



유아의 분변에서 분리한 *Lactobacillus gasseri* KACC 91155의 Jurkat T Cells에서 항산화 효과

정석근* · 김현수 · 함준상 · 채현석 · 이종문 · 안종남
농촌진흥청 축산연구소

The Antioxidant Effect of *Lactobacillus gasseri* KACC 91155 Isolated from Korean Infant in Jurkat T Cells

Seok-Geun Jeong*, Hyun-Soo Kim, Jun-Sang Ham, Hyun-Seok Chae,
Jong-Moon Lee, and Chong-Nam Ahn
National Livestock Research Institute, RDA

Abstract

In the present study, we investigate the protective effect of antioxidant strain *Lactobacillus gasseri* KACC 91155, isolated from Korean infant feces(Obstetrics & Gynecology, Suwon, Korea) on the oxidative stress damage on the Jurkat T cells. To estimate the extent of cellular lipid peroxidation inhibition, MDA(malondialdehyde) production was measured. Furthermore, cell viability was detected by the MIT assay, DNA damage was tested by the comet assay. Cell grown in medium with or without *L. gasseri* lysate(100~1,000 µg) were treated with H₂O₂, Fe²⁺ as an oxidative stimulus. From the results obtained, the supplementation of Jurkat T cells with *L. gasseri* lysate significantly decreased in MDA production(1,250 vs. 835 nmol/mg protein), and DNA damage(31.6 vs. 22.6 tail moment). Also *L. gasseri* increase cell viability against oxidative damage. We concluded that the *L. gasseri* KACC 91155 showed a protective effect against oxidative stress.

Key words : *Lactobacillus gasseri*, antioxidant, Jurkat T cell, DNA damage

서 론

활성 산소는 미토콘드리아 대사, 중성 백혈구(neutrophil) 대사와 같은 다양한 경로를 통해 생성될 뿐만 아니라 생화학 물질, 발암 물질과 같은 외인성 요인에 의해서도 생성되므로 우리 인체는 계속해서 활성 산소에 노출되게 된다(Thannickal and Fanburg, 2000). 생리적으로 생성된 낮은 농도의 활성 산소는 세포의 다양한 분자적 메커니즘을 통해 조절되나(Finkel, 2000), 과도하게 생성된 활성 산소는 세포벽의 지질을 공격하여 지질 과산화를 개시하고, 산화적 손상을 초래하여 세포가 사멸함으로써 노화를 비롯한 각종 질병의 원인이 되고 있

다(Davies, 1995).

항산화물이란 활성이 강한 free radical의 작용을 방지하는 역할을 하는 화합물을 말하는 것으로서, 활성 산소에 의한 세포의 노화 억제 및 각종 질병을 예방할 수 있는 천연의 항산화물에 대한 연구가 이루어져왔다(Halliwell, 1991; Aruoma, 1996). 그 가운데 하나가 유산균으로서 여러 연구자들에 의해 새로운 프로바이오틱으로서의 항산화 효과를 나타내는 유산균에 대한 연구가 수행되었다(Kullisaar *et al.*, 2002; Annuk *et al.*, 200).

그러나 항산화 유산균의 cell line에서의 산화적 손상으로 부터 항산화 효과에 대한 측정은 그동안 일반적으로 사용되었던 *in vitro* 항산화 측정법보다 효과적인 방법임에도 불구하고 이에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서 *in vitro* 선발 과정을 통해 선발된 항산화 균주인 *Lactobacillus gasseri* KACC 91155의 Jurkat T cell line에

* Corresponding author : Seok-Geun Jeong, National Livestock Research Institute, RDA, Suwon, 441-350, Korea. Tel: +82-031-290-1692, Fax: +82-031-290-1697, E-mail: sg5959@rda.go.kr

서 항산화 효과를 측정하고자 하였다.

재료 및 방법

항산화 균주의 분리 및 동정

높은 항산화 활성을 갖는 *Lactobacillus* spp.를 분리하고자 모유를 수유하는 유아 11명의 분변(중앙산부인과, 수원)을 멸균 생리식염수로 십진 희석한 후 0.02% sodium azide가 첨가된 MRS agar(Difco, USA)에 도말하고 BBL gas pack anaerobic system(BBL, USA)을 사용하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 성장한 특성적인 단일 균주를 분리하고, 다시 MRS broth(Difco, USA)에서 배양한 17 균주의 항산화 효과를 TBA법으로 측정하였다(Lin and Chang, 2000). 이들 균주 중 항산화 효과가 높은 단일 균주를 선발하였고, 생명공학연구원 한국유전자원센터(대전)에 의뢰하여 16S rDNA 염기 서열로 분석한 결과 *Lactobacillus gasseri*로 동정되었다.

