balb/C mice fed by placebo(control) or by cell lysate of *L. plantarum* for 2 weeks conc. I; 10mg/kg/day, conc. II; 40mg/kg/day.

가지 장내 미생물의 표면항원을 이용하여 immunoblotting을 하여본 결과는 Figure 2와 같다. No. 1은 placebo를 투여한 그룹이고 No. 2는 유산균을 투여한 그룹으로, 유산균 투여 그룹이 비투여 그룹에 비해 미생물의 의막 항원에 대한 장내 IgA의 생산력이 전반적으로 증가하는것으로 나타났다. 또 *L. plantarum*에 대한 항체는 물론이고 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *H. pylori* 등과 같은 장내 미생물에 대한 항원 결합력도 증가하는 것으로 나타났다. 지금까지 유산균을 음용할 경우 장내 세균에 대한 면역력이 증가한다는 이론이 있었으나 유산균의 경구투여가 장내 분비항체 생산량의 증가와 함께 장내 미생물에 대한 항체의 결합력이 커진다는 구체적인 자료는 없었다.

**혈액내 cytokine 농도변화**

유산균을 경구투여하였을 때 장내 면역계가 활성화되는것은 어느 정도 짐작할 수 있는 일이다. 그러나 이 효과가 전신면역계로 이어질 가능성에 대해서는 그동안 각종 항암작용이 실험된 외에는 아직까지 구체적인 연구결과가 없는 실정이다. Table 4는 유산균 투여군과 비투여군의 혈액에서 TNF- $\alpha$  및 IL-2의 농도를 측정한 것으로 투여농도에 따라 각각 1.8 ~ 3.3배 그리

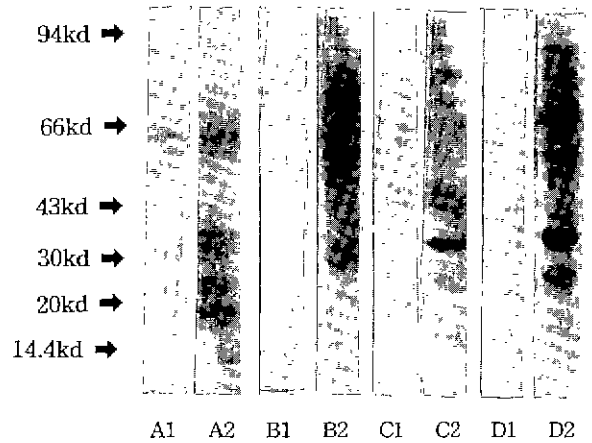


Figure 2. Immunoblotting with membrane surface antigens of various microorganisms using IgA collected from the gut of mouse feeding *L. plantarum* lysate for 2 weeks. No. 1; IgA collected from placebo feeding group (0.75% saline solution) No. 2 : IgA collected from *L. plantarum* feeding group Membrane surface antigens from A) *Lactobacillus plantarum*, B) *Escherichia coli*, C) *Pseudomonas aeruginosa*, D) *Helicobacter pylori*.

Table 4. Effect of feeding of *L. plantarum* cell lysate on the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-2 in the mouse blood.

Cell lysate feeding	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-2 (ng/mL)
control	118.6 $\pm$ 12.4	14.9 $\pm$ 3.8
10 mg/kg/day	213.6 $\pm$ 18.6	22.7 $\pm$ 5.7
40 mg/kg/day	391.5 $\pm$ 32.9	28.6 $\pm$ 6.6

고 1.5 ~ 1.9배씩 증가하는 것으로 나타났다. TNF- $\alpha$ 와 IL-2는 모두 T세포에 의해 생산되는 cytokine들로 혈액내에 이들의 양이 증가하는 것은 T세포가 활성화 되었음을 간접적으로 보여 주고 있다. 그러나 이러한 cytokine의 증가가 신체 방어에 있어서 유리하게 작용하는지 아니면 오히려 해를 주는지에 대해서는 현재로서 알 수 없으며 앞으로 더 많은 실험이 필요하다.

