

장내 상피세포 점막 투과성에 대한 유산균 및 금은화의 효과

이신지 · 이명종 · 정지은 · 김호준^{*} · Shambhunath Bose

동국대학교 한방재활의학과

In Vitro Profiling of Bacterial Influence and Herbal Applications of *Lonicerae Flos* on the Permeability of Intestinal Epithelial Cells

Sin Ji Lee, Myeong-Jong Lee, Ji Eun Jung, Ho-Jun Kim[†], and Shambhunath Bose

Dept. of Oriental Rehabilitation Medicine, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

Abstract

This study was designed to examine influence of bacteria and herbal applications of *Lonicerae Flos* on the permeability of intestinal epithelial cells. The HCT-116 human intestinal cell was used as an *in vivo* model of "leaky gut". Dextran sodium sulphate (DSS) was used to induce an increase in the permeability of epithelial cell tight junctions. Probiotics including *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Salomonella* spp. and *Staphylococcus aureus* were used to evaluate bacterial influence on the intestinal epithelial cells. Herbal extract *Lonicerae Flos* was also assessed to find out what kind of effects it has when used alone or fermented with *Lactobacillus plantarum*. The permeability of intestinal cell lines was assessed using transepithelial electrical resistance (TEER) and horseradish peroxidase (HRP) assessments. This data provides evidence for the probiotic benefits of intestinal permeability. The data also provides promising evidence of herbal effects on reducing intestinal permeability, especially when fermented with probiotics.

Key words: permeability of intestinal epithelial cells, tight junction, leaky gut syndrome, probiotics, herbal fermentation

서 론

인체의 장관은 장내 세균의 저장소로서 점막 장벽기능(intestinal barrier), 면역글로불린 분비 기능, 대식세포계 등을 포함한 일련의 방어체계를 이루고 있다(1). 장관 내 장점막층은 장내에 존재하는 다양한 세균 및 독소 등이 혈류로 유입되는 것을 차단하는 방어벽 역할을 하며 상피세포층에 단단히 결합되어 있다. 즉 장점막은 외부물질을 차단하는 장벽인 동시에 이들을 통과, 흡수시키는 이중적인 기능을 갖고 있는 것이다.

장점막세포는 일정한 세포 사이의 간극을 유지하다가 소화 흡수 과정이 일어나는 동안 어떠한 자극이나 손상이 가해지면서 세포 사이의 틈으로 고분자 물질이 왕복할 수 있는 장점막 투과성이 증가되는 현상이 나타나게 된다. 이때 장벽의 기능을 제대로 하지 못하여 혈액 내 고분자 물질이 장관 내 관강으로 누수되거나 관강 내의 고분자 물질이 직접 혈액으로 들어가는 현상이 초래되는데 이를 "새는 장" 즉 "leaky gut"의 상태라고 말한다(2). 이때 나타나는 증상을 총괄하여 장누수 증후군(leaky gut syndrome: LGS)이라고 하며 노화, 알레르기, 다발성 외상, 류마티스 관절염, 염증성 대장질환, 만성피로 증후군, 과민성 증후군 등의 다양한 임상적 상태로

나타난다(3). 또한 장점막 투과성의 증가나 장점막의 손상으로 인해 병원체, 항원, 부패물질 등이 장점막 내로 유입되어 염증반응이 일어나고 내독소가 혈류로 유입되어 장내세균 전위(bacterial translocation), 장관내독소혈증(intestinal endotoxemia) 등을 야기하여 각종 염증반응 및 면역 반응이 나타나게 된다(4).

이러한 장관 투과성 증가상태(increased intestinal permeability)는 이전부터 보완대체의학에서 세운 가설로 알려졌으나 최근 내재면역(innate immunity)분야의 성장발달에 힘입어 분자생물학적인 연구가 꾸준히 진행되면서 증가된 장관 투과성과 여러 질병과의 관계가 증명되고 있다(2). 본 연구는 사람 대장암 세포인 HCT-116 cell을 dextran sodium sulphate(DSS)로 장점막 손상을 유발시킨 후 다양한 조건에서의 장점막 투과성 변화에 대해 알아보하고자 하였다.

장누수 증후군의 *in vitro* 모델을 유발하는 방법은 DSS로 케양성 대장염을 유발한 동물 모델에서 참고하였는데(5), DSS가 막의 상피세포에 유해한 영향을 미쳐 점막의 투과성을 증가시키고 장벽 기능의 손상을 가져와 장관 내 세균과 그들의 산물의 흡수가 증가되어 염증을 유발하는 기전을 바탕으로 실험을 설계하였다(6).

