creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

**저작자표시**. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

**비영리**. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

**변경금지**. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

**저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.**

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

碩士學位論文

# 마우스 골수유래 수지상세포의 성숙과 싸이토카인 생산에 대한 젓갈 분리균의 효과 연구

濟州大學校

獸醫學科

文　瑄　迎

2013年 12月

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

# 마우스 골수유래 수지상세포의 성숙과 싸이토카인 생산에 대한 젓갈 분리균의 효과 연구

指導敎授 朱 洪 球

文 瑄 迎

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2013年 12月

文瑄迎의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 지 영 흔 (印)
委 員 박 은 진 (印)
委 員 주 홍 구 (印)

濟州大學校 大學院

2013年 12月

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

초록

# 마우스 골수유래 수지상세포의 성숙과 싸이토카인 생산에 대한 젓갈 분리균의 효과 연구

(지도교수: 주홍구)

문선영

제주대학교 대학원 수의학과

젓갈(염장 해산물)은 한국에서 전통적으로 식생활의 부재료로서 활용되어 왔으며, 한국뿐만 아니라 동남아시아를 포함하여 전 세계적으로 이용되는 주요 발효식품 중 하나이다. 이러한 젓갈은 다른 발효식품처럼 젓갈에 포함된 미생물에 대한 특성연구는 많이 이루어지고 있지만, 면역학적인 중요성은 아직 밝혀지지 않았다. 이번 연구에서는 젓갈에서 분리된 균들이 특별한 면역학적 능력을 갖춘 항원제시세포인 수지상세포의 기능을 조절하는 지에 대해 조사했다. 실험에 사용하기 위하여 4종의 대표적인 젓갈 분리균(이하 젓갈균)들이 선정되었다. 살아있는 수지상세포에 처리하기위해, 젓갈균을 60℃에서 30분 동안 사균 처리하였다. 골수세포는 마우스의 대퇴골과 경골에서 추출하였고, granulocyte macrophage-colony stimulating factor가 들어있는 배지에서 배양하였다. 젓갈균으로 처리된 수지상세포의 생존률을

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

분석하였으며, 흥미롭게도 두 개의 균이 수지상세포에서 대표적인 세포매개성 싸이토카인인 interleukin-12의 생산을 뚜렷하게 유도하였다. 수지상세포의 표면 활성화 및 성숙마커(MHC class II, CD40, CD86)는 유세포분석기로 분석되었다. 그리고 젓갈균으로 처리된 수지상세포는 대조군에 비해 allogeneic mixed lymphocyte reaction에서 높은 항원제시능력을 갖는다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 관찰을 통해 젓갈균은 숙주에서 면역자극 미생물로서 기능할 수 있다는 것을 알았다. 젓갈이 중요한 식품 부재료라는 사실을 감안하면, 젓갈균이 숙주에서 유산균과 같이 높은 면역강화능력을 가진 probiotics의 원천이 될 수 있을 것으로 보인다. 향후 위장관면역에서 젓갈균의 *in vivo* 면역학적 평가가 필요하다. 종합하면, 젓갈균이 수지상세포에 대해 강력한 면역자극활성을 가지고 있다는 본 연구결과를 토대로 하여 우리 전통 식생활에서 부재료로서의 젓갈의 역할 뿐만 아니라, 젓갈의 발효와 저장을 주도하는 미생물의 면역분야에서 사용가능성을 확인하여 식품 이외의 역할로 확장시킬 수 있을 것으로 기대된다.

**Key words:** Jeotgal isolates (microorganisims), dendritic cells (DCs), immunostimulation, probiotics

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Abstract

# Bacterial strains isolated from Jeotgal (Salted seafood) induce maturation and cytokine production in mouse bone marrow-derived dendritic cells

Supervised by professor Hong-Gu Joo

Sun-Young Moon

College of Veterinary Medicine,

Graduate school,

Jeju National University

Jeotgal (Salted seafood) has been one of major fermented foods in Korea for long time. Although there are many studies about Jeotgal in various aspects of food, its immunological importance on hosts has not been elucidated yet. In this study, we investigated if several bacteria isolated from Jeotgal may modulate the function of dendritic cells (DCs), powerful antigen-presenting cells equipped with special immunological capabilities. 4 Jeotgal bacteria were selected as representatives and used for experiments. To treat viable DCs, those bacteria were killed at 60℃ for 30 min. Bone marrow cells were harvested from femur and tibia of mice

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

and cultured in the presence of granulocyte macrophage-colony stimulating factor. The viability of DCs treated with Jeotgal bacteria was verified and two isolates significantly induced high production of interleukin-12, a representative cell-mediated cytokine of DCs. Surface activation and maturation markers (MHC class II, CD40, CD86) of DCs were analyzed by flow cytometer. In addition, the treated DCs showed significantly high antigen-presenting capability compared to control DCs based on allogeneic mixed lymphocyte reactions. These observations suggest that Jeotgal isolates can function as immunostimulating bacteria in hosts. The fact that Jeotgal is a major fermented food leads an assumption that Jeotgal isolates can be a source of probiotics with high immunopotentiating ability, such as lactobacillus in hosts. The immunological evaluation of Jeotgal isolates *in vivo*, especially in gastrointestinal immunity, needs to be performed. Taken together, these experimental evidence that Jeotgal isolates have powerful immunostimulating activities on DCs may broaden the use of Jeotgal isolates in immunological fields in addition to as a fermented food.

Key words: Jeotgal isolates (microorganisims), dendritic cells (DCs), immunostimulation, probiotics

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

# 목 차

Ⅰ. 서 론 ---------- 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ---------- 2

Ⅲ. 결 과 ---------- 6

Ⅳ. 고 찰 ---------- 16

Ⅴ. 참 고 문 헌 ---------- 19

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

# Ⅰ. 서론

젓갈은 한국의 전통적인 염장 식품의 부재료 중 하나로 새우, 조개, 생선 등과 같이 다양한 종류의 해산물에 20-30%(w/w)의 식염을 넣어서 부패 및 변질을 억제하여 일정기간 숙성시켜 만든다[1]. 젓갈은 원료에서 유래된 자가소화효소와 미생물 유래의 효소작용에 의하여 단백질이 분해되어 숙성되며, 다른 발효 및 숙성 식품들과는 숙성기전에서 차이를 보이지만 그 정확한 기전에 대해서는 알려져 있지 않다. 젓갈에 포함된 염분의 농도가 높기 때문에 일반적인 환경에서 서식하는 균종과는 다르게 고농도의 염을 생육환경으로 하는 미생물이 많이 서식한다. 한국에는 약 130-160종의 젓갈이 알려져 있으며 특히 새우젓과 멸치젓에서는 610종의 순수 세균 콜로니가 배양되었고, 총 24속 104종의 세균의 존재가 밝혀졌다[1, 2].