**특이항체 생성세포수의 변화**

비장 세포중에서 SRBC에 대한 특이항체 생성 세포수는 유산균 투여그룹이 비투여군에 비해 현저히 증가하였다. Table 5에 따르면 10mg/kg/day의 양으로 투여했을 경우 비투여군에 비해 2.0 ~ 3.3배, 40mg/kg/day의 양으로 투여했을 경우 4.1 ~ 4.8배씩 증가했음을 알 수 있다. 이로써 경구투여한 유산균이 비장세포의 B cell 활성화에도 영향을 미치고 있음을 확인할수 있었다. Fig. 3은 지금까지의 실험결과를 토대로 하여 유산균을 경구투여 했을때 일어날수 있는 장내 및 전신 면역반응의 경로를 그려본 것이며 밑줄 친 부분은 본 실험을 통하여 활성화를 확인한 부분이다. 이상의 결과로 보아 쥐에게 유산균을 경구투여 했을 때 장내면역계나 전신 면역계에서 상당 수준의 면역활성 효과를 기대할수 있음을 알 수 있었다. 그러나 이러한 효과가 사람에게

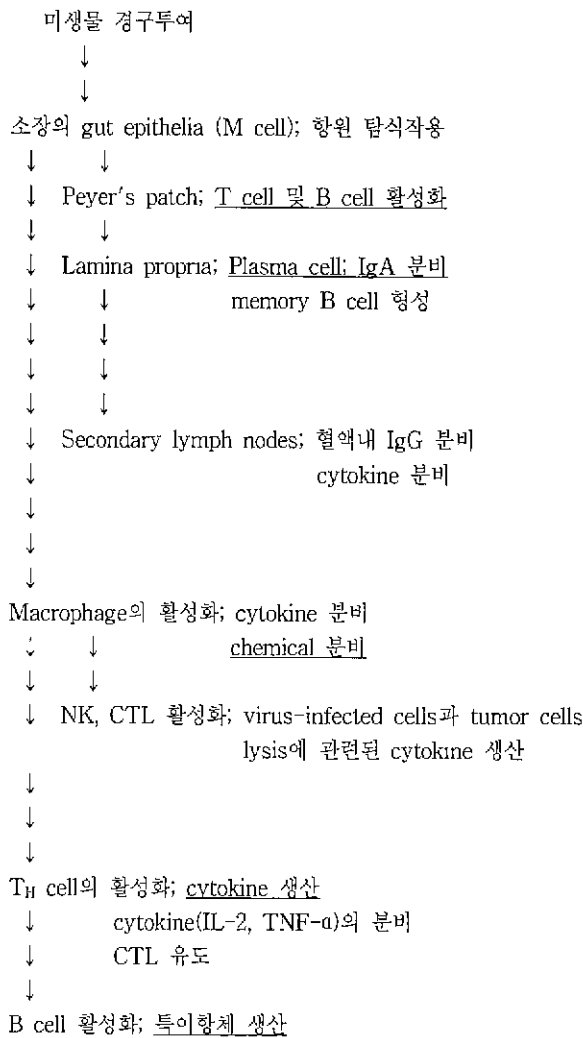


Figure 3. Schematic diagram of immunostimulating pathway of mice fed with cell lysate of *L. plantarum*.

Table 5. Effect of feeding of *L. plantarum* cell lysate on the hemolytic plaque forming cells in the spleen of Balb/C mice immunized with SRBC.

Cell lysate feeding	SRBC injection (1×10 <sup>7</sup> )	PFC/10 <sup>6</sup> spleen cells	Stimulation index
Control	-	0.82±0.06	1.0
10 mg/kg/day	-	1.77±0.1	2.1
Control	1	2.3±0.42	1.0
10 mg/kg/day	1	7.5±1.93	3.3
40 mg/kg/day	1	10.9±2.45	4.8
Control	5	16.2±2.88	1.0
10 mg/kg/day	5	32.8±4.37	2.0
40 mg/kg/day	5	66.8±7.23	4.1

도 그대로 적용될수 있을지는 의문이며 앞으로 이에 대한 연구가 더 보충되어야 할 것이다.

