

대장암 세포에서 lactobacilli와  
lactobacilli 배양 배지가 IL-1 $\beta$  자  
극에 의한 IL-8 생성에 미치는 영  
향

연세대학교 대학원  
의학과  
최 창 환

대장암 세포에서 lactobacilli와  
lactobacilli 배양 배지가 IL-1 $\beta$  자극에 의한 IL-8 생성에 미치는 영향

지도 김 원 호 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2004 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의학과

최 창 환

최창환의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 김 원 호 인

심사위원 김 경 섭 인

심사위원 김 주 향 인

심사위원 김 태 일 인

심사위원 윤 덕 미 인

연세대학교 대학원

2004년 6월 일

## 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 끊임없이 지도해 주시고 자상함으로 이끌어 주신 김원호 교수님께 진심으로 감사드리며, 본 연구를 위하여 각별한 조언을 아끼지 않으신 김태일 교수님, 김경섭 교수님, 김주향 교수님, 그리고 윤덕미 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 아울러 어려울 때 항상 힘이 되어 주는 소화기내과 강사 여러분들, 서로를 격려하며 여러 날을 같이 지낸 이상길 선생님, 그리고 연구 실험에 실제적인 도움을 많이 주신 양경민 선생님, 채보아 선생님, 오소영 선생님께 감사드립니다.

이 자리에 오기까지 사랑과 격려로 키워주신 부모님과 사랑하는 친구들에게 이 논문을 드립니다.

## 차 례

국문요약 .....	1
I. 서 론 .....	4
II. 재료 및 방법 .....	7
1. 세포 및 세포배양 .....	7
2. 실험 재료 및 약제 .....	7
3. Lactobacilli 배양 .....	7
4. Lactobacilli 의 조작 .....	8
5. Lactobacilli 배양 배지(lactobacilli-cm)의 처리 .....	8
6. ELISA 분석 .....	9
7. Luciferase reporter assay .....	9
8. Western blot 분석 .....	10
9. 통계분석 .....	11
III. 결 과 .....	12
1. IL-1 $\beta$ 자극에 의한 IL-8 생성에 lactobacilli 가 미치는 영향 .....	12
2. IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 유전자의 전사활성도에 LGG 가 미치는 영향 .....	13
3. IL-1 $\beta$ 에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화도에 LGG 가 미치는 영향 .....	14

4. IL-1 $\beta$ 에 의한 Ik B- $\alpha$ 분해에 LGG 가 미치는 영향.....	15
5. LGG 의 조각이 LGG 의 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응에 미치는 영향 .....	16
6. LGG sonication 이 LGG 의 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응에 미치는 영향 .....	18
7. LGG debris 의 조각이 LGG debris 의 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응에 미치는 영향 .....	18
8. IL-1 $\beta$ 자극에 의한 IL-8 생성에 lactobacilli-cm 이 미치는 영향.....	19
9. LGG-cm 의 조각이 LGG-cm 의 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응에 미치는 영향.....	21
 IV. 고 찰 .....	22
V. 결 론 .....	26
참고문헌 .....	28
영문요약.....	34



## 그림 차례

그림1. IL-8 promoter 부위를 포함하는 pGL2-Basic vector.....	10
그림2. IL-1 $\beta$ 자극에 의한 IL-8 생성에 lactobacilli 가 미치는 영향.....	13
그림3. IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 유전자의 전사활성도에 LGG가 미치는 영향.....	14
그림4. IL-1 $\beta$ 에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화도에 LGG가 미치는 영향 .....	15
그림5. IL-1 $\beta$ 에 의한 I $\kappa$ B- $\alpha$ 분해에 LGG가 미치는 영향 .....	16
그림6. 열, 항생제, 혹은 formaldehyde 처리가 LGG의 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응에 미치는 영향.....	17
그림7. LGG sonication 산물이 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성 에 미치는 영향 .....	18
그림 8. 열, 혹은 formaldehyde 처리가 LGG debris 의 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응에 미치는 영향 .....	19
그림 9. IL-1 $\beta$ 자극에 의한 IL-8 생성에 lactobacilli-cm 이 미치는 영향.....	20



그림 10. LGG-cm 의 조작이 LGG-cm 의 IL-1 $\beta$  에 대한  
반응에 미치는 영향 .....21

## 국문요약

### 대장암 세포에서 lactobacilli와 lactobacilli 배양 배지가 IL-1 $\beta$ 자극에 의한 IL-8 생성에 미치는 영향

Probiotics는 건강에 이로운 효과를 나타내는 살아있는 organism으로서 lactobacilli, bifidobacteria, streptococci 등의 세균과 yeast인 *Sacharomyces boulardii* 등이 널리 알려져 있다. 최근에 probiotics가 아토피, 급성 설사, 염증성장질환 등 여러 염증성 질환의 치료와 예방에 효과가 있다는 보고가 많은데 아직 염증억제 기전에 대한 연구는 매우 부족하며, 실제 염증을 억제하는 물질에 대해서도 거의 알려진 바가 없는 실정이다. 이에 연구자는 대장암 세포(Caco-2 세포)에서 probiotics인 lactobacilli가 IL-1 $\beta$  자극에 의한 IL-8의 생성과 그 중간 신호전달경로인 NF- $\kappa$  B에 미치는 영향을 알아보고, 실제 염증을 억제하는 물질을 밝혀 보고자 하였다.

Lactobacilli로는 *L. casei rhamnosus* GG (LGG), *L. casei* YIT 9018, *L. acidophilus* HY2177, *L. casei* HY2743 등 4가지 균주를 사용하였다. IL-8의 생성량은 ELISA 방법으로 측정하였고, IL-8 유전자의 전사활성도와 NF- $\kappa$  B 활성도는 luciferase reporter assay로 측정하였으며, I $\kappa$ B- $\alpha$  분해 정도는 western blot을 이용하여 분석하였다. Lactobacilli의 생존여부가 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 항생제, formaldehyde 또는 열처리한 LGG를 사용하였으며, lactobacilli의 어떤 구성성분이 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응에 영향을 미치는지 밝히기 위하여 LGG를 sonication하여 얻은 extract와 debris를 사용하였다. 또한 lactobacilli가 분비하는 물질이 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응을 억제하는지 알아보기 위하여 LGG 배양 배지(LGG-cm)를 사용하였으며 LGG-cm에 포함된 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응 억제물질의 성질을 규명하기 위하여 DNase I, proteinase K 또는 열처리한 LGG-cm을 사용하였다.

1. Caco-2 세포에 IL-1 $\beta$  를 처리하였을 때 IL-8 생성이 유의하게 증가하였고, IL-1 $\beta$  처리 30분전에 LGG, *L. casei* YIT 9018, *L. acidophilus* HY 2177, 그리고 *L. casei* HY 2743을 각각 전처리 하였을 때는 lactobacilli 농도에 비례하여 IL-8 생성이 유의하게 억제되었다.
2. IL-8 유전자의 전사활성도와 NF- $\kappa$  B의 활성도는 IL-1 $\beta$  처리 후 각각 4.6배 및 4.3배 증가하였으며, 이러한 활성도의 증가는 전처리한 LGG농도에 비례하여 억제되었다. IL-1 $\beta$  에 의한 I $\kappa$  B- $\alpha$  분해 정도는 대조군 세포의 I $\kappa$  B- $\alpha$  레벨을 100%로 하였을 때 IL-1 $\beta$  를 처리하고 15분 경과 후에는 81%가 분해되어 19%만 남아 있었고, 30분, 60분, 그리고 90분 경과 후에는 각각 29%, 49%, 56%로 회복되었다. LGG를 전처리한 후 IL-1 $\beta$  를 처리하였을 때는 15분, 30분, 60분 경과 후 I $\kappa$  B- $\alpha$  레벨이 각각 56%, 59%, 93%로 회복되어 I- $\kappa$  B $\alpha$  분해가 완전히 억제되지는 않았으나 부분적으로 억제되었다.
3. LGG의 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 생성 억제 효과는 LGG를 항생제 혹은 formaldehyde로 처리하여도 유지되었으나 열처리하면 소실되었다.
4. LGG를 sonication 시킨 후 분리한 debris는 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 생성 억제 효과를 보였으나 extract는 억제효과를 가지지 않았다. LGG debris의 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8생성 억제 효과는 LGG debris를 formaldehyde로 고정하여도 유지되었으나 열처리하면 소실되었다.
5. 실험에 이용한 4가지 lactobacilli의 배양배지(lactobacilli-cm)는 모두 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 생성을 억제하였으며, LGG-cm을 proteinase K, DNase I 또는 열처리하여도 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 생성 억제 효과는 유지되었다.

결론적으로 본 연구를 통하여 사람 장 상피상피(Caco-2 세포)에

서 LGG가 IL-1 $\beta$  자극에 의한 IL-8 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, 이러한 효과는 최소한 부분적으로는 NF- $\kappa$  B 경로의 억제를 통해 이루어진다는 것을 알 수 있었다. IL-8 생성을 억제하는 효과는 LGG의 구조를 이루는 물질과 LGG가 분비하는 물질 모두가 가지고 있으며 이 두 가지 물질의 성질이 서로 다르다는 것을 확인하였다.

---

핵심되는 말 : lactobacilli, lactobacilli-cm, IL-8

# 대장암 세포에서 lactobacilli와 lactobacilli 배양 배지가 IL-1 $\beta$ 자극에 의한 IL-8 생성에 미치는 영향

<지도 김 원 호 교수>

연세대학교 대학원 의학과

## 최 창 환

### I. 서 론

인체에서 상재균은 피부, 구강점막, 상기도, 요로기관, 여성의 질 등에 존재하나, 위장관 내에 가장 많이 존재한다.<sup>1,2</sup> 위장(stomach)은 위산으로 인한 낮은 pH 때문에 위장 내 내용물 1ml 당 0-10<sup>3</sup> colony forming units (CFU) 정도의 상대적으로 적은 수의 세균을 포함하고 있으나 하부위장관에는 높은 pH와 느린 통과시간 때문에 다양하고 많은 수의 세균이 존재한다. 가장 많은 곳에는 하부위장관 내 내용물 1ml 당 10<sup>11</sup>-10<sup>12</sup> CFU 의 세균이 존재하며 *Bacteroides* 종류, *Clostridium* 종류, bifidobacteria, fusobacteria, eubacteria 와 같은 혐기성 세균이 그 대부분(99.9%)을 차지한다.<sup>3,4</sup>

하부위장관에 주로 존재하는 probiotics는 건강에 이로운 효과를 나타내는 살아있는 organism을 말한다.<sup>5</sup> 상업적으로 사용되는 대표적인 probiotics는 유산균(lactic acid bacteria) 인데 이는 위장관 내에 정상적으로 존재하는 상재균이며 대개는 해가 없다. 그 외에 요구르트 등의 성분으로 쓰이는 bifidobacteria, streptococci 등의 세균과 yeast 인 *Sacharomyces boulardii* 등이 널리 알려져 있다.<sup>6</sup> Probiotics는 위장관 점막 장벽의 통합성(integrity)을 유지시켜주고, 병원균의 과증식을 억제함으로써 위장관 상재균의 대사작용과 구성을 조절하며, 그 외 여러 가지 기전을 통하여 인체에 유익한 영향을 미친다.<sup>7</sup> 항생제와 비슷한 역할을 하는 물질을 분비하는 기능, 장관

의 pH를 낮추는 기능, 인체의 영양에 도움이 되는 비타민 B와 K 및 단쇄지방산(short chain fatty acid; acetate, butyrate)을 생산하는 기능, 발암물질과 담즙산의 대사하는 기능, 그리고 대식세포와 자연살해세포(natural killer cell) 활성화, 림프구 증식 및 IgA 분비 증가를 통하여 면역계를 자극하는 기능 등이 알려져 있으며, 몇몇의 lactobacilli 균주는 위장관의 점막 표면에 부착하여 병원성 세균의 부착을 방해한다.<sup>2,6-9</sup>

Probiotics는 급성 설사를 일으키는 몇몇 질환의 예방과 치료에 효과가 있다. 예를 들면 lactobacilli의 투여는 rotavirus 혹은 세균 감염에 의한 급성 설사와<sup>10-12</sup> 항생제 연관성 설사(antibiotic-associated diarrhea)의<sup>13-16</sup> 예방과 치료에 효과적이고, 급성 설사 이후에 장관 내 상재균을 다시 조성하는데 효과가 있다. 또한 lactobacilli 뿐 아니라 yeast probiotics인 *Saccharomyces bouladii*도 *Clostridium difficile* 감염에 의한 재발성 위막성 대장염의 치료에 효과가 있다.<sup>17-20</sup>

염증성장질환에서는 염증 초기의 병리기전에 세균의 역할이 중요한데 최근에는 병리기전뿐만 아니라 치료에서도 세균의 역할이 중요시 되어 많은 연구가 이루어지고 있으며 염증성장질환의 치료에 있어서 probiotics의 효과를 제시한 여러 임상적 및 실험적인 연구 보고가 있다. 염증성장질환에서 염증은 장관 내 상대적인 병원균의 우위에 의한 상재균의 불균형에 의해 시작될 가능성이 제시되었으며, 활동성 궤양성대장염 환자 혹은 크론병 환자의 대변 및 대장 조직검사에서 lactobacilli 및 bifidobacteria 농도가 감소되고 혐기성 세균의 농도가 증가되어 있다.<sup>21-24</sup> 크론병 환자에서 *Lactobacillus* GG의 투여는 점막 IgA를 증가시키며, 장 투과성과 질병 활동도를 감소시킨다.<sup>25</sup> *Lactobacillus plantarum* 299V는 IL-10 유전자 결실 생쥐 대장염 모델에서 장점막의 장벽(barrier) 기능을 안정화 시킨다.<sup>26</sup> 궤양성대장염 환자의 관해 유지 치료에서 mesalamine과 probiotics의 효과를 비교한 두 연구에서 두 군 간에 효과의 차이가 없으며,<sup>27,28</sup> 크론병 환자에서도 mesalazine 단독 투여에 비해 probiotics의 병용

투여가 재발률을 유의하게 감소시킨다.<sup>29,30</sup> 또한 활동성 회낭염 (pouchitis) 환자의 대변에서도 lactobacillus 와 bifidobacteria의 농도가 감소되어 있으며,<sup>31</sup> 만성 회낭염 환자에서 probiotics는 위약군에 비해 유의하게 좋은 치료 효과를 보인다.<sup>32</sup>

특징적으로, 장점막으로 세균이 침투하면 NF- $\kappa$  B (nuclear factor- $\kappa$  B)의존 유전자를 활성화시킴으로써 면역반응을 일으킨다. 이 염증반응은 TLR (Toll like receptor)을 통한 세균생성물질의 직접적인 영향으로 시작되거나, 주변 대식세포에 의한 염증성 사이토카인의 분비를 통해 간접적으로 시작된다. TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-1 (interleukin-1), LPS (lipopolysaccharide) 등의 자극은 NIK (NF- $\kappa$  B inducing kinase)와 MEKK (MAPK/ERK kinase kinase)1 같은 상위 인산화효소(kinase) 활성화를 통해 I $\kappa$  B kinase (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ )를 활성화시키며 I $\kappa$  B (inhibitor- $\kappa$  B)가 인산화되면서 ubiquitination되어 proteosome에 의해 분해되고, I $\kappa$  B에 결합되어 억제되었던 NF- $\kappa$  B가 핵 내로 이동하게 되어 consensus DNA element에 결합하게 됨으로써 여러 유전자를 transactivation 시켜 발현시킨다.<sup>33-35</sup> 사람 장 상피세포에서 살아있는 비병원성 *Salmonella* 균주 (*Salmonella typhimurium* PhoP<sup>c</sup> or *S. pullorum*)는 병원성 *Salmonella* 균주에 의해 유발된 IL-8의 생성을 억제하는데, NF- $\kappa$  B 경로 중 인산화된 I $\kappa$  B- $\alpha$  의 ubiquitination 과정을 억제하여 I $\kappa$  B- $\alpha$  가 분해되는 것을 막음으로써 IL-8 생성을 억제한다.<sup>36</sup>

최근에 이렇게 probiotics에 관한 여러 임상적 및 실험적 연구가 진행되고 있는데 아직 probiotics의 항염증 작용기전과 실제 염증을 억제하는 물질을 밝히는 등에 대한 연구는 매우 부족한 상태이다. 이에 연구자는 대장암 세포 (Caco-2 세포)에서 probiotics인 lactobacilli가 IL-1 $\beta$  자극에 의한 IL-8의 생성과 그 중간 과정인 NF- $\kappa$  B 경로에 미치는 영향을 알아보고, 실제 염증을 억제하는 물질이 무엇인지 밝혀 보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포 및 세포배양

인체에서 기원한 대장 선암세포인 Caco-2 세포를 ATCC (Rockville, MD, USA)로부터 분양 받아 100 IU/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin 및 10% 열 비활성화 우태아혈청이 포함된 RPMI-1640 배지(pH 7.4) (Gibco Introgen Corporation, Grand island, NY, USA)로 5% CO<sub>2</sub>, 37℃에서 배양하였으며 세포 배양 plate 70-80% confluence 상태에서 실험을 진행하였다.

### 2. 실험 재료 및 약제

Caco-2 세포를 IL-1 $\beta$  2 ng/ml (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)로 자극하여 최종 생성물로서 IL-8 양을 측정하였다. Lactobacilli 균주의 종류에 따른 IL-8 생성 억제 효과를 알아보기 위해 IL-1 $\beta$  처리 30 분 전에 4 가지 균주의 lactobacilli 를 Caco-2 세포에 전처리하였다. 사용된 균주는 *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* (LGG), *Lactobacillus casei* YIT 9018, *Lactobacillus acidophilus* HY2177, 그리고 *Lactobacillus casei* HY2743 이었다. 농도 별 반응을 보기 위해 각각 균주를 세포배양 배지 1ml 당 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup> CFU 의 농도로 Caco-2 세포에 처리하였다.

### 3. Lactobacilli 배양

각각의 *Lactobacillus* 균주를 MRS (Man-Rogosa-Sharpe) 한천 배지(agar plate)에 배양시킨 후 집락(colony) 하나를 MRS 액체 배지(broth media) 10ml에 점적하고 15시간 동안 배양하였다. 배양시킨 세균 부유액을 단계적으로 희석하여 MRS 한천 배지에 도말하여 배양한 후 집락수를 세어 배양된 액체 배지 내 세균의



농도 (CFU/ml)를 구하였다. 600nm에서 이의 흡광도(optical density) 값을 구하여 반복 실험할 때 세균 농도의 기준 값으로 이용하였다. 액체 배지에서 배양된 lactobacilli를 3000rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 이를 항생제가 들어있지 않은 RPMI-1640 배지로 세척한 후 다시 RPMI-1640 배지로 실험에 사용할 농도( $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  CFU/ml)로 희석하여 Caco-2 세포에 처치하였다.

#### 4. Lactobacilli 의 조작(manipulation)

Lactobacilli의 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 생성 억제 효과가 다음과 같은 조작에 의하여 어떻게 변하는지 알아보았다. 첫째, RPMI 1640 배지 1ml 당  $10^9$  CFU 농도의 LGG를 75 $^{\circ}$ C와 95 $^{\circ}$ C에서 15분 간 열처리하였다. 둘째, LGG를 100 IU/ml penicillin과 100  $\mu$ g/ml streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지로 현탁액을 만들었다. 셋째, 4% formaldehyde로 4 $^{\circ}$ C에서 30분 간 처리하여 세균의 구조를 고정시켰다. 넷째, formaldehyde로 고정한 lactobacilli를 다시 열처리하였다. 그리고 lactobacilli의 어떤 구성 성분이 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 생성을 억제하는지 알아보기 위하여 LGG를 RPMI-1640 배지로 현탁액을 만들고 sonication하여 3000rpm에서 15분간 원심분리한 후 이를 extracts와 침전물인 debris로 분리하였다.

#### 5. Lactobacilli 배양 배지(lactobacilli-cm)의 처리

Lactobacilli 를 배양시켰을 때 대사과정에서 분비하는 물질이 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 생성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 MRS 액체 배지에 lactobacilli 집락 하나를 점적하고 24 시간 배양시킨 배지를 3000rpm 에서 15 분간 원심분리한 후 0.2  $\mu$ m 크기의 pore 를 가지는 filter (Pall corporation, Ann Arbor, MI, USA)에 통과시켜 lactobacilli-cm 을 분리하였다.

Caco-2 세포 배양액 양의 5%, 10%, 15% 부피로 lactobacilli-cm 을 각각 30 분 전에 전처리 한 후 IL-1 $\beta$  를 처리하고 12 시간 경과 후 상층액 내 생성된 IL-8 양을 측정하였다. 이후 몇 가지 방법으로 LGG-cm 을 처리하여 IL-1 $\beta$  에 대한 반응의 변화를 알아보았다. 첫째, LGG-cm 을 95 $^{\circ}$ C에서 15 분 간 열처리하였다. 둘째, LGG-cm 을 proteinase K 0.5-1.0 mg/ml 로 처리하고 37 $^{\circ}$ C에서 60 분간 반응시켰다. 셋째, LGG-cm 을 DNase I 10-120 U/ml 로 처리하고 실온에서 30 분간 반응시켰다. Proteinase K 와 DNase I 를 각각 lactobacilli-cm 에 처리한 후에 효소를 불활성화시키기 위해 95 $^{\circ}$ C에서 10 분간 열처리 과정을 거쳐 전처리하였다.

## 6. ELISA 분석

IL-8 생성은 샌드위치 ELISA 로 검출하였다. Microtiter plate (Costar, Corning, NY, USA)에 PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)로 희석한 항-IL-8 단세포항체를 well 당 100  $\mu$ l 씩 넣고 하룻밤 동안 도장한 후에 PBST (phosphated buffered saline + Tween 20)로 3 회 세척하고 1% BSA 로 상온에서 차단하였다. 표본과 중합된 IL-8 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)을 PBST 로 희석하고, 각 well 당 희석된 standard 나 표본(10  $\mu$ l/ml)을 추가한 후 상온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 부착된 IL-8 은 biotin 부착 항체와 Streptavidin-alkaline phosphate 에 반응한 후에 검출하였다. 세척 후에 ELISA 증폭장치 (Gibco BRL)를 이용하여 450nm 에서 흡수 값을 결정하였다.

## 7. Luciferase reporter assay

IL-8 유전자의 전사활성도와 NF- $\kappa$  B 의 활성도는 luciferase reporter assay 로 측정하였다. Caco-2 세포에 human IL-8 promoter (그림 1) 또는 NF- $\kappa$  B 결합부위를 가진 luciferase reporter construct 를 포함하는 plasmid DNA 0.4  $\mu$ g과 transfection 효율을 측정하고 보정하기 위한 pCMV- $\beta$ -gal plasmid DNA 0.2  $\mu$ g을 LipofectAMINE PLUS (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 설명서 지시에 따라 transfection 하였다. Transfection 3 시간 후 새로운 배지로 바꾸어 주고, 12-24 시간 경과한 다음 적절한 처치에 따르는 luciferase (Luciferase assay system, Promega, Madison, WI, USA)와  $\beta$ -galactosidase 의 활성도를 측정하였다. 모든 luciferase 활성도는  $\beta$ -galactosidase 활성도로 나누어 보정하였다.

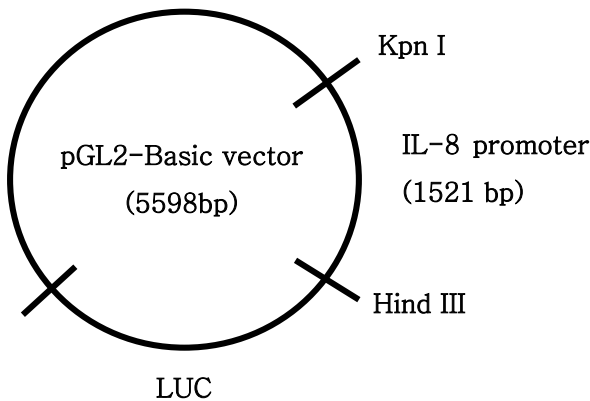


그림 1. IL-8 promoter 부위를 포함하는 pGL2-Basic vector (5598bp).

## 8. Western blot 분석

Western blot 분석을 이용하여 NF- $\kappa$  B 경로의 중간 매개물질인 I $\kappa$ B- $\alpha$  를 정량분석 하였다. Caco-2 세포에 lactobacilli 와 IL-1 $\beta$  혹은 IL-1 $\beta$  만을 시간 별로 처리한 후 수거하여 50 mM Tris (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 25  $\mu$  g/mL

leupeptin, 20  $\mu$ g/ml pepstatin 이 함유된 완충액에서 용해시켜 얼음에서 30 분 동안 반응시킨 후, 12,000 rpm 에서 20 분간 원심 분리하여 상층액만을 취하였다. 추출된 단백질을 100°C에서 5 분간 가열한 후 10% SDS 가 포함된 polyacrylamide gel 에서 전기영동하고, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 단백질을 이동시켰다. 그 후 membrane 을 5% 탈지분유가 함유된 TBST [10 mM Tris (pH7.4), 100 mM NaCl, 0.5 % Tween 20]로 30 분간 차단하고 1:1000 으로 희석된 1 차 항체를 1 시간 동안 표적 시킨 후 TBST 로 3 회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다. Horseradish peroxidase 가 결합된 2 차 항체[HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Amersham LifeScience, Arlington Heights, IL, USA)]를 1:3000 으로 희석하여 membrane 에 1 시간 동안 반응시킨 후 TBST 로 10 분간 3 회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다. Peroxidase 기질이 함유된 ECL (enhanced chemiluminescence) 용액을 처리한 후 X-ray 필름에 감광하여 분석하였으며, 1 차 항체로는 항-I $\kappa$ B- $\alpha$  항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 이용하였다.

## 9. 통계분석

모든 통계 내용은 3 회 이상의 독립적인 실험에 의한 평균  $\pm$  표준편차로 나타내고, Mann-Whitney U test 를 이용하여 두 그룹간의 통계적 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은  $p < 0.05$  로 정의하였다.

### III. 결 과

#### 1. IL-1 $\beta$ 자극에 의한 IL-8 생성에 lactobacilli가 미치는 영향

Caco-2 세포에 IL-1 $\beta$  를 처리하고 12시간 경과 후 IL-8생성은 IL-1 $\beta$  를 처리하지 않은 대조군 세포에 비하여 유의하게 증가하였다. IL-1 $\beta$  처리 30분전에 LGG, *L. casei* YIT 9018, *L. acidophilus* HY 2177, 그리고 *L. casei* HY 2743을 전처리하였을 때에는 각 세균의 농도에 비례하여 IL-8생성이 억제 되었으며 10<sup>9</sup> CFU/ml 농도에서 각각 최대 96%, 58%, 91% 및 89%가 억제되었다(그림 2).

Lactobacilli를 Caco-2 세포에 처리하고 12시간 경과 후 세균 일부를 MRS 한천배지에 도말하여 배양시켰을 때 생존하여 집락을 형성하였다. Lactobacilli를 처리한 Caco-2 세포에 tryphan blue 염색을 시행하여 대조군 세포와 비교하였는데 lactobacilli는 Caco-2 세포의 생존에 영향을 미치지 않았다. 또한 Caco-2 세포에 lactobacilli를 처리하고 12시간 경과 후 제거하고 새로운 RPMI-1640 배지로 바꾼 후 IL-1 $\beta$  로 자극하였을 때 IL-8 생성량은 lactobacilli를 처리하기 전과 같이 유지되었다. 따라서 lactobacilli는 Caco-2 세포의 생존에 영향을 미치지 않을 뿐 아니라 세포의 기능에도 비가역적인 영향을 미치지 않았다.

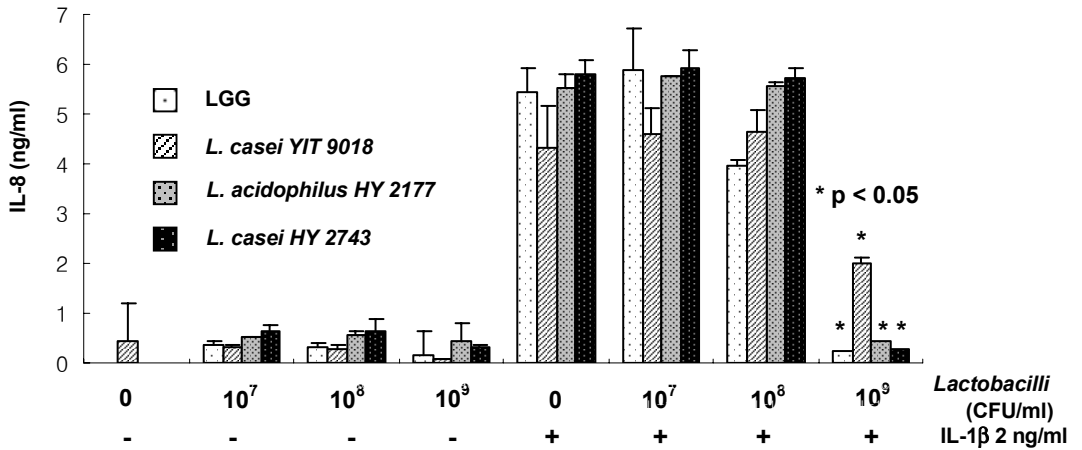


그림 2. IL-1 $\beta$  자극에 의한 IL-8 생성에 lactobacilli 가 미치는 영향. Caco-2 세포에 LGG, *L. casei* YIT 9018, *L. acidophilus* HY 2177, 그리고 *L. casei* HY 2743 을 각각 농도별로 30 분전에 전처치하고 IL-1 $\beta$  를 처리하여 12 시간 경과 후 IL-8 생성량을 측정하였다. IL-1 $\beta$  자극에 의해 IL-8 생성은 유의하게 증가되었으며 LGG, *L. casei* YIT 9018, *L. acidophilus* HY 2177, 그리고 *L. casei* HY 2743 를 전처치하였을 때는 IL-8 생성이 유의하게 감소되었다.

## 2. IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 유전자의 전사활성도에 LGG가 미치는 영향

IL-1 $\beta$  자극에 의한 IL-8 생성에 억제 효과가 가장 큰 LGG를 이용하여 LGG 가 IL-8 유전자의 전사활성도를 억제하는지 알아보았다. IL-8 유전자의 전사 활성도는 IL-1 $\beta$  처리하고 8시간 경과 후 대조 세포에 비하여 4.6배 증가되었으며, 이렇게 증가된 IL-8 유전자의 전사 활성도는 IL-1 $\beta$  처리 30분전에 LGG를 전처치하였을 때 LGG 농도에 비례하여 억제되었으며 10<sup>9</sup> CFU/ml 농도에서 최대 74% 억제되었다(그림 3).

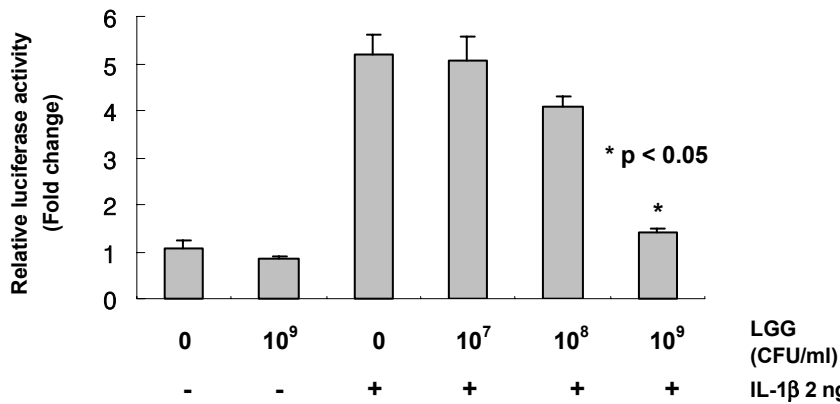


그림 3. IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 유전자의 전사활성도에 LGG 가 미치는 영향. IL-8 promoter 를 가진 luciferase reporter construct 를 포함하는 plasmid DNA 를 transfection 시킨 Caco-2 세포에 LGG 를 농도별로 전처리하고 IL-1 $\beta$  를 처리하여 8 시간 경과 후 luciferase 활성도를 측정하였다. 이 때 pCMV  $\beta$ -gal plasmid DNA 를 같이 transfection 하여 transfection 효율을 측정하고 보정하였다. IL-8 유전자의 전사활성도는 IL-1 $\beta$  처리 후 대조군 세포에 비하여 유의하게 증가되었으며, IL-1 $\beta$  투여 전에 LGG 를 전처리하였을 때 LGG 농도에 비례하여 억제되었다.

### 3. IL-1 $\beta$ 에 의한 NF- $\kappa$ B 활성도에 LGG가 미치는 영향

NF- $\kappa$  B는 염증 반응의 중간 매개체로서 중요한 역할을 하는 전사인자로 알려져 있는데 IL-1 $\beta$  에 자극에 의한 NF- $\kappa$  B 활성도가 LGG에 의해 억제되는지 알아보았다. NF- $\kappa$  B의 활성도는 IL-1 $\beta$  를 처리하고 8시간 경과 후 대조군 세포에 비하여 4.3배 증가되었으며, 증가된 NF- $\kappa$  B의 활성도는 IL-1 $\beta$  처리 30분전에 LGG를 전처리하였을 때 LGG 농도에 비례하여 억제되었으며 10<sup>9</sup> CFU/ml 농도에서 최대 75% 억제되었다(그림 4).

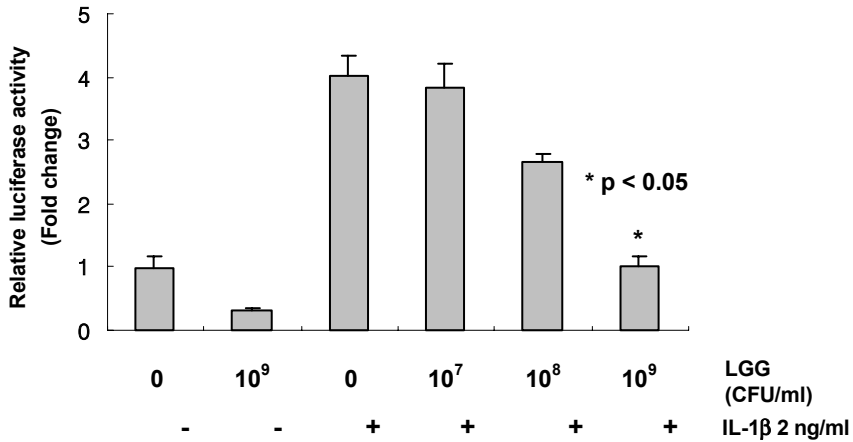


그림 4. IL-1 $\beta$  에 의한 NF- $\kappa$  B 활성화도에 LGG 가 미치는 영향. NF- $\kappa$  B 결합부위를 가진 luciferase reporter construct 를 포함하는 plasmid DNA 를 transfection 시킨 Caco-2 세포에 LGG 를 농도별로 전처리하고 IL-1 $\beta$  를 처리하여 8 시간 경과 후 luciferase 활성도를 측정하였다. 이 때 pCMV  $\beta$ -gal plasmid DNA 을 같이 transfection 하여 transfection 효율을 측정하고 보정하였다.. NF- $\kappa$  B 의 활성화도는 IL-1 $\beta$  처리 후 대조군 세포에 비하여 유의하게 증가되었으며, 이렇게 증가된 NF- $\kappa$  B 의 활성화도는 IL-1 $\beta$  투여 전에 LGG 를 전처리하였을 때 LGG 농도에 비례하여 억제되었다.

#### 4. IL-1 $\beta$ 에 의한 I $\kappa$ B- $\alpha$ 분해에 LGG가 미치는 영향

NF- $\kappa$  B 경로 중에 NF- $\kappa$  B 가 핵 내로 이동 하는데 관련되는 I $\kappa$  B- $\alpha$  의 분해 과정에 LGG 가 영향을 미치는지 알아보기 위하여 I $\kappa$  B- $\alpha$  특이 항체를 이용한 Western blot 을 시행하였다. 대조군 세포의 I $\kappa$  B- $\alpha$  레벨을 100%로 하였을 때 IL-1 $\beta$  를 처리하고 15 분 경과 후에는 81%가 분해되어 19%만 남아 있었고, 30 분, 60 분, 그리고 90 분 경과 후에는 각각 29%, 49%, 56%로 회복되었다. LGG 를 10<sup>9</sup> CFU/ml 농도로 30 분 전에 전처리하고 IL-1 $\beta$  를 처리하였을 때는 15 분, 30 분, 60 분 경과 후 I $\kappa$  B- $\alpha$  레벨이 각각 56%, 59%, 93%로 회복되어 LGG 가 I $\kappa$  B- $\alpha$  분해를 완전히



억제하지는 못 하지만 최소한 부분적으로는 억제한다는 것을 알 수 있었다(그림 5).

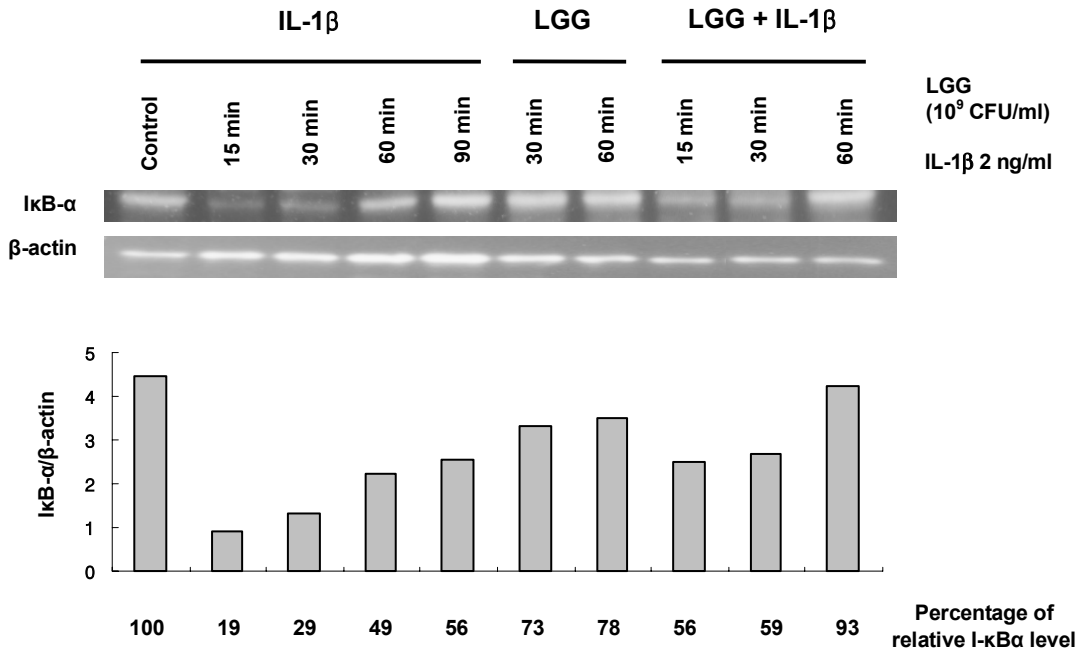
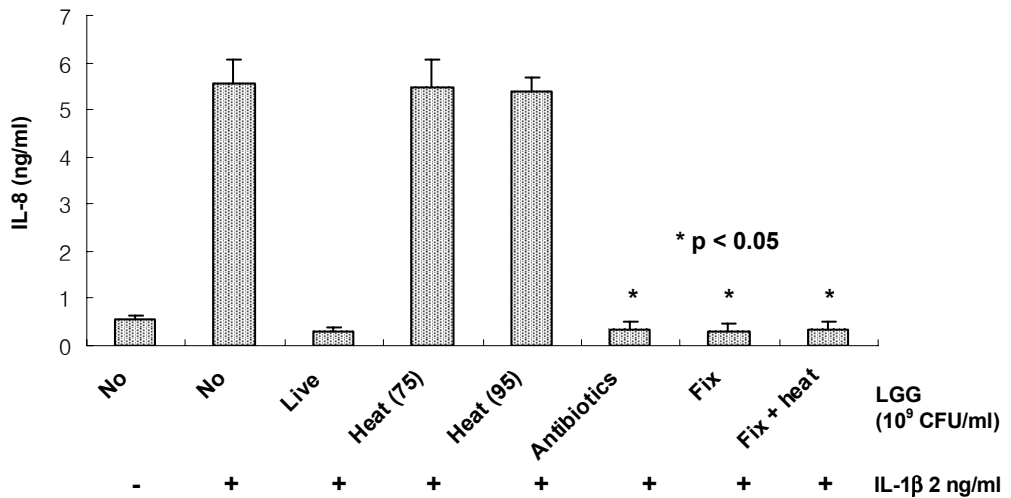


그림 5. IL-1β 에 의한 Ik B-α 분해에 LGG 가 미치는 영향. Caco-2 세포에 IL-1β 를 단독으로 혹은 LGG 를 전처리하고 IL-1β 를 처리한 후 시간 별로 세포를 용해시켜 Ik B-α 특이 항체(상단)와 대조 항체인 항-β -actin 항체(하단)를 이용하여 Western blot 을 시행하였다. Caco-2 세포에 IL-1β 를 처리하면 Ik B-α 가 분해되어 15 분 후에는 대조 세포 Ik B-α 레벨의 19%로 감소되었다가 시간이 지남에 따라 점점 회복되었으며, LGG 를 전처리하고 IL-1β 를 처리하였을 때는 Ik B-α 분해가 부분적으로 억제되었다.

## 5. LGG의 조작이 LGG의 IL-1β 에 대한 반응에 미치는 영향

열처리한 LGG를 전처리하였을 때는 IL-1β 자극에 의한 IL-8 생성 억제 효과가 소실되었으나 항생제(penicillin과 streptomycin)로 처리하거나 4% formaldehyde로 고정시킨 LGG를 전처리하였을 때

는 IL-8 생성 억제 효과가 유지되었다. 또한 LGG를 4% formaldehyde 로 고정시킨 후에는 열처리하여도 IL-1 $\beta$  자극에 의한 IL-8 생성 억제 효과가 유지되었다(그림 6). 열처리하거나 항생제, 혹은 4% formaldehyde로 처리한 LGG의 일부를 MRS 액체 배지에 접종하였을 때 모두 배양되지 않았다.



**그림 6.** 열, 항생제, 혹은 formaldehyde 처리가 LGG의 IL-1 $\beta$  에 대한 반응에 미치는 영향. LGG를 10<sup>9</sup> CFU/ml 농도에서 열처리하거나 항생제, 혹은 4% formaldehyde로 처리한 후 각각 Caco-2 세포에 전처리하였다. 이후 IL-1 $\beta$  로 자극하여 12시간 경과 후 IL-8 생성량을 측정하였다. 열처리한 LGG를 전처리하였을 때는 IL-1 $\beta$  자극에 의한 IL-8 생성 억제 효과가 소실되었으나 항생제 혹은 4% formaldehyde로 처리한 LGG를 전처리하였을 때는 IL-8 생성 억제 효과가 유지되었다. (Heat (75): 75 $^{\circ}$ C 에서 15분 간 열처리, Heat (95): 95 $^{\circ}$ C에서 15분 간 열처리, Antibiotics: 100 IU/ml penicillin과 100  $\mu$ g/ml streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지로 LGG 현탁액을 만들어 희석, Fix: 4% formaldehyde로 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리, Fix+ heat: 4% formaldehyde로 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리 후 95 $^{\circ}$ C에서 15분 간 열처리)

## 6. LGG sonication이 LGG의 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응에 미치는 영향

LGG를 sonication 시킨 후 분리한 debris를 IL-1 $\beta$  투여 30분전에 전처리하였을 때는 IL-8 생성 억제되었으나 extract를 전처리하였을 때는 IL-8 생성이 억제되지 않았다. 또한 debris와 extract를 같이 전처리하였을 때도 IL-8 생성이 억제되었다(그림 7). Sonication 시킨 LGG를 MRS 액체 배지에 점적하였으나 배양되지 않았다.

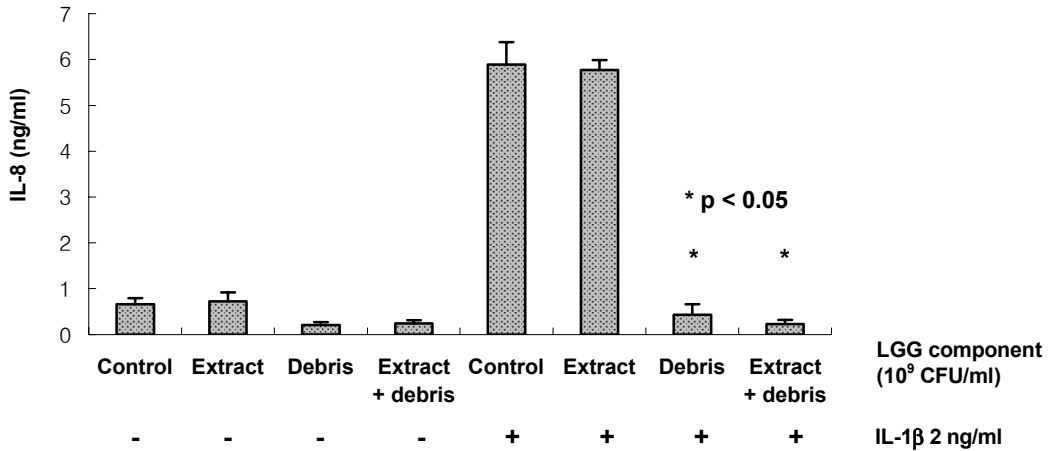
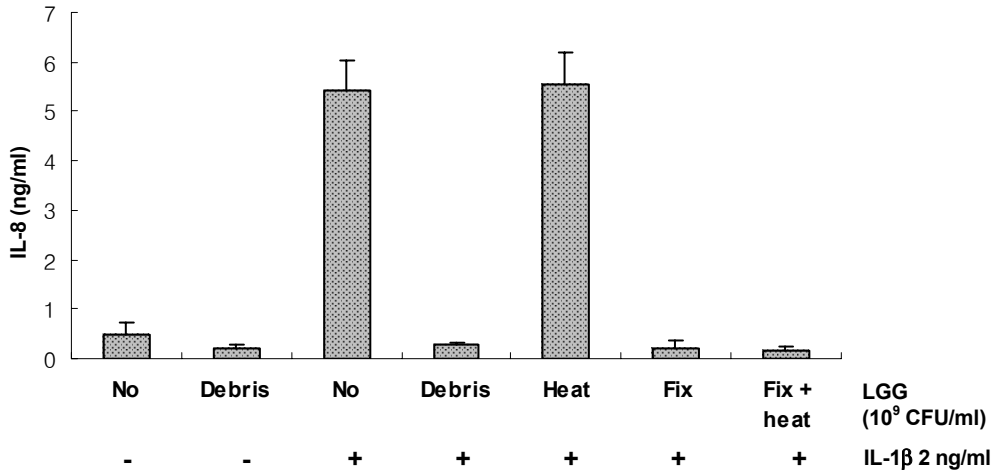


그림 7. LGG sonication 산물이 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성에 미치는 영향. LGG를 RPMI 1640 배지로 현탁액 상태로 만든 후 sonication 시키고 원심 분리 하여 배지에 녹아 있는 물질인 extract와 pellet인 debris로 분류하였다. 이들을 각각 Caco-2 세포에 전처리하고 IL-1 $\beta$ 를 처리하여 12시간 경과 후 IL-8 생성량을 측정하였다. Extract와 debris 혹은 debris를 전처리하였을 때는 IL-8생성이 유의하게 억제되었으나 extract만을 전처리하였을 때는 IL-8생성이 억제되지 않았다.

## 7. LGG debris의 조작이 LGG debris의 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응에 미치는 영향

LGG를 10<sup>9</sup> CFU/ml 농도에서 sonication시킨 후 debris를 얻어

LGG를 조작한 방법과 같은 방법으로 열 혹은 4% formaldehyde로 처리하였다. LGG debris의 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성 억제 효과는 LGG debris를 4% formaldehyde로 고정하여도 유지되었으나 열처리하면 소실되었다. 또한 LGG debris를 formaldehyde로 고정시킨 후에는 열처리하여도 IL-8 생성 억제 효과가 유지되었다(그림 8).



**그림 8.** 열, 혹은 formaldehyde 처리가 LGG debris의 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응에 미치는 영향. LGG를 10<sup>9</sup> CFU/ml 농도에서 sonication 하여 얻은 debris를 열처리하거나 4% formaldehyde로 처리한 후 각각 Caco-2 세포에 전처리하였다. 이후 IL-1 $\beta$ 를 처리하고 12시간 경과 후 IL-8 생성량을 측정하였다. LGG debris의 IL-8 생성 억제 효과는 LGG debris를 4% formaldehyde로 고정하여도 유지되었으나 열처리하면 소실되었다. Formaldehyde로 고정한 LGG debris를 다시 열처리하여도 LGG debris의 IL-8 생성 억제 효과는 유지되었다. (Heat: 95 $^{\circ}$ C에서 15분 간 열처리, Fix: 4% formaldehyde로 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리, Fix+heat: 4% formaldehyde로 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리 후 95 $^{\circ}$ C에서 15분 간 열처리)

## 8. IL-1 $\beta$ 자극에 의한 IL-8 생성에 lactobacilli-cm이 미치는 영향

실험에 이용한 4가지 균주의 lactobacilli를 배양시킨 배지 (lactobacilli-cm)를 Caco-2 세포에 전처리하여 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-

8 생성에 미치는 영향을 알아보았다. MRS 액체 배지만을 전처리하였을 때는 IL-8 생성을 억제하지 못했으나 lactobacilli-cm을 전처리하였을 때는 4가지 균주 모두에서 IL-8생성을 억제하였다(그림 9).

Lactobacilli-cm을 처리한 Caco-2 세포에 tryphan blue 염색을 시행한 후 대조 세포와 비교하였는데 lactobacilli-cm은 Caco-2 세포의 생존에 영향을 미치지 않았다. 또한 Caco-2 세포에 lactobacilli-cm을 처리 후 제거하고 새로운 RPMI-1640 배지로 바꿔주어 IL-1 $\beta$ 로 자극하였을 때 IL-8 생성량은 lactobacilli-cm을 처리하기 전과 같이 유지되었다. 따라서 lactobacilli-cm은 Caco-2 세포의 생존에 영향을 미치지 않을 뿐 아니라 세포의 기능에도 비가역적인 영향을 미치지 않았다.

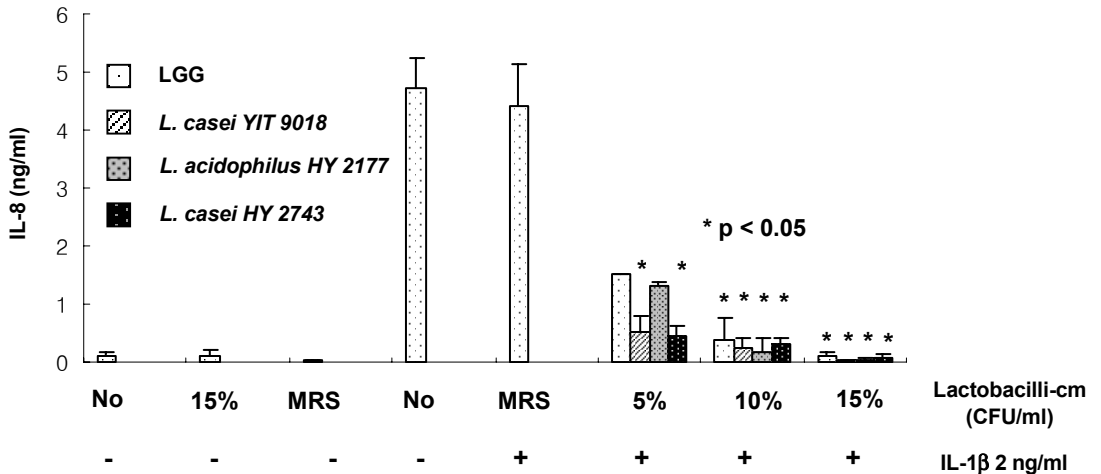
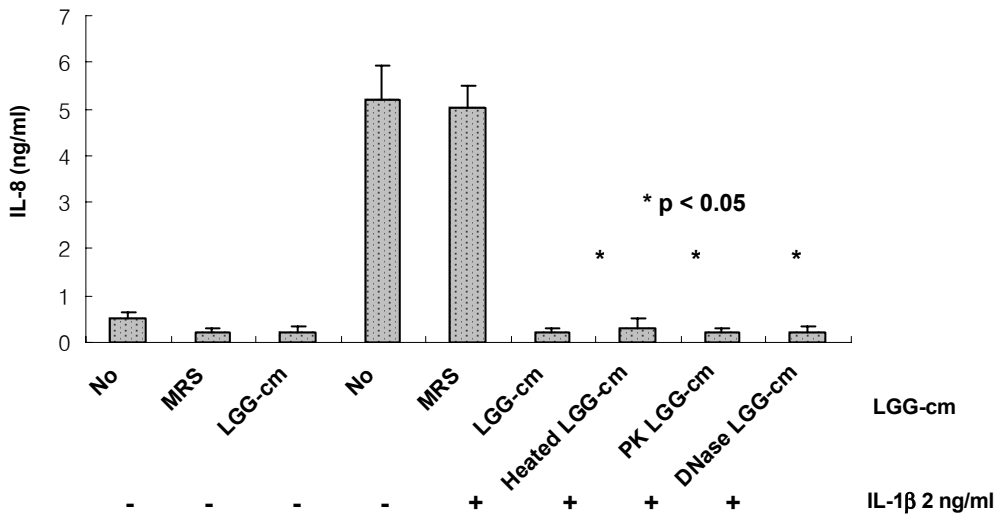


그림 9. IL-1 $\beta$  자극에 의한 IL-8 생성에 lactobacilli-cm이 미치는 영향. 네 가지 lactobacilli 균주 각각의 lactobacilli-cm 을 Caco-2 세포 배양액 양의 5%, 10%, 15% 부피로 전처리하였다. 이후 IL-1 $\beta$  를 처리하고 12시간 경과 후 IL-8 생성량을 측정하였다. MRS 배지 만을 전처리하였을 때는 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 생성을 억제하지 못했으나 lactobacilli-cm을 전처리하였을 때는 4가지 균주에서 모두 IL-8생성을 유의하게 억제하였다. (MRS: Man-Rogosa-Sharpe 배지).

## 9. LGG-cm의 조작이 LGG-cm의 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응에 미치는 영향

Lactobacilli-cm에 포함되어 있는 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응 억제물질의 성질을 규명하기 위하여 LGG-cm을 몇 가지 방법으로 조작한 후 Caco-2 세포에 전처리하여 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성에 미치는 영향을 알아보았다. LGG-cm을 열처리 후 전처리하여도 열처리하지 않았을 때와 같이 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성 억제 효과를 유지되었으며, proteinase K 혹은 DNase I을 처리한 후 전처리하였을 때도 IL-8 생성 억제 효과는 유지되었다(그림 10).



**그림 10.** LGG-cm의 조작이 LGG-cm의 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응에 미치는 영향. LGG를 MRS 액체 배지에서 24시간 배양시킨 후 얻은 LGG-cm을 몇 가지 방법으로 조작하여 Caco-2 세포에 배양액 양의 15% 부피로 전처리하였다. 이후 IL-1 $\beta$ 를 처리하고 12시간 경과 후 IL-8 생성량을 측정하였다. LGG-cm을 열처리 하거나 proteinase K 혹은 DNase I 처리 후에 전처리하여도 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성 억제 효과는 유지되었다. (MRS: Man-Rogosa-Sharpe 배지, Heated LGG-cm: 95 $^{\circ}$ C에서 15분 간 열처리, PK LGG-cm: proteinase K로 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 처리, DNase LGG-cm: DNase I으로 실온에서 30분간 처리)

#### IV. 고 찰

최근에 아토피, 급성 설사, 염증성장질환 등 염증성 질환의 치료 및 예방에 대한 probiotics의 효과를 제시한 여러 연구들이 보고되고 있으나 염증 억제 기전에 대한 연구는 매우 부족하며, 이에 연구자는 IL-1 $\beta$ 로 자극한 사람 대장암 세포(Caco-2 세포)를 이용하여 probiotics인 lactobacilli가 주로 염증의 초기반응에 관여하는 대표적 염증성 사이토카인인 IL-8의 생성과 그 중간 과정인 NF- $\kappa$ B 경로에 미치는 영향을 알아보고, 실제 염증을 억제하는 물질의 성질을 알아보았다.

Caco-2 세포에 4가지 종류의 lactobacilli를 전처리 하였을 때 세균의 농도에 비례하여 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성을 억제하였다(그림 2). 작용기전을 알아보기 위하여 IL-8 유전자 전사활성도를 측정한 결과 LGG가 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 유전자의 전사 활성도를 억제하였다(그림 3). 또한 LGG는 전사인자(transcription factor)인 NF- $\kappa$ B<sup>37</sup>의 활성도도 억제하였으며(그림 4) NF- $\kappa$ B 경로 중에 NF- $\kappa$ B가 핵내로 이동 하는데 관련되는 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 억제하였다(그림 5). 따라서 IL-1 $\beta$  자극한 Caco-2 세포에서 IL-8 생성에 대한 LGG의 억제 효과는 최소한 부분적으로는 NF- $\kappa$ B 경로의 억제를 통해 이루어진다는 것을 알 수 있었다.

특징적으로, 장점막으로 세균이 침투하면 NF- $\kappa$ B 의존 유전자를 활성화시킴으로써 면역반응을 일으키는데<sup>33-35</sup> 사람 장 상피세포에서 살아있는 비병원성 *Salmonella* 균주는 병원성 *Salmonella* 균주에 의해 유발된 IL-8 생성을 억제하였다.<sup>36</sup> 비병원성 *Salmonella* 균주는 NF- $\kappa$ B 경로 중 인산화된 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 ubiquitination 과정을 억제하여 I $\kappa$ B- $\alpha$ 가 분해되는 것을 억제함으로써 IL-8 생성을 억제한다. 이 연구에서 이용된 비병원성 *Salmonella* 균주는 I $\kappa$ B- $\alpha$ 나 mitogen activated protein kinase (MAPK)의 인산화 과정을 억제하지는 못 했는데 yeast probiotics인 *Saccharomyces bouladii*는<sup>38</sup> 사람 장 상피세포에서 NF- $\kappa$ B 경로 중 I $\kappa$ B- $\alpha$ 와 MAPK의 인산화

단계를 모두 억제하여 장출혈성 대장균에 의한 IL-8 생성을 억제하였다. 앞으로 lactobacilli가 MAPK 경로에 미치는 영향과 NF- $\kappa$ B 경로 중 어떤 단계를 억제하는지에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

LGG의 어떤 구성요소가 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성 억제 효과를 가지는지 알아보기 위해 몇 가지 방법으로 LGG를 조작하여 실험을 진행하였는데 LGG를 95 $^{\circ}$ C 또는 75 $^{\circ}$ C로 가온하였을 때는 IL-8 생성 억제 효과가 사라졌다. 하지만 항생제 혹은 4% formaldehyde로 처리하여 LGG의 구조를 그대로 유지하면서 사균 상태로 만들었을 때는 IL-8 생성 억제 효과가 유지되었다(그림 7). 또한 sonication을 한 후에 얻은 LGG debris도 IL-8 생성 억제기능을 가지는 것으로 보아 LGG의 생존 여부와는 상관 없이 LGG 구조를 이루는 열에 불안정한 어떤 물질이 IL-1 $\beta$  자극에 의한 IL-8 생성을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

한편 lactobacilli-cm도 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성을 억제하였다(그림 9). 그러나 LGG-cm을 가온하거나 proteinase K 혹은 DNase I을 처리하여도 억제 효과는 유지되었다(그림 10). 따라서 LGG를 배양시켰을 때 분비하는 IL-8 생성 억제 물질은 열에 안정하며 단백질이나 DNA가 아니라는 것을 알 수 있었다. 또한 이렇게 LGG가 배양액 내로 분비한 수용성의 IL-8 생성 억제 물질은 앞의 실험 결과에서 확인하였던 LGG 세균 구조 내에 포함되어 있는 IL-8 생성 억제 물질과 서로 다른 물질일 가능성이 있다는 것을 알 수 있었다.

Lactobacilli-cm은 lactobacilli가 대사 과정을 통해 생성한 젖산(lactic acid) 때문에 산성화 상태(pH 4.0-4.4)로 되어 있는데 이렇게 낮은 pH가 Caco-2 세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성을 억제할 가능성을 배제하기 위해 산성화시킨 MRS 배지를 전처리한 후 IL-1 $\beta$ 로 자극하였다. 여기서 산성화시킨 MRS 배지는 IL-1 $\beta$  자극에 의한 IL-8 생성을 억제하지 못하였다. 따라서 lactobacilli-cm의 낮은 pH와 lactobacilli-cm의 IL-8 생성 억제 기능은 상관이 없다는



것을 확인하였다.

사람 대장암 세포인 HT-29와 단핵세포인 THP-1 세포를 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ToxA (*Clostridium difficile* Toxin A) 혹은 LPS (lipopolysaccharides)로 자극하였을 때 *S. boulardii*를 배양한 배지로 전처리하면 IL-8 생성이 억제되며 이는 최소한 부분적으로는 NF- $\kappa$ B 경로를 통해 이루어진다. 또한 *S. boulardii* 배양 배지에 포함된 항염증 물질은 열에 안정하고 수용성이며 크기가 1kD 이하인 물질이라고 한다.<sup>39</sup> 생쥐 단핵세포인 RAW 264.7를 LPS로 자극하여 TNF- $\alpha$  생성을 유도하였을 때 LGG 배양 배지(LGG-cm)로 전처리하면 TNF- $\alpha$  생성이 억제되는데, LGG-cm을 95°C에서 열처리하거나 DNase I을 처리한 후 전처리하면 TNF- $\alpha$  생성 억제 효과가 유지되나 proteinase K로 처리한 후 전처리하면 이 억제 효과가 유의하게 감소되었다.<sup>40</sup> 하지만 본 연구에 의하면 LGG 배양액 내로 분비한 IL-8 생성 억제 물질은 열에 안정하며 DNase I 나 proteinase K로 처리한 후에도 효과가 유지되었다. 이전의 보고와<sup>40</sup> 본 연구 결과가 다른 이유는 실험에 사용한 세포가 다르기 때문일 수도 있겠지만 세포에 처리한 물질(LGG-cm)의 농도 차이에서 기인했을 가능성도 생각해 볼 수 있다.

이전에 본 연구 기관에서는 크론병을 포함한 일부 염증성 질환과 악성종양에서 항염증 효과<sup>41-44</sup> 및 신생혈관 형성 억제 효과<sup>45-47</sup>를 가지는 thalidomide를 이용하여 Caco-2 세포에서 NF- $\kappa$ B 경로의 억제를 통해 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성을 억제한다고 보고한 바 있다.<sup>48</sup> 하지만 thalidomide는 태아에서 단지증(phocomelia)을 유발하는 심각한 부작용 때문에 임상적 치료제로 적용하는데 어려움이 있는데 이에 비해 본 연구의 대상인 lactobacilli는 부작용이 거의 없다는 것이 큰 장점이라고 할 수 있다. 따라서 여러 가지 염증성 질환을 가진 환자에서 치료제로 적용하는 것이 다른 약물에 비해 빨리 이루어질 수 있으리라 생각한다.

본 연구와 같은 염증 억제 기전에 대한 연구는 정상 사람의 대장 상피세포를 이용하여 진행해야 좀 더 실제에 가까운 사람의 대장 점

막 내 상황을 대변할 수 있겠지만 세포를 배양하고 유지할 때 어려움 등으로 인해 본 연구에서는 사람 대장암 세포인 Caco-2 세포를 이용하였다. Caco-2 세포는 비록 암세포이지만 사람 장 상피세포와 같이 분화되고 극성(polarization)을 가지는 성질을 가지고 있기 때문에 대장질환과 관련된 많은 연구에서 이용되고 있으며,<sup>49</sup> lactobacilli에 대한 반응도 정상 사람 장 세포와 유사할 것이라 생각한다.

결론적으로 본 연구를 통하여 Caco-2 세포에서 LGG가 IL-1 $\beta$  로 유도한 IL-8 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, 이러한 효과는 최소한 부분적으로는 NF- $\kappa$  B 경로의 억제를 통해 이루어진다는 것을 알 수 있었다. 이렇게 IL-8 생성을 억제하는 기능은 LGG 세균 구조를 이루는 물질과 LGG가 대사를 통해 분비하는 물질 모두가 가지고 있으며 이 IL-8 생성 억제 물질의 성질이 서로 다르다는 것을 확인하였다. 따라서 LGG는 최소한 두 가지 다른 물질을 통해 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 생성을 억제할 것으로 생각되며 앞으로 이 물질을 밝히는 추가 연구가 필요할 것이다.

## V. 결 론

Caco-2 세포에서 IL-1 $\beta$  로 IL-8 생성을 유도하여 *L. casei rhamnosus* GG (LGG), *L. casei* YIT 9018, *L. acidophilus* HY2177, *L. casei* HY2743, 그리고 lactobacilli 배양 배지(lactobacilli-cm)가 IL-8 생성과 IL-8 gene의 전사활성도 및 NF- $\kappa$  B 활성도에 미치는 영향을 알아보았다. Lactobacilli의 생존여부가 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 생성에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 항생제, formaldehyde 또는 열처리한 LGG를 사용하였으며, lactobacilli의 어떤 구성성분이 IL-1 $\beta$  에 대한 반응에 영향을 미치는지 밝히기 위하여 LGG를 sonication하여 얻은 extract와 debris를 사용하였다. 또한 lactobacilli가 분비하는 물질이 IL-1 $\beta$  에 대한 반응을 억제하는지 알아보기 위하여 LGG 배양 배지(LGG-cm)를 사용하였으며 LGG-cm에 포함된 IL-1 $\beta$  에 대한 반응 억제물질의 성질을 규명하기 위하여 DNase I, proteinase K 또는 열처리한 LGG-cm을 전처리하고 IL-1 $\beta$  로 자극하여 IL-8 생성에 미치는 영향을 알아보았다.

1. Caco-2 세포에서 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 생성은 여러 종류의 lactobacilli, 즉 LGG, *L. casei* YIT 9018, *L. acidophilus* HY 2177 및 *L. casei* HY 2743에 의하여 유의하게 억제되었다.
2. LGG는 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 유전자의 전사 활성도와 NF- $\kappa$  B의 활성도를 농도의존적으로 억제하였으며, IL-1 $\beta$  에 의한 I- $\kappa$  B $\alpha$  분해를 억제하였다.
3. LGG를 가온하였을 때는 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8생성 효과가 소실되었으나 항생제 혹은 4% formaldehyde로 처리한 LGG는 IL-8 생성 억제 효과를 유지하였다.
4. LGG를 sonication 시킨 후 분리한 debris는 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8 생성 억제 효과를 보였으나 extract는 억제효과를 가지지 않았다. LGG debris의 IL-1 $\beta$  에 의한 IL-8생성 억제

효과는 LGG debris를 formaldehyde로 고정하여도 유지되었으나 열처리하면 소실되었다.

6. 실험에 이용한 4가지 lactobacilli-cm는 모두 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성을 억제하였으며, LGG-cm을 proteinase K, DNase I 또는 열처리하여도 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성 억제 효과는 유지되었다.

이상의 결과를 통하여 사람 장 상피세포(Caco-2 세포)에서 LGG가 IL-1 $\beta$ 로 유도한 IL-8 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, 이러한 효과는 최소한 부분적으로는 NF- $\kappa$ B 경로의 억제를 통해 이루어진다는 것을 알 수 있었다. 이렇게 IL-8 생성을 억제하는 효과는 LGG 세균 구조를 이루는 물질과 LGG가 대사를 통해 분비하는 물질 모두가 가지고 있으며 이 염증 억제물질의 성질이 서로 다르다는 것을 확인하였다. 따라서 LGG는 최소한 두 가지 다른 물질을 통해 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-8 생성을 억제할 것으로 생각되며 앞으로 이 물질을 밝히는 추가 연구가 필요할 것이다.

## 참고 문헌

1. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977;31:107-133.
2. Simon GL, Gorbach SL. The human intestinal microflora. *Dig Dis Sci* 1986;31:147S-162S.
3. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 1984;86:174-193.
4. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in' t Veld J. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 2001;41:85-101.
5. Schaafsma G. State of the art concerning probiotic strains in milk products. *Nutr Newsl* 1996;5:241-245.
6. Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Meuwissen SGM. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: Current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol* 2001;Suppl 234:29-40.
7. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 1998;42:2-7.
8. Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *Immunol Med Microbiol* 1999;26:137-142.
9. Lennard-Jones JE. Inflammatory bowel disease: medical therapy revisited. *Scand J Gastroenterol* 1992;Suppl 192:110-116.
10. Guarino A, Canani RB, Spagnuolo MI, Albano F, Di Benedetto L. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;25:516-519.

11. Maiamaa H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;20:333-339.
12. Mitra AK, Rabbani GH. A double-blind, controlled trial of bioflorin (*Streptococcus faecium* SF68) in adults with acute diarrhea due to *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Gastroenterology* 1990;99:1149-1152.
13. Siitonen S, Vapaatalo H, Salminen S, Gordin A, Saxelin M, Wikberg R, et al. Effect of *Lactobacillus* GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann Med* 1990;22:57-59.
14. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Elmer GW, Moyer KA, Melcher SA, et al. Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995;90:439-448.
15. Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, Bartolozzi F, Capelli G, Gasbarrini G, et al. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1461-1467.
16. D' Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *Br Med J* 2002;324:1361-1364.
17. Schellenberg D, Bonington A, Champion CM, Lancaster R, Webb S, Main J. Treatment of *Clostridium difficile* diarrhea with brewer's yeast. *Lancet* 1994;343:171-172.
18. Buts JP, Corthier G, Delmee M. *Saccharomyces boulardii* for *Clostridium difficile*-associated enteropathies in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;16:419-425.
19. Lewis SJ, Freedman AR. The use of biotherapeutic agents in the prevention and treatment of gastrointestinal disease.

- Aliment Pharmacol Ther 1998;12:807-822.
20. Pochapin M. The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea. *Am J Gastroenterol* 2000;95:S11-S13.
  21. Giaffer MH, Holdsworth CD, Duerden BI. The assessment of faecal flora in patients with inflammatory bowel disease by a simplified bacteriological technique. *J Med Microbiol* 1991;35:238-243.
  22. Fabia R, Ar' Rajab A, Johansson ML, Andersson R, Wille'n R, Jeppson B, et al. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in rats. *Digestion* 1993;54:248-255.
  23. Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel JF, Mizon J. Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn' s disease. *Dig Dis Sci* 1997;42:817-822.
  24. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44-54.
  25. Malin M, Suomalainen H, Saxelin M, Isolauri E. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn' s disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. *Ann Nutr Metab* 1996;40:137-145.
  26. Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001;121:580-591.
  27. Kruis W, Schutz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis.

- Aliment Pharmacol Ther 1997;11:853-858.
28. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon ATR. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. Lancet 1999;354:635-639.
  29. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn' s disease. Dig Dis Sci 2000;45:1462-1464.
  30. Malchow HA. Crohn' s disease and Escherichia coli. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn' s disease? J Clin Gastroenterol 1997;25:653-658.
  31. Ruseler-van Embden JGH, Schouten WR, van Lieshout LMC. Pouchitis: result of microbial imbalance? Gut 1994;35:658-664.
  32. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. Gastroenterology 2000;119:305-309.
  33. Boone DL, Lee EG, Libby S, Gibson PJ, Chien M, Chan F et al. Recent Advances in Understanding NF- $\kappa$  B Regulation. Inflamm Bowel Dis 2002;8:201-210.
  34. Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Fransozo G, Siebenlist U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. Science 1995;267:1485-1488.
  35. Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, et al. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. Genes Dev 1995;9:1586-1597.



36. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I $\kappa$ B- $\alpha$  ubiquitination. *Science* 2000;289:1560-1563.
37. Mukaida N, Okamoto SI, Ishikawa Y, Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 1994;56:554-558.
38. Dahan S, Dalmasso G, Imbert V, Peyron JF, Rampal P, Czerucka D. *Saccharomyces boulardii* interferes with Enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced signaling pathways in T84 cells. *Infect Immun* 2003;71:766-773.
39. Sougioultzis S, Simeonidis S, Bhaskar KR, Anton P, Pan A, Warny M, et al. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF- $\kappa$ B-mediated IL-8 gene expression. *Gastroenterology* 2003;125:606.
40. Peña JA, Versalovic J. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol* 2003;5:277-285.
41. Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, Baldwin AS Jr. Inhibition of NF- $\kappa$ B activity by thalidomide through suppression of I $\kappa$ B kinase activity. *J Biol Chem* 2001;276:22382-22387
42. Ginsburg PM, Dassopoulos T, Ehrenpreis ED. Thalidomide treatment for refractory Crohn's disease: a review of the history, pharmacological mechanisms and clinical literature. *Ann Med* 2001 Nov;33(8):516-525.
43. Bauditz J, Wedel S, Lochs H. Thalidomide reduces tumour necrosis factor alpha and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. *Gut*

- 2002;50:196-200.
44. Sabate JM, Villarejo J, Lemann M, Bonnet J, Allez M, Modigliani R. An open-label study of thalidomide for maintenance therapy in responders to infliximab in chronically active and fistulizing refractory Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1117-1124.
  45. Grover JK, Vats K. Thalidomide: from teratogen to anti-angiogenic. *Indian J Cancer* 2001;38:22-32.
  46. Bamias A, Dimopoulos MA. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. *Eur J Intern Med*. 2003;14:459-469.
  47. Kumar S, Witzig TE, Dispenzieri A, Lacy MQ, Wellik LE, Fonseca R, et al. Effect of thalidomide therapy on bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia* 2004;18(3):624-7.
  48. Jin SH, Kim TI, Han DS, Shin SK, Kim WH. Thalidomide suppresses the interleukin1 $\beta$ -induced NF $\kappa$ B signaling pathway in colon cancer cells. *Ann NY Acad Sci* 2002;973:414-418.
  49. Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, et al. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 1983;47:323-330.

## Abstract

### Effect of lactobacilli and lactobacilli-conditioned media on IL-1 $\beta$ induced IL-8 production in Caco-2 cells

Chang Hwan Choi

*Department of Medicine*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Won Ho Kim)

**Background:** Probiotics are live non-pathogenic organisms that belong to the resident microflora, and confer health benefits by multiple mechanisms. *Lactobacillus sp.* is one of the probiotic bacteria that ameliorates intestinal injury and inflammation caused by various stimuli. We aimed to evaluate the effect of lactobacilli and media conditioned by lactobacilli (lactobacilli-cm) on IL-1 $\beta$  -induced IL-8 production in Caco-2 cells, and to find out what components of lactobacilli have this effect.

**Methods:** Caco-2 cells were stimulated with IL-1 $\beta$  in the presence or absence of *L. casei rhamnosus* GG (LGG), *L. casei* YIT 9018, *L. acidophilus* HY2177, *L. casei* HY2743, or lactobacilli-cm. Production of the pro-inflammatory chemokine IL-8 was measured in supernatants by ELISA. Transcriptional activity of IL-8 gene and NF- $\kappa$ B-responsive gene were evaluated by transient transfection of luciferase reporter gene. The effect on I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation was evaluated by western blot. To determine the nature of immunomodulatory molecules, LGG was modified to the following: antibiotics (penicillin and

streptomycin) treatment, 4% formaldehyde treatment at 4°C, 15 min heating at 95°C, or sonication. Conditioned media was subjected to the following: 15 min heating at 95°C, 30 min DNase I treatment at room temperature, or 60 min digestion at 37°C with proteinase K followed by a 10 min heat inactivation at 95°C.

**Result:** We demonstrated that the pretreatment of LGG, *L. casei* YIT 9018, *L. acidophilus* HY2177, and *L. casei* HY2743 inhibited IL-1 $\beta$  -induced IL-8 production in Caco-2 cells (by 97%, 55%, 95%, and 95%, respectively;  $p < 0.01$  for each). LGG, dose dependently, attenuated the IL-1 $\beta$  -induced transcriptional activation of IL-8 gene and NF- $\kappa$  B responsive gene. LGG also attenuated IL-1 $\beta$  -induced I- $\kappa$  B $\alpha$  degradation. Formaldehyde-fixed or antibiotics-treated LGG maintained the inhibitory effect, but heated LGG lost this effect. Sonicated LGG debris had similar inhibitory effect with whole LGG. LGG-conditioned media attenuated the IL-1 $\beta$  -induced IL-8 production and this effect was maintained after heating, and proteinase K or DNase I treatment.

**Conclusion:** Lactobacilli inhibited the IL-1 $\beta$  -induced IL-8 production in Caco-2. This attenuation was at the transcriptional level, at least in part, via inhibition of the NF- $\kappa$  B signaling pathway. Both structural material of lactobacilli and soluble factor secreted from lactobacilli inhibited the IL-1 $\beta$  -induced IL-8 production, and they might be different substances.

---

Key Words : lactobacilli, lactobacilli-conditioned media, IL-8