젓갈 내 미생물들에 대한 연구는 비교적 오래 전부터 진행되어 왔고, 다양한 균종을 분리, 배양해 낼 수 있는 기술은 계속 발전하고 있다. 젓갈유래의 많은 균종이 보고되었지만, 젓갈에서 분리한 균(이하 젓갈균)의 면역학적인 역할에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

수지상세포(Dendritic cells, DCs)는 피부 및 림프기관에서 발견되며 대부분의 말초기관에서 미성숙한 상태로 존재한다. 특징적인 돌기를 갖고 있는 골수유래의 면역계 중심세포로서 외부항원을 탐식한 후 주변의 림프절로 이동한다. 특징적으로 수지상세포는 항원성펩타이드로 미감작 T 림프구를 자극할 수 있는 항원제시세포(Antigen presenting cells, APCs)로서의 기능을 가지고 있으며, 선천면역과 적응면역에서 중요한 역할을 담당한다[3, 4, 5].

젓갈은 우리 식생활에서 자주 섭취하는 식재료로서, 젓갈균은 위장관의 점막면역계와 접하며 일련의 음식물성분 흡수과정을 통해 전신면역계에도 노출된다. 본 연구에서는 면역중심세포인 수지상세포에 젓갈균을 처리하여 다양한 기능변화를 확인하려고 한다. 젓갈균을 수지상세포에 처리한 후 형태학적인 변화, 싸이토카인의 생산량과 표면마커의 발현을 분석하고, 항원제시기능의 변화를 관찰하려 한다. 본 연구에서 얻은 실험결과들을 통해 젓갈균이 노출되었을 때 면역계에 어떤 영향을 줄 수 있는지를 알 수 있고, 관련된 기초자료를 제공하고자 한다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

# Ⅱ. 재료 및 방법

**실험동물**

실험동물은 ORIENT BIO(Korea)에서 구입하여 제주대학교 실험동물 관리시설에서 사육한 6-8 주령의 Balb/c와 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 시행되었으며 제주대학교 동물실험윤리지침을 준수하였다.

**균주의 배양 및 정량**

본 실험에 사용된 균주는 한국 전통 발효식품인 젓갈에서 분리한 4종(species)이며, 이들은 가자미식해에서 분리한 *Alishewanella jeotgali* KCTC 22429$^{T}$(=JCM15561$^{T}$)[6], 황새기젓에서 분리한 *Halomonas jeotgali* KCTC 22487$^{T}$(=JCM15645$^{T}$)[7], 토하젓에서 분리한 *Carnobacterium jeotgali* KCTC 13251$^{T}$(=JCM15539$^{T}$)[8], 그리고 해양 생물에서 분리한 *Marinilactibacillus psychrotolerans* NBRC 100002$^{T}$(=NRIC0510$^{T}$)[9]이다. 균주는 Korean Collection for Type Cultures (Korea)와 National Biological Resource Center (Japan)로부터 분양받아 사용하였다. 동결건조 상태로 분양받은 균주는 0.85% NaCl 용액에 현탁하여 Tryptic Soy Broth (Difco, USA)에 접종한 후 37℃에서 24-72시간 호기적으로 배양하였다. 배양한 균주는 2회 계대 배양 후 실험에 사용하였으며, 배양이 완료된 균주는 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액은 버리고 가라앉은 균주를 0.85% NaCl 용액으로 현탁한 후 세척과정으로 동일과정을 반복 수행하였으며, 다시 원심분리하여 상층액을 버리고 얻어낸 균주를 실험에 사용하였다. 균주는 phosphate buffered saline (PBS)에 희석한 뒤 열처리(heat inactivation, 30 min/60℃)를 실시하였고, PBS에 한 번 더 세척과정을 거친 후 단백질 정량하여 실험에 사용하였다.

**세포의 준비 및 배양**

세포를 배양하는 방법은 다음과 같다. 골수세포는 6-8 주령의 C57BL/6 마우스의 대퇴골과 경골에서 Hanks' balanced salt solution으로 골수 내강을 세척하여 얻었다. 이 세포들은 hypotonic lysis buffer (150 mM $NH_4Cl$, 10 mM $KHCO_3$,



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

0.1 mM EDTA)를 넣은 후 실온에서 10분 간 반응시켜 적혈구를 제거하였고, 원심분리한 후 5% culture medium (5% fetal bovine serum(FBS), L-glutamine, penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI1640배지; 5% CM)에 2일 주기로 mouse granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF; Biosource International, USA)를 첨가한 새 배지로 갈아주며 6-10일간 배양하였다[10]. 비장세포는 6-8 주령의 Balb/c 마우스의 비장을 절취한 후, PBS에서 비장을 으깨어 세포를 얻었다. 이 세포들을 hypotonic lysis buffer에 실온에서 10분 간 반응시켜 적혈구를 제거하였고, 원심분리한 후 5% CM에서 1시간 배양하여 대식세포와 같은 부착세포가 배양플라스크의 바닥에 부착되도록 하였다. 이 후 떠 있는 세포를 회수한 뒤 40 ㎛ cell strainer로 결합조직 등을 걸러내고, 원심분리한 후 10% lymphocyte culture medium (10% FBS, penicillin/streptomycin, sodium pyruvate, non-essential amino acids, L-glutamine, 2-mercaptoethanol이 첨가된 RPMI1640배지; 10% LCM)을 넣어 부유시켰다. 세포배양 시 온도는 37℃이고, $CO_2$의 농도는 5%를 유지하였다[11].

**수지상세포의 생존률 및 형태 관찰**

6-10일간 배양하여 분화된 골수유래 수지상세포(Bone marrow-derived dendritic cells; BMDCs)를 얻은 후 96-well culture plate에 $1 \times 10^5$ cells/㎖의 농도로 200 ㎕/well씩 분주한 후, 젓갈균을 각각 1 ㎍/㎖의 농도로 처리하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA)와 trypan blue solution (Gibco, USA)으로 세포의 활성도와 생존율을 평가하였다. MTT assay는 배양세포에 MTT 용액을 0.5 ㎎/㎖ 농도로 10 ㎕/well씩 넣어 4시간 배양한 후, 10% sodium dodecyl sulfate 용액을 100 ㎕/well씩 넣은 후 2시간 더 배양하였다. Microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA)를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 세포의 생존율을 알아보기 위해 trypan blue solution으로 염색한 세포를 hemocytometer에서 살아있는 세포와 죽은 세포의 숫자를 세어 백분율로 나타내었다. 젓갈균에 의한 세포의 형태적인 변화를 관찰하기 위해 위상차현미경(Olympus, Japan)을 사용하여 배율 ×100에서 세포의 크기, 형태변화, 군집양상 등을 관찰하였고, digital camera (Cannon, Japan)로 사진을 촬영하였다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