유산균은 장관 내를 통과하며 인체에 이로운 영향을 주는

[†]Corresponding author. E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr
Phone: 82-31-961-9111, Fax: 82-31-961-9009

살아있는 미생물로 병원체에 대항하여 점막 표면을 보호하는 작용을 한다. 최근 유산균이 장내세균총에 대한 비정상 면역반응과 사이토카인 증가를 특징으로 하는 만성 염증성 장질환 치료 등에 점막 방어 효과가 있고 세포 투과성 조절 효과가 있어 장의 장벽 기능을 강화시킬 것이라는 가설을 바탕으로 한 연구가 다양하게 시행되고 있다(7-9).

금은화(*Lonicera Flos*)는 인동덩굴(능박나무, *Lonicera japonica* Thumb)의 개화된 꽃을 채취하여 건조한 것으로, 한의학적으로 해독 및 해열, 청혈 등의 항염증 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 luteolin, inositol, inosite, tannin, saponin 등이 함유되어 있다. 금은화는 급성 위염, 급만성 장염 및 과민성 장질환의 치료 처방인 보장건비탕에 포함된 약재이며 정상 효과에 대한 연구가 실험적으로 진행된 바 있다(10).

식중독 유발세균의 증식에 미치는 금은화 추출물의 항균 효과에 대한 연구에서도 *Staphylococcus(S.) aureus*에 대한 항균활성은 금은화의 chloroform 추출물과 methanol 추출물에 유효하다는 결과가 보고되었다(11). 발효 금은화에 대한 연구로는 자연 발효 금은화를 이용한 금은화 전당 숙성도에 따른 억균 효과에 따른 실험보고가 있었다(12).

이번 연구에서는 장 상피세포에서 DSS로 장점막 투과성 증가를 유발시킨 HCT-116 cell의 투과성을 감소시키고 장 점막을 보호하는 probiotics의 효과가 장누수 증후군을 비롯한 전신 면역체계를 개선시키는 치료로 응용될 수 있는지 알아보고자 하였다. 또한 장 투과성에 대하여 항염 작용이 우수하다고 알려져 있는 금은화와 발효 금은화의 효과를 살펴보고 유해균과 세포가 접촉되었을 때 장 투과성에 어떠한 변화가 나타나는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

HCT-116 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분주 받아 사용하였다. 세포배양은 McCoy's 5A medium(500 mL)에 10% FBS(50 mL)와 1% penicillin streptomycin이 함유된 배지를 사용하였다.

세포배양

본 연구에 사용된 HCT-116 세포는 McCoy's 5A medium, 10% FBS, 1% penicillin streptomycin이 함유된 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂, 90% humidity의 조건하에서 배양되었다. 배양된 세포는 2~3일에 한 번씩 배양액을 바꾸어 주면서 배양하여 세포분화가 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline(PBS)으로 세포를 세척한 후 trypsin-EDTA용액으로 부착된 세포를 분리한 뒤 원심분리 하여 세포를 모은 다음 세포와 배지를 잘 혼합하여 계대 배양하여 사용하였다.

균주배양

균주는 셀바이오택(Gimpo, Korea)에서 분양받은 *Lactobacillus acidophilus*와 *Lactobacillus(L.) plantarum*(유익균), *S. aureus*(유해균)를 이용하였다. 스타터 배양액은 Lactobacilli MRS agar plate에서 autoclave를 이용하여 121°C에서 15분간 멸균한 액체배지(Lactobacilli MRS broth, Difco, Detroit, MI, USA)에 각각의 균주를 1회 접종한 뒤 최적 조건에서 배양하였다. 유해균은 동일한 방법으로 액체배지(nutrient broth)에 배양하였으며 각각의 균주에 따른 최적의 조건을 적용하였다. *L. acidophilus*와 *L. plantarum*은 Lactobacilli MRS broth/agar에, *S. aureus*는 nutrient broth/agar에 각각 24시간 동안 37°C에서 배양되었다.

추출물 및 발효물 제조

본 실험에서 사용된 금은화(*Lonicera Flos*)분말은 동국대학교 일산병원으로부터 제공받아 밀봉한 후 암소에서 보관하여 사용하였다. 금은화의 추출은 250 mL 비커에 금은화 분말 30 g에 Lactobacilli MRS broth 150 mL를 첨가하여 실온(15~20°C)에서 30분간 sonication한 뒤, shaking water bath를 이용하여 70°C, 70 rpm의 조건에서 3시간 동안 열수 추출하였다. 발효 금은화 추출물은 금은화 추출물을 autoclave하여 121°C에서 15분간 멸균시킨 후 실온에서 충분히 식히고 *L. plantarum*을 2×10⁷ CFU/mL가 되도록 접종하여 24시간 동안 37°C incubation에서 발효한 뒤 autoclave하여 121°C에서 15분간 멸균시킨 후 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 얻은 상층액을 실험에 이용하였다.