요 약

김치에서 분리한 유산균 과쇄액을 2주간 쥐에게 경구투여한후 이들 쥐로부터 여러가지 면역활성 효과를 조사하였다. 그 결과 쥐에게 유산균 과쇄액을 투여한 그룹이 투여하지 않은 그룹에 비해 ① 비장(SPC) 및 소장(PPC)의 면역세포 증식속도의 증가 ② 복강 마크로파지의 NO 생성량 증가 ③ 장내 분비 IgA 생성량의 증가 ④ 혈액내 TNF-α 및 IL-2 농도의 증가 그리고 ⑤ 특히 항체 생성 세포수의 증가 등과 같은 다양한 면역활성 효과를 관찰하였다. 특히 유산균 과쇄액과 같은 면역활성 물질을 복강투여가 아닌 경구투여만으로도 장내의 분비항체 생산량이 증가하고 또 이들 항체가 유산균이 아닌 다른 장내 미생물의 표면 항원과도 결합하는 능력이 증가함을 보여 주었다. 또 혈액내 cytokine의 증가와 특히 항체 생산세포수 증가등으로 부터 김치 유산균을 경구투여한 쥐에게서 장내면역은 물론 전신 면역기관 까지 활성화가 가능함을 알 수 있었다. 그러나 이러한 면역반응 결과를 사람에게 적용시키기는 아직 시기상조이며 이를 위해 더 많은 실험결과가 필요하다 하겠다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처 선도 기술과제의 연구비로 수행된 연구 결과의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다

참 고 문 헌

1. 村上 浩紀, 上野川修一 (1992), 식품과 생체방어, pp. 47-57, 講談社, 東京.
2. Kato, T, and R. L. Owen (1994), Structure and function of intestinal mucosal epithelium, Handbook of mucosal immunology, (P. Ogra et al. eds) pp. 11-23 Academic Press, New York.
3. Kitazawa, H., M. Noumra, T. Itoh, and T. Yamaguchi (1991), Immunostimulating activity of Rpy fermented milk and lactic acid bacteria, *J. Jpn. Dairy and Food Sci.*, 74, 2082-2088.
4. Lee J. H. (1994), Structural and functional characterization of immunopotentiator from food microorganism, Doctoral thesis, Univ. of Tokyo, Jpn.
5. Vallot, N., F. Boudard and M. Bastide (1994), Effect of a (1→3)-β-D-glucan, Pichilan, extracted from pichia fermentants on a murine macrophage cell line, *J. Immunopathol. Pharmacol.*, 7, 21-35.
6. Kang, K. Y., S. H. Park and T. B. Choe (1994), Immunostimulation effect of cell wall components isolated from *L. plantarum*, *J. Microbiol. and Biotechnol.* 4, 195-199.
7. Fusiwara, S., Y. Kato-Oka, T. Hirota, and H. Makazato (1990), Immunopotentiating effects of *B. longum* SBT

- 2928 showing mitogenic activity *in vitro*, *J. Jpn Soc. Nutr. Food Sci.*, **43**, 327-333.
8. Keller, R., M. Geiges, and R. Keist. (1992), L-arginine dependent reactive nitrogen intermediates as mediators of tumor cell killing activated macrophages, *Cancer Res.*, **50**, 142-1425.
  9. Tomasi, T. B. (1994), An overview of the mucosal system, (P. Ogra et al. eds.) *Handbook of mucosal immunology*, pp. 4-8, Academic Press, New York.
  10. Kato, M., K. Hirose, M. Hakozaiki, M. Ohno, Y. Saito, R. Izutani, J. Noguchi, Y. Hori, S. Okumoto, D. Kuroda, H. Nomura, S. Nishimatsu, and H. Ohoyanagi (1995), Induction of gene expression for immunomodulating cytokines in peripheral blood mononuclear cells in response to orally administered PSK, an immunomodulating protein-bound polysaccharide, *Cancer Immunol. Immunother.*, **40**, 152-156.
  11. Kajikaya, T., Y. Shimada, H. Oshima, M. Yamazaki, and D. Mizuno (1987), Endogeneous production of TNF-like cytotoxic factor in BCG-primed mice by heterologous fibrinogen, *J. Biol. Response Modif.*, **6**, 88-95.
  12. Ohno, R., S. Yokomaku, K. Wakayama, S. Sugiura, K. Imai, and K. Yamada (1976), Effect of protein-bound polysaccharide preparation, PSK on the immune response of mice to sheep red blood cells, *Gann*, **67**, 97-99.
  13. Charles, O., W. Ealding, and J. Lefkowitz (1984), A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions, *J. Immunol. Method.* **67**, 101-108.