### 유세포분석

수지상세포의 세포표면마커의 발현정도와 세포 크기를 측정하기 위하여 실시하였으며, 세포염색법은 확립된 방법에 따라 실시하였다[12, 13]. 수지상세포 표면의 Fc receptor를 차단하여 비특이적 반응을 줄이기 위해 anti-mouse CD16/32 단클론 항체를 이용하였다. 배양한 수지상세포를 6-well culture plate에 분주한 후, 각 well에 젓갈균을 1 ㎍/㎖ 농도로 처리하여 3일간 배양한 후 유세포분석에 이용하였다. 세포염색은 1차 항체로 biotin-labeled anti-CD40, anti-CD86 처리하였고, 2차 항체로 streptavidin-phycoerythrin (PE) (BD Biosciences, USA)를 처리하였다. MHC class II는 단독으로 anti-mouse I-$A^b$-FITC (fluorescein isothiocyanate) (BD Biosciences, USA)를 처리하였다. 염색된 세포는 FACSCalibur (Becton Dickson, USA), WinMDI 2.9 software를 이용하여 분석하였다.

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용한 싸이토카인의 정량

배양된 수지상세포를 3일간 젓갈균을 처리한 후, 원심분리하여 상층액을 얻었다. CytoSet kit (Invitrogen, USA)를 이용해 상층액 속의 interleukin (IL)-12, tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), IL-4, IL-10을 정량하였으며, 실험 매뉴얼에 따라 진행하였고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Nitric oxide (NO) 정량 분석

Nitrate/nitrite의 측정은 Griess reagent (Sigma, USA)를 이용하여 측정하였다. 수지상세포에 젓갈균을 1 ㎍/㎖ 농도로 처리한 뒤에 5일간 배양한 뒤, 원심분리하여 상층액을 얻었다. Sodium nitrite를 standard로 사용하였고, 96-well plate에서 standard용액 또는 상층액을 Griess reagent와 50 ㎕씩 1:1비율로 혼합하였다. 실온상태에서 15분 간 반응시켜준 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 수지상세포의 항원제시능 측정시험(Mixed leukocyte reactions, MLR)

C57BL/6 마우스유래의 수지상세포를 6-well culture plate에 분주한 후, 젓갈균을 각각 1 ㎍/㎖로 처리하였다. Allogeneic co-culture를 위해 Balb/c 마우스에서



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

비장세포를 채취한 후 96-well culture plate에 2 × $10^5$ cells/well의 농도로 넣고, 젓갈균이 처리된 수지상세포와 5일간 배양하였다. 수지상세포로 자극된 비장세포의 증식 및 활성을 측정하기 위해 CCK-8 solution (Dojindo, Japan)을 10㎕/well 넣어 4시간 동안 배양하고 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. MLR 상층액 속의 interferon-gamma (IFN-gamma)와 IL-10, IL-4의 생산량은 ELISA법으로 측정하였다. MLR의 림프구 표면의 CD25와 CD69의 발현정도의 측정은, 배양된 세포를 1차 항체로 biotin-labeled anti-CD25, anti-CD69를 각각 처리하고, 2차 항체로 streptavidin-PE를 처리한 후 유세포분석을 하였다.

**유의성분석**

Data는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, student 's *t*-test를 통해 분석하였다. 0.05미만의 $p$ value를 유의성이 있다고 판정하였으며, *, **, ***는 대조군과 비교하였을 때 $p < 0.05$, 0.01, 0.001을 의미한다.

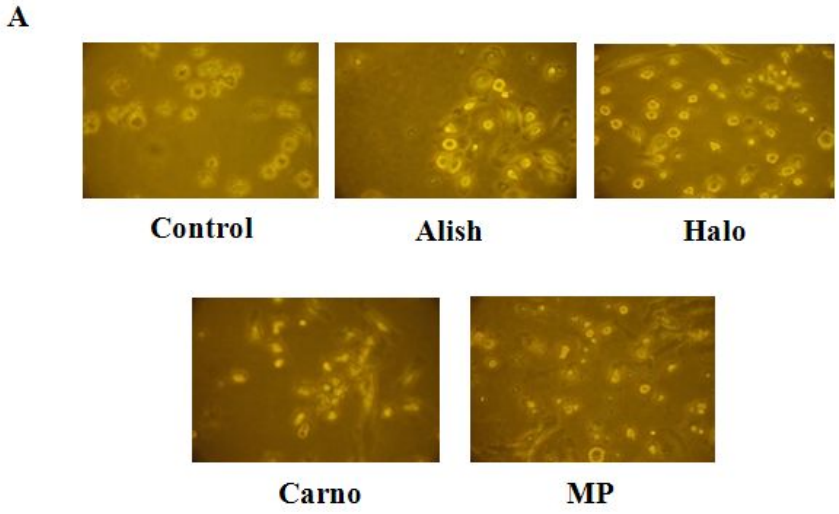


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

# Ⅲ. 결과

**수지상세포의 생존율과 활성도에 대한 젓갈균의 효과**

수지상세포의 생존율과 활성도에 대한 젓갈균의 효과를 알아보았다. 수지상세포에 젓갈균을 각각 1 ㎍/㎖씩 처리하여 3일 뒤에 위상차현미경으로 세포의 형태를 육안으로 관찰하였다(Fig. 1A). 젓갈균을 처리한 수지상세포는 Control에 비해 세포표면에 돌기모양으로 가지가 뻗어 성숙된 수지상세포의 모습을 보였다. 세포의 생존율은 trypan blue exclusion test를 이용하여 알아보았다. Trypan blue solution으로 세포를 염색한 후, hemocytometer를 이용하여 죽은 세포와 살아있는 세포수를 세어 생존율을 구했다(Fig. 1B). 생존율은 총 4번 측정하였는데 젓갈균 처리에 따른 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 0-2 ㎍/㎖의 젓갈균을 수지상세포에 처리하여 3일간 배양한 후, MTT assay를 실시하여 활성도를 측정하였다(Fig. 1C). 2 ㎍/㎖의 농도를 기준으로 보면 Alish, Carno, MP, Halo 순으로 활성도를 보였으며, 가장 높은 활성도를 보였던 1 ㎍/㎖의 농도에서는 Alish, Halo가 높은 활성도를 보인 반면 Carno와 MP는 Control과 비교하여 차이가 없었다. Alish는 1-2 ㎍/㎖의 범위에서 다른 군에 비해 활성도가 높았고, Halo는 0.25-1 ㎍/㎖의 범위에서 Carno와 MP에 비해 높은 활성도를 보였다.