장점막 투과성 분석

세포분화가 최대 상태가 되면 HCT-116 세포는 24-well culture insert plate(apical)에 McCoy's 5A medium, 10% FBS, 1% penicillin streptomycin이 함유된 500 µL의 배양액을 사용하여 2×10⁵ cells/well이 되도록 배양되었고 24-well receiver plate(basolateral)에는 800 µL의 배양액을 넣어 37°C, 5% CO₂, 90% humidity의 조건하에서 24시간 동안 배양하였다. Macfarland Scale에 상응하는 흡광도를 측정하여 계산한 유산균의 균수가 10⁹ CFU/10 µL가 되도록 각각의 균주 10 µL를 insert plate에 넣어 HCT-116 세포배양액에 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 세포가 잘 부착되면 장점막 투과성 증가를 유발하기 위하여 3% DSS를 첨가하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 금은화 및 발효 금은화도 동일한 방법으로 HCT-116 세포에 배양되어 DSS를 첨가한 후 다시 배양한 결과로 장 점막 투과성의 변화를 관찰하였다.

Transepithelial Electrical Resistance(TEER) 측정

장 점막의 투과성을 확인하기 위해 apical plate에 배양된 균주에 DSS를 첨가한 날부터 Millicell-ERS(Millipore, Bedford, MA, USA) 기계를 이용하여 약 2시간, 4시간, 20시간, 22시간째 되는 시점에서 TEER값을 측정하였다. 각 실험은 3개의 well의 값을 측정하여 평균값을 구하였으며 결과는

대조군에 대한 TEER 값의 변화율(%)로 나타내었다. DSS 처리를 하지 않은 배지가 있는 well의 monolayer TEER값을 대조군으로 설정하였다.

TEER 측정 전극은 사용하기 전에 0점이 되는지 확인하고 전극 끝이 긴 쪽을 각 transwell의 안쪽에 있는 구멍에 넣어 basolateral plate의 media에 잠기게 하였다. 전극의 짧은 쪽은 apical plate의 media에 닿을 정도로만 넣어 세포 단층막을 손상하지 않게 주의하며 TEER값을 측정하였다.

Horseradish peroxide(HRP) 투과성 측정

HCT-116 세포에 DSS를 첨가한지 22시간 되는 시점에서 24-well culture insert plate(apical)에 기존 배지를 제거한 후 HRP(peroxide from horseradish type VI-A, Sigma, St. Louis, MO, USA) 60 μ L를 첨가하였다. 한 시간 동안 37°C, 5% CO₂, 90% humidity의 조건하에서 배양한 다음 receiver plate(basolateral)의 배지를 10,000배 희석한 배지액 100 μ L에 HRP 기질용액인 TMB SOL(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 100 μ L를 혼합하여 약 10분간 실온에 두어 반응시킨다. HRP가 처리된 plate에 있는 용액의 색이 진하게 변하게 되면 Stop solution(2 M H₂SO₄) 100 μ L를 넣어 반응을 종결시킨다. UV ELISA microplate reader를 이용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

본 연구의 실험결과는 평균(mean)과 표준편차(SD)로 나타내었다. 통계적 분석은 The statistical package for social science(SPSS) software program(version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다. 각 그룹간의 표준편차를 확인하기 위해 One-way ANOVA와 Bonferroni's post-hoc test를 시행하였으며 실험군 간의 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결 과

유산균과 금은화 및 발효 금은화를 첨가한 세포의 점막 투과성 변화

장점막 투과성에 대한 유산균의 효과 및 금은화와 발효 금은화의 효과를 확인하기 위하여 HCT-116 세포 점막에서 DSS만 첨가한 세포, *L. acidophilus*와 *L. plantarum*, 금은화 및 *L. plantarum*과 발효시킨 금은화 추출물을 첨가하여 배양한 세포의 TEER값을 각각 측정하였고 TEER이 측정된 때 시간마다 대조군을 100%로 설정하여 TEER의 변화율을 측정하였다. Percentage of control을 다음과 같이 계산하여 Fig. 1에 표기하였다.

$$\text{Percentage of control (\%)} = (\text{TEER value} / \text{control TEER value}) \times 100$$

