

ORIGINAL ARTICLE

Lipopolysaccharide로 유도된 HT-29 세포주의 염증에서 *Lactobacillus rhamnosus* GG의 항염증 작용과 기전

이상길, 양경민, 천재희, 김태일, 김원호

연세대학교 의과대학 내과학교실, 소화기병 연구소

Anti-inflammatory Mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Lipopolysaccharide-stimulated HT-29 Cell

Sang Kil Lee, Kyung Min Yang, Jae Hee Cheon, Tae Il Kim and Won Ho Kim

Department of Internal Medicine, Institute of Gastroenterology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background/Aims: Probiotics are live non-pathogenic organisms that belong to the resident microflora, and confer health benefits by multiple mechanisms. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) is one of the probiotic bacteria that ameliorates intestinal injury and inflammation caused by various stimuli. We aimed to evaluate the anti-inflammatory effect and mechanism of LGG in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated HT-29 cells.

Methods: HT-29 cells were stimulated with interleukin (IL)-1 β (2 ng/mL), tumor necrosis factor (TNF)- α (20 ng/mL), and LPS (20 μ g/mL) in the presence or absence of LGG (10^7 - 10^9 colony forming units/mL). Production of the pro-inflammatory chemokine IL-8 was measured by ELISA and semi-quantitative PCR. Transcriptional activity of NF- κ B-responsive gene was evaluated by luciferase assay with reporter gene. Toll-like receptor 4 (TLR4) mRNA expression was assessed by semi-quantitative PCR. The I κ B α degradation was evaluated by western blot and intranuclear translocation of NF- κ B was determined by western blot and immunofluorescence.

Results: LGG did not affect the viability of HT-29 cells. Pretreatment of HT-29 cells with LGG significantly blocked TNF- α , and LPS induced IL-8 activation at both mRNA and protein level ($p < 0.05$). Pretreatment of HT-29 cells with LGG attenuated LPS-induced NF- κ B nuclear translocation and also blocked LPS-induced I κ B α degradation. LGG also down-regulated TLR4 mRNA activated by LPS.

Conclusions: LGG attenuates LPS induced inflammation, and this may be associated with TLR4/NF- κ B down-regulation. (Korean J Gastroenterol 2012;60:86-93)

Key Words: *Lactobacillus rhamnosus*; Lipopolysaccharides; NF- κ B

서론

프로바이오틱(probiotic)은 사용하였을 때에 인간에게 좋은 영향을 미치는 미생물로 다양한 종류들이 실제로 사용되고 있다.¹ 대장 질환에서 프로바이오틱은 다양한 효능을 가질 수 있는데, 이는 프로바이오틱이 인공적인 부산물이 아니라 천연

물이고 또한 직접, 간접적으로 많은 질환의 원인이 되는 상재 균들을 조절할 수 있다는 점 때문이다.² 장내에서의 보고된 프로바이오틱의 작용기전으로는 직접 혹은 간접적으로 병원균의 성장을 방해하거나,³⁻⁵ 점막장벽의 기능을 강화시켜서 병원균이 침투하지 못하게 하거나,⁶ 장상피세포나 점막연관 림프조직의 면역기능을 조절하는 것이다.^{7,8}

Received March 2, 2012. Revised May 30, 2012. Accepted May 31, 2012.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

교신저자: 이상길, 120-752, 서울시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 의과대학 내과학교실

Correspondence to: Sang Kil Lee, Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea. Tel: +82-2-2228-1996, Fax: +82-2-393-6884, E-mail: sklee@yuhs.ac

Financial support: This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD, Basic Research Promotion Fund) (KRF-2007-331-E00065) and the Yonsei University College of Medicine, Internal Medicine Research Grant (7-2006-0177). Conflict of interest: None.

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)는 요구르트의 형태로 오래 전부터 식품으로 사용되어 왔다. 임상적으로는 소아에서의 설사, 여행자 설사, 항생제 연관 설사 등에 이미 효과가 알려져 널리 사용되고 있고, 궤양성 대장염의 관해를 유지시키는 데에도 효과가 보고되었다.^{9,10} 더불어 염증성 장질환 증 동물 모델에서도 LGG의 항염증 효과가 보고되고 있어 염증성 장질환의 치료관점에서 LGG가 많은 관심을 받고 있다.¹¹ 그러나 최근의 프로바이오틱의 궤양성 대장염의 관해 유지에 대한 임상연구를 메타분석한 결과에 의하면 아직까지도 효능에 대해서 확신하기는 어렵다고 결론내리고 있다.¹² 따라서 LGG를 비롯한 프로바이오틱의 치료효과와 기전에 대한 더 많은 연구가 필요하다.

박테리아의 Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성 박테리아(gram-negative bacteria)의 주요한 표면 요소로 toll-like receptor 4 (TLR4)에 의해 인지되고 장내 환경에서 주요한 염증 원인으로 작용한다.¹³ TLR4를 통한 염증반응의 과정은 완전히 알려져 있지는 않지만 전사 인자인 NF- κ B 조절회로에 관여하는 것으로 알려져 있는데, 이를 통해서 미생물 살해 시스템의 변화, 염증성 사이토카인과 키모카인의 생산과 분비, 효과적인 T 세포 활성화에 필수적인 보조 수용체 발현의 향상과 아라키돈산(arachidonic acid) 신진 대사물질의 생산 증가를 유도한다.¹⁴ 이러한 TLR4를 통한 선천 면역(innate immunity)은 감염에 대한 숙주 보호에 절대적으로 필수적이지만, 조절이 되지 않을 때는 염증성 질환의 원인이 되기도 한다.¹⁵ 실제로 크론병이나 궤양성 대장염에서 조절되지 않는 TLR4를 통한 염증반응이 중요한 기전으로 인정되고 있다.¹³ 현재까지 프로바이오틱과 여러 종류의 TLR의 발현의 연관성에 관한 연구는 진행이 되었으나 이를 통한 작용 기전에 관한 연구는 제한적이다.

이번 연구는 LGG로 전처치된 장상피세포주에서 매개체 유도성 염증반응이 감소되는지와 LPS 자극에 의한 TLR/NF- κ B 경로가 억제되는지를 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 세포와 실험 약물

대장암 세포주인 HT-29 (ATCC HTB 38)과 SW480 (ATCC CCL 228)은 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)으로부터 구입하였으며, 각각 100 IU/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin 및 10% 우태아 혈청이 포함된 McCoy's 5A 배지(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)와 RPMI 배지(Gibco-BRL)를 이용하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다. 모든 실험은 HT-29 세포를 1×10^4 /well의 농도로 6 well plate (Coster, Cambridge,

MA, USA)에 도포한 후 24시간 뒤에 시행하였다. HT-29 세포의 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 tumor necrosis factor- α (TNF- α ; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 20 ng/mL, interleukin-1 β (IL-1 β ; Sigma) 2 ng/mL, *Escherichia coli* (serotype 0111: B4)의 LPS (Sigma) 20 μ g/mL를 각각 4시간 처리한 후 세포와 상층액을 회수하였다.

2. LGG의 처리

이번 실험에 사용된 *Lactobacillus* strains은 LGG (ATCC 53103)로서 Man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 부유시킨 후에, MRS agar plate에 접종해서 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다. MRS agar plate에서 배양된 각각의 colony들은 다시 10 mL의 MRS broth로 옮겨져 15시간 배양하였다. 이후에 600 nm의 파장에서 분광광도계(UV 1601; Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 세균수를 측정하였다. LGG를 MRS broth로부터 분리하기 위해서 원심분리(3,000 rpm, 15분)한 후에 세척하고 항생제가 포함되지 않은 10 mL의 McCoy's 5A 배지에 풀었다. LGG의 생균은 HT-29 세포에 배양액 당 10^7 , 10^8 과 10^9 colony forming units (CFU)의 농도로 처리하였다. LGG는 다른 세균감염이 있는지를 관찰하기 위해서 분리 후에 일부를 MRS broth와 agar plate에 계속 배양하였다.

3. MTT assay

LGG가 HT-29 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해서 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide assay (MTT assay)를 시행하였다. 1×10^4 /well 농도로 HT-29 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 LGG를 배양액당 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 과 10^{10} CFU의 농도로 처리하였다. 배양액을 제거한 후 50 μ L의 MTT 용액(2 μ g/mL)을 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거하고 50 μ L의 dimethyl sulfoxide를 첨가한 후 10분간 진탕하고 570 nm에서의 optical density를 측정하였다.

4. IL-8에 대한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

IL-8 단백질은 R&D Systems사(Minneapolis, MN, USA)에서 구입한 ELISA kit를 이용하여 450 nm 파장에서 ELISA reader (Gibco-BRL)로 측정하였다.

5. Semi-quantitative polymerase chain reaction (PCR)

Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 HT-29 세포로부터 RNA를 추출하였다. cDNA 합성을

위해서 1 μ g의 RNA에 10 mM dithiothreitol, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 μ M dNTPs, 10 U RNase inhibitor, random primer (0.05 μ M)와 200 U Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen)를 첨가하여 반응시켰다. PCR은 1 μ g c-DNA와, 2.5 mM dNTP, 1 \times PCR buffer, 10 pmol primer, 그리고 1.5 U Ex Taq Polymerase (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하였고 95°C에서 5분, 58°C에서 45초와 72°C에서 1분의 조건으로 총 32-38회의 증폭을 시행하였다. PCR 반응의 확인을 위해 PCR 산물 10 μ L를 2% agarose gel을 이용하여 전기영동하였으며 ethidium bromide로 염색하였다. 각 샘플의 RT-PCR 산물은 동일한 샘플이 나타내는 GAPDH 유전자의 PCR 산물의 농도를 이용하여 densitometry (Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용해서 보정한 후에 분석하였다. 사용된 primer는 다음과 같다; [human TLR4 (438 bp), 5'-TGTCCTGAACCTATGAAC-3'sense, 5'-GCCTTTTGAGAGATTTGAGT-3' anti-sense; IL-8 (965 bp), 5'-CTCTCTTGGCAGCCTTCC-3'sense, 5'-CTCAATCACTCTCAGT-TCTTTG-3' anti-sense; and GAPDH (200 bp), 5'-TCTA-GACGGCAGGTCAGGTC-3' sense, 5'-ACCCAGAAGAC-TGTGGATGG-3' anti-sense].

6. NF- κ B luciferase 분석

LGG의 NF- κ B 전사에 대한 영향을 보기 위해서 SW480 세포를 NF- κ B binding site를 포함한 HIV-1 long-terminal repeat luciferase construct와 보정을 위해서 pCMV- β -gal

plasmid를 transient transfection시켰다. Transfection은 LipofectAMINE PLUS reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하였다. 모든 transfection은 6 well plate에서 70% confluence 상태에서 시행하였다. Transfection 24시간 이후에 LGG를 1시간 전처리하고 LPS 20 μ g/mL를 4시간 처리 후에 firefly luciferase 활성도를 luciferase reporter assay system (Promega, Madison, WI, USA)를 이용해서 측정하였다. β -galactosidase enzyme assay system (Promega)을 이용해 β -galactosidase 활성도를 측정한 후 luciferase 활성도를 보정하였다.

7. 세포분획과 Western blot

세포질과 핵을 분획해서 단백질을 얻기 위해서 HT-29 세포를 plate로부터 trypsin을 이용해 분리한 후에 100 μ L의 hypotonic buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 2.0 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 5% glycerol)와 inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL aprotinin)를 처리하고 얼음에서 10분 반응시키고 원심분리(3,500 rpm, 5분, 4°C)를 이용해서 핵과 세포질 분획을 분리하였다. 핵은 buffer B (10 mM HEPES, pH 7.9, 20 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT), buffer C (20 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 25% glycerol)와 inhibitor를 처리한 후에 원심분리(14,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 상층액을 취하였다. Whole cell lysates를 위해서는 50 mM pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl₂,

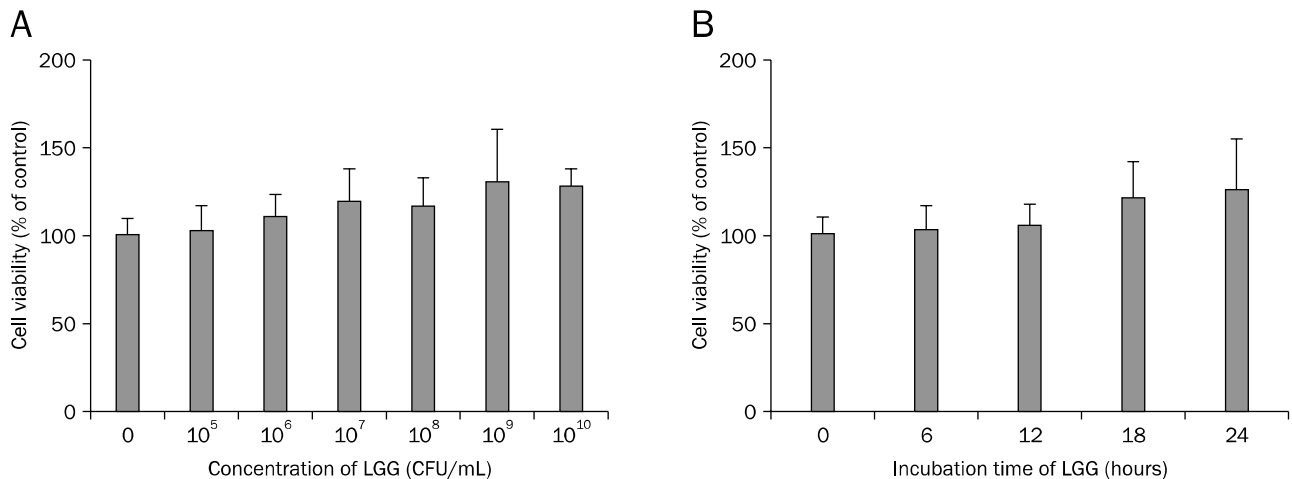


Fig. 1. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) did not affect the viability of HT-29 cell. HT-29 cells were seeded at the density of 1×10^4 cells/well in 6-well plates and maintained in the medium with 10% FBS for 24 hours. (A) LGG were added to the HT-29 cell culture wells at the appropriated dilution to reach a final concentration of 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , and 10^{10} colony forming units (CFU) per mL of the incubation medium without antibiotics. After 4 hours incubation, cell viability was determined by MTT assay. (B) The 10^9 CFU/mL concentration of LGG were added to HT-29 cell culture well and incubated with various time intervals (6, 12, 18, and 24 hours). Data are the mean of triplicate assays and represent the relative viability compared to untreated controls.

1 mM DTT, 0.5% triton X-100과 protease inhibitors를 이용하였고, 단백질 농도는 Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하였다. Western blot을 위해서 세포 전체(50 µg), 세포질(40 µg)과 핵(10 µg) 용해물을 denature시킨 후에 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels에 부과하고 polyvinylidene difluoride로 전이시켰다. 이후에 tris-buffered saline with 0.05% Tween-20와 5% 무지방 분유로 차단한 후에 anti-IκBα antibody (1 : 1,000; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA)와 anti-NFκB antibody (1 : 1,000; Santa Cruz Biotechnologies)를 처리하였다. 동량의 단백질이 전개되었는지의 여부는 anti-β-actin 항체(Sigma)를 통하여 확인하였다. 2차 항체 처리 후 ECL-kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)를 이용해서 band를 검출하고 densitometry를 이용해 정량

화하였다.

8. 면역형광염색

HT-29 세포는 3% formaldehyde를 처리한 후에 3분간 상온에 반응하고 acetone/methanol (50% v/v)를 이용해서 고정하였다. 3% BSA를 포함한 PBS로 세포를 차단한 후에 anti-NFκB antibody를 4°C에서 반응시켰다. 이후에 2차 항체 (anti-mouse FITC conjugated)와 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)를 1시간 반응시킨 후에 confocal microscopy (TCSNT; Leica, Switzerland)을 이용해 관찰하였다.

9. 통계 분석

통계 분석은 SPSS version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였고, 모든 결과는 평균 표준편차로 표시하였

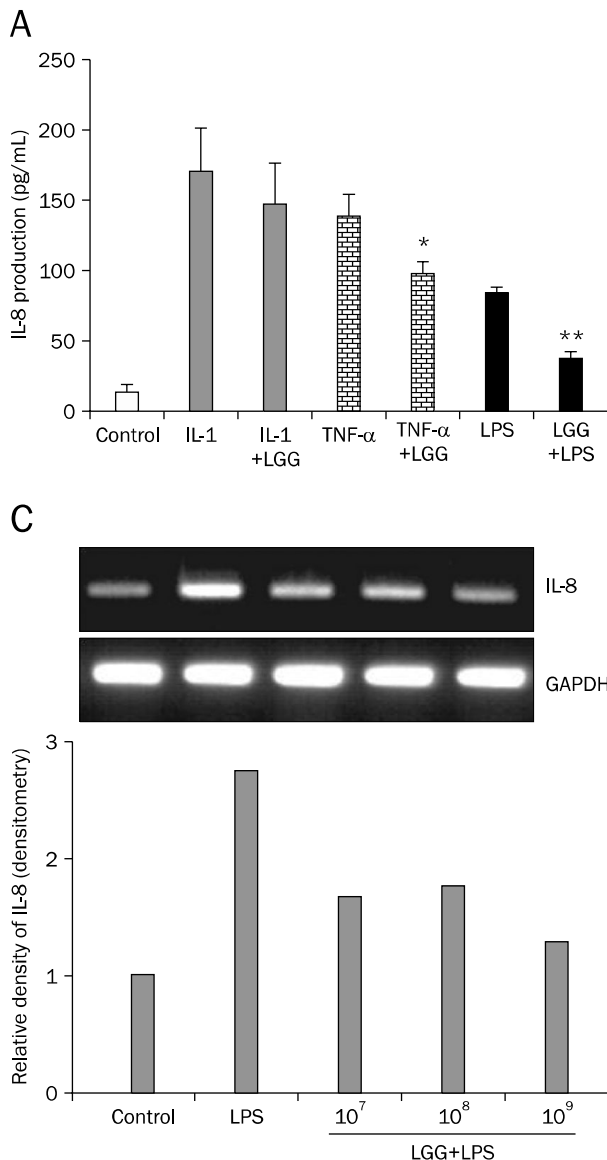


Fig. 2. Attenuation of tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β, or lipopolysaccharide (LPS)-mediated suppression of IL-8 expression by *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) in HT-29 cells. (A) HT-29 cells were pre-incubated with LGG (1×10⁹ colony forming units [CFU]/well) for 1 hour before treatment with 20 ng/mL of TNF-α, 2 ng/mL of IL-1β, and 20 µg/mL of LPS. Supernatant were harvested for IL-8 ELISA. (B) HT-29 cells were pre-incubated with different concentration of LGG (1×10⁷, 1×10⁸, and 1×10⁹ CFU/mL) for 1 hour before treatment with 20 µg/mL of LPS. Supernatant were harvested for IL-8 ELISA. (C) Cells were harvested for RT-PCR analysis of IL-8 mRNA expression. GAPDH expression was used as control. The increases in the percentages of IL-8 mRNA expression were quantified by densitometric analysis. *p < 0.05, **p < 0.01 in Mann-Whitney U test.

다. 두 군 간의 비교는 Mann-Whitney U test를 이용하였으며, p값이 0.05 미만인 경우 유의하다고 평가하였다.

결 과

1. LGG가 HT-29 세포의 생존에 미치는 영향

MTT assay를 이용하여 LGG의 처리농도 및 시간에 따른 HT-29 세포생존의 변화여부를 분석하였다. 먼저 LGG의 처리농도에 따른 영향을 파악하기 위해 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/mL의 농도로 4시간 배양한 경우에서도 뚜렷한 세포생존의 변화는 없었다(Fig. 1A). LGG 처리시간에 따른 영향을 파악하기 위하여 1×10^9 CFU/mL의 농도로 6-24시간 배양한 후 세포생존을 조사하였으나 처리하지 않은 대조군에 비하여 현저한 차이는 없었다(Fig. 1B).

2. LGG가 IL-1 β , TNF- α , LPS에 의한 IL-8 생성에 미치는 영향

IL-1 β , TNF- α 와 LPS에 의한 IL-8 단백질 발현 변화에 LGG의 전처치가 미치는 영향을 ELISA를 이용해서 분석하였다. HT-29 세포에 IL-1 β (2 ng/mL), TNF- α (20 ng/mL)와 LPS (20 μ g/mL) 각각을 4시간 동안 처리하였을 때 IL-8 단백질 발현이 증가되었다(Fig. 2). 그러나 IL-1 β , TNF- α , LPS 투여 1시간 전에 LGG를 1×10^9 CFU/mL의 농도로 전처리할 경우 IL-1 β , TNF- α , LPS에 의한 IL-8 발현 증가가 감소되었고, 이중 TNF- α , LPS에 의한 IL-8 상승은 통계적으로 의미있게 억제되었다(Fig. 2A). 특히 LGG는 용량 의존적으로 LPS에 의한 IL-8 단백질 상승을 억제하였고, 1×10^9 CFU/mL의 농도에서는 통계적으로 의미있는 차이를 보였다(Fig. 2B). LGG는 LPS에 의한 IL-8 mRNA의 발현 증가도 억제하였다(Fig. 2C).

3. LGG가 IL-1 β , TNF- α , LPS에 의한 TLR4 발현 변화에 미치는 영향

IL-1 β , TNF- α , LPS에 의한 TLR4의 발현 변화와 이에 대한 LGG의 역할을 보기 위해서 TLR4 mRNA에 대한 정량적 PCR을 하였다. HT-29세포에서 TNF- α 는 TLR4의 발현을 변화시키지 않았으나, LPS는 TLR4를 현저히 증가시켰다(Fig. 3). 그리고 LGG를 농도별로 전처리하였을 때에는 LPS에 의한 TLR4의 증가는 감소하였다. IL-1 β 도 TLR4를 증가시켰으나 LPS에 비해서는 정도가 적었으며, LGG를 전처리하였을 때에도 TLR4의 증가가 일부 감소함을 보였다.

4. LGG가 LPS에 의한 NF- κ B 발현 변화에 미치는 영향

NF- κ B에 대한 LGG의 작용기전을 분석하기 위해서 NF- κ B

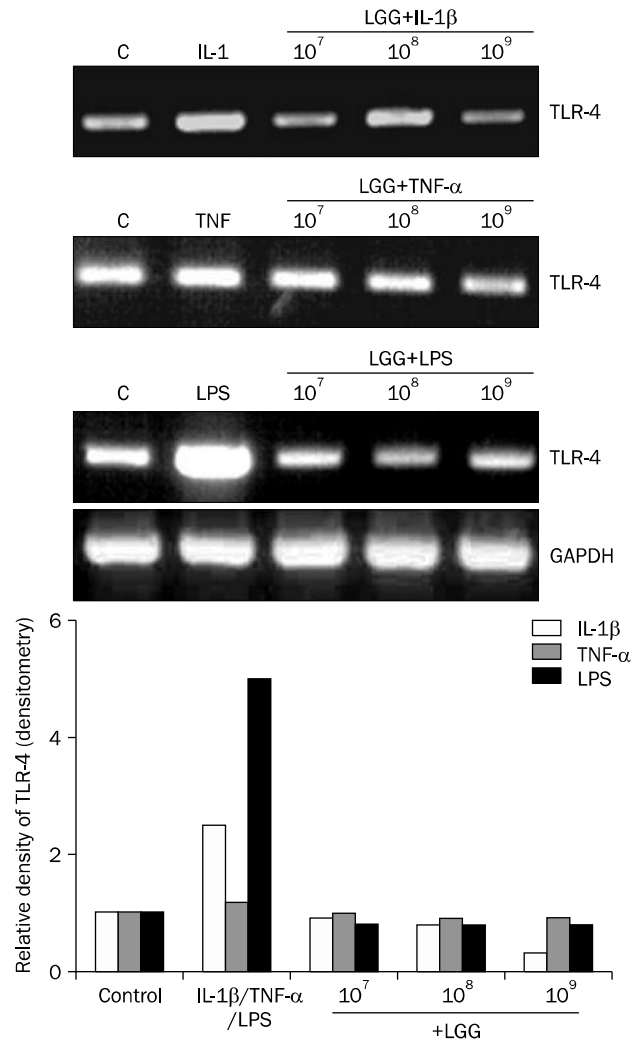


Fig. 3. Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-mediated induction of TLR4 expression by *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) in HT-29 cells. HT-29 cells were pre-incubated with different concentration of LGG (1×10^7 , 1×10^8 , and 1×10^9 CFU/well) for 1 hour before treatment with 20 ng/mL of tumor necrosis factor (TNF)- α , 2 ng/mL of interleukin (IL)-1 β , and 20 μ g/mL of LPS. Cells were harvested for RT-PCR analysis of toll-like receptor 4 (TLR4) mRNA expression. GAPDH expression was used as control. The increases in the percentages of TLR4 mRNA expression were quantified by densitometric analysis.

promoter assay, 핵과 세포질 분획에 대한 NF- κ B/p65, I κ B α 에 대한 Western blot과 NF- κ B/p65에 대한 면역형광염색을 하였다. LPS를 NF- κ B promoter가 transfection된 SW480세포에 처리하였을 때 NF- κ B luciferase 활성도는 의미있게 증가하였고, LGG를 전처리하면 감소하였다(Fig. 4A). HT-29 세포를 LPS로 자극하였을 때에 핵 내의 뚜렷한 NF- κ B/p65 증가 소견을 보였다. 그러나 LGG를 전처리하였을 때에는 LPS만 처리한 경우에 비해서 60분 이후의 시점에서 NF- κ B/p65의 핵내 증가소견이 감소되었고 I κ B의 붕괴가 감소되었다

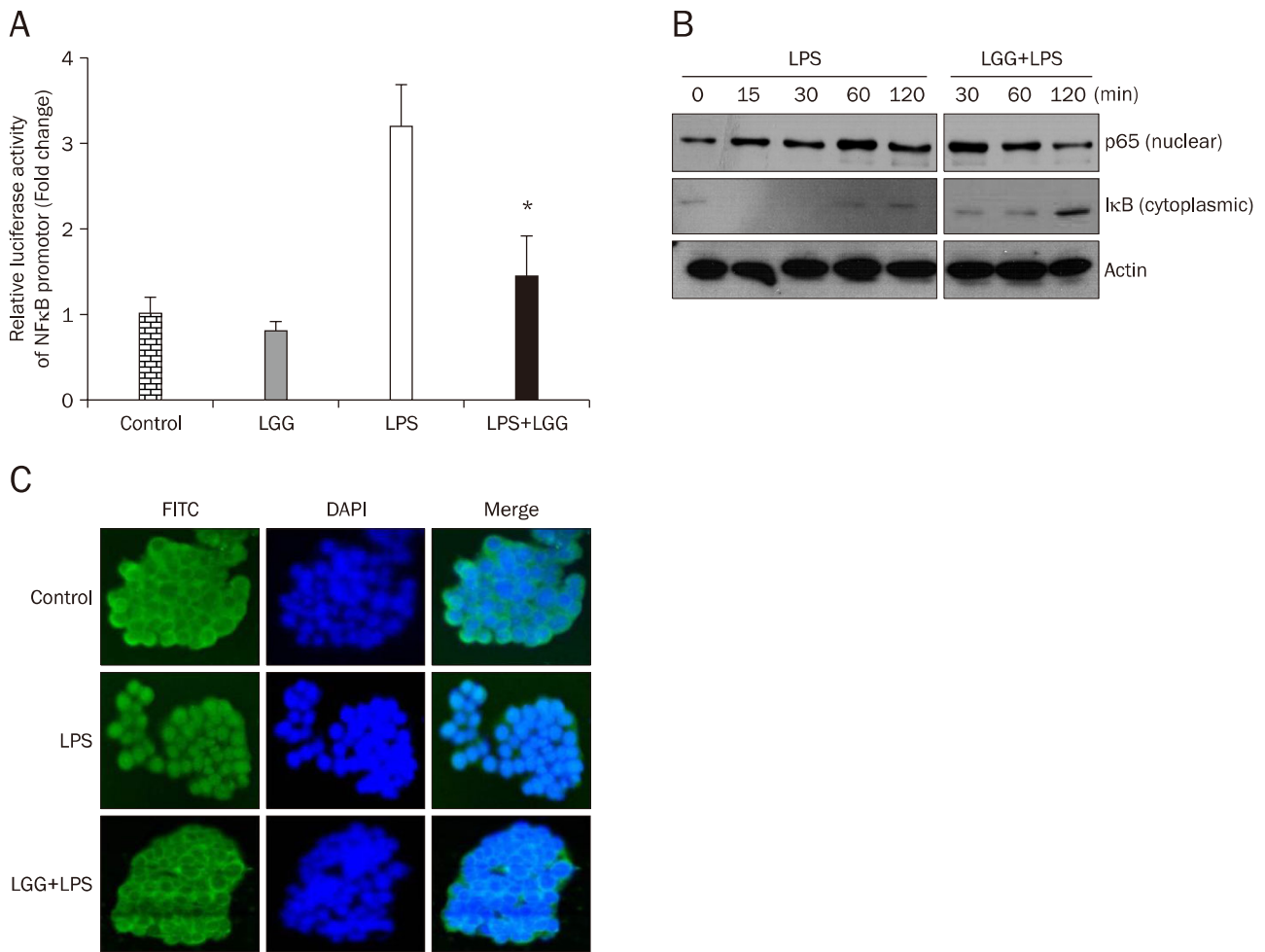


Fig. 4. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) on NF-κB transcriptional activation induced by lipopolysaccharide (LPS). (A) SW480 cells were cotransfected with an HIV-1 long-terminal repeat luciferase construct containing NF-κB binding sites and pCMV β-gal plasmid. pCMV β-gal served as a marker of transfection efficiency. Cotransfected cells were stimulated with LPS (20 μg/mL) with or without pretreatment of LGG (1×10^9 colony forming units [CFU]/mL), and NF-κB-dependent luciferase activity was measured 4 hours after stimulation. Data represent the mean with SEM and are expressed as fold increase over the media control cells. Results are expressed as means of triplicate determinations and are representative of three independent experiments. * $p < 0.05$ compared with LPS-stimulated cells without LGG. (B) HT-29 cells were lysed at different times (15, 30, 60 and 120 minutes) after LPS (20 μg/mL) stimulation with or without pretreatment of LGG (1×10^9 CFU/mL). Nuclear and cytoplasmic fractions were separately prepared for Western blot. Samples were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with anti-NFκB/p65, anti-IκBα antibody and an anti-β-actin antibody for control. (C) HT-29 cell were plated in 4-chamber slides, grown to 70% confluence, and pre-treated with or without LGG (1×10^9 CFU/mL). LPS (20 μg/mL) was added to the medium and incubation continued for 4 hours. Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated secondary antibody and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used for immunofluorescence. DAPI staining served to visualize the nucleus ($\times 500$). These results are representative of three independent experiments.

(Fig. 4B). 면역형광염색으로 p65 NF-κB를 관찰하였을 때에 LGG 처리는 LPS에 의한 p65 NF-κB의 핵과 세포질 분획간 분포 변화를 억제하였다(Fig. 4C).

고 찰

프로바이오틱은 예로부터 사용되어 왔고 안전하다고 인식되어 있기 때문에 여러 종류의 소화기질환에서 보조적 혹은 대체적인 요법으로 각광을 받고 있다. 최근 들어서는 다양한

형태로 상용화가 되었고 사용이 늘어나고 있는 추세이다. 여러 프로바이오틱 중에서도 *Lactobacillus*는 전통적으로 발효를 근간으로 하는 식품 산업 분야에서 사용되어 왔으며, 대표적인 종류로는 *Lactobacillus casei*, *L. bulgaricus*와 *L. acidophilus*를 들 수가 있다.¹ 그러나 이러한 균주들은 사람의 장내에서는 생존가능성이 낮아서 유익한 영향을 줄 수 없는 것으로 알려져 있다. Gorbach¹⁶는 처음으로 건강한 사람의 대변에서 다양한 종류의 *Lactobacillus*를 채취하여 사람의 건강에 도움을 줄 수 있는 균주를 찾는 연구에 착수하였다.

그 연구의 결과로 위산에도 죽지 않고 인체의 장내에서도 생존이 가능하며 독성균(pathogen)에 대한 치료효과를 보이는 물질(antimicrobial substance)을 생산할 수 있는 LGG를 분리하였다. 이후로부터 LGG는 여행자 설사, 소아 설사등의 질환에 쓰이기 시작하였고 최근에는 염증성 장질환에도 시도되어 임상적 효과가 보고되었으나, 그 기전에 대해서는 아직 알려진 것이 적다.¹⁷

이번 연구에서는 LGG의 항염증 효과와 작용 기전을 알아보기 위하여 IL-1 β , TNF- α , LPS를 이용하여 HT-29 대장암 세포주를 자극하고 염증반응 매개체인 IL-8의 발현을 분석한 후에, LPS의 염증반응과 연관된 TLR4와 NF- κ B의 경로를 분석하였다. 연구 결과 LGG는 LPS로 유발된 IL-8 생성을 의미 있게 감소시켰다. Jones 등¹⁸도 비병원성 *Salmonella*는 I κ B α 의 파괴를 막아서 2차적인 NF- κ B의 핵 내로의 이동을 억제하는 것을 보고하였다. 또한 같은 연구에서 비병원성 *Salmonella*는 I κ B α 와 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 인산화를 억제하지는 않았지만, *Saccharomyces bouladii*는 I κ B α 와 MAPK의 인산화를 억제하여 프로바이오틱 균주에 따라서 다양한 작용기전이 있음을 보고하였다.

이번 연구에서 LGG는 특히 LPS에 의한 염증반응에 대해 의미있는 억제 효과를 보였다. LGG가 LPS에 의해서 유발된 TLR4의 과발현을 의미있게 감소시키고 또한 LPS에 의한 p65 NF- κ B의 핵내로의 이동과 promoter 활성을 억제하며 I κ B 단백질의 인산화도 억제한다는 것을 확인하였다. 최근 나온 LGG의 기전에 관한 연구에서도 열가열로 불활성화한 LGG도 TLR-4의 발현을 억제하였으며,¹⁹ *Vibrio cholerae*에 의한 염증반응도 감소시켰다.²⁰ LGG는 INF- γ , TNF- α 에 의한 염증반응과 세포 장벽기능저하(barrier dysfunction)를 역전시켰고, 이에 NF- κ B 경로가 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다.²¹ 또한 LGG는 TLR-4 이외의 다른 종류의 TLR-2, 9의 발현도 조절할 수 있는 것으로 보고되었다.²² TLR4는 박테리아의 LPS를 인식하는 pattern recognition receptors의 일종으로 장상피세포에 존재한다. TLR4는 활성화를 위해서는 MD-2, CD14와 LPS binding protein과 같은 보조적 물질이 필요하다. 중요한 기능으로는 정상적으로 존재하는 세균에 대해서는 면역 관용(tolerance)을 보이고 병원균에 대해서는 적절한 면역반응을 하는 것이다.¹³

LGG가 장내 염증 반응의 조절에 있어 TLR4의 발현을 조절할 수 있다는 것은 많은 점을 시사한다. 크론병과 궤양성 대장염을 비롯한 염증성 장질환의 발병기전 중에서 장내 세균에 대한 조절되지 않는 면역반응이 중요한 것으로 알려져 있다.²³ 이는 장내 세균의 LPS에 대한 TLR4의 조절되지 않은 반응으로 표현이 되는데, 실제 염증성 장질환 환자의 조직에서 정상인에 비해서 증가된 TLR4가 보고되었다.²⁴ 이번 연구

에서 LGG는 특이적으로 LPS에 의한 TLR4의 과형성을 억제 하였으므로 LGG가 임상적으로 흔한 감염성 설사뿐만 아니라 염증성 장질환에도 시도될 수 있다는 실험적 근거를 보여준다. 이번 연구결과에서 장상피 세포에서 LGG의 항염증 효과는 TLR4/ NF- κ B pathway의 억제를 통하여, 이는 위장관에서 장점막 세포와 유해한 박테리아 사이의 면역 조절에 있어서 분자적 신호 전달 체계의 기초를 제공하리라 기대한다.

요 약

목적: *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG)는 설사를 비롯한 다양한 소화기 질환에 이용되고 있는 프로바이오틱의 일종이다. 그러나 임상적 유용성에도 불구하고, LGG의 작용 기전에 대해서는 많이 알려져 있지 않다. 저자들은 대장암세포주에서 LGG의 항염증 작용 기전을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: 염증반응을 유발하기 위해서 대장암 세포주인 HT-29 세포에 IL-1 β (2 ng/mL), TNF- α (20 ng/mL)와 Lipopolysaccharide (LPS) (20 μ g/mL)를 처리하였고, LGG (10^7 - 10^9 CFU/mL)를 농도별로 전처리한 후에 IL-8 mRNA와 단백질 발현을 ELISA와 semi-quantitative PCR로 측정하였다. LGG의 작용기전을 알기 위해 TLR4에 대한 semi-quantitative PCR을 시행하였고, NF- κ B와 I κ B에 대한 Western blot과 NF- κ B promoter에 대한 luciferase activity를 측정하였다.

결과: LGG는 HT-29 세포의 생존에 영향을 미치지 않았다. HT-29 세포주에서 IL-1 β , TNF- α 와 LPS 처리는 IL-8 발현을 증가시켰고, LGG를 전처리하였을 때 IL-8 발현증가는 감소되었다. LPS에 의한 IL-8 mRNA와 단백질 발현 증가는 LGG 전처치에 의해서 용량의존적으로 감소되었다($p < 0.05$). IL-1 β 와 TNF- α 는 TLR4 mRNA 발현에 영향을 미치지 않았지만 LPS는 TLR4 mRNA 발현을 증가시켰고, LGG를 처리하였을 때에 TLR4 mRNA 발현 증가는 감소되었다. LGG 전처치는 I κ B α degradation을 감소시키고 핵 내로의 NF- κ B/p65 이동을 억제하는 기전을 통해서 LPS에 의한 NF- κ B의 활성화를 억제하였다.

결론: LGG는 LPS에 의한 염증반응을 억제하였으며, 그 기전은 TLR4/NF- κ B 경로와 관련이 있다.

색인단어: *Lactobacillus rhamnosus*; Lipopolysaccharide; NF- κ B

REFERENCES

- Fuller R. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol 1989; 66:365-378.
- Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in

- inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004;126:1620-1633.
3. Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, et al. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1103-1108.
 4. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 1999;276:G941-G950.
 5. Flynn S, van Sinderen D, Thornton GM, Holo H, Nes IF, Collins JK. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiology* 2002;148:973-984.
 6. Madsen K, Cornish A, Soper P, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001;121:580-591.
 7. Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ, Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 2000;47:79-87.
 8. Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, Midtvedt T, Brandtzaeg P. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology* 1996;89:494-501.
 9. Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, et al. Efficacy of *Lactobacillus GG* in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1567-1574.
 10. McFarland LV. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe* 2009;15:274-280.
 11. Kumar A, Wu H, Collier-Hyams LS, et al. Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *EMBO J* 2007;26:4457-4466.
 12. Do VT, Baird BG, Kockler DR. Probiotics for maintaining remission of ulcerative colitis in adults. *Ann Pharmacother* 2010;44:565-571.
 13. Testro AG, Visvanathan K. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:943-954.
 14. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819-826.
 15. Lee SK, Il Kim T, Kim YK, et al. Cellular differentiation-induced attenuation of LPS response in HT-29 cells is related to the down-regulation of TLR4 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337:457-463.
 16. Gorbach SL. Lactic acid bacteria and human health. *Ann Med* 1990;22:37-41.
 17. Cain AM, Karp KD. Clinical utility of probiotics in inflammatory bowel disease. *Altern Ther Health Med* 2011;17:72-79.
 18. Jones RM, Wu H, Wentworth C, Luo L, Collier-Hyams L, Neish AS. *Salmonella* AvrA coordinates suppression of host immune and apoptotic defenses via JNK pathway blockade. *Cell Host Microbe* 2008;3:233-244.
 19. Giahi L, Aumüller E, Elmadfa I, Haslberger AG. Regulation of TLR4, p38 MAPkinase, I κ B and miRNAs by inactivated strains of lactobacilli in human dendritic cells. *Benef Microbes* 2012;3:91-98.
 20. Nandakumar NS, Pugazhendhi S, Madhu Mohan K, Jayakanthan K, Ramakrishna BS. Effect of *Vibrio cholerae* on chemokine gene expression in HT29 cells and its modulation by *Lactobacillus GG*. *Scand J Immunol* 2009;69:181-187.
 21. Donato KA, Gareau MG, Wang YJ, Sherman PM. *Lactobacillus rhamnosus GG* attenuates interferon- γ and tumour necrosis factor- α -induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signalling. *Microbiology* 2010;156:3288-3297.
 22. Vizoso Pinto MG, Rodríguez Gómez M, Seifert S, Watzl B, Holzapfel WH, Franz CM. Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *Int J Food Microbiol* 2009;133:86-93.
 23. Hamilton MJ, Snapper SB, Blumberg RS. Update on biologic pathways in inflammatory bowel disease and their therapeutic relevance. *J Gastroenterol* 2012;47:1-8.
 24. Oostenbrug LE, Drenth JP, de Jong DJ, et al. Association between toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:567-575.