제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

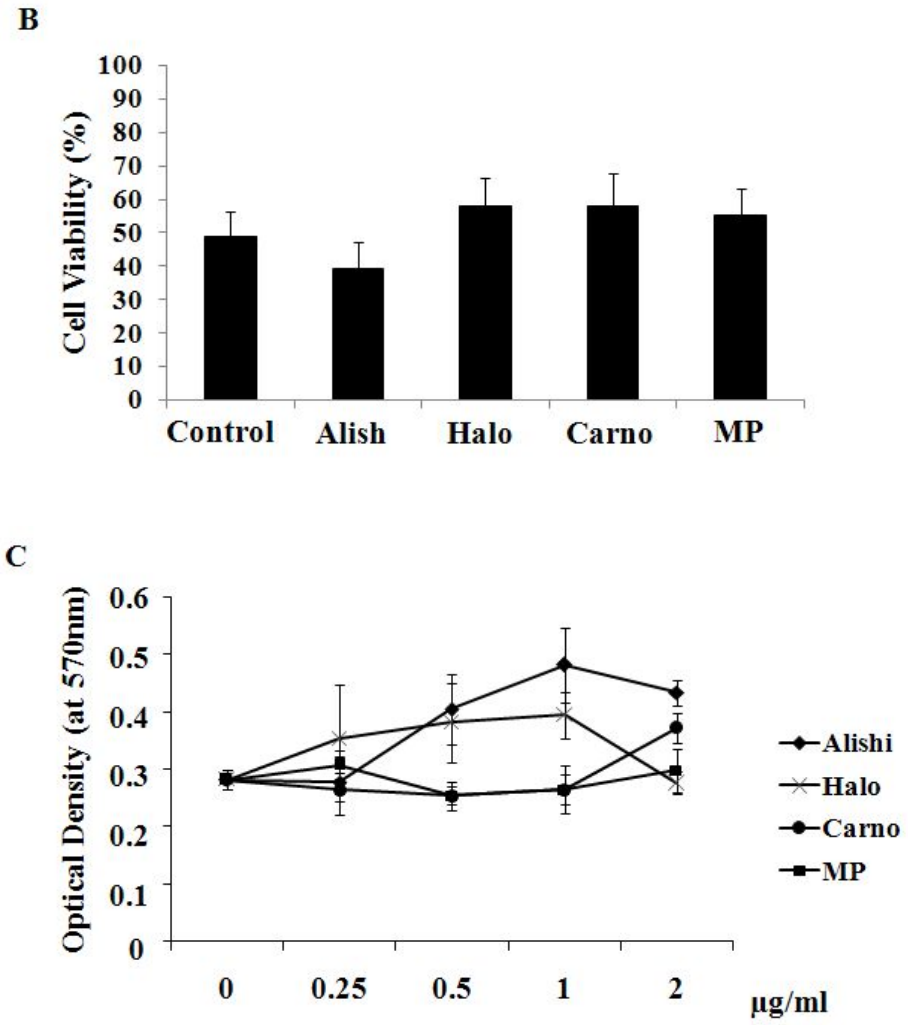


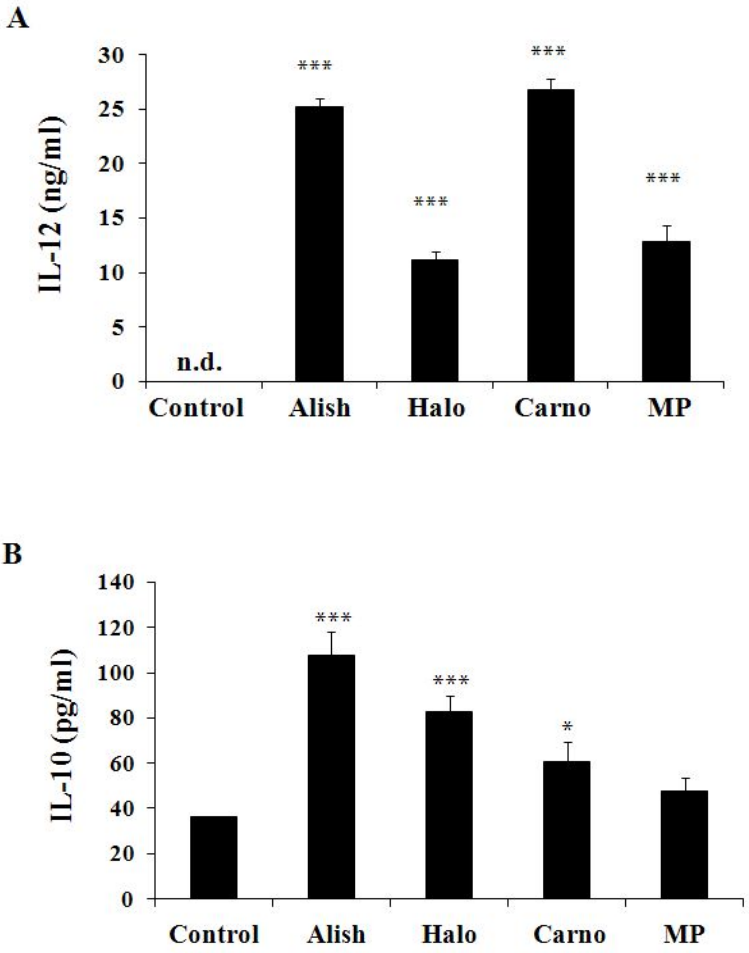

**Fig. 1.** Jeotgal isolates affect the viability of dendritic cells (DCs). Cells were seeded at 1 × $10^5$ cells/㎖ in 6- or 96-well culture plates and treated with or without *Alishewanella jeotgali* (Alish), *Halomonas jeotgali* (Halo), *Carnobacterium jeotgali* (Carno), *Marinilactibacillus psychrotolerans* (MP). The morphology of DCs treated with 1 ㎍/㎖ bacteria was observed by inverted microscope and digital camera (A). For viability analysis, cells were stained with trypan blue solution (B) and incubated with MTT solution (C). Cells were treated with 1 ㎍/㎖ (B) and indicated concentrations (C) of bacteria for 3-5 days.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

**젓갈균 처리에 의한 수지상세포의 싸이토카인 생산량 변화**

Fig. 1C에서 최적의 활성도를 보였던 농도인 1 ㎍/㎖로 젓갈균을 수지상세포에 처리한 후 3일간 배양하였다. 세포배양액을 분리한 뒤 ELISA법을 이용하여 싸이토카인을 정량하였다(Fig. 2). 싸이토카인은 TNF-alpha, IL-12, IL-4, IL-10을 측정하였다. TNF-alpha는 염증반응을 매개하는 기능이 있고 선천면역을 대표하는 싸이토카인이며, IL-12는 Th1 면역반응을, IL-4와 IL-10은 Th2 면역반응을 유도하는 싸이토카인이다. TNF-alpha는 Alish, Halo, Carno, MP 처리군 순서이나 상호간에 큰 격차는 없었으며, 전반적으로 생산량이 많지는 않았다. IL-12는 Alish와 Carno 처리군에서, IL-10은 Alish, Halo 처리군에서 많이 생산되었다. IL-4는 모든 처리군에서 측정범위 이하였다(data not shown).






제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

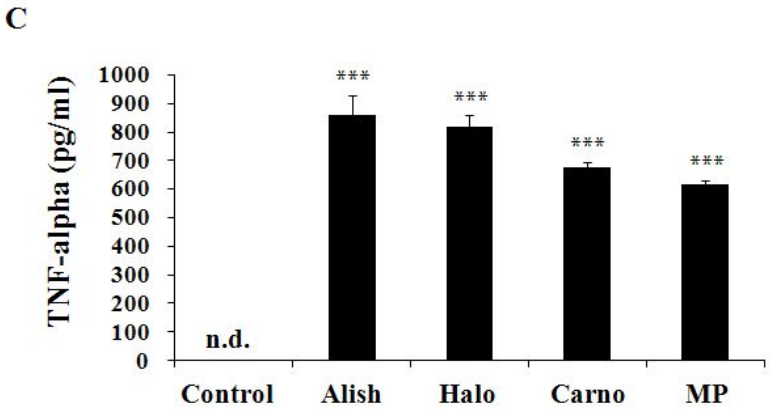



Fig. 2. Jeotgal isolates increase the production of cytokines. DCs were setup in 96-well culture plates and treated with 1 ㎍/㎖ Alish, Halo, Carno, or MP. The amounts of IL-12 (A), IL-10 (B), TNF-alpha (C), and IL-4 (data not shown) in the supernatants of treated DCs were measured by using ELISA. All values are represented as mean ± SD. *, *** indicate $p < 0.05$, 0.001 respectively compared with control group.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

**젓갈균으로 처리된 수지상세포의 면역관련 표면마커 발현의 확인**

수지상세포 표면에 발현하여 effector cells을 활성시키는데 관여하는 MHC class II, CD86, CD40의 발현량을 조사하였다. 특히 MHC class II와 CD86은 수지상세포의 성숙(maturation) 여부를 알 수 있는 대표적인 마커로도 사용된다. 젓갈균을 1 ㎍/㎖의 농도로 수지상세포에 처리하여 3일간 배양한 뒤 세포를 회수해 면역형광염색법을 실시하여 유세포분석을 하였다(Fig. 3). MHC class II는 Alish에서 가장 많이 발현되었고, 나머지 처리군에서는 비슷한 수준으로 측정되었다. CD86의 경우에는 Alish와 Halo가 가장 높은 수치로 측정되었고, 다른 처리군들의 경우 Control보다는 높지만 거의 비슷한 수준으로 측정되었다. CD40의 경우에는 Alish와 Halo가 가장 높은 수치로 측정되었다. 따라서 표면마커분석에서 수지상세포를 가장 활성화시키는 젓갈균은 Alish이고, 그 다음으로 Halo로 추정된다.

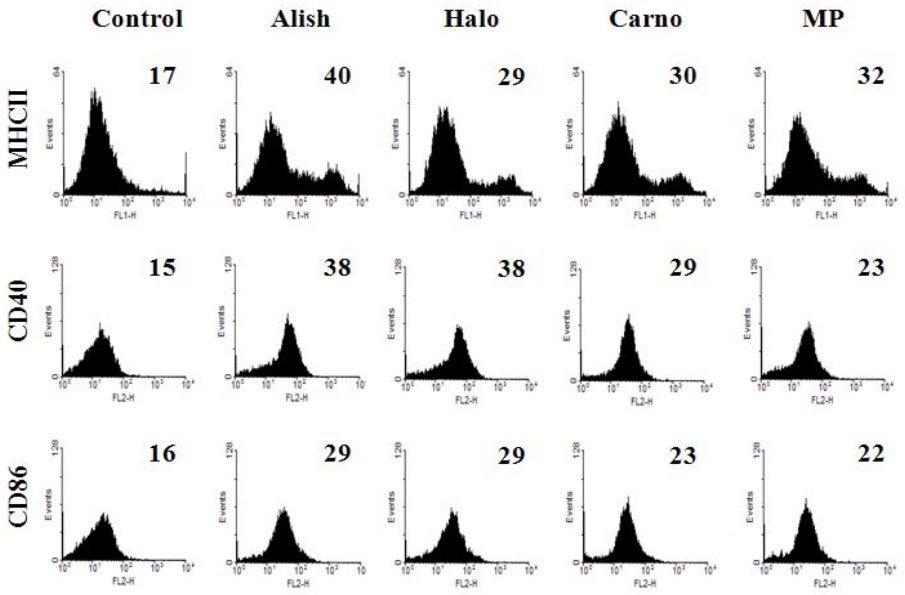



Fig. 3. Alish and Halo increase the expression of surface maturation and activation markers of DCs. Cells were cultured and treated with 1 ㎍/㎖ Alish, Halo, Carno, or MP for 3 days. And then, the treated DCs were stained with antibodies specific for MHC class Ⅱ, CD40, and CD86 and analyzed by flow cytometry. The number of histograms indicates mean fluorescence intensity.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

### 젓갈균으로 처리된 수지상세포의 NO 생산

*In vitro* 상에서 세포의 상층액에 녹아있는 NO를 NO assay를 통해 정량하였다. 이는 대식세포와 수지상세포의 세포성면역과 관련된 간접적인 활성측정의 방법으로서, IFN-gamma 등의 자극으로 수지상세포가 활성화되면 세포내에서 식균작용을 할 수 있는 NO의 생산이 유도된다. 이러한 일련의 과정은 세포성면역의 유도와 밀접한 관련이 있다[14]. Alish와 MP에서 NO가 높게 검출되었으며, Halo와 Carno에서도 Control에 비해 유의한 증가를 보였다(Fig. 4).