*L. gasseri*의 lysate는 전보(Kim 등, 2005)와 동일한 방법으로 제조하였다. 즉, 분리한 유산균을 MRS broth에서 배양(37°C) 후 원심분리(4,000×g, 10 min)하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 20 mM sodium phosphate buffer(SPB, pH 7.4)로 2회 세척 후 다시 SPB에 현탁하여 초음파 처리로 파쇄하고 원심분리(7,000×g, 10 min)한 다음 상등액을 0.45 μm acrodisc syringe filter(Life Science, USA)로 여과하였으며, 단백질 함량은 Bradford 법(Bio-Rad Laboratories, USA)으로 측정하였다.

세포배양

Jurkat T cell(ATCC TIB-152)은 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)으로부터 구입하여 10% fetal bovine serum(FBS, Biowhittaker, USA), 2 mmol/L L-glutamine(Biowhittaker, USA), 1×10⁵ IU/L penicillin(Biowhittaker, USA) 및 100 mg/L streptomycin(Biowhittaker, USA)을 함유하는 RPMI 1640(Biowhittaker, USA) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

지질 과산화 억제 효과 측정

지질 과산화 정도를 알아보기 위하여 MDA(malondialdehyde) 함량을 측정하였다. 100 mm dish에 5×10⁴ cell/mL를 분주하여 24시간 배양하였다. *L. gasseri* lysate는 PBS에 희석하여(100~1,000 μg protein) 첨가하고 1시간 배양 후 100 μM FeSO₄, 100 μM H₂O₂를 처리하여 세포에 산화적 스트레스를 가하고 30분간 배양 후 cell을 멸균 PBS(Biowhittaker, USA)로 2회 세척 후 초음파 분쇄기를 사용하여 세포를 파쇄(40% power, 20 sec, Vibra cell™, Sonics & Materials INC, USA)하

고 원심분리(250×g, 5 min)하여 상등액을 얻었다. 세포의 MDA 함량은 상업적 측정 kit인 Lipid peroxidation assay kit(Calbiochem®, USA)를 사용하여 측정하였다. MDA 함량은 회귀방정식으로 산출된 표준 MDA(1,1,3,3-Tetramethoxy propane)의 직선 방정식에 대입하여 구하였고, nmol MDA/mg protein으로 나타내었다.

세포 사멸 억제 효과

세포를 96-well microplates(5×10⁴ cells/mL)에 넣고 24시간 배양하였다. 세포에 *L. gasseri* lysate를 처리하고 1시간 배양 후 100 μM H₂O₂를 처리하고 30분간 배양하였다. 세포 사멸 억제 효과는 Cell counting kit-8(Dojindo Laboratories, Japan)를 사용하여 ELISA reader(REF 402-5802, Bio-rad, USA)를 이용하여 450 nm 흡광도에서 측정하였다.

Comet Assay에 의한 DNA 손상 보호 효과

세포의 DNA 손상 정도 측정을 위해 comet assay를 Singh 등(1998)의 방법에 준하여 실시하였다. 세포에 *L. gasseri* lysate를 1시간 동안 처리한 다음 100 μM H₂O₂를 첨가 후 5분 동안 반응시키고 PBS로 세척하였다. 세포(2×10⁴ cells/mL)를 원심분리(600×g, 5 min) 후 normal melting agarose(NMA)가 precoating된 frosted slide 위에 75 μL의 0.7% low melting agarose gel(LMA)와 함께 분산시킨 후 gel 층을 만든 후 다시 0.7% LMA 용액 75 μL를 부가하여 gel층을 중층하였다. Alkali lysis buffer(pH 10) (2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris, 1% Na-lauroylsarcosinate, 10% DMSO와 1% Triton X-100)에 담가 저온에서 1시간 동안 lysis시켜 DNA의 double strand를 풀어주고 다시 전기영동 buffer(300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA)에 담가 unwinding시켰다. 40분 후 25 V/300 mA로 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충용액(pH 7.5)으로 충분히 세척하였다.

Comet image 분석을 위해 ethidium bromide(20 μg/mL)로 nucleotides를 염색하여 형광현미경(Leica DMLB, Germany)에서 관찰하고, CCD 카메라를 통해 comet image analyzing system이 설치된 컴퓨터에서 분석하였다. DNA 손상 정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리값(tail length, TL)에 tail 내 함유된 DNA% (Tail % DNA)를 곱해준 tail moment(TM)값을 측정하여 나타내었다.