TEER값의 변화 추이를 살펴 본 결과 시간이 지날수록 DSS만 첨가한 세포의 TEER값은 실험 시작 2시간 경과 시

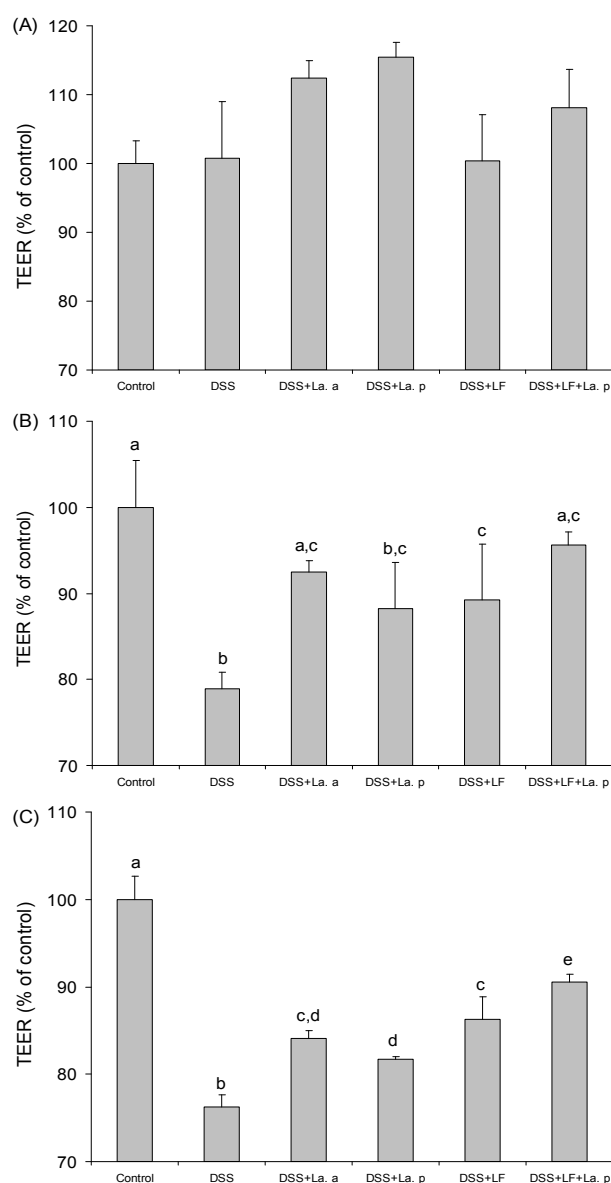


Fig. 1. Results are expressed as percent of control in TEER (transepithelial electrical resistance) measurements of HCT-116 cells at 3 different stages of the experiment. Graphs show the results measured at the starting point of the experiment. No statistically significant differences between the groups (A). 4 hour DSS treatment. The means without a common letter differed when $p < 0.05$ (B). 22 hour DSS treatment. The means without a common letter differed when $p < 0.05$ (C). La. a: *Lactobacillus acidophilus*, La. p: *Lactobacillus plantarum*, LF: *Lonicerae Flos*, LF+La. p: fermented *Lonicerae Flos* with *Lactobacillus plantarum*.

점부터 대조군에 대하여 감소 추세를 보였으며(percentage of control: 84.84%) 4시간 경과 시 78.91%, 20시간 경과 시 77.83%, TEER 측정 종료 시간인 22시간 경과 시점에서는 76.25%로 측정되었다. DSS군을 제외한 나머지 군에서 실험 시작 당시 측정된 금은화 첨가군의 TEER값(100.36%)만이 유일하게 DSS군(100.72%)보다 낮게 측정되었고, 나머지군은 DSS만 첨가한 세포의 TEER값보다 전부 높은 수치의 변화율을 나타냈으며 그중 실험 시작 당시 측정된 수치를

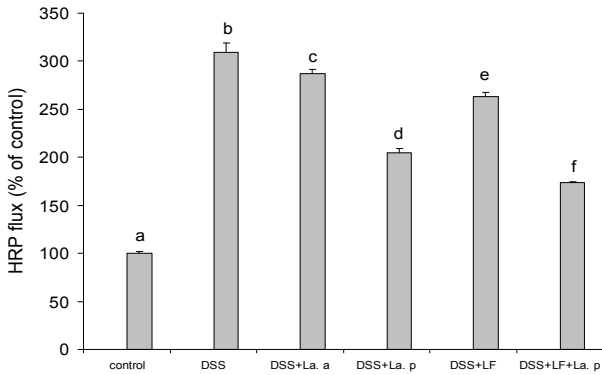


Fig. 2. Results show as percentage of control in HRP flux measurements of HCT-116 cells at 22 hour of DSS induced increased intestinal permeability. The means without a common letter differed when $p < 0.05$. La. a: *Lactobacillus acidophilus*, La. p: *Lactobacillus plantarum*, LF: *Lonicerae Flos*, LF+La. p: fermented *Lonicerae Flos* with *Lactobacillus plantarum*.

제외한 나머지 4개의 TEER값을 토대로 계산한 percentage of control 값이 각각 2시간 경과 시 100.96%, 4시간 경과 시 95.58%, 20시간 경과 시 93.87%, 24시간 경과 시 90.5%로 *L. acidophilus*와 발효시킨 금은화를 첨가한 군에서 가장 높게 측정되었다.

HRP 투과성 측정 결과를 살펴보면, HRP 활성정도가 증가할수록 점막 투과성이 증가하여 receiver plate의 농도가 증가했다는 것을 확인할 수 있다. 전체 군에서 대조군보다 높은 투과도가 나타났고 유익균과 금은화 및 발효 금은화를 첨가한 세포에서 DSS 처리만 한 세포보다 HRP 투과성이 높은 것으로 확인되었다. 그중에서 발효 금은화의 HRP 투과성 변화율이 174.01%로 가장 낮게 확인되어 세포 점막 투과성을 가장 많이 감소시켰다는 것을 확인할 수 있다. 대조군을 기준으로 HRP 투과도의 변화율은 percentage of control을 계산하였으며 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

유해균을 첨가한 세포의 점막 투과성 변화

장 점막 투과성에 대한 유해균의 영향을 확인하기 위하여 DSS만 첨가한 세포와 *S. aureus*를 단독으로 첨가하여 배양한 세포의 TEER값을 각각 측정하였고, 대조군을 100%로 설정하여 TEER의 변화를 측정하였다. 그 결과는 Fig. 3에 표기하였다.

2시간 경과한 시점에서 *S. aureus*를 첨가한 군의 TEER 변화율이 95.12%로 DSS군(87.94%)보다 높게 측정되었으며 실험이 종료되는 22시간까지 각각의 시간대에서 DSS보다 높은 변화율을 나타내었다. 그러므로 유해균을 첨가한 세포의 TEER 변화율이 DSS로 장 점막 투과성을 유발시킨 세포의 TEER 변화율보다 높게 측정되었다는 것을 확인할 수 있었다.

장 점막 투과성에 대한 유해균의 영향을 확인하기 위하여 HRP값을 측정하였으며 HRP 투과성 측정을 통해 HRP 활성도가 증가할수록 장 투과성이 증가하여 receiver plate의 농

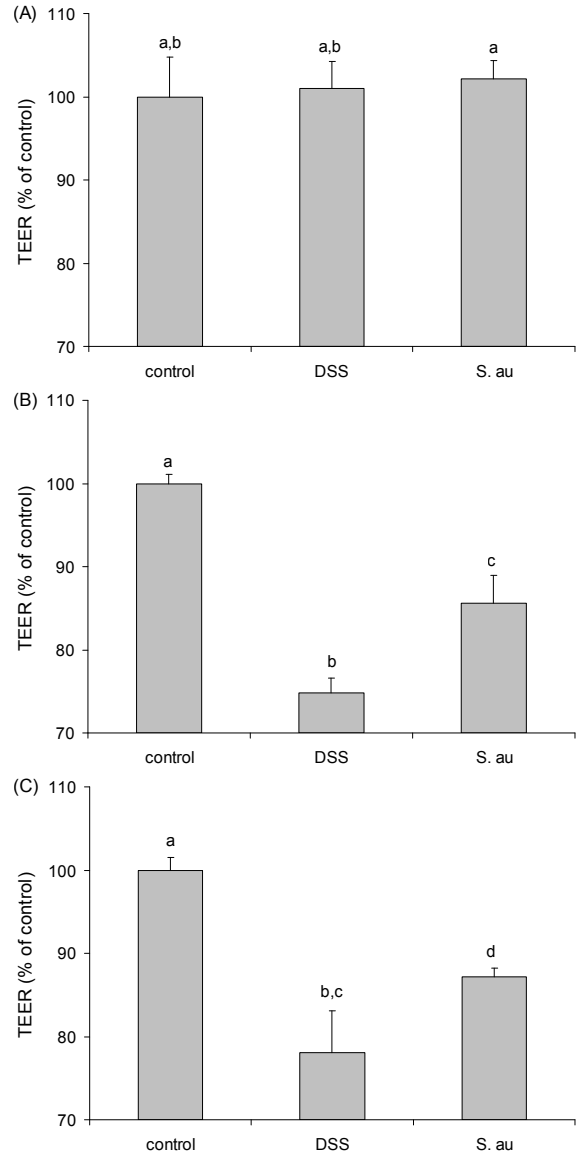


Fig. 3. Results are expressed as percent of control in TEER (Transepithelial Electrical Resistance) measurements of HCT-116 cells at 3 different stages of the experiment. Graphs show the results measured at the starting point of the experiment. The means without a common letter differed when $p < 0.05$ (A). 4 hour DSS treatment. The means without a common letter differed when $p < 0.05$ (B). 22 hour DSS treatment. The means without a common letter differed when $p < 0.05$ (C). S. au: *Staphylococcus aureus*.

도가 증가했다는 것을 확인할 수 있다. 전체 군에서 대조군보다 높은 HRP 투과도가 나타났고 *S. aureus*를 첨가한 세포의 HRP 투과성 변화율(347.54%)이 DSS 처리를 한 세포의 TEER 변화율(377.54%)보다 낮게 나타나 DSS처리만 한 세포보다 유해균을 첨가한 세포의 투과성이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 대조군을 기준으로 HRP 투과도의 변화율은 percentage of control을 계산하였으며 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다

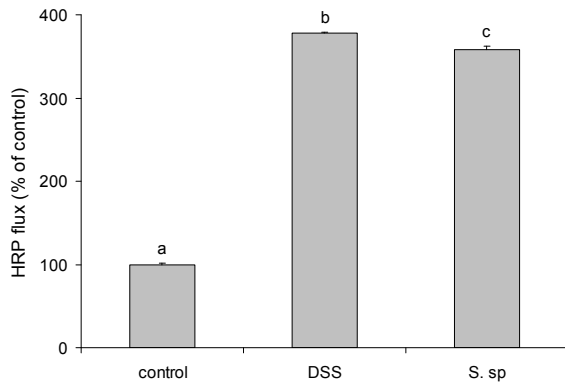


Fig. 4. Results show as percentage of control in HRP flux measurements of HCT-116 cells at 22 hour of DSS induced increased intestinal permeability. The means without a common letter differed when $p < 0.05$. S. au: *Staphylococcus aureus* alone.

고 찰

이번 연구에서는 장벽의 투과성을 감소시키고 장 점막을 보호하여 장누수 증후군을 비롯한 전신 면역체계를 개선시키는 치료로 응용될 수 있는 probiotics와 금은화 및 발효 금은화의 효과를 알아보려고 하였다.

유산균은 장내 유해균의 억제작용 및 정장작용, 혈중 콜레스테롤 감소기능, 면역 증강 작용, 영양학적 가치 증진, 간경화 개선 작용, 항암 작용, 노화억제 작용, 피부 미용효과, 유당 불내증 격감 작용 등을 가지고 있어 인간의 건강과 아주 밀접해 있다(13). 한약재를 유산균으로 발효시켰을 때 유해균 억제효과가 증대된다는 것은 효소 작용에 의해 발효균이 생성시킨 생물전환효과를 한약재의 기존 항염 작용에 도입하는 새로운 방법적인 시도라고 볼 수 있고, 이것은 한약치료에 새로운 패러다임을 제시해줄 수 있는 획기적인 방법이라고 볼 수 있다. 그러므로 유산균을 단독으로 사용하는 것보다 한약과 발효시켜서 사용하는 것이 장누수 증후군에 더욱 유의한 결과를 나타낼 수도 있을 것이라는 추측을 해볼 수 있었다.

장누수 증후군 *in vitro* model의 확립

장누수 증후군의 *in vitro* 모델은 dextran sodium sulphate(DSS)로 케양성 대장염을 유발한 *in vivo* 모델에서 참고하였는데(5), 본 연구 결과의 TEER과 HRP 측정 결과상 대조군에 비해 DSS를 첨가한 세포의 투과도가 현저히 증가되었으며 이로써 DSS가 HCT-116의 장 점막의 투과성 변화를 측정하는데 꼭 필요한 요소라는 것이 입증되었다.

장 점막 투과성에 대한 유산균의 효과

HCT-116세포는 대장암에서 유래된 세포주로서 24-well culture plate의 polycarbonate membrane상에서 배양될 때 극성을 나타내는 단층세포막을 형성하게 되며, polycarbonate membrane과 세포가 접한 부분의 세포막은 혈관측 세포막(receiver plate, basolateral side membrane), polycarbonate

membrane과 세포가 접하지 않은 쪽의 세포막은 장관측 세포막(insert plate, apical side membrane)의 특징을 띄게 된다(14).

TEER값은 투과 장벽의 역할을 하는 장점막 세포의 기능을 보여주기 때문에 세포간의 점착상태(tight junctions)를 평가하는데 사용된다. Tight junction이 잘 유지되면 점막이 단단하게 부착되어 있어 세포와 세포 사이로 흐르는 전류가 세포사이를 통과할 때 큰 저항을 발생시키기에 TEER값이 높게 나타난다. 고로 투과성이 증가되어 있는 상태에서 TEER값은 낮게 나타나게 된다.

HRP 투과성 분석은 과산화효소-항과산화소복합체를 이용한 방법으로 세포와 효소를 부착한 HRP에 대한 항체를 세포에서 반응시킨 다음 효소의 기질을 가하여 세포의 특정 항원 위치에서 항원-항체 복합체가 색소반응물로 나타나는 염색법이다. HRP 활성을 TMB SOL(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)반응으로 염색하여 나타내면 활성도를 가시화할 수 있다. 흡광도 측정법은 세균의 배양액에 일정한 파장의 빛을 통과시켰을 때 용액은 그 빛을 흡수 혹은 산란시킬 수 있고 이때 흡수된 빛의 양은 용액의 세포농도에 비례함을 이용한 것이다. 그러므로 HRP 활성정도가 증가할수록 장 투과성이 증가하여 receiver plate의 농도가 증가했다는 것을 확인할 수 있다.

본 연구에서 시행한 유익균의 TEER 측정 결과에 따르면 DSS 처리를 한 세포에서 장 점막 투과성 증가가 나타났으며 유익균과 배양된 후 DSS 처리를 한 세포의 TEER 측정값이 DSS 처리만 한 세포의 TEER 측정값보다 높게 나타났다. HRP 투과도를 측정한 결과 유익균과 배양된 세포의 점막 투과도가 DSS 처리만 한 세포보다 낮은 것으로 나타나서 각각의 결과는 점막 투과성의 증가를 보이고 있어 두 방법간의 일치된 결과를 보여주고 있다. 이러한 결과는 유산균을 복용했을 때 장점막의 점착도가 증가되면서 장누수 증후군을 예방할 수 있다는 기존의 연구와 일맥상통한 결과이며 유익균이 장점막을 보호한다는 기존의 연구와 연관성이 있는 결과라고 할 수 있겠다. 특히 발효금은화를 첨가한 그룹의 TEER 변화율이 가장 높게 측정되었고 HRP값은 가장 낮게 측정된 것으로 미루어 보아 발효 한약재의 장점막 보호 효과가 입증되었다고 볼 수 있겠다. 향후 유산균을 금은화를 발효시켰을 때 나타나는 유산균과 금은화의 상호작용에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 보인다.

본 연구에서 시행한 유해균의 TEER 측정 결과에 따르면 DSS 첨가로 장점막 투과성 증가를 유발시킨 세포와 비교했을 때 *S. aureus*를 단독으로 첨가하여 배양한 세포의 TEER 변화량이 더 높게 측정되어 유해균을 첨가한 그룹에서의 점막 투과성이 더 낮게 나왔다는 것을 확인할 수 있었다. HRP 측정 결과에 따르면 모든 군에서 대조군보다 높은 HRP값이 확인되었으며 *S. aureus*를 첨가한 세포의 HRP 투과성 변화율이 DSS 처리를 한 유해균 세포의 투과성보다 낮게 측정되

었다. 그러므로 TEER과 HRP 투과성의 변화율은 장 점막에 대한 유해균의 영향에 대하여 일치한 결과를 보였다는 사실을 확인할 수 있었다. 즉 유해균이 점막 상피세포에 주는 악영향이 DSS가 유발시키는 점막 투과성에 비해 미약하다는 사실을 확인할 수 있었다. 그러나 data가 충분하지 않아 여러 종류의 유해균과 장 점막 투과성에 대한 상관관계를 규명할 수 있는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

장누수의 기전과 점막 투과성의 관계

장누수의 주요 원인으로는 면역시스템의 과민반응으로 인하여 장점막이 손상되는 면역 체계의 이상을 꼽을 수 있다. 음식 알레르기로 인하여 소화 능력이 상실되어 위산 분비가 저하되면 단백질 분해효소인 펩신이 단백질을 분해하지 못하여 소장 유해균 증가와 유익균 감소가 나타난다. 이것은 장내 산도를 떨어뜨려 칸디다균이 번식하게 되고, 그것이 장벽에 단백분해 효소를 방출하여 장점막을 파괴시켜 장내 투과성을 증가시키게 된다(15). 또한 알코올, 커피, 트랜스지방산, 설탕, 감미제 등이 외부 유해물질로 작용하여 장누수를 일으킬 수 있다. 항생제의 과사용 역시 장내 이상균의 번식을 초래할 수 있으며, NSAID의 COX-1 억제, 프로스타글란딘의 점액분비억제 작용이 점막 방어력을 감소시킨다. 영양불량과 스트레스는 위장관의 면역력을 약화시켜서 IgA 항체의 생성을 저하시키고 소화력과 소화관 연동운동을 저하시키며 소화관점막 혈류를 감소시켜 점막 차단벽의 합성을 위협한다. 그러므로 막 투과성을 항진시키는 다양한 요인들이 장누수를 발생시키는 것으로 볼 수 있다.

본 실험에서는 유익균으로 *L. acidophilus*와 *L. plantarum*이 사용되었는데 *L. acidophilus*는 변비 치료에 이용되며, 방사선요법과 관련된 설사 치료에 관여하며 면역력 증강과 장내 균주의 조화를 이루는 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(16). 또한 NSAID의 사용으로 인해 발생하는 Tight junction의 면역조절억제를 방지해주는 역할을 한다는 연구도 시행된 바 있다(17). *L. plantarum* 또한 *E. coli* 감염에 의한 장 투과성 증가를 억제해주는 장벽 보호 효과가 있다는 것이 다수의 연구를 통해 입증된 바 있어(18,19) 본 실험에서 다시 한 번 유익균의 장 점막 보호 효과가 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. 금은화는 항산화와 항균효과가 뛰어나 예전부터 그 효과를 위해 널리 사용되어 왔다. 선행연구에서 금은화를 식중독 유발세균에 처리하였을 때 우수한 항균 효과가 있었다고 보고되고 있어(11) 이번 연구 결과를 통해서도 장 점막의 보호기능 및 항균작용이 우수하다는 것이 한번 입증되었다.

요 약

유산균과 금은화, 발효 금은화는 장누수 증후군과 연관된 장 상피세포 점막 투과성 감소에 대하여 유의한 효과를 나타내었다. 따라서 유산균을 단독으로 사용하는 방법과 유산균

을 이용해 발효시킨 금은화를 증가된 장 투과성 및 장내미생물 불균형으로 인한 장누수 증후군과 관련된 일련의 증상들을 치료하고 면역관련 질환 및 만성 염증성 질환에도 응용할 수 있을 것으로 예상되며 이에 대한 앞으로의 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임.

문 헌

- Han MJ, Lee S, Lim JK, Lee HM, Han MS, Kim WJ, Park IH, Son SC. 2008. Assessment of intestinal permeability using polyethylene glycol in liver cirrhosis with ascites. *Chonnam Med J* 44: 87-92.
- Jeon WK. 2010. Complement and integrative approach in gut health and immunologic disease. *Hanyang Med Rev* 30: 109-114.
- Liu Z, Li N, Neu J. 2005. Tight junction, leaky intestines and pediatric diseases. *Acta Paediatr* 94: 386-393.
- Silverman MH, Ostro MJ. 1999. *Bacterial endotoxin in human disease*. XOMA (US) LLC, Berkeley, CA, USA.
- Elson C, Sartor R, Tennyson G, Riddell R. 1995. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109: 1344-1367.
- Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. 1999. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sodium sulphate. *Exp Anim* 48: 137-43.
- Resta-Lenert S, Barrett KE. 2006. Probiotics and commensals reverse TNF-alpha and IFN-gamma-induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 130: 731-746.
- Park YK. 2007. Effect of *Lactobacillus* GG on impaired intestinal barrier function. *PhD Dissertation*. Hanyang University, Seoul, Korea.
- Ukena S, Singh A, Dringenberg U, Engelhardt R, Seider U, Hansen W, Bleich A, Bruder D, Franzke A, Rogler G, Suerbaum S, Buer J, Gunzer F, Westendorf A. 2007. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS ONE* 2: e1308. DOI: 10.1371/journal.pone.0001308
- Ro WS, Ryu BH, Kim JS, Yoon SH. 2006. Experimental Studies on the anti-cathartic effects of Dolichoris Semen, Terminaliae Fructus and Bojanggunbi-tang. *Korean J Orient Int Med* 27: 356-370.
- Bae JH, Kim MS, Kang EH. 2005. Antimicrobial effect of *Lonicerae Flos* extracts on food-borne pathogens. *Korean J Food Sci Technol* 37: 642-647.
- Shin JY. 1983. An experimental study on the antibacterial action on maturity of *Lonicera Flos* extract. *Taehan Hanui Hakhoechi* 4: 32-38.
- Jeong HG. 2001. Selection criteria for probiotics and their industrial applications. *Bioindustry News* 14: 39-48.
- Hidalgo L, Raub T, Borchardt R. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96: 736-749.
- Moon G, Myung SJ, Jeong JY, Yang SK, Cho YK, Lee SM,

- Chang HS, Byeon JS, Lee YJ, Lee JH, Hong WS, Kim JH, Min YI, Kim JS. 2004. Prophylactic effect of *Lactobacillus* GG in animal colitis and its effect on cytokine secretion and mucin gene expressions. *Korean J Gastroenterol* 43: 234-245.
16. Donohue DC, Salminen S. 1996. Safety of probiotic bacteria. *Asia Pac J Clin Nutr* 5: 25-28.
17. Montalto M, Maggiano N, Ricci R, Curigliano V, Santoro L, Di Nicuolo F, Vecchio FM, Gasbarrini A, Gasbarrini G. 2004. *Lactobacillus acidophilus* protects tight junctions from aspirin damage in HT-29 cells. *Digestion* 69: 225-228.
18. Mangell P, Nejdfor P, Wang M, Ahrne S, Westrom B, Thorlacius H, Jeppson B. 2002. *Lactobacillus plantarum* 299v inhibits *Escherichia coli*-induced intestinal permeability. *Dig Dis Sci* 47: 511-516.
19. Anderson R, Cookson A, McNabb W, Kelly W, Roy N. 2010. *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS Microbiol Lett* