

Immunoregulation of Murine Immunocytes to *Bifidobacteria* Strain Isolated from Feces of Healthy Korean Children: IL-10 Release and Proportional Change of CD4⁺CD25⁺ Cells

Dan Jin¹, Bo-Whan Kim², Hyeon Cheol Cho², Sung-Sik Yoon³,
Yoon-Sun Park⁴ and Soo-Ki Kim^{2,3*}

¹Immunology and Pathogenic Biology, College of Basic Medicine, Yanbian University, Yanji, China;

³Division of Biological Science and Technology, College of Science and Technology, Institute of Bioproduct, Yonsei University, Wonju, Korea; ⁴Department of Microbiology, Kwandong University of College of Medicine, Gangneung, Korea; ²Department of Microbiology, Institute of Basic Medical Science, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju Korea

Bifidobacteria is one of the prototypes of probiotics bacteria, normally inhabiting the intestinal tract of humans. To search for a potent immunoregulatory *Bifidobacteria* strain, we screened the *Bifidobacteria* strains isolated from the feces of healthy Korean children. The mRNA or protein expression of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, from mouse macrophages stimulated with live *Bifidobacteria* was examined. Of tested strains, *Bifidobacteria* A28 induced the highest IL-10 gene expression of murine macrophages. To probe immunoregulatory activity of the selected strain on the mice, we evaluated the proportional changes of CD4⁺CD25⁺ surface marker in the murine splenocytes. Flow cytometric analysis showed that the overall percentages of CD4⁺CD25⁺ cells in A28-treated splenocytes were higher than those of untreated splenocytes. In parallel, IL-10 release from A28-treated mouse peritoneal macrophages and splenocytes was significantly higher than that of untreated control cells. Collectively, the *Bifidobacteria* A28 strain isolated from the feces of healthy Korean children augments the mRNA or protein expression of IL-10 release from mouse peritoneal macrophages as well as the proportion of CD4⁺CD25⁺ cells of naïve splenocytes. These provide *in vitro* scientific clues that *Bifidobacteria* A28 might be usable for anti-inflammatory disease such as inflammatory bowel disease (IBD).

Key Words: *Bifidobacteria*, IL-10, Macrophage, CD4⁺CD25⁺ cell, Splenocyte

서 론

비피더스 균 (*Bifidobacterium spp.*)은 인체 장내에 상재 균으로 다양한 대사와 면역조절 기능으로 인체에 유익

한 균으로 잘 알려져 있다. 예로 비타민을 만들어 숙주에 공급하고 소화기능 향상, 병원성 균의 감염 예방, 장내 균총 평형 유지, 혈중 콜레스테롤 저하 및 항암작용과 면역조절 기능에도 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다 (1~3). 특히 비피더스 균은 대식세포, 림프구 및 NK 세포의 활성화 (4~6)를 유도하여 세포성 면역증진 및 항체 생성 등의 체액성 면역을 증진시킨다 (7). 또한 체장과 파이어반 주위 면역세포에 작용하여 세균항원에 대한 선천면역반응을 강화시킨다 (8). 최근 과민면역반응의 조절과 관련된 IL-10과 전환성장인자 (transforming growth factor, TGF)-β의 분비를 증가시키며, 조절성 (regulatory) T

Received: August 20, 2010/ Revised: October 28, 2010

Accepted: November 1, 2010

*Corresponding author: Soo-Ki Kim, M.D., Ph.D. Department of Microbiology, Institute of Basic Medical Science, Wonju College of Medicine, Yonsei University, 162 Ilsan-Dong, Wonju, Gangwon, 220-701, Korea.

Phone: +82-33-741-0323, e-mail: kim6@yonsei.ac.kr

**This was supported by R01-2002-000-00365-0 (KOSEF).

세포 증식을 유도하여 주목 받고 있다 (9). 그러나, 이전의 많은 연구에서는 서로 다른 비피더스 균을 사용하여 효능이 일관되지 않았으며, 인간의 장내에서 분리한 같은 속의 유산균이라 하더라도 장내 미생물의 적응 특성상 비슷한 환경에서 분리된 균종일수록 더 큰 효과를 기대하고 있다 (10). 이런 증거들은 비피더스 균을 기능성 생균제 또는 의약품으로 사용하려면 사용목적에 따라 알맞은 균주를 선택해야 함을 제시해주고 있다.

본 연구에서는 한국 어린이 분변에서 분리한 비피더스 균의 여러 균주를 마우스 비장세포와 복강대식세포에 자극시 항염증 사이토카인인 IL-10의 분비와 CD4⁺CD25⁺ 세포 수의 변화를 조사하여 면역조절능이 우수한 균주를 선별하고자 하였다.

재료 및 방법

비피더스 균주

본 실험에 사용된 11개 비피더스 균주는 연세대학교 문리대학 생물자원 공학과에서 한국의 건강한 어린이 분변에서 직접 분리 배양한 300여개의 균주 중에서 선택하여 제공받았고, 2개 표준 균주인 *B. catenulactum* (ATCC 27539)와 *B. infantis* (ATCC 15697)는 ATCC에서 분양받았다.

비피더스 균의 배양

비피더스 균은 MRS 액체 배지 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 이용하여, 37°C, 혐기성 조건에서 24 시간 배양하였다. 배양된 균은 실온에서 원심분리 (2000 rpm/10분)하였고, 균 침전물은 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)로 두 번 세척하고 나서 농도가 1×10^9 cell/ml 되게 PBS로 희석하였다.

분리 배양은 비피더스 균을 BL agar (Scharlaru Chemie Microbiology, Barcelona, Spain) 평판 배지에 접종한 후 평판을 BBL™ GasPak™ Pouch Sytem (Becton Dickinson Microbiology, Sparks, MD, USA)에 넣고 37°C에서 24~48 시간 배양하고, 자라난 colony는 다시 MRS 액체 배지에서 배양하였다.

실험동물

생후 7주령 SPF급 BALB/c 수컷 마우스를 오리엔트바이오 (Seongnam, Korea)에서 구입하여 연세대학교 원주의

과대학 동물실험 사육실에서 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $56 \pm 5\%$, 12시간 명암주기 하에서 사육하였다. 사료는 삼양 유지사료 (Wonju, Korea)의 마우스용 배합사료를 자유롭게 먹을 수 있게 하였고, 물은 동물실의 수돗물을 정수하여 공급하였다. 일주일간 순화기간을 거친 후 마우스를 희생시켜 비장세포와 복강대식세포를 분리하였다. 동물 실험은 동 대학 동물실험실 규칙을 준수하였고, 동물윤리위원회 규정에 의거하여 실험하였다.

RAW 264.7 세포주 배양

실험에 사용된 마우스 대식세포주인 RAW 264.7은 ATCC에서 분양 받아 계대 배양하여 사용하였다. 세포 배양은 4 mM L-glutamine, 4,500 mg/L glucose, sodium pyruvate 등이 함유된 Dulbecco's modified Eagle media (DMEM, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 배지에 10% 우태아 혈청과 페니실린 100 IU/ml, 스트렙토마이신 100 µg/ml을 첨가하여 사용하였다.

마우스 복강대식세포 분리

BALB/c 마우스에 무균 처리한 3% thioglycolate broth (Difco Laboratories) 3 ml를 복강 내 주사하고, 3 일 후 마우스를 희생시켜 복강을 5 ml의 PBS로 3번 세척하여 복강액을 모은 후, 원심분리 (2,000 rpm/10분)하였고, 얻은 복강삼출세포 중 배양판에 1시간 부착시킨 후 부착세포를 대식세포로 사용하였다. 복강삼출세포는 DMEM에 부유시킨 후, 5×10^5 cell/well 되게 24 well plate에 나누어 담고 5% CO₂가 함유된 37°C 배양기에서 배양하였다.

마우스 비장세포의 분리

마우스를 경추 탈구법으로 희생시켜 비장을 꺼냈다. 한쪽에 거친 면이 있는 무균 유리 슬라이드를 이용하여 비장세포를 분리하였다. 분리된 세포부유액을 원심분리 (1,000 rpm/10분)하였다. 남아있는 적혈구는 0.83% NH₄Cl로 실온에서 5분간 용해시키고, PBS로 세척하였다. 분리한 세포를 10% 우태아 혈청이 함유된 DMEM 배지에 부유시킨 후 well 당 5×10^5 개의 세포를 24 well plate에 나누어 담고 5% CO₂가 함유된 37°C 배양기에서 배양하였다.

RNA 분리 및 cDNA 합성

TRIzol® Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad,

Table 1. Primer sequences and sizes for PCR

| Target gene | | Sequence (5'→3') | Size |
|-------------|------------|---------------------------|--------|
| β-actin | Sense | TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAG | 348 bp |
| | Anti-sense | TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG | |
| IL-6 | Sense | AATGATGGATGCTACCAAAC | 281 bp |
| | Anti-sense | TAGCCACTCCTTCTGTGACT | |
| IL-10 | Sense | AGAAATCAAGGAGCATTTGA | 251 bp |
| | Anti-sense | CTGCAGGTGTTTTAGCTTT | |

CA, USA)를 이용하여 일차 분리세포 또는 세포주의 총 RNA를 분리하였다. 약술하면, TRIzol 시약으로 세포를 깬 후 chloroform을 첨가한 후 15초간 진탕하였다. 원심 분리 후에 RNA가 포함된 상층액을 tube에 옮겨 담고 isopropanol를 첨가하여 상온에 10분간 두었다가 원심분리 (12,000 rpm/15분)하였다. 다음 RNA 침전물을 제외한 나머지 용액을 버리고 75% 에탄올을 첨가하여 혼합한 후 4℃에서 원심분리 (7,500 rpm/10분)하였다. 이후 상층액은 제거하고 RNA 침전물을 공기 중에서 건조시킨 후 RNase와 DNase를 포함하지 않은 증류수로 RNA를 녹이고 정량하였다. cDNA를 합성하기 위해 1 µg의 RNA, 500 ng의 oligo-dT primer, 15 U avian myeloblastosis virus 역전사효소, 20 U의 RNase inhibitor, 1 mM의 dNTP, 5 mM의 MgCl₂를 혼합하여 반응액을 만든 후 (Reverse Transcription System A3500: Promega, Madison, WI, USA) GeneAmp® PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 42℃에서 1시간 반응시킨 후 95℃에서 5분간, 4℃에서 10분간 두었다가 실험에 사용할 때까지 -20℃에 보관하였다.

반 정량-중합효소연쇄반응 (semi quantitative PCR)

역전사 반응의 결과로 만들어진 cDNA는 각각의 실험 목적에 맞게 IL-10, IL-6, 및 β-actin에 대한 primer를 사용하여 증폭하였다. 중합효소연쇄반응을 수행하기 위해 cDNA 1 µl, 10× 완충용액 (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 0.2 mM dNTP, 1.25 U Taq polymerase (Takara Biochemicals, Shiga, Japan), primer를 넣어서 25 µl의 반응액을 만든 후 GeneAmp® PCR system 2400 (Applied Biosystems)에 넣고 적절한 조건으로 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 중합효소반응에 사용된 primer 서열과 증폭조건은 Table 1과 Table 2에 제시하였다. 중합

Table 2. Experimental condition for PCR

| Primer | cDNA (µl) | Annealing temperature (℃) | Cycle |
|---------|-----------|---------------------------|-------|
| β-actin | 1 | 60 | 30 |
| IL-6 | 2 | 57 | 30 |
| IL-10 | 2 | 55 | 35 |

효소연쇄반응의 산물은 1.5% agarose gel에 50 mV, 40분간 전기영동하여 관찰하였다.

유세포 측정 (flow cytometry, FACS)

비피더스 군으로 처리된 비장세포를 FITC-anti-CD4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 PE-anti-CD25 (Santa Cruz Biotechnology) 단일클론항체로 4℃에서 30분간 염색한 후 PBS로 세척하였다. 다시 PBS로 세포를 부유시키고, 유세포 측정기를 이용하여 분석하였다. 결과분석은 WinMDI 2.8 분석프로그램을 이용하였다.

효소면역측정법 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

마우스 대식세포와 비장세포를 24-well plate에 각각 5×10^5 cell/ml씩 넣고 각 well에 비피더스 A28 군주 (1×10^7 bacteria/ml) 또는 LPS (Sigma, St Louis, MO, USA) (100 ng/ml)를 첨가하고 24시간 배양한 후 배양 상층액을 모아 -70℃에 보관하였다. 세포 배양 상층액에 유리되어 있는 IL-10의 양을 측정하기 위하여 sandwich ELISA를 수행하였다. 표준 항원으로 마우스 IL-10 (R&D System, Minneapolis, MN, USA)을 사용하였고, capture 항체 및 검출 항체는 anti-mouse IL-10 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)을 사용하였다. 항마우스 IL-10 항체로 96-well plate에 well당 4 µg/ml로 4℃에서 12시간 반응시킨 후 차단

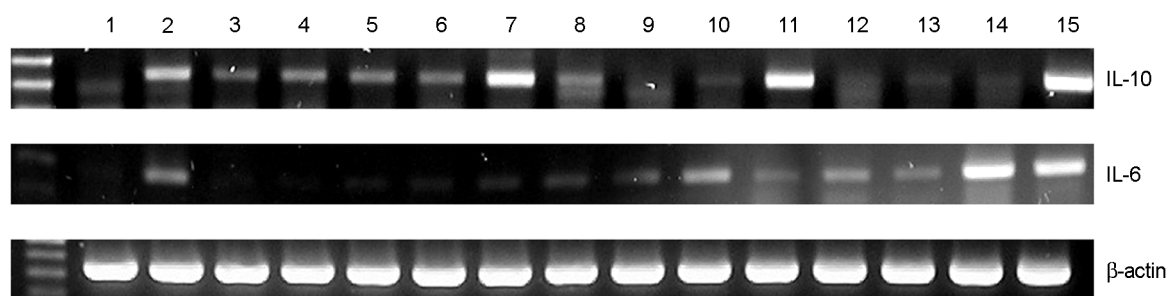


Figure 1. Expression of IL-10 mRNA in RAW 264.7 cells treated with various *Bifidus* strains. Lane 1, control; Lane 2, LPS 100 ng/ml; Lane 3, *B. infantis*; Lane 4, *B. catenulactum*; Lane 5, A1; Lane 6, A2; Lane 7, A5; Lane 8, A13; Lane 9, A14; Lane 10, A16; Lane 11, A28; Lane 12, A34; Lane 13, B17; Lane 14, B2730; Lane 15, YM112

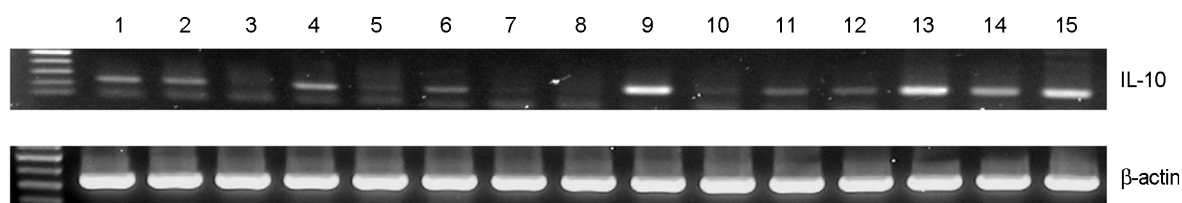


Figure 2. Expression of IL-10 mRNA in mouse peritoneal macrophage treated with various *Bifidus* strains. Lane 1, control; Lane 2, LPS 100 ng/ml; Lane 3, A1; Lane 4, A2; Lane 5, A5; Lane 6, A13; Lane 7, A14; Lane 8, A16; Lane 9, A28; Lane 10, A34; Lane 11, B17; Lane 12, B2730; Lane 13, YM112; Lane 14, *B. infantis*; Lane 15, *B. catenulactum*

용액을 넣고 실온에서 2시간 방치하였다. 표준 IL-10 항원과 측정하고자 하는 세포 배양 상층액을 100 μ l/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 세척 후 biotinylated 항마우스 IL-10 항체 (500 ng/ml)를 well당 100 μ l씩 분주하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 세척하였다. Avidin HRP (1:1,000, BD Biosciences) 용액으로 실온에서 30분간 반응시킨 후 세척하고 TMB substrate reagent (BD Biosciences)를 분주하여 30 분간 반응시켰다. 이후 정지용액을 넣어 반응을 정지시킨 다음 파장 430 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

비피더스 균주를 RAW 264.7 세포주 처리시 IL-10과 IL-6 mRNA의 발현

비피더스 균주 13개를 각각 RAW264.7 세포주에 처리하여 IL-10 mRNA의 발현을 관찰하였고, 동시에 친염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokine)인 IL-6의 발현을 관찰하였다. 그 결과 A5, A28과 YM11의 3개 균주가 다른 균주들에 비해 RAW264.7 세포주로부터 IL-10 mRNA를 비교적 높게 발현시켰다. 또한 YM112와 B273

균주는 IL-6 mRNA의 발현을 증가시키는 반면에, IL-10 mRNA의 발현을 증가시켰던 A5와 A28 균주는 IL-6 mRNA 발현 증가가 나타나지 않았다 (Fig. 1).

비피더스 균주를 마우스 복강대식세포에 처리시 IL-10 mRNA의 발현

11개 균주와 ATCC 표준 균주 2개를 각각 BALB/c 마우스 복강에서 분리한 대식세포에 2시간 동안 처리한 뒤 RT-PCR 방법으로 IL-10 mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과 A28과 YM112균에 의해 IL-10 mRNA가 가장 많이 발현되었다 (Fig. 2).

선발된 비피더스 균주 (A28)의 마우스 복강대식세포와 비장세포에 각각 처리시 IL-10 분비능 및 CD4⁺CD25⁺ 세포 수의 변화

A28 균주를 마우스 복강대식세포와 비장세포에 자극한 후 IL-10 분비를 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과 마우스 복강대식세포와 비장세포 모두에서 A28 균주를 처리시 IL-10의 분비가 증가하였다 (Fig. 3). 그리고 마우스 비장세포에 A28 균주를 처리한 다음 CD4⁺CD25⁺ 세포 수의 변화에 대해 관찰한 결과, A28 균주를 처리한

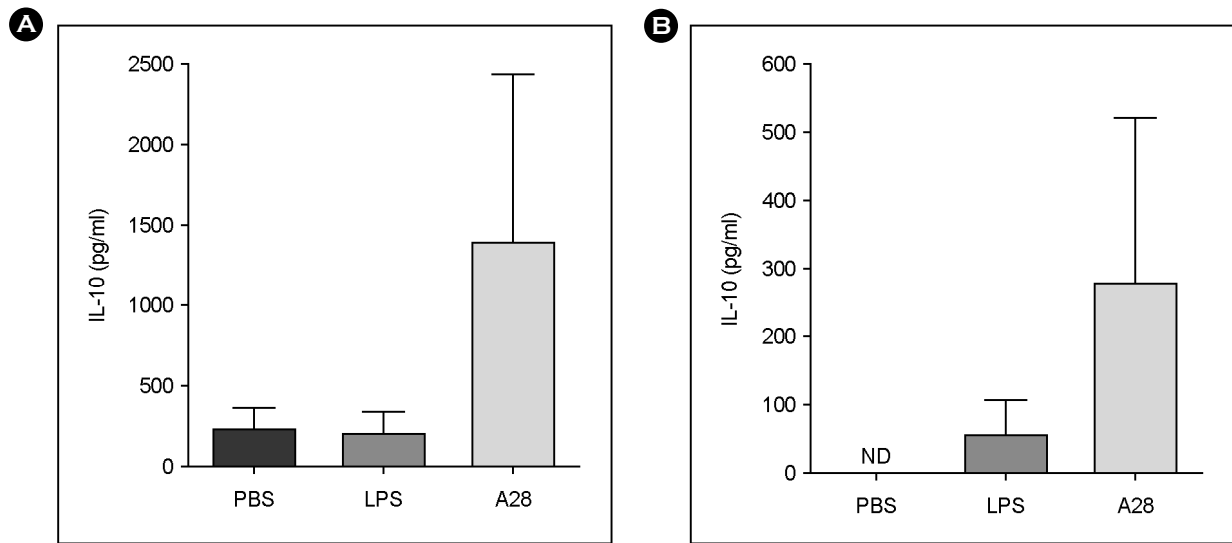


Figure 3. Production of IL-10 by mouse peritoneal macrophages (A) and splenocytes (B) treated with *Bifidus* strain A28.

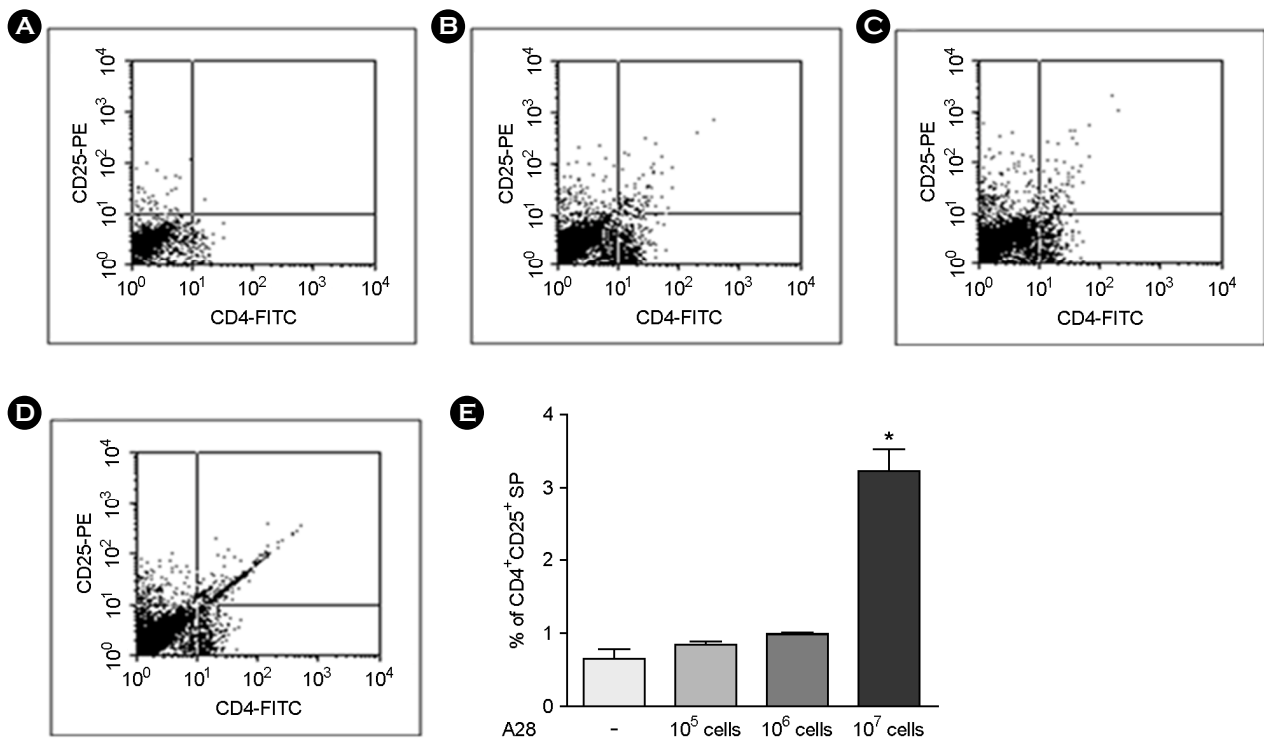


Figure 4. Proportional increment of CD4⁺CD25⁺ T cell in mouse splenocytes treated with *Bifidus* strain A28. A: CD4⁺CD25⁺ expression in A28-untreated mouse splenocytes; B: CD4⁺CD25⁺ expression in A28 (10⁵ cells/ml)-treated mouse splenocytes; C: CD4⁺CD25⁺ expression in A28 (10⁶ cells/ml)-treated mouse splenocytes; D: CD4⁺CD25⁺ expression in A28 (10⁷ cells/ml)-treated mouse splenocytes; E: Comparative CD4⁺CD25⁺ expression in different numbers of A28-treated mouse splenocytes. Data were expressed as Mean \pm standard error and analyzed with one-way ANOVA (* $p < 0.05$).

비장세포에서 처리하지 않은 세포에 비해 CD4⁺CD25⁺ 세포 수가 증가하였다. 즉, 처리한 세균수에 비례하여

CD4⁺CD25⁺ 세포 수의 증가를 관찰할 수 있었다 (Fig. 4).

고 찰

본 연구 결과에서 비피더스 균은 체외실험에서 면역세포를 활성화하여 친염증성과 항염증성 사이토카인을 분비를 유도하였다. Marin 등 (11)의 연구에서 14개의 비피더스 균주를 각각 마우스 대식세포주 RAW264.7 세포와 T 세포주 EL-4에 처리했을 때 TNF- α , IL-6, IL-2와 IL-5 등의 사이토카인 분비 증가를 관찰할 수 있었는데, 모든 균주가 같은 반응을 보이지 않으며, 이중 4개 균주가 사이토카인 생성능이 가장 우수하였다고 보고하였다. 이는 비피더스 균이 균주에 따라 면역세포에 대한 사이토카인 생성 유도에 차이가 있음을 시사한다. He 등 (12)이 건강한 어린이와 어른의 분변, 알리지환자의 분변 그리고 유제품에서 분리한 27개 비피더스 균들이 마우스 대식세포주인 J774.1 세포에 미치는 영향과 Park 등 (13)이 시행한 건강한 사람 변에서 분리한 24개 비피더스 균들이 RAW264.7 세포에 미치는 영향에 대한 조사에서 TNF- α 와 IL-6의 분비가 균주마다 차이가 났다. 또한 Young 등 (14)은 아토피성 질환 이환률이 높은 뉴질랜드와 영국의 신생아 변에서 주로 *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum*과 *B. pseudocatenulatum*을 분리하였고, 아토피성 질환 발병률이 낮은 Ghana의 신생아 변에서는 주로 *B. infantis*를 분리하였다. 이는 장내 균총 중 비피더스 균의 종류가 아토피성 질환의 발생과 관련성을 시사한다. 동일 연구에서 각 균주의 가지세포 (dendritic cell)에 미치는 반응에 대한 조사에서 어떤 비피더스 균은 종이 같으면 비슷한 반응을 보였고, 어떤 비피더스 균은 종이 같더라도 균주가 틀리면 서로 다른 반응을 나타냈다. 이것은 비피더스 균의 면역자극기능은 균종 특이성 뿐만 아니라 균주에 의한 특이성을 시사한다 (14). 이러한 결과들은 비피더스 균을 식품으로 또는 의약품으로 사용 시 목적에 따라 알맞은 균주를 선택하여 사용해야 함을 시사한다.

본 연구에서는 한국의 건강한 어린이 분변에서 분리 배양한 비피더스 균주 11개와 ATCC 표준 균주 2개 중에서 항염증효과가 있는 균주를 선별하고자 하였다. IL-10은 항염증사이토카인 중의 하나로서 활성화된 대식세포, 단핵구, 가지세포의 기능을 억제하는 면역조절능이 보고되고 있다 (15). 그러므로 본 연구에서는 항염증효과가 가장 강한 비피더스 균주를 선별하고자 13개 균주를 RAW 264.7 세포와 마우스 복강대식세포에 처리하여 IL-

10 mRNA의 발현을 관찰하였다. 그 결과 A28과 YM112 균주는 두 가지 세포에서 모두 IL-10 mRNA 발현을 강하게 유도하였다. 그러나 그 중 YM112 균주는 RAW264.7 세포에서 친염증사이토카인인 IL-6의 발현도 많이 유도하였으므로 최종적으로 A28 균주가 항염증효과가 가장 우수한 균주로 판단되어 선별하였다 (Fig. 1).

위에서 선별된 비피더스 A28 균주의 IL-10 생성 자극의 효과를 조사하기 위하여 A28 균주를 마우스 복강대식세포와 비장세포에 처리하여 IL-10의 분비를 ELISA 방법으로 측정하였다. 결과 A28 균주를 처리한 마우스 복강대식세포나 비장세포에서 모두 IL-10의 분비가 처리하지 않은 세포에 비해 의미있게 증가되었다 ($p < 0.05$). 이는 본 균주가 RNA 수준에서 뿐만 아니라 단백질 수준에서도 IL-10의 분비를 증가할 수 있음을 나타낸다. CD4⁺CD25⁺ 조절성 T 세포는 보조 T 세포의 아군 (sub-group)으로서 면역 내성 및 숙주의 조직 특이성 자가면역 반응을 억제하는 등 면역조절 기능을 갖고 있다 (16, 17). 그리고 Niers 등은 비피더스를 포함한 총 13개 유산균을 사람의 말초혈액 단핵구에 자극하여 IL-10과 같은 사이토카인을 분비하는 양이 균마다 서로 다르고, 또한 일부 비피더스 균 (*B. bifidum*, *B. infantis* 등)이 CD4⁺CD25⁺ 세포의 수도 증가시킨다고 하였다 (18). Gill 등 또한 *B. lactis* HN019 균주를 복용한 중년층들의 말초혈액에서 CD4⁺ 세포와 활성화된 CD25⁺ 세포의 수가 증가되었다고 보고하였다 (19). 이러한 연구 결과는 비피더스 균주가 CD4⁺CD25⁺ 면역조절성 T 세포 변화에 영향을 줄 것이라는 것을 제시하고 있다. 본 연구에서도 A28 균주로 마우스 비장세포 자극 시 CD4⁺CD25⁺ 세포의 수가 증가하였음을 관찰할 수 있었으나, Foxp3의 발현은 측정하지 못하여 면역조절 T 세포의 증가를 입증하지 못하였다. 최근 CD4⁺CD25⁺ T 세포와 관련하여 Foxp3의 발현이 면역조절 T 세포의 특징이므로 이를 조사한다면 A28 균주에 의한 면역조절 기전 규명에 기여할 것으로 생각된다. 그러나 선별된 A28 균주가 마우스 면역세포에 자극하여 IL-10의 분비와 CD4⁺CD25⁺ 세포의 수를 증가시킨다는 사실은 생체 내에서도 면역조절의 가능성을 제시하고 있다.

본 연구에서는 한국의 건강한 어린이 분변에서 항염증 및 면역조절효과를 갖는 *Bifidobacteria* A28 균주를 시험관내 선별하였고, 이 균주를 향후 염증성 장질환의 연구에 사용될 수 있는 기본자료를 제시하였다.

참 고 문 헌

- 1) Poupard JA, Husain I, Norris RF. Biology of the bifidobacteria. *Bacteriol Rev* 1973;37:136-65.
- 2) Rhee YK, Han MJ, Choi EC, Kim DH. Hypcholesterolemic activity of *Bifidobacteria* isolated from a healthy Korean. *Arch Pharm Res* 2002;25:681-4.
- 3) Sekine K, Ohta J, Onishi M, Tatsuki T, Shimokawa Y, Toida T, *et al.* Analysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation (WPG) of *Bifidobacterium infantis*. *Biol Pharm Bull* 1995;18:148-53.
- 4) Hatcher GE, Lambrecht RS. Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid-producing bacteria. *J Dairy Sci* 1993;76:2485-92.
- 5) Sekine K, Watanabe-Sekine E, Toida T, Kasashima T, Kataoka T, Hashimoto Y. Adjuvant activity of the cell wall of *Bifidobacterium infantis* for *in vivo* immune responses in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1994;16:589-609.
- 6) Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, *et al.* Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 2004;53:1602-9.
- 7) Park JH, Um JI, Lee BJ, Goh JS, Park SY, Kim WS, *et al.* Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cell Immunol* 2002;219:22-7.
- 8) Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:4121-8.
- 9) Fedorak RN, Madsen KL. Probiotics and the management of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:286-99.
- 10) Salminen S, Salminen E. Lactulose lactic acid bacteria, intestinal microecology and mucosal protection. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1997;222:45-8.
- 11) Boulinier G. Arthur Keith and the first settlement of human being in Malta. Two subversive teeth. *Hist Sci Med* 2004;38:37-48.
- 12) He F, Morita H, Ouwehand AC, Hosoda M, Hiramatsu M, Kurisaki J, *et al.* Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by *Bifidobacterium* strains. *Microbiol Immunol* 2002;46:781-5.
- 13) Park SY, Ji GE, Ko YT, Jung HK, Ustunol Z, Pestka JJ. Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide, and cytokine production in RAW 264.7 macrophage cells exposed to human and commercial isolates of *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol* 1999;46:231-41.
- 14) Young SL, Simon MA, Baird MA, Tannock GW, Bibiloni R, Spencely K, *et al.* Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:686-90.
- 15) Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19: 683-765.
- 16) Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-62.
- 17) Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2:389-400.
- 18) Niers LE, Timmerman HM, Rijkers GT, van Bleek GM, van Uden NO, Knol EF, *et al.* Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1481-9.
- 19) Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr* 2001;74:833-9.