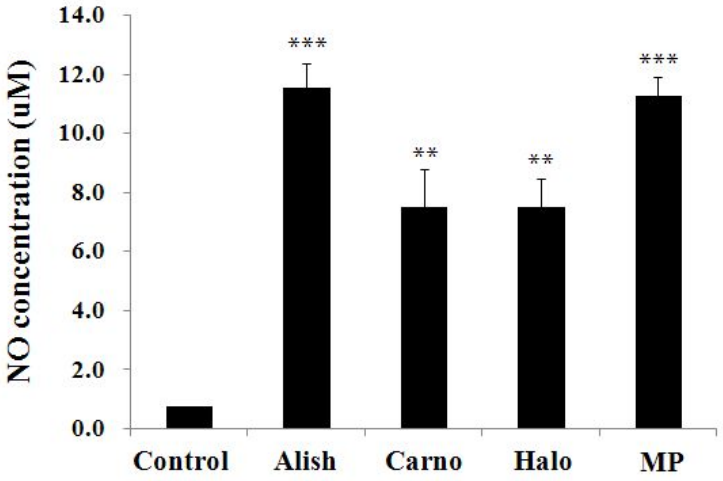



**Fig. 4.** Jeotgal isolates increase NO production of DCs. Cells were setup and treated as described in Fig. 2. The concentration of NO in supernatants was determined by using Griess reagent. All values are represented as mean ± SD. **, *** indicate $p < 0.01$, 0.001 respectively compared with control.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

**비장세포를 이용한 수지상세포의 항원제시능 분석에서 젓갈균의 효과**

비장세포의 증식률을 측정하여 수지상세포의 항원제시능을 분석하는 allogeneic co-culture를 실시하였다. 젓갈균이 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해, 우선 배양된 C57BL/6 마우스의 골수유래 수지상세포에 젓갈균을 처리하였다. 이후 회수된 수지상세포는 stimulator로서 사용하였고, Balb/c 마우스의 비장세포를 allogenic responder로 사용하여 co-culture하여 반응시켰다. Co-culture에서 배양된 allogeneic 비장세포의 반응을 분석하여, 젓갈균으로 처리된 수지상세포의 활성화상태, 유도되는 면역반응의 양상을 추정할 수 있다.

젓갈균으로 처리된 수지상세포에 의한 비장세포의 증식률을 측정하기위해 CCK-8 solution을 사용하였다(Fig. 5). Halo로 처리된 수지상세포는 다른 처리군 수지상세포에 비해 3,333-10,000 DC cells/well의 범위에서 유의하게 증식률이 증가하는 모습을 보였다. 동일 co-culture 배양액의 상층액으로 싸이토카인의 분비를 측정하였다(Fig. 6). Th1과 Th2 면역반응의 주요 싸이토카인 들인 IFN-gamma와 IL-10/IL-4를 측정한 결과, IFN-gamma는 Halo에서 가장 높게 측정되었고, 그 다음으로 Alish순이며 Carno와 MP는 비슷한 수준으로 생산되었다. IL-10의 경우에도, Halo 처리군에서 가장 높게 측정되었고 Carno, MP, Alish 순이다. IL-4는 전체 처리군에서 측정범위 이하였다(data not shown). Co-culture에서 젓갈균에 처리된 수지상세포에 의해 비장세포가 얼마나 활성화 되었는지 알아보기 위해, 림프구의 활성화마커인 CD25와 CD69의 발현량을 측정하였다(Fig. 7). 활성마커인 CD25 (IL-2 수용체 alpha chain)의 발현은 Halo가 가장 높았던 반면, 초기 활성마커인 CD69는 모두 거의 비슷한 수준으로 발현되었다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

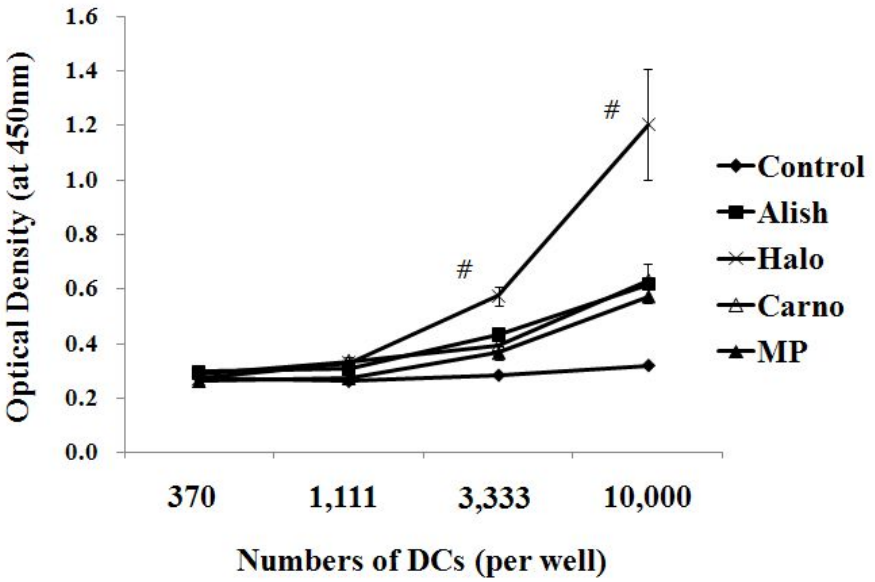



**Fig. 5.** Halo-treated DCs significantly have high antigen presenting capability. DCs of C57BL/6 mice were setup in 6-well culture plates and treated with 1 ㎍/㎖ Alish, Halo, Carno, or MP for 3 days. And then, DCs were harvested and co-cultured with $2 \times 10^5$ cells/well allogeneic spleen cells of Balb/c mice in 96-well culture plates for 5 days. To determine the proliferation of allogeneic spleen cells, CCK-8 solution was used. All values are represented as mean ± SD. # indicates $p < 0.05$ compared with the other treated DCs at same cell number.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

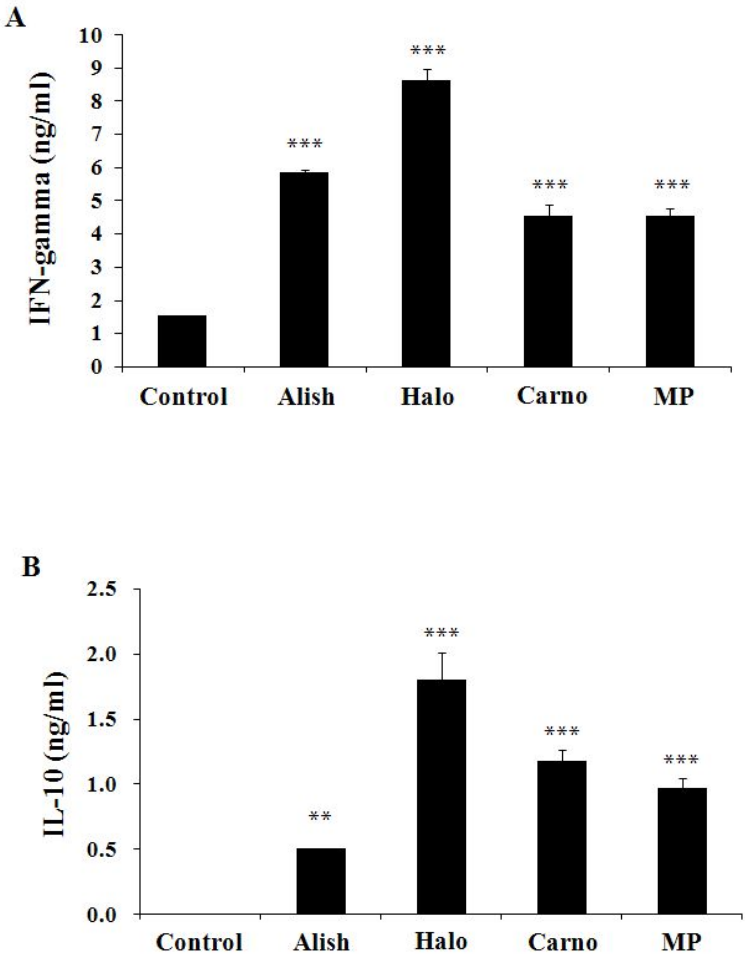



**Fig. 6.** Halo-treated DCs produce high amount of IFN-gamma and IL-10 in co-cultures. The setup of co-culture was performed as described in Fig. 5. The supernatants of co-cultures with 10,000 cells/well DCs were harvested and levels of cytokines were determined by ELISA. All values are represented as mean ± SD. **, *** indicate $p < 0.01$, 0.001 respectively compared with control group.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

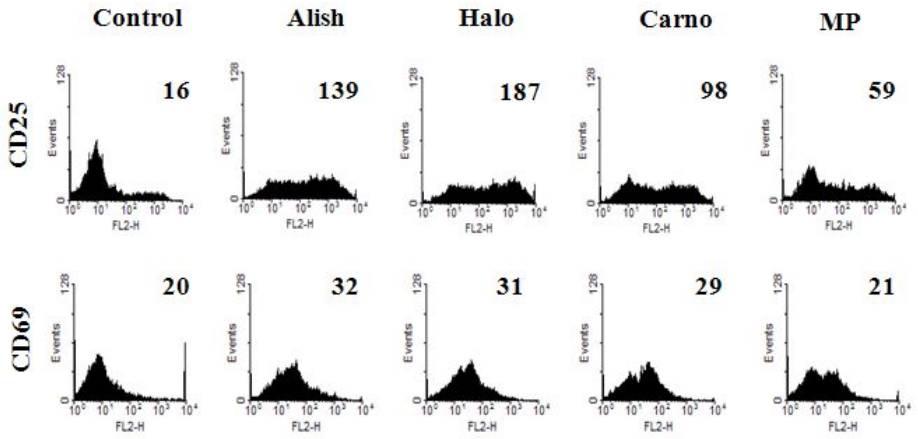



Fig. 7. Halo-treated DCs enhance CD25 expression of the co-cultured spleen cells. The setup of co-culture was performed as described in Fig. 5. The spleen cells co-cultured with treated DCs were harvested and stained with antibodies specific for CD25 or CD69. Flow cytometric analysis was performed. The number of histograms indicates mean fluorescence intensity.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

# Ⅳ. 고찰

최근 김치, 된장 등의 발효 및 염장 식품 내에 들어있는 유용미생물 들에 대한 생물학적, 면역학적 역할에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나 대부분의 연구가 유산균에 대한 연구로 집중되어 왔다. 우리나라의 대표적 염장식품중 하나인 젓갈 내에 들어있는 미생물에 대해서는 젓갈 내 미생물의 동정, 생물학적인 응용분야로서 젓갈균 추출물을 이용하는 수준의 연구가 진행되었다[15]. 젓갈은 섭취 후 위장관에서 장관면역계와 접촉을 하고 음식물의 흡수과정을 통해 전신면역계에 노출되지만, 현재까지 젓갈균의 면역학적인 기능에 대해서는 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 젓갈균의 면역학적인 효능을 비교하기위한 기초자료를 제시할 목적으로, 대표적인 젓갈균을 4종 선정한 후, 수지상세포에 처리하여 세포활성도, 면역관련 싸이토카인의 생산능력, 세포표면마커의 발현, 항원제시능(MLR) 등을 확인하였다.

본 연구에서 젓갈균은 미성숙한 수지상세포를 성숙시키며 면역반응을 활성화시킬 수 있는 것으로 확인되었다. 수지상세포는 활성화되고 성숙되면 표면에 MHC class II와 CD86분자의 발현을 증가시켜 강력한 항원제시기능을 나타낸다[16]. CD40은 활성화된 $CD4^+$ helper T 림프구의 표면에 발현한 CD40 ligand와 결합하여 수지상세포 내로 강력한 신호전달을 보내 면역반응을 증폭시킨다[17]. Alish는 특히 MHC class II의 발현을 증가시켰고 다른 마커들도 전반적으로 증가시켜 다른 처리군에 비해 강력한 수지상세포 자극능을 보였다. 다음은 Halo가 CD40과 CD86을 증가시켰다.

활성화된 수지상세포는 싸이토카인을 분비하여 면역반응을 촉진한다. 본 연구에서는 젓갈균에 처리된 수지상세포의 배양액에서 세 가지 대표적인 싸이토카인의 함량을 측정하였다. IL-12는 선천면역과 세포성면역반응에서 자연살해세포의 IFN-gamma의 생산을 유도하여 대식세포를 활성화시키고 Th1 면역반응을 촉진한다[18]. IL-10은 대식세포의 활성화를 억제하고 B 림프구의 생존율을 높여 Th2 면역반응을 매개한다[19]. 또한 TNF-alpha는 선천면역에 중요하고 수지상세포의 성숙을 유도한다. ELISA를 이용한 싸이토카인의 정량실험을 실시한 결과, Alish와



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Carno는 IL-12, Alish와 Halo는 IL-10, 전처리군에서 TNF-alpha의 생산이 높았다. 이 실험을 통해 Alish를 비롯한 젓갈균 들이 수지상세포를 자극하여 면역관련 싸이토카인을 생산할 수 있음을 알았다.

젓갈균으로 처리된 수지상세포의 항원제시능을 알아보기 위해 allogenic co-culture (mixed leukocyte reaction)를 실시하였다. 수지상세포는 C57BL/6 마우스의 골수세포를 이용해 배양했고 allogeneic 비장세포는 Balb/c 마우스에서 채취해 사용하였다. 수지상세포의 비장세포 증식능시험은 CCK-8 assay를 이용하였으며 Halo로 처리된 수지상세포가 가장 높은 증식능을 보였다. 또한 co-culture의 상층액에서 IFN-gamma와 IL-10을 정량한 실험에서도 Halo 처리된 수지상세포가 가장 높은 생산능을 보였다. 림프구 표면에 발현된 활성화마커를 분석한 결과, Halo로 처리된 수지상세포가 비장세포의 CD25 발현을 현저히 증가시켰다. IFN-gamma와 IL-10은 Th1과 Th2 세포가 생산하는 대표적인 싸이토카인이므로, Halo로 처리된 수지상세포가 Th1과 Th2 세포 모두를 증식시키며 다른 수지상세포군에 비해 강력한 항원제시능을 갖춘 것으로 판단된다.

직접 젓갈균을 수지상세포에 처리하여 측정한 세포활성도, 싸이토카인 생산, 표면마커의 발현에서는 Alish가 전반적으로 높은 자극능을 보였다. 반면 젓갈균에 처리된 수지상세포의 항원제시능 실험에서는 Halo로 처리된 수지상세포가 가장 높았다. 이런 차이는 Halo에 의한 수지상세포의 항원제시능 증가가 기존에 일반적으로 수행되는 싸이토카인과 표면마커 분석 이외에도 추가적인 요소에 의한 것으로 추정된다. 한 가지 가능성은 균주의 호염성에 의한 변화요소이다. 최근 연구에 의하면 메주에서 추출한 호염균인 *Tetragenococcus halophilus*를 이용해 실험한 결과 염분조건에 따라 싸이토카인의 생산량이 달라졌으며[20], 그 원인으로 heat shock protein의 변화 등으로 추정하고 있다. 본 실험에서 사용된 모든 균의 최적 생육 염분농도는 약간씩 다르며, 최적 생육 염분농도를 참고하여 설정한 배양 염분 농도는 각각 Alish는 1%[6], Halo는 10%[7], Carno는 2%[8]이다. Halo의 경우 다른 균주에 비해 고염분의 조건에서 배양되었는데, 균주의 배양 시 수지상세포의 항원제시능을 향상시킬 수 있는 요소를 발현시킬 가능성이 있다. 향후 추가연구를 통해 Halo의 배양 시 염분농도를 다르게 하여 균주 내에서 어떤 요소들이 변했는지,



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

수지상세포의 항원제시능에 어떻게 영향을 주는지 등을 밝힐 필요가 있다.

본 연구에서는 젓갈균이 면역계의 중심세포인 수지상세포에 다양한 면역학적 활성을 유도하며, 항원제시능력을 증강시킬 수 있음을 보였다. 이전까지 젓갈균은 염장식품의 발효를 담당하는 유용세균으로만 인식되어왔다. 본 연구를 통해 젓갈균이 실제 체내 면역계에도 영향을 미칠 수 있으며, 균주의 종류에 따라서 서로 다른 면역반응을 유도할 수 있다는 사실을 확인했다. 일반적으로 probiotics로 다용되는 유산균(Lactobacillus)에 대한 면역학적인 연구는 많이 수행되었던 반면, 젓갈균에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 이번 연구결과는 관련 학계와 산업계에 젓갈균의 면역학적 특징과 관련된 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 보인다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

# Ⅴ. 참고문헌


1. **Guan L, Cho KH, Lee JH.** Analysis of the cultivable bacterial community in jeotgal, a Korean salted and fermented seafood, and identification of its dominant bacteria, Food Microbiol. 2011, **28**, 101-113.

2. **Roh SW, Kim KH, Nam YD, Chang HW, Park EJ, Bae JW.** Investigation of Archaeal and Bacterial Diversity in Fermented Seafood using Barcoded Pyrosequencing. ISME J. 2010, **4**, 1-16.

3. **Adams S, O' neill DW, Bhardwaj N** Recent advances in dendritic cell biology. J Clin Immunol. 2005, **25**, 87-98.

4. **Steinman RM** Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. Mt Sinai J Med. 2001, **68**, 160-166.

5. **Banchereau J, Steinman RM** Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998, **392**, 245-252.

6. **Kim MS, Roh SW, Nam YD, Chang HW, Kim KH, Jung MJ, Choi JH, Park EJ, Bae JW.** Alishewanella jeotgali sp. nov., isolated from traditional fermented food, and emended description of the genus Alishewanella. Int J Syst Evol Microbiol. 2009, **59**, 2313-2316.

7. **Kim MS, Roh SW, Bae JW.** Halomonas jeotgali sp. nov., a new moderate halophilic bacterium isolated from a traditional fermented seafood. J Microbiol. 2010, **48**, 404-410.

8. **Kim MS, Roh SW, Nam YD, Yoon JH, Bae JW.** Carnobacterium jeotgali




제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

sp. nov., isolated from a Korean traditional fermented food. Int J Syst Evol Microbiol. 2009, **59**, 3168-3171.

9. **Ishikawa M, Nakajima K, Yanagi M, Yamamoto Y, Yamasato K.** Marinilactibacillus psychrotolerans gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. Int J Syst Evol Microbiol. 2003, **53**, 711-720.

10. **Joo HG.** Altered maturation of dendritic cells by taxol, an anticancer drug. J Vet Sci. 2003, **4**, 229-234.

11. **Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ.** Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. J Leukoc Biol. 2001, **69**, 555-564.

12. **Byon YY, Kim MH, Yoo ES, Hwang KK, Jee Y, Shin T, Joo HG.** Radioprotective effects of fucoidan on bone marrow cells: improvement of the cell survival and immunoreactivity, J Vet Sci. 2008, **9**, 359-365.

13. **Kim HJ, Kim MH, Byon YY, Park JW, Jee Y, Joo HG.** Radioprotective effects of an acidic polysaccharide of Panax ginseng on bone marrow cells. J Vet Sci. 2007, **8**, 39-44.

14. **Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A.** The role of nitric oxide in innate immunity. Immunol Rev. 2000, **173**, 17-26.

15. **Kim SY, Shin S, Koo HC, Youn JH, Paik HD, Park YH.** In vitro antimicrobial effect and in vivo preventive and therapeutic effects of



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

partially purified lantibiotic lacticin NK34 against infection by Staphylococcus species isolated from bovine mastitis. J Dairy Sci. 2010, **93**, 3610-3615.

16. **Larsen CP, Ritchie SC, Hendrix R, Linsley PS, Hathcock KS, Hodes RJ, Lowry RP, Pearson TC.** Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. J Immunol. 1994, **152**, 5208-5219.

17. **Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, Nair SK, Thomas EK, Morse MA, Lyerly HK.** A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment. Blood. 2000, **96**, 3499-3504.

18. **Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N, Schuler G.** Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. Eur J Immunol. 1996, **26**, 659-668.

19. **Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G.** Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. J Immunol. 2001, **166**, 4312-4318.

20. **Masuda S, Yamaguchi H, Kurokawa T, Shirakami T, Tsuji RF, Nishimura I.** Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium Tetragenococcus halophilus Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium. Int J Food Microbiol. 2008, **121**, 245-252.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY