

DSS로 유도된 염증성 장 질환 마우스 동물모델에서 생식이 장관 임파조직내 면역조절 기능에 미치는 영향

임병우^{1*} · 정용준¹ · 박미현² · 김종대³ · 황성주² · 유병필⁴

¹건국대학교 의료생명대학 생명과학부

²(주)이룸 생명과학연구원

³강원대학교 BT 특성화학부 대학

⁴미국 텍사스주립대학 건강과학센터

Immunoregulatory Effects of Saengshik on DSS-Induced Inflammatory Bowel Disease in Mouse Model System

Beong Ou Lim^{1*}, Yong Jun Jeong¹, Mi Hyoun Park², Jong Dai Kim³,
Sung Joo Hwang² and Byung Pal Yu⁴

¹Dept. of Life Science, College of Biomedical & Health Science, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea

²The Erom R&D Center, Seongam 468-828, Korea

³College of Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

⁴Dept. of Physiology, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA

Abstract

This study was conducted on the immunoregulatory effect of Saengshik on gut-associated lymphoid tissue with inflammatory bowel disease. Although the contents of IgA increased in mesenteric lymph node, IgE content was suppressed by Saengshik. The same results were found in spleen, but IgA and IgE responses were very weak. Concentration of fecal IgA was high from the first day through the third day in Saengshik group. In DSS+Saengshik group, concentration of IgA was high till the 2nd day and it maintained the highest level among the test groups on the 5th day. Concentration of IFN-gamma and IL-2 was the highest in the Saengshik group, but the concentration of TNF-alpha was lower in DSS+Saengshik compared to DSS. The expressions of STAT1 in Saengshik group were high, while those of STAT6 were low. According to these findings, Saengshik exhibited effectiveness via increasing the IgA production, suppressing the IgE production, followed by inhibiting the production of IL-4 and IL-10. Saengshik also strengthened the immune system and alleviated injury in DSS-induced inflammation.

Key words: Saengshik, inflammatory bowel disease, DSS, STAT1, STAT6, IFN-gamma, IL-4

서 론

장관계 질환은 생활습관병 중의 하나로서 계속 증가 추세에 있으며 발생율은 GNP와 상관관계를 가진다는 보고가 되어 있는 것처럼 사람들의 생활이 윤택해지면서 증가한다. 즉, 지방, 당분의 섭취, 동물성 단백질 섭취량의 증가, n-6/n-3 다가 불포화지방산 비율의 다량 섭취로 말미암아, 지방조직의 축적으로 인한 지방간의 발생, 장관계 질환의 발병율이 높아지는 것으로 보고되고 있다(1,2). 이러한 질병들의 예방책으로 강한 알러지 원인임과 동시에 다가 불포화지방산 성분인 치즈, 버터 등의 서양식품 등의 섭취를 줄이고, 항염증 성분인 식이섬유(3), 어유(4), flavonoid(5) 등의 성분이 들어간 식품의 섭취가 그 예방책으로 연구되고 있다.

그중 장관계 질환의 발병요인으로 고지방, 서양식을 주로 하는 식사습관이 장내의 *Bifidobacterium* 등의 혐기성균과 *Lactobacillus*의 감소를 일으켜 장내 세균을 변화(4)시키는 것을 그 하나로 보고 있다(6-8).

장관계 질환은 gut-associated lymphoid tissue(GALT)와 아주 밀접한 관련이 있다. GALT는 미생물과 식이 항원을 포함한 외부 항원들에 대한 점막 장벽의 주요 구성요소이다(9,10). 장관에는 여러 가지 임파계의 염증세포가 모여 있어서 소화관에서 보내진 막대한 항원 자극에 응답하고 있다. 즉 장점막에서는 다른 장기와는 틀려 항상 염증이 생기며, 이것은 넓은 의미에는 "controlled inflammation"으로서 알려져 있다. 이것을 엄밀히 제어하고 있는 것이 GALT이며 peyer patch, mesenteric lymph node, epithelial cell, lamina

*Corresponding author. E-mail: beongou@kku.ac.kr
Phone: 82-43-840-3570, Fax: 82-43-851-4169

propia cell 등으로 되어있다. 정상적인 환경에서는 점막의 면역학적 tolerance(관용)가 장관내의 세균 그리고 식이 항원들에 대하여 항상 유도되지만, 어떤 경우에는 이들의 기능이 break down되어 장관 내 환경적인 인자에 대하여 과잉 유도되어 면역 응답을 아주 민감하게 만든다. 식이 항원과 미생물에 매일 접촉하고 있는 소화관에는 수많은 면역학적 무질서로 발생하는 염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD)과 같은 난치성 질환이 장관 조직에 나타난다. 최근, 많은 연구들이 장관 조직에 있어서 그들의 기능장애에 있어서 분자와 세포학적 작용기전을 규명하여 왔으며, 장관 면역계 질환이 식이요인에 깊은 관련이 있는데에도 불구하고 GALT에 있어서 생식(Saengshik)이 미치는 면역조절에 관한 연구는 국내는 거의 전무한 상태이다.

염증성 장질환은 크론병(Crohn's disease, CD)과 궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC)으로 나누어진다. 이들은 면역학적으로 염증에 대한 다양한 특성들을 보이고 있다. 궤양성 대장염과 크론병의 발달과 연구에 있어서 면역시스템이 중요한 역할을 한다. 인간의 연구에서는 손상된 장관 점막기능 선천적 면역성, cytokine의 생성, CD4⁺의 활성화 등이 염증성 장질환의 병인에 포함된다. 염증성 장질환의 발병과 연구화에 있어서 cytokine의 역할에 대한 증거는 명확하다. 최근 proinflammatory cytokine의 생성에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 염증부위에서 tumor necrosis factor(TNF- α), interleukin(IL)-1, IL-6, IL-8 생성이 궤양성 대장염과 크론병환자에게서 현저하게 증가되었다(11). 환자들에게서 cytokine의 생산 조절에 대한 연구는 이들 질병에 있어서 병리생리학적으로 매우 중요함을 보여준다. 선행연구에서 수용성 식이섬유가 장관 면역계에 대한 조절 기능이 있음을 처음으로 보고하였다(1-5). 이것은 식이섬유소의 생리학적 및 약리학적 효과에 대한 관심을 증가시키며 MLN 임파구에서 immunoglobulin 생성을 조절하고, 항알러지 작용을 가지고 있으며 이들 결과는 식이 pectin의 효능은 Th1 세포의 기능을 통해 일어난다고 할 수 있다(5-7). 최근 많은 연구에서 수용성 식이섬유소가 장의 구조와 기능에 있어 중요한 기질로서의 역할에 대한 인식이 증가되고 있다(1,6,8)

생식의 주요 성분인 탄수화물에는 소화성과 난소화성이 있는데 대표적인 소화성 다당류에는 전분이 있고, cellulose 등의 식물섬유나 일부의 올리고당은 소화되기 어렵고 칼로리원으로는 되기 어렵지만 다채로운 생리활성을 가지고 있다. 그 중에 식이섬유는 소화관에 미치는 효과에 있어서는 두 가지의 메카니즘이 보고되고 있다(12). 처음은 장내세균에 의한 식이섬유의 분해에 의해 미생물의 성장을 자극(13), 두 번째는 소화되지 않고 남은 식이섬유가 장관내에서 수분을 정체시키는 것이다(14). 그 결과, 배변량의 증가, 배변통과시간의 영향, 소화흡수의 영향, 양이온 변환능력 등에 영향을 미치므로 소화관내 주요한 생리 및 약리적 효과가 있다고 보고되었다(15-17). 이러한 생리활성으로 비만, 당뇨병,

허혈성심장병, 고지혈증, 대장질환 등에 유효하다는 많은 연구가 진행되어 있다. 특히, 과거의 IBD(특히, UC)의 식사에는 저식이섬유식(low-dietary fiber diet)이 습관적으로 사용되었다. 그것은 식이섬유의 대장점막에 대한 기계적인 자극에 의해 장해가 될 수 있다고 생각했기 때문이다(18). 그러나, 최근에는 IBD에 있어서 저식이섬유식보다 고식이섬유식이 질환의 재발을 감소시킨다고 보고되어 있다(19,20). 대표적인 임상실험 결과로서(21-23) UC환자에 대해 실시한 여러 가지 식이섬유의 유효성을 확인한 대장내시경 검사와 Hallert 등이 UC환자에 ispaghula husk(식물성 섬유질의 일종)를 4개월간 투여하면서 나타난 특히 설사와 변비 등의 배변이상에 대한 유의적인 증상개선에 관한 보고가 있다(18).

이와 같이 장관에서 면역학적 무질서로 발생하는 장관계 질환과 같은 난치성 질환은 생활습관병 중의 하나로서 식이요인이 매우 크게 작용한다고 할 수 있다. 그러나 생식에 대한 장관 조직 내에서의 면역활성에 대한 연구는 국내는 물론 국외적으로 미비한 상태이다. 본 연구의 목적은 dextran sulfate sodium(DSS)으로 유발된 대장염 동물모델에서 생식이 장관 내 면역조절에 미치는 영향에 대해 평가해 보고자 한다. 이를 위해 DSS로 대장염을 유발시킨 후, MLN, spleen 그리고 임파구의 Ig 생산, cytokine의 생성, T 세포 집단, 신호전달 그리고 분변 IgA 등의 생성에 대해 정상식이와 비교하여 생식의 효능을 검토했다. 마우스에게 DSS를 경구투여시켜 유발한 대장염 동물모델은 사람의 궤양성 대장염 증상과 비슷하며, 사람에게 있어 염증성 장질환의 병적 증상을 잘 나타내어 준다. 그러므로 본 연구에서는 이러한 동물 모델을 통해 사람의 염증성 장질환에 미치는 생식의 효과에 관한 간접적인 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

재료

ConcanavalinA(ConA), lipopolysaccharides(LPS), dextran sulfate sodium(DSS)은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Hemoglobin 측정시약 Hemo-S는 영동 제약 주식회사에서 구입하였다. ConA는 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)에 녹였다. Monoclonal antibodies와 cytokines은 ID Labs Inc.(Ontario, Canada)에서 구입하였다. IgA와 관련된 항체는 Zymed Laboratories Inc.에서 구입하고 IgE와 관련된 항체들은 Biosource International(Comarillo, CA)에서 구입하였다. Mouse의 IgE와 IgA를 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 위해 PBS에 0.05% Tween 20을 첨가한 용액(PBST)으로 세척을 하고, Block ace(Dainihon Pharmaceutical Co., Osaka)를 이용하여 비특이적 결합 저해 및 항체를 희석하였다. STAT1(Cell signaing Co., USA)와 STAT6(Santa Cruz Biotechnology Inc., California), 그리고 Caspase3은 Caspase assay

kit(Pharmingen)를 사용하여 측정하였다. 기타 다른 시약은 Sigma에서 구입을 하거나 실험실에 비치된 것을 사용하였다.

생식 식이

생식의 주요 조성물로는 brown rice, sprouted brown rice, Job's tear, Blasesame, barley, Alariaciae, carrot, pumpkin, kale, Brudock, *Lentinus edodes*, *Angelica utilis*, water dropwort, Spirulina, yeast, sorghum, glutinous millet, soybean, glutinous rice, laver, sea tangle, radish leaves, pine needle, mugwort, *Ganoderma lucidum*, cabbage, Lactobacilli, fructooligosaccharide 등으로 구성되어 있다. 실험에서 사용된 생식은 (주)이룸에서 제공받아 사용하였으며 조성물과 영양성분 구성은 Kang 등(21)의 연구 논문에서 조사되었다.

금성게양 유발 방법

마시는 물에 5%의 DSS를 첨가하여 섭취시킴으로써 대장염을 유발시켰다. Normal군은 DSS를 함유하지 않은 물을 섭취시켰다.

실험방법 및 식이조성

4주령의 Balb/c female을 Samtaco Bio Korea(Osan, Korea)로부터 구입했다. 모든 동물 관리 방법은 institutional animal care에서 정한 규정에 따랐다. 마우스를 12시간 동안 dark-light cycle에 적응을 시키고, 25±2°C로 조절된 상태에서 nonpurified한 pellet과 음용수를 자유 섭취시켰으며, 실험 시작전 7일간의 적응기를 가졌다. 마우스에게 Table 1의 normal과 각 군당 8마리씩 4군으로 나누었다. 각 군은 다음과 같다.

- 1) Normal group - DSS를 함유하지 않은 water를 5일간 섭취시켰으며 5일 후; AIN-93G 식이를 2주간 자유섭취시킨다.
- 2) DSS group - 5일간 DSS를 섭취시킴으로써 급성 대장염을 유발시킨 후, 2주간 음용수와 AIN-93G 식이를 자유 섭취시켰다.
- 3) 생식 group - 이 군은 Table 1의 식이와 DSS

를 함유하지 않은 음용수를 5일간 섭취시킨 후, AIN-93G 식이조성 중 corn starch 함량 대신 생식을 첨가한 식이를 2주간 같은 방법으로 섭취시켰다. 4) DSS+생식 group - 5%의 DSS가 함유된 물을 5일간 섭취시켜 급성 대장염을 유발시킨 후, AIN-93G 식이의 corn starch 함량 대신 생식을 첨가한 식이를 2주간 섭취시켰다(24).

혈액채취 및 장기무게 측정

사육기간이 끝난 실험동물을 경추탈골시킨 후 회복하여, 안와 정맥에서 혈액을 채취하고 혈중 hemoglobulin을 측정하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분 정도 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 얻은 후, -70°C에서 냉동 보관하였고, 혈액 채취 직후 장의 길이, 간, 신장, 비장, 폐를 분리하여 생리식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거한 뒤 무게를 잰 후 -70°C에 냉동 보관하였다.

임파구의 분리 및 정제

Balb/c 마우스의 mesenteric lymph node(MLN)를 적출하고 임파구는 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배지(Invitrogen Corporation, Grand island, N.Y.) 내에서 분리하며 세포는 RPMI 1640 배지로 3번 세척했다. 임파구는 10% fetal bovine serum(FBS)(Invitrogen Corporation, Grand island, N.Y.)이 함유된 RPMI 1640 배지로 배양하고, 배양한 상층액에서의 IgE와 IgA 함량은 ELISA로 (1,2,5,13-15) 측정하였다. 세포생존률은 trypan blue staining으로 측정하였으며 이 방법에 의한 세포생존률은 95% 이상이였다.

효소 항체법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용한 마우스 항체 측정

총 항체량의 측정으로는 항체의 F(ab)²단편을, 항원 특이적 정량법으로서는 항원을 ELISA plate에 고정된 다음, 혈청 또는 배양상청(supernatant) 등의 시료를 반응시켰다. 항체는 ELISA plate 표면에 비특이적으로 결합하는 경향이

Table 1. Diet composition

(g/kg diet)

Diet composition	Group ¹⁾			
	Normal	DSS	Saengshik	DSS+Saengshik
Casein	200	200	200	200
DL-methionine	3	3	3	3
Cornstrach	150	150	Saengshik 150	Saengshik 150
Sucrose	500	500	500	500
Cellulose	50	50	50	50
Corn oil	50	50	50	50
Mineral mix	35	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10	10
Choline bitartrate	2	2	2	2

¹⁾Normal: Normal was fed the AIN-93G diet and drinking water without DSS for 5 days. After 5 days, it orally treated with water for 2 weeks only. DSS: Acute colitis was induced by feeding mice for 5 days with DSS. After 5 days of DSS, when mice returned to drinking plain water, the mice were treated with water only for 2 week. Saengshik: This group was fed AIN-93G diet and drinking water without DSS for 5 days. Diet containing Saengshik given for 2 weeks. DSS+Saengshik: Acute colitis was induced by feeding mice for 5 days with 5% DSS. After 5 days of DSS, when mice returned to drinking plain water, the mice were given Saengshik for 2 weeks.

있기 때문에, 고정항체와 또는 항원을 고정시킨 후 단백질용액으로 처리하는 blocking조작을 하였다. 다음으로 고정항체 또는 항원에 결합한 항체에 효소 표식한 anti항체를 결합시켜, 기질용액을 첨가하여 발색시킨다. 존재량이 많은 IgA의 항체는 이 직접법으로 쉽게 정량하였다. 존재량이 적은 IgE로는 검출감도를 높일 필요가 있기 때문에 avidin-biotin법을 사용해 ELISA법으로 검출했다. 이것은 biotin 표식항체에 avidin 표식항체를 결합시키는 것이기 때문에 한 번의 조작이 더 늘지만 항체에 각각의 효소 결합량을 늘이기 때문에 검출감도를 높였다(22).

Cytokine의 함량 측정

Anti-mouse cytokine(IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4 and IL-10)의 항체를 coat한 96 well plate에 임파구의 배양상청을 50 μ L씩을 첨가하여, 2차 항체에 biotin화시킨 anti-cytokine 등의 각 항체를 반응시켰다. 1시간 동안 37°C에서 배양한 후 peroxidase 혹은 streptavidin 등을 결합시킨 각 substrate를 100 μ L 첨가한 후 1시간 실온에서 배양했다. 각 스텝은 0.05% Tween 20 in PBS(TPBS)로 세척하며 마지막으로 1.5% oxalic 산을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 동일한 과정을 통하여 purified cytokine을 표준으로 정한 후 비교 정량했다(25).

세포활성화에 따른 유전자 발현 변이 분석

임파구의 활성 조절 시 나타나는 유전자 발현의 차이를 알아보기 위하여, 다양한 lectin들로 처리한 세포로부터 RNA를 분리하고, TNF- α , IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-18 등의 알려진 염증유발 유전자는 RT-PCR 방법을 통해 발현 정도를 조사했다.

CD4⁺와 CD8⁺의 측정 방법

10% FBS를 함유한 PBS 100 mL당 1×10^6 cell이 부유된 MLN 임파구에 CD4⁺-Fluorescein isothiocyanate나 CD8⁺-Phycoerythrin monoclonal antibodies 5 μ L를 첨가하고, 4°C에서 30분간 배양하였다. 임파구는 10% FBS가 함유된 PBS로 3번 세정하고, 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 염색된 임파구는 2% paraformaldehyde로 고정시켰으며, Epics Altra™ flow cytometry(Beckman Coulter)로 측정하였다.

특정 유전자 발현 변이와 관련된 세포신호전달 과정 연구

2×10^6 cells/well MLN 세포를 24 well plate에 조정하여 24시간 배양한 후 single-detergent lysis buffer(50 mM Tris-HCL, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 1% Nondet P-40, 1 μ g/mL aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 첨가한 후 sonication으로 잘 혼합시킨 후에 반응시킨다. 단백질 정량은 BCA protein assay reagent kit(Pierce, Rockford, IL)를 사용하여 결정하였다. 각 시료의 단백질 양을 동일하게 하고 12% SDS PAGE로 전개

시키고 protran nitrocellulose transfer membrane(Schleicher & Schuell, Hanover, Germany)를 사용하여 transfer했다. Membrane을 5% Tween 20 Tris-buffer에 Skim milk로 block하고 일차항체로 배양한 후 HRP-conjugated secondary antibody(anti-rabbit IgG, Pierce)로 반응시킨다. ECL 용액(Amersham Pharmacia biotech, Piscataway, NJ)을 섞어 membrane에 끌고루 용액을 뿌린 후 1분간 반응시킨 후 현상했다. 일차 antibody는 rabbit polyclonal antiphosphorylated Tyr 701 of human or mouse STAT1 and 6(Cell signalling Technology, Beverly, MA)를 사용했다(26).

분변 중의 IgA 함량 측정

0일부터 14일까지 각 군의 마우스마다 분변을 채취하여 모은 것을 -80°C에 저장하였다. 모아진 분변 샘플은 Fukushima 등의 방법(27)에 의해 실험하였다. 각각 마이크로 원심튜브에 담긴 분변 pellet은 4°C에서 1시간 동안 방치한 protease inhibitor(0.1 g/mL)에 부유시켰다. 부유시킨 분변 pellet은 vortex로 균질화 하여 15,000 \times g에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 채취하여 IgA antibody를 측정하기 전까지 -80°C에 저장하였다.

통계처리

자료분석에서 유의적인 차이는 Duncan's new multiple range test를 사용하여 나타내었다(28).

결과 및 고찰

증식인자 및 식이섭취량

마우스의 체중은(시작체중 16.8 \pm 0.2) DSS군(17.0 \pm 0.3)이 normal군, 생식군, DSS+생식군의 경우보다(18.5 \pm 0.3, 19.5 \pm 0.7, 18.4 \pm 0.3) 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). 군간의 식이섭취량은 유사하였지만 DSS군은 다른 군간의 차이점은 유의성을 나타내었다($p < 0.05$).

DSS에 의해 유도된 염증성 장질환 모델

5% DSS를 음용수에 섞어서 마우스에 투여한 결과, 3, 4일째에 먹는 물의 양이 현저히 감소하였고 외관상 피모가 거칠어졌으며 체중감소, loose stool 및 bloody diarrhea가 관찰되었는데 위의 현상은 4일 이후에 급격히 심화되어 5일째에는 연변 또는 혈변 및 체중감소가 유의하게 나타났다(Fig. 1).

Hemoglobin 농도

DSS 유발 후 hemoglobin 수치는 normal군에 비하여 유의하게 저하되었다. 그러나, 생식섭취로 인하여 hemoglobin 수치가 정상군에 가까워진 수치를 나타냈다(Table 2).

장기무게

염증성 장질환 유발 후 각 군의 장기 상태를 측정된 결과 장의 길이는 DSS+생식>생식>normal>DSS이었고(Table 3), 비장 무게는 DSS>생식 \geq DSS+생식>normal 순이었

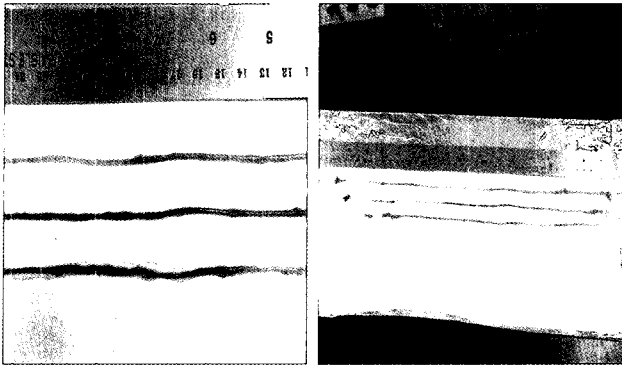


Fig. 1. The changes in the length of intestine in DSS-treated mice.
 Photographs of dissected intestine of Saengshik diet fed mice (top), a control mice treated with DSS+Saengshik diet (second row), and mice fed 5% DSS (third).

다. 간의 무게는 생식>normal>DSS+생식≥DSS이며, 폐의 무게는 DSS+생식>normal>생식>DSS로 측정되었지만, 유의한 차이는 없었다.

혈청, 분변 및 MLN과 spleen 중의 항체 농도
 DSS 유발한 군에서의 혈청 IgA 농도는 다른 군보다 가장

Table 2. Hemoglobin concentrations of mice (g/100 mL)

Group ¹⁾	Hemoglobin
Normal	3.18±0.85 ^{2)a3)}
DSS	1.12±0.11 ^b
Saengshik	2.79±0.69 ^{ab}
DSS+Saengshik	2.58±0.10 ^{ab}

¹⁾Groups are the same as in Table 1.

²⁾Data are means±SE of 8 mice.

³⁾Values without the same superscript letters are significantly different at p<0.05.

낮게 나타났다. DSS+생식군은 DSS군보다 높은 수치를 나타냈으나 유의한 차이는 보이지 않았으며 혈청 IgE 농도는 시험한 군과 관계없이 유의한 차이는 없었다(Fig. 2). 분변 IgA 농도를 측정하기 위하여 5일 동안 마우스에게 DSS를 섭취시켜 급성 대장염을 유발시킨 후(Fig. 3), 질병 치료기간인 14일 동안 mice의 분변을 채취하여 분변 중의 IgA concentration을 측정하였다. DSS군의 IgA level은 DSS로 대장염을 유발시킨 후 2일째에 증가하였고 4일째에 다시 저하되어 낮은 레벨을 유지하였다. Normal군은 4일째 증가하고 6일째부터 계속 300 ng/mL 정도의 정상레벨을 유지했다. 생식군은 1일째부터 3일째까지 높은 레벨을 나타냈고 4일째

Table 3. The change of organ weight in each group

Group ¹⁾ \ Tissues	Intestinal length (cm)	Spleen	Thymus	Liver	Lung
Normal	38.2±2.0 ^{2)a3)}	0.07±0.01 ^a	0.04±0.01 ^{ns4)}	0.77±0.09 ^a	0.13±0.02 ^{ns}
DSS	36.6±0.8 ^b	0.15±0.13 ^b	0.05±0.05	0.69±0.15 ^b	0.10±0.01
Saengshik	38.8±2.0 ^a	0.10±0.04 ^a	0.03±0.01	0.81±0.10 ^a	0.12±0.02
DSS+Saengshik	39.0±1.6 ^a	0.09±0.04 ^a	0.07±0.07	0.68±0.14 ^b	0.14±0.07

¹⁾Groups are the same as in Table 1.

²⁾Data are means±SE of 8 mice.

³⁾Values without the same column superscript letters are significantly different at p<0.05.

⁴⁾ns: not significant.

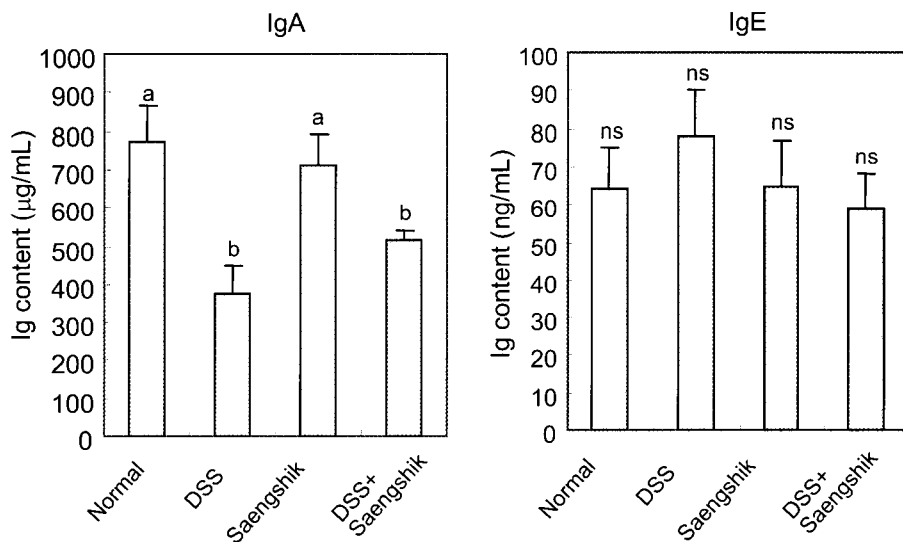


Fig. 2. Effect of Saengshik on Ig contents in serum of mice after DSS-induced colitis.

Groups are the same as in Table 1.

Each value is the mean±SE of 5 mice. ^{a,b}Values with the different superscript letters are significantly different at p<0.05.

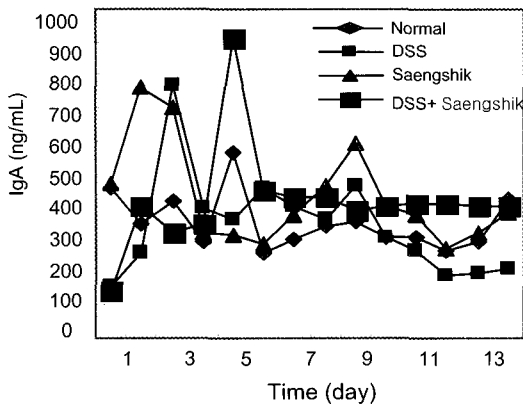


Fig. 3. Effect of Saengshik on IgA contents in feces of mice after DSS-induced colitis. Groups are the same as in Table 1.

부터 normal군과 거의 유사한 경향으로 유지해 갔다. DSS + 생식군에서는 2일째 높은 레벨을 나타내었고 다시 5일째 시험군 중에서 가장 높은 레벨을 나타냈다. 그리고, 6일째부터 400 ng/mL의 농도로 계속 유지해 갔다. 또한 MLN과 spleen의 항체 농도의 측정 결과, 먼저 MLN의 경우, ConA로 처리하지 않은 경우, MLN 임파구를 24시간 배양한 후에 측정 IgA 농도는 normal군보다 생식을 섭취시킨 군에서 더 높게 나타났다(Fig. 4A). 또한, DSS군이 normal, 생식 및 DSS + 생식군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. ConA로 처리한 경우, normal과 생식을 섭취시킨 군에서 IgA의 함량이 증가하였고, 그 수치는 ConA로 처리하지 않은 것보다 현저히 높게 나타났다. DSS + 생식을 섭취시킨 군에서 IgA 함량은 DSS군보다 높았다. 반면에 DSS군의 MLN 임파구에서 측정된 IgE 함량은 ConA로 처리하지 않았을 경우

DSS + 생식을 섭취시킨 군보다 높게 나타났다(Fig. 4B). ConA를 첨가하여 배양하였을 경우에도 이와 비슷한 경향을 나타내었다. Spleen의 경우에는 ConA로 처리하지 않은 경우에 DSS군에서 IgA 농도가 가장 낮게 나타났으며 다른 군간에서는 유의한 차이는 없었다. ConA를 첨가했을 경우에도 동일한 경향을 나타냈다(Fig. 5A, B). 반면에 IgE 함량의 경우에는 DSS군에서의 IgE 농도가 가장 높았으며 다른 군간의 유의한 차이는 없었다.

식이섬유질의 type은 장내에서 생성된 short-chain fatty acids(SCFA)의 합성에 영향을 준다. 수용성 섬유소들은 acetic acid와 소량의 butyric acid로 발효된다(29-31). 게다가, 식이 pectin은 장관 시스템에서 T cell의 수를 증가시키고 이는 식이섬유질이 면역기능 조절에 미치는 영향에 관한 메커니즘에 대한 설명을 가능하게 한다(29,30). DSS로 유발된 대장염에서 식이 생식은 normal군과 비교하여 immunoglobulin 생성에 미치는 효과에 대해 유의성을 나타내었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 DSS로 대장염을 유발시킨 후 생식을 섭취시킨 군에서 분변 IgA 함량과 MLN 임파구의 IgA 생성이 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 4).

임상 질환의 동물 모델에 있어서 IgA 함량 증가는 장점막 보호를 조절하는 항체로서 작용한다(32). 또한, 생식군에서 IgE 생성은 유의적으로 낮게 나타났으며, DSS로 대장염을 유발시킨 경우에서도 유사한 반응을 보였다. 이러한 효과들은 배양 배지에 ConA 첨가 여부에 대해서는 영향을 받지 않았다. 앞에서의 연구결과를 종합해볼 때, 생식이 DSS로 유발시킨 대장염에서 MLN 임파구의 IgA 생성을 증가시키는 것이 관찰되었다. IgA는 allergen의 흡수를 방해하여 알레르기 반응 예방에 중요한 역할을 하므로 이러한 효과들은 생식의 알레르기 과민증상에 대한 치료 효과제로서의 그 가

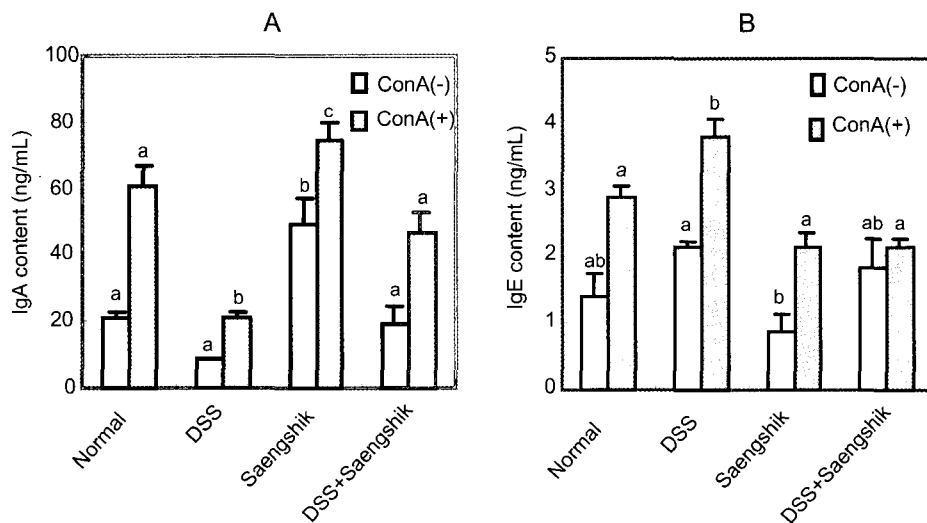


Fig. 4. Immunoglobulin A and E production mesenteric lymph node lymphocytes of mice fed on Saengshik. MLN isolated from mice fed on Saengshik (2×10^6 cell/mL) were cultured for 48 hr in the absence (white bars) and presence (black bars) of 25 mg/L of concanavalin A (ConA). The Ig contents of culture supernatants were measured by ELISA. Groups are the same as in Table 1. The results are the means \pm SE (n=8). ^{a-c}Values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$.

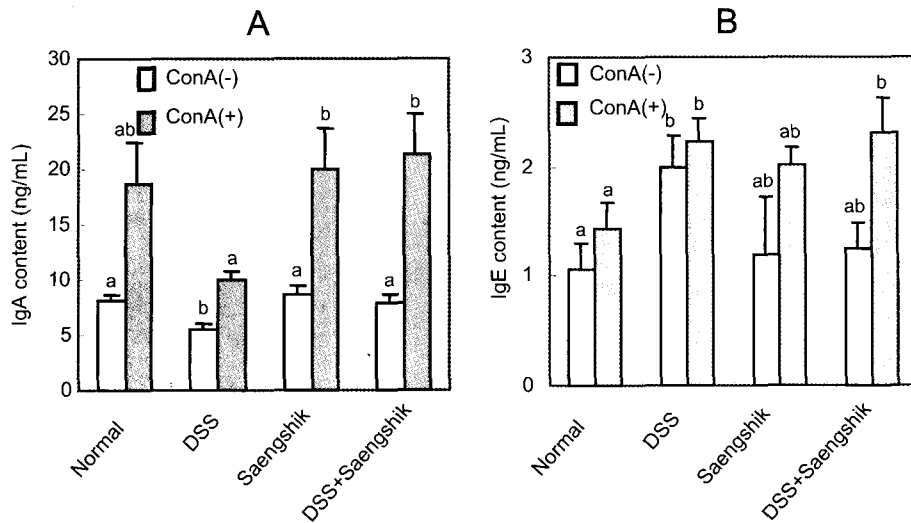


Fig. 5. Immunoglobulin A and E production in spleen lymphocytes of mice fed on Saengshik. Spleen isolated from mice fed on Saengshik (2×10^6 cell/mL) were cultured for 48 hr in the absence (white bars) and presence (black bars) of 25 mg/L of concanavalin A (ConA). The Ig contents of culture supernatants were measured by ELISA. Groups are the same as in Table 1. The results are the means \pm SE (n=8). ^{ab}Values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$.

능성이 기대된다.

MLN의 CD4⁺와 CD8⁺ 분석

MLN 임파구에서 CD4⁺와 CD8⁺ T세포의 비율을 Ig 함량의 변화와 관련하여 측정하였다(Table 4, Fig. 6). DSS로 대장염을 유발시킨 군이 normal군과 생식만을 섭취시킨 군들과 비교하여 보았을 때 CD4⁺ T 세포가 유의적으로 증가하였다. 한편 CD8⁺ T 세포는 생식군보다 normal군에서 약간 높게 나타났다. 그러나, normal군과 DSS+생식을 섭취시킨 군에서 CD8⁺의 비율은 거의 차이가 없었다. 따라서, CD4⁺/CD8⁺의 비율은 다른 군들보다 normal군에서 낮게 나타났다. 식이 생식의 섭취로 helper T 세포에 의해 유발된 면역반응에 대한 조절이 가능하다(33). 생식의 주요성분인 탄수화물에 있어서 식이섬유질은 MLN 임파구에서 CD4와 CD8의 비율을 변화시킨다(1). CD8⁺ T 세포는 IFN- γ 나 다른 조절 cytokine의 생산에 의해 CD4⁺ T 세포의 발달을 조절하고 Th2 세포의 발달을 억제한다. T 세포의 mitogen인 ConA를 사용할 경우, 식이 생식은 간접적으로 T 세포를 통한 면역조절 작용을 변화시킨다. 이번 연구에서 식이 생식은 MLN에서 CD4⁺와 CD8⁺ T 임파구의 비율을 증가시켰다. Table

4에서 보는 바와 같이 DSS로 대장염을 유발시킨 군에서 CD4⁺ T 세포의 수가 유의적으로 증가하였다. 흥미롭게도 DSS군과 normal군의 CD4⁺와 CD8⁺ 비율은 정상 수치로

Table 4. MLN T lymphocytes populations of mice in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice

Dietary group	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
Normal	54.2 \pm 0.4 ^a	13.2 \pm 0.4 ^a	3.9 \pm 0.1 ^a
DSS	60.0 \pm 0.4 ^b	14.0 \pm 0.3 ^{ab}	4.3 \pm 0.1 ^b
Saengshik	56.8 \pm 0.6 ^a	13.9 \pm 0.2 ^{ab}	4.7 \pm 0.1 ^c
DSS+Saengshik	62.1 \pm 0.3 ^b	14.6 \pm 0.5 ^b	4.1 \pm 0.1 ^{ab}

Groups are the same as in Table 1. Data are means \pm SE of 5 mice. ^{a-c}Values without the same superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

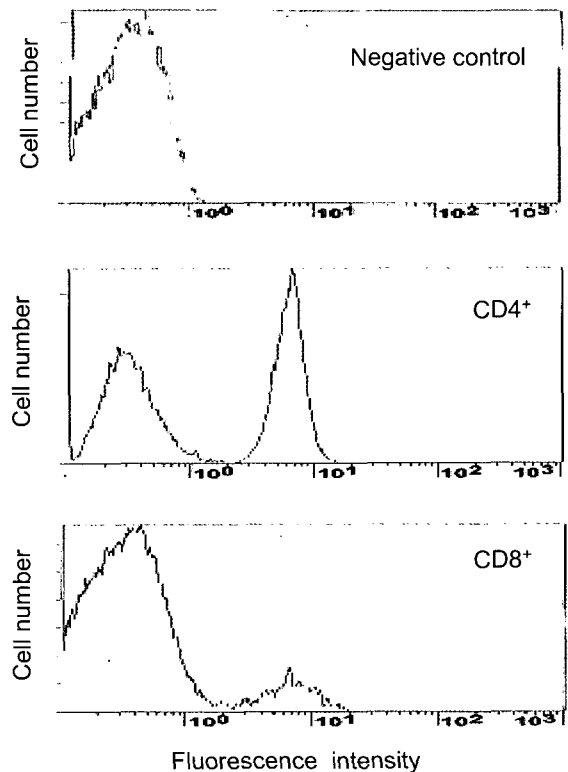


Fig. 6. Flow cytometer histograms on expression of CD4⁺ and CD8⁺ in MLN.

The MLN lymphocytes population of each primary culture supernatant were measured by EPICS Altra TM flowcytometry. Each value is the mean \pm SE (n=5).

두 군에서 유사하게 나타났고 이는 식이 생식에 의해 조절된 효과를 나타내준다. IgA와 IgE의 반응은 식이 생식이 DSS로 유발된 대장염에서 비정상적인 Th2 세포의 반응으로 인한 염증을 완화시킬 수 있다는 것을 증명하였다.

DSS에 의해 유도된 염증성 장 질환 모델의 spleen과 MLN에 있어서 cytokine mRNA 발현에 대한 RT-PCR 분석 및 MLN 임파구에 있어서 cytokine 정량

DSS에 의해 유도된 MLN의 IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4, IL-18의 발현량이 normal군보다 유의적으로 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 spleen에 있어서도 동일한 결과를 나타냈다(Fig. 7). MLN 임파구에서 ConA로 처리하지 않은 임파구를 24시간 동안 배양하였을 때 IFN- γ , IL-2, TNF- α 의 함량은 검출되지 않았다(Table 5). 그러나, ConA로 처리한 경우, IFN- γ 함량은 생식군에서 가장 높게 나타났으나, TNF- α 의 함량에서는 DSS+생식군에서의 TNF- α 함량 레벨이 DSS군보다 유의하게 낮게 나타났다. 따라서, DSS로 대장염을 유발시킨 군에서 생식군이 normal군이나 DSS+생식군보다 IFN- γ 생산량이 더 높게 나타났다. 그렇지만,

IL-2 생산량에 대해서는 유의하게 높게 나타났다. Th2 type cytokine에서는 ConA를 첨가한 경우, DSS로 대장염을 유발시킨 군에서 IL-4와 IL-10의 생산량이 유의적으로 증가하였다. 생식을 섭취시킨 군의 IL-4와 IL-10의 함량은 normal군과 차이는 없었다(Table 5). 흥미롭게도 DSS로 대장염을 유발시킨 군에서 생식을 섭취한 군은 다른 군들보다 IL-4와 IL-10의 생성량이 저하되었다. T-helper 세포는 그들이 생산하는 cytokine에 따라 조절기능을 하는 것과 효율성을 높이는 것으로 분류될 수 있다. Th1 임파구는 IFN- γ , IL-2, TNF- α 를 발현시키고, Th2 임파구는 IL-4와 IL-10을 생성한다. Th1 세포는 hypersensitivity, allograft, rejection, 자가면역질환에 관여하고 비정상적인 Th2 세포의 반응은 아토피성 질환에 영향을 준다. 궤양성 대장염의 장점막에서 생성되는 cytokine은 대부분 Th2 세포의 특징을 나타내고, 크론병의 경우엔 Th1 세포와 관련된 질병이다. Cytokine은 염증 및 면역반응 조절에 크나큰 영향을 주는 중요한 요인이다. IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10은 궤양성 대장염 및 크론병에 있어 염증의 시작, 조절, 기능에 있어 중요한 요인들이다

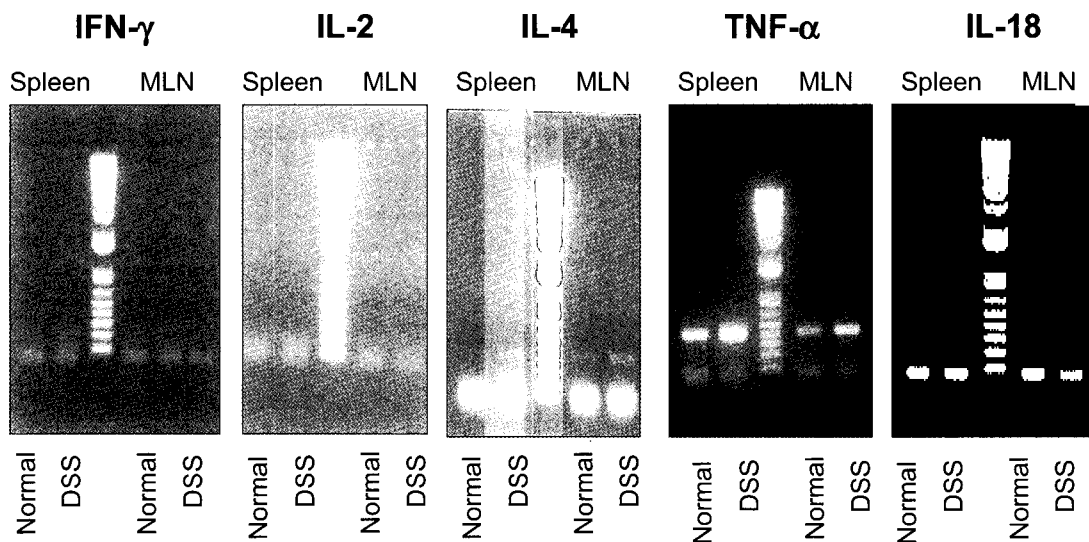


Fig. 7. RT-PCR analysis for cytokine mRNA expression in the spleen and MLN with DSS induced colitis. mRNA expressions of proinflammatory genes in spleen and MLN were measured by RT-PCR, as described in Material and Methods.

Table 5. Activation-induced Th1 and Th2 cytokine secretion of MLN lymphocytes in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice

Group	ConA	IFN- γ	IL-2	TNF- α	IL-4	IL-10
Normal	-	nd	nd	nd	nd	31 \pm 7 ^a
DSS	-	nd	nd	nd	nd	51 \pm 3 ^b
Saengshik	-	nd	nd	nd	nd	38 \pm 8 ^a
DSS+Saengshik	-	nd	nd	nd	nd	40 \pm 7 ^a
Normal	+	717 \pm 30 ^a	102 \pm 11 ^a	326 \pm 21 ^a	58 \pm 8 ^a	73 \pm 6 ^a
DSS	+	724 \pm 63 ^a	198 \pm 13 ^b	640 \pm 24 ^b	133 \pm 13 ^b	107 \pm 16 ^b
Saengshik	+	1088 \pm 101 ^b	141 \pm 20 ^a	252 \pm 40 ^a	52 \pm 12 ^a	77 \pm 8 ^{ab}
DSS+Saengshik	+	951 \pm 103 ^{ab}	148 \pm 19 ^a	414 \pm 21 ^c	81 \pm 8 ^a	54 \pm 9 ^a

Groups are the same as in Table 1.

Data are means \pm SE of 8 mice. ^{a-c}Values without the same superscript letter are significantly different at p<0.05.

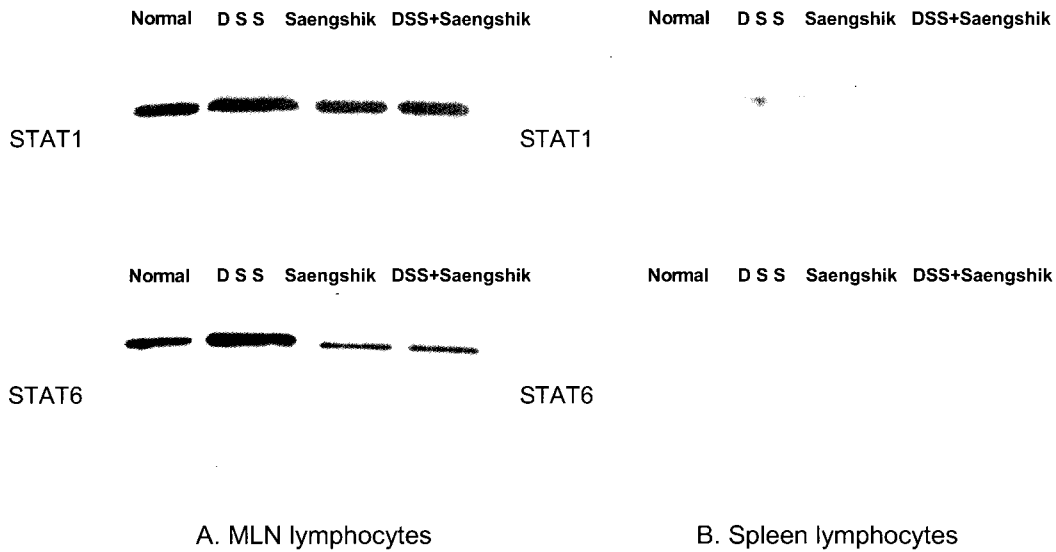


Fig. 8. Expression of STAT1 and STAT6 in MLN and spleen lymphocytes of mice fed on Saengshik. The cells were incubated 24 hr with medium, LPS (1 µg/mL). For the determination of intracellular STAT1 and STAT6 proteins, western immunoblot analysis was carried out as described in Material and Method. The data are from one respective experiment out of three. Groups are the same as in Table 1.

(34-38). 이번 연구에서는 생식성분이 DSS로 유발시킨 대장염에서 cellulose군보다 IFN- γ 의 함량을 증가시키고, IL-4와 IL-10의 함량은 감소시켰다. 또한, 증가된 Th1 세포의 cytokine과 감소된 Th2 cell의 cytokine의 결과를 통해, T-helper 세포가 생산하는 cytokine으로 염증을 유발시킨 후, 식이 생식을 통해 염증유발에 관련되는 cytokine의 생성 변환이 가능함을 증명하였다. 또한 이러한 연구 결과를 통해 DSS로 유발시킨 대장염에서 식이 생식을 통한 IL-4와 IL-10 등의 염증성 cytokine의 생성 억제가 면역시스템을 강화시키고, 손상된 염증을 완화시켜 줄 것으로 판단된다.

STAT와 caspase 3의 발현량

MLN과 spleen 임파구를 분리하여 24시간 배양 후 RT-PCR방법으로 STAT(Signal Transducer and Activator of Transcription)-1과 STAT-6의 발현량을 검토했다(Fig. 8). MLN의 경우, DSS로 염증성 반응을 유도시켰을 경우 STAT-1과 STAT-6의 발현량이 높은 것을 알 수 있었다(Fig. 8A). STAT-1의 경우 생식섭취로 인하여 DSS 유발군보다 발현량이 약간 낮은 경향을 나타냈다. 또한, STAT-6의 발현량을 분석했을 경우 normal군이 DSS군보다 생식, DSS+생식군에서 발현량이 유효하게 낮게 나타낸 것을 알 수 있다. Spleen의 경우를 검토하면 그룹별로 STAT-1의 발현량을 검토한 경우 DSS+생식군의 경우를 제외하고는 다른 군에서 발현량의 정도는 거의 동일하였다(Fig. 8B). STAT-6의 발현량은 DSS군보다 유의하게 낮은 발현량을 보였다. ConA를 첨가하여 배양한 경우에는 STAT-1의 발현은 DSS+생식군에서 가장 높게 나타났으며, STAT-6는 normal군에서는 발현되지 않았으며 다른 군에서는 거의

유사한 정도로 발현율을 나타냈다. Lipopolysaccharide (LPS)를 첨가한 경우에는 생식군과 DSS+생식군에서 발현이 되지 않았으며 STAT-6의 발현은 LPS로 자극했을 때 DSS군에서 유도된 것을 알 수 있었다. DSS+생식군에서는 이 발현 정도가 약하게 나타났다. Apoptosis의 최종 경로에 관련된 caspase-3에 대한 발현량에 대해서도 검토하였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다(data not shown). Jak-Stat pathway는 단지 몇 개의 신호 전달 인자만을 이용하여 세포막에서 세포핵에 직접적으로 신호를 전달하는 신호체계를 가지는 것이 그 특징이다. 따라서 많은 종류의 cytokine이 특정 유전자에 대해 빠른 전사적 변화를 유도하는 한 방법으로 이 pathway가 유력시 되고 있다(39,40). 즉 활성화된 Jak kinases가 직접적으로 전사인자의 tyrosine 잔기를 인산화 시켜서 전사 촉진을 유도하는 것이 대표적인 예이다(41). 이러한 전사인자로서 대표적인 단백질이 STAT이다. STAT 단백질에는 7개의 서로 다른 iso-form이 존재한다고 보고되고 있다(STAT-1,2,3,4,5,6). 이 중에 STAT-1과 STAT-6는 마우스에 있어서 IFN- γ 와 IL-4에 의해 발현되는 생물학적 활성에 필수적 역할을 한다. 본 연구에서 생식이 MLN 임파구에 대한 STAT-6의 발현 억제효과가 있음이 관찰되어, 생식에 의해서 STAT-6에 의한 IL-4 전사활동을 저해작용이 있음을 확인하였다. 이 결과는 MLN의 임파구에서 cytokine을 정량한 결과와 같은 경향을 보이는 것이다. 즉 Th2 세포에 의해 생성되는 cytokine이 억제됨으로, IL-4와 IL-10의 신호체계가 저해되고, 케양성 대장염의 장점막에 관련된 염증이 억제될 수 있음을 알 수 있다. STAT-1의 전사인자는 Th1의 분화와 IFN- γ 조절에 관여한다. 따라서, 본 연구에서는 생식이 IFN- γ 의 활성화에 필수적인

STAT-1의 발현에 대한 증가효과를 보여주어, CD4⁺ T 세포에 있어서 IFN- γ 생산의 증가를 통한 IgE 억제 효능이 있음을 보여 주었다.

요 약

본 연구의 목적은 DSS로 유발시킨 대장염 동물모델에서 생식섭취가 장관 내 면역조절에 미치는 영향에 대하여 검토해보고자 했다. 그 결과, 생식섭취가 DSS로 유발시킨 대장염에서 normal군보다 IFN- γ 의 함량을 증가시키고, IL-4와 IL-10의 함량은 감소시킴이 관찰되었다. 또한, 증가된 Th1 세포의 cytokine과 감소된 Th2 세포의 cytokine은 염증이 유발된 후, 생식을 통한 치료로써 변환시킬 수 있음을 증명하였다. 이러한 연구 결과를 볼 때 DSS로 유발시킨 대장염에서 생식섭취를 통한 치료는 IL-4와 IL-10과 같은 염증성 cytokine의 억제기능을 통하여 면역시스템을 강화시키고, 손상된 염증을 완화시켜 줄 것으로 판단된다. 생식의 면역조절에 관한 자세한 기전은 아직 밝혀져 있지 않지만, 염증성 장질환에서 생식섭취가 면역학적 역할에 대한 새로운 양상들에 대한 연구가 더욱더 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 (주)이룸의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N. 1996. Epidemiologic analysis of Crohn's disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn's disease in Japan. *Am J Clin Nutr* 63: 741-745.
- Song MK, Hong SG, Hwang SJ, Park OJ, Park MH. 2003. Improve effects of Saengshik on patients with fatty liver and hyperlipidemia in murine. *Korean J Nutr* 36: 834-840.
- Lim BO, Yamada K, Nonaka M, Kuramoto Y, Hung P, Sugano M. 1997. Dietary fibers modulate indices of intestinal immune function in rats. *J Nutr* 127: 663-667.
- Lim BO, Choue RW, Park DK, Kim HC, Kim SY, Yamada K, Sugano M. 2002. Effect of dietary level of pectin on immunoglobulin and cytokine production by mesenteric lymph node lymphocytes and interleukin-2 receptor in rats. *Food Sci Technol Res* 8: 14-16.
- Lim BO, Jolly CA, Zaman K, Fernandes G. 2000. Dietary (n-6) and (n-3) fatty acids and energy restriction modulate mesenteric lymph node lymphocytes function in auto-immune-prone (NZBxNZW)F1 mice. *J Nutr* 130: 1657-1664.
- Lim BO. 2001. Effect of ganhuangenin obtained from *Scutellaria radix* on the chemical mediator production of peritoneal exudate cells and immunoglobulin E level of mesenteric lymph node lymphocytes in sprague-dawley rats. *Phytotherapy Res* 16: 166-170.
- Yamada K, Hung P, Yoshimura K, Taniguchi S, Lim BO, Sugano M. 1996. Effect of unsaturated fatty acids and antioxidants on immunoglobulin production of rat mesenteric lymph node lymphocytes of sprague-dawley rats. *J Biochem* 120: 138-144.
- Hung P, Yamada K, Lim BO, Mori M, Yuki T, Sugano M. 1997. Effect of unsaturated fatty acids and alpha-tocopherol on immunoglobulin levels in culture medium of rat mesenteric lymph node and spleen lymphocytes. *J Biochem* 121: 1054-1060.
- Kiyono H, Bienenstock J, McGhee JR, Ernst PB. 1992. The mucosal immune system: features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development. *Reg Immunol* 4: 54-62.
- McGhee JR, Kiyono H. 1999. The mucosal immune system. In *Fundamental Immunology*. 4th ed. Paul WE, ed. Lippincott-Raven Publishers, New York. p 909.
- Kwon KH, Murakami A, Hayashi R, Ohgashi H. 2005. Interleukin-1beta targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 647-654.
- Cranston D, McWhinnie D, Collin J. 1988. Dietary fibre and gastrointestinal disease. *Br J Surg* 75: 508-512.
- Stephen AM, Cummings JH. 1980. Mechanism of action of dietary fibre in the human colon. *Nature* 284: 283-284.
- Stephen AM, Cummings JH. 1979. Water-holding by dietary fibre in vitro and its relationship to faecal output in man. *Gut* 20: 722-729.
- Burkitt DP, Walker AR, Painter NS. 1972. Effect of dietary fiber on stools and transit-times, and its role in the causation of disease. *Lancet* 300: 1408-1412.
- Connel AM. 1976. Natural fiber and bowel dysfunction. *Am J Clin Nutr* 29: 1427-1431.
- Cummings JH, Hill MJ, Jenkins DJ, Pearson JR, Wiggins HS. 1976. Change in fecal composition and colonic function due to cereal fiber. *Am J Clin Nutr* 29: 1468-1473.
- Hallert C, Kaldma M, Petersson BG. 1991. Ispaghula husk may relieve gastrointestinal symptoms in ulcerative colitis in remission. *Scand J Gastroenterology* 26: 747-750.
- Blumberg RS. 1990. Relapse of chronic inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 98: 792-796.
- Leo S, Leandro G, Di Matteo G, Caruso ML, Lorusso D. 1989. Ulcerative colitis in remission is it possible to predict the risk of relapse? *Digestion* 44: 217-221.
- Kang SM, Shim JY, Hwang SJ, Hong SG, Jang HE, Park MH. 2003. Effect of Saengsik supplementation on health improvement in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 906-912.
- Sugano M, Kamo F, Ikeda I, Morioka H. 1976. Lipid-lowering activity of phytosterols in rats. *Atherosclerosis* 24: 301-309.
- Sandberg AS, Andersson H, Hallgren B, Hasselblad K, Isaksson B, Hulten L. 1981. Experimental model for in vivo determination of dietary fibre and its effect on the absorption of nutrients in the small intestine. *Br J Nutr* 45: 283-294.
- American Institute of Nutrition. 1977. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on Standards for Nutrition Studies. *J Nutr* 107: 1340-1348.
- Lim BO, Yamada K, Yoshimura K, Watanabe T, Pham H, Taniguchi S, Sugano M. 1995. Free bile acids inhibit IgE production by mouse spleen lymphocytes stimulated by lipopolysaccharide and interleukins. *Biosci Biotech Biochem* 59: 624-627.
- Suk K, Kim SY, Kim H. 2002. Essential role of caspase-11

- in activation-induced cell death of rat astrocytes. *J Neurochem* 80: 230-238.
27. Fukushima C, Matsuse H, Saeki S, Kawano T, Machida I, Kondo Y, Kohno S. 2005. Salivary IgA and oral candidiasis in asthmatic patients treated with inhaled corticosteroid. *J Asthma* 42: 601-604.
 28. Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.
 29. Finegold SM, Flora DJ, Atterbery HR, Sutter VL. 1974. Effects of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am J Clin Nutr* 27: 1456-1469.
 30. Rao AV. 1995. Effects of dietary fiber on intestinal microflora and health. In *Dietary fiber in Health & Disease*. Kritchevsky D, Bonefield C, eds. Egan Press, St. Paul, MN. p 257-266.
 31. Tappenden KA, Pratt VC, Goruk SD, Field CJ, McBurney MC. 1995. Short chain fatty fatty acid (SCFA) supplementation of total parenteral nutrition (TPN) improves whole body response to intestinal resection. *FASEB J* 9: 862A.
 32. Lin CC, Shieh DE. 1996. The anti-inflammatory activity of *Scutellaria rivularis* extracts and its active components, baicalin, baicalein and wogonin. *Am J Chin Med* 24: 31-36.
 33. Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, Mannel DN, Andus T, Scholmerich J, Gross V, Falk W. 1997. Neutralization of tumor necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduce inflammation in chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 107: 353-358.
 34. Obermeier F, Kojouharoff G, Han W, Scholmerich J, Gross V, Falk W. 1999. Interferon-gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 116: 238-245.
 35. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Strober W. 1995. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 182: 1281-1290.
 36. Schreiber S, Heing T, Thiele HG, Raedler A. 1995. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patient with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 108: 1434-1444.
 37. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. 1993. Interleukin-12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin-4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10188-10192.
 38. Metcalfe DD. 1991. Food allergy. *Current Opinion Immunol* 3: 881-886.
 39. Moutoussamy S, Kelly PA, Finidori J. 1998. Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. *Eur J Biochem* 255: 1-11.
 40. Imada K, Leonard WJ. 2000. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 37: 1-11.
 41. Bromberg J, Chen X. 2001. STAT proteins: signal transducers and activators of transcription. *Methods Enzymol* 333: 138-151.

(2005년 12월 19일 접수; 2007년 1월 5일 채택)