통계처리

측정값은 평균±표준오차로 나타내었고, SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하였고, 모든 통계적 유의성은 p<0.05 수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

항산화 균주 분리 및 동정

본 실험에 사용한 유산균은 유아의 분변에서 분리한 *Lactobacillus* spp. 중 *in vitro* 선발 과정을 통하여 선발된 항산화 활성이 가장 우수한 균주로서 34.87±2.68%(500 µg protein)의 항산화 효과를 나타내었다(Fig. 1). 16S rDNA 염기 서열 분석 결과 *Lactobacillus gasseri*로 동정되었고 한국농업미생물자원센터(수원)에 기탁하여 *Lactobacillus gasseri* KACC 91155(이하 *L. gasseri* 91155)의 등록번호를 부여 받았다. Fig. 2에 이 균주의 전자 현미경 사진을 나타내었다.

Jurkat T cell line은 lymphocyte와 유사한 membrane marker를 가지고 있기 때문에 식이 항산화제의 항산화 효과를 측정하기 위하여 일반적으로 사용되는 세포이다(Konicova et al., 1992; Duthie et al., 1996). 본 연구에서는 *L. gasseri* 91155의 Jurkat T cell에서의 지질 과산화 억제 효과, 세포 생존율, DNA 손상 억제 정도를 측정하였다.

지질 과산화 억제 효과

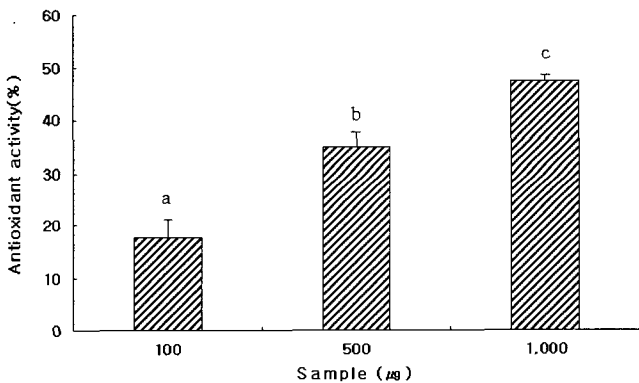


Fig. 1. Antioxidant activity of *L. gasseri* KACC 91155.
a-c: Values not sharing common letters are significantly different($p<0.05$).

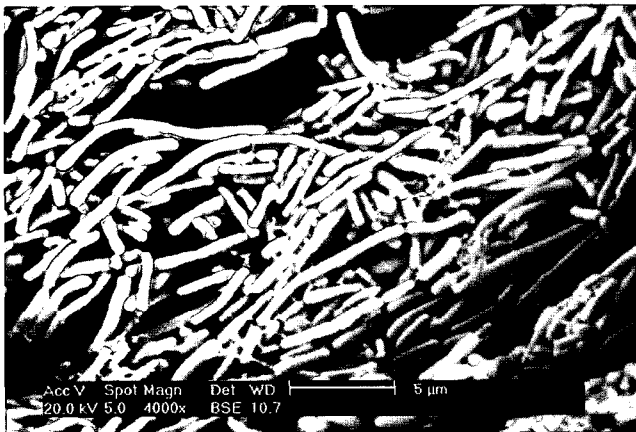


Fig. 2. SEM micrograph of the *L. gasseri* KACC 91155(×4,000).

L. gasseri 91155의 활성 산소에 의한 MDA 생성 억제 효과를 조사하였다. Fig. 3에 나타 낸 바와 같이 이 균주는 세포 산화에 의해 생성된 지질 과산화물인 MDA의 생성을 방지하였다. 세포의 MDA 함량은 유산균을 처리하지 않은 positive control에서 1,250±42.7 nmol MDA/mg protein이었으나, *L. gasseri* 500 µg lysate 처리구는 835±33.9 nmol MDA/mg으로 MDA 생성이 억제되었다.

H₂O₂는 산화적 스트레스를 유도하기 위하여 많이 사용되는 주요 활성 산소이다(Xiao, 2000; Tanaka et al., 2001). 그러나 본 연구에서는 H₂O₂ 단독 처리로는 MDA 생성을 초래하지 못하였기 때문에 Jurkat cell에 산화적 스트레스를 가하기 위하여 일반적으로 *in vitro* assay에서 많이 사용되는 산화제인 Fe²⁺와 H₂O₂를 사용하였다. 이 두 산화제는 Fenton reaction을 통하여 매우 반응성이 큰 hydroxyl radical을 생성한다(Li and Lau, 1993). Erba 등(2003)의 연구에서 높은 농도의 H₂O₂를 처리하여도 MDA가 생성되지 않아 지질 과산화 측정에 적합하지 않다고 보고하였다. 이는 H₂O₂가 charge를 띤 분자가 아니기 때문에 phospholipid bilayer를 통과하기 때문에 손상을 받지 않는 것으로 설명되고 있다(Halliwell and Chirico, 1993).

반응성이 큰 free radical은 DNA, RNA, 단백질 그리고 지질을 공격한다. 이 중 지질은 산화적 스트레스 동안 주요 목표물로서 세포 배양에서 지질막의 장쇄 불포화 지방산은 특히 금속이온에 의해 불안정한 지질 과산화물을 생성한다(Humpries and Sweda, 1998). 이것은 빠르게 단쇄 alkene이나 MDA 같은 aldehyde로 분해되며 지질 과산화를 개시할 뿐만 아니라 DNA 손상을 초래한다(Uchida, 2000). 생체 내 MDA 생성은 세포의 잠재적인 내부 항산화제로 조절되나, 지질 과산화의

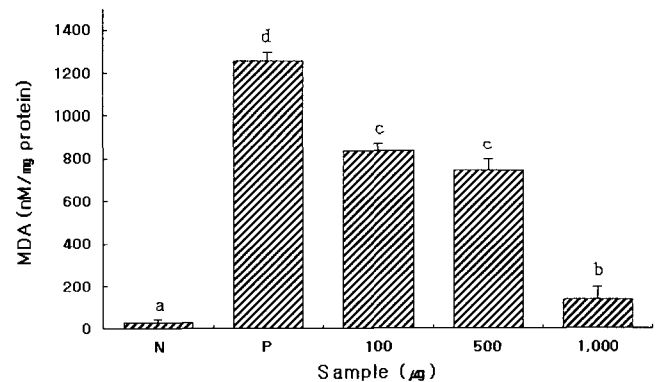


Fig. 3. MDA levels in control and *L. gasseri* KACC 91155 supplemented Jurkat T cells with or without oxidative treatment.

N: negative control(control cells), P: positive control (oxidized cells), MDA: malondialdehyde.

a-d: Values not sharing common letters are significantly different($p<0.05$).

개시나 증폭의 억제를 위해서는 추가적인 항산화제가 필요하다(Bonnes-Taourei *et al.*, 1992).

세포 사멸 억제 효과

유산균이 H₂O₂ 유도 세포 사멸에 방어 효과가 있는지 조사하기 위하여 유산균을 미리 처리한 세포에서 세포 생존성을 측정하고 Fig. 4에 나타내었다. 본 연구에서는 MTT assay를 사용하여 세포의 생존성을 측정하였다(Han *et al.*, 2004). 유산균과 활성 산소를 처리하지 않은 negative control의 세포 생존율을 100%로 보았을 때 유산균을 처리하지 않고 H₂O₂를 첨가한 positive control의 생존율은 30.5±1.5%로 낮았다. 반면 *L. gasseri* 91155 첨가구(100 µg)는 42.9±8.64%로서 *L. gasseri* 91155는 뚜렷하게 세포 생존성을 증가시켰다.

H₂O₂는 농도 의존적으로 세포 성장, 유전자 발현 같은 세포 과정을 조정하거나 DNA 손상, 세포 사멸을 유도하고, 1 mM 이상이 되면 세포 독성이 커서 세포가 사멸한다(Cantoni *et al.*, 1989; Chandra *et al.*, 2000).

Jurkat T cell은 *L. gasseri* 91155와 함께 배양함으로써 H₂O₂에 의한 세포 독성으로부터 보호되어 생존성이 증가하였다. Wang 등(2003)은 산화적 손상으로부터 세포의 손상을 보호하기 위해서는 항산화 성분이 세포에 축적되기 위한 충분한 배양 시간이 필요하다고 하였다. 또한 세포의 생존성이 증가한 원인은 항산화 성분이 세포의 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase(GPX) 등과 같은 항산화 효소의 활성을 증가시켰기 때문이라고 보고하였다. 본 연구에서도 *L. gasseri* 91155의 H₂O₂에 의한 손상으로부터 Jurkat T cell의 생존성 증가 효과는 *L. gasseri* 91155 lysate 성분이 세포의 항산화 효소 활성을 증가시킨 것으로 사료되며 이에

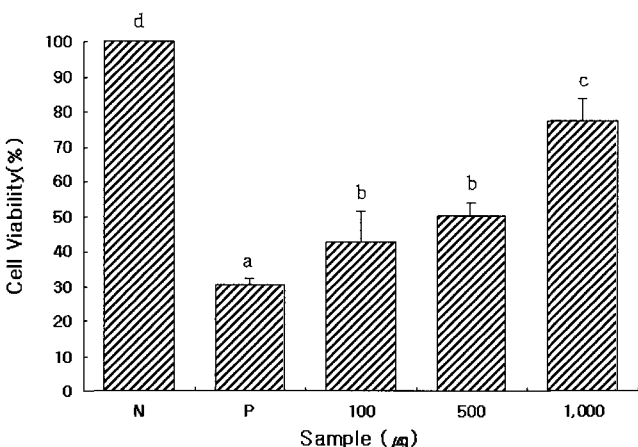


Fig. 4. Effect of *L. gasseri* KACC 91155 on Jurkat T cell viability against H₂O₂ induced oxidative stress. N: negative control(control cells), P: positive control (oxidized cells). a~d: Values not sharing common letters are significantly different(p<0.05).

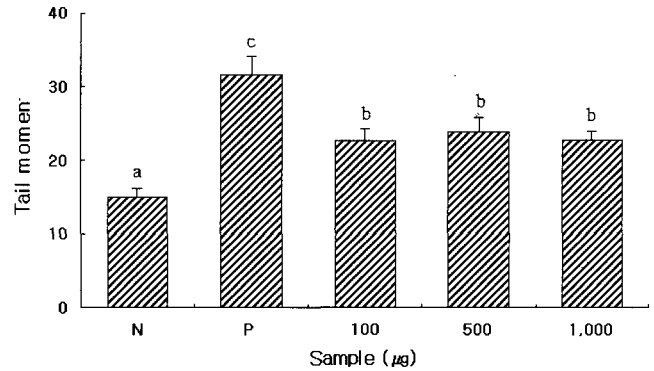


Fig. 5. Levels of DNA damage evaluated by comet assay in control and *L. gasseri* KACC 91155 supplemented cells. N: negative control(control cells), P: positive control (oxidized cells). a~d: Values not sharing common letters are significantly different(p<0.05).

대한 추가적인 실험이 요구된다.

DNA 손상 보호 효과

L. gasseri 91155의 DNA 손상 억제 효과를 조사하였다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 H₂O₂를 처리한 positive control의 TM 값 31.6에 비하여 *L. gasseri* 91155 lysate(100 µg protein) 첨가구는 22.6으로서 DNA 손상 보호 효과를 나타내었다.

DNA 손상은 세포의 산화적 상태와 항산화 방어 시스템의 유용한 bio marker로서 사용되고 있다(Riso *et al.*, 1999), 산화적 처리는 세포 DNA의 손상을 초래하며, 이 때 생성된 DNA break를 comet assay(Single-cell gel electrophoresis; 단 세포전기영동법)로서 측정할 수 있다(Duthie *et al.*, 1996).

Riso 등(2002)의 75 µM H₂O₂의 높은 농도에서 DNA 손상 증가하였다는 보고에서와 같이 H₂O₂에 노출에 의해 human cell은 세포 구성 성분에 손상을 받게 된다. 따라서 이를 제거하거나 중화시킬 수 있도록 세포의 능력을 증가시켜 주는 항산화제가 필요하다(Halliwell *et al.*, 2000). 항산화 유산균은 이와 같이 H₂O₂에 의한 DNA 손상을 줄여줌으로써 세포를 보호해 주는데 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 여겨진다.

요약

본 연구에서는 유아의 분변에서 분리한 항산화 효과를 갖는 유산균인 *Lactobacillus gasseri* KACC 91155의 Jurkat T cell line에서의 지질 과산화 억제 효과, 세포 보호 효과 및 DNA 손상 억제 효과를 측정하였다. 그 결과 *L. gasseri* 91155는 세포 산화에 의해 생성된 지질 과산화물인 MDA의 생성을 방지하였으며, 또한 뚜렷하게 세포 생존성을 증가시켰다. 그리고 산화적 손상으로부터 DNA 손상을 줄여주는 효과를 나타내었다.

참고문헌

1. Annuk, H., Shchepetova, J., Kullisaar, T., Songisepp, E., Zilmer, M., and Mikelsaar, M. (2003) Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 403-412.
2. Aruoma, O. I. (1996) Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radical Bio. Med.* **20**, 671-683.
3. Bonnes-Taourei, D., Guerin, M. C., and Torreilles, J. (1992) Is malondialdehyde a valuable indicator of lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 985-988.
4. Cantoni, O., Cattabeni, F., Stocchi, V., Meyn, R. E., Cerutti, P., and Murray, D. (1989) Hydrogen peroxide insult in cultures mammalian cells; relationship between DNA single-strand breakage, poly(ADP-ribose) metabolism, and cell killing. *Biochem. Biophys. Acta.* **1014**, 1-7.
5. Chandra, J., Samali, A., and Orrenius, S. (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 323-333.
6. Davies, K. J. A. (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium* No. 61. London. pp. 1-35.
7. Duthie, S. J., Ma, A., Ross, M. A., and Collins, A. R. (1996) Antioxidant supplementation decrease oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.* **56**, 1291-1295.
8. Erba, D., Riso, P., Criscuoli, F., and Testolin, G. (2003) Malondialdehyde production in Jurkat T cells subjected to oxidative stress. *Nutr.* **19**, 545-548.
9. Finkel, T. (2000) Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* **476**, 52-54.
10. Halliwell, B. (1991) Drug antioxidant effects: a basis for drug selection. *Drugs.* **42**, 569-605.
11. Halliwell, B. and Chirico, S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**, 715-724.
12. Halliwell, B., Clement, M. V., and Long, L. H. (2000) Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* **486**, 10-13.
13. Han, Y. T., Han, Z. W., Yu, G. Y., Wang, Y. J. Cui, R. Y. and Wang, C. B. (2004) Inhibitory effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on ultraviolet A-induced oxidative damage on human skin fibroblasts *in vitro*. *Pharmacol. Res.* **49**, 265-274.
14. Humpries, K. M. and Sweda, L. I. (1998). Selective inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochem.* **37**, 15835-15841.
15. Kim, H. S., Chae, H. S., Jeong, S. G., Ham, J. S., Im, S. K., Ahn, J. N., and Lee, J. M. (2005) Antioxidative activity of some yogurt starter cultures. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **18**, 255-258.
16. Konicova, E., Babusikova, O., Kusenda, J., and Glasova, M. (1992) Detection of cytoplasmatic and surface membrane markers in cells of some human hematopoietic cell lines. *Neoplasma.* **39**, 337-342.
17. Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., and Kilk, A. (2002) Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Intl. Food Microbiol.* **72**, 215-224.
18. Li, L. and Lau, B. H. (1993) A simplified *in vitro* model of oxidant injury using vascular endothelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **29**, 531-536.
19. Lin, M. Y. and Chang, F. J. (2000) Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive Disease Sci.* **45**, 1617-1622.
20. Riso, P., Erba, D., Criscuoli, F., and Testolin, G. (2002) Effect of green tea extract on DNA repair and oxidative damage due to H₂O₂ in Jurkat T cell. *Nurt. Res.* **22**, 1143-1150.
21. Riso, P., Santangelo, A., and Porrini, M. (1999) The comet assay for the evaluation of cell resistance to oxidative stress. *Nurt. Res.* **19**, 325-333.
22. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. (1998) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp. Cell. Res.* **175**, 184-191.
23. Tanaka, K. I., Fujita, N., and Yoshioka, M. (2001) Immunosuppressive and non-immunosuppressive immunophilin ligands improve H₂O₂-induced cell damage by increasing glutathione levels in NG108-15 cells. *Brain Res.* **889**, 225-228.
24. Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**, 11005-11028.
25. Uchida, K. (2000) Role of active aldehyde in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1685-1696.

26. Wang, L., Nishida, H., Ogawa, Y., and Konishi, T. (2003) Prevention of oxidative injury in PC12 cells by a traditional Chinese medicine, Shengmai San, as a model of an antioxidant-based composite formula. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1000-1004.
27. Xiao, X. O., Lee, N. T. K., Carlier, P. R., Pang, Y. P., and Han, Y. F. (2000) Bis(7)-tacrine-induced injury in rat pheochromocytoma cells: comparison with tacrine. *Neurosci. Lett.* **209**, 197-200.
-
- (2005. 10. 27. 접수 ; 2005. 12. 5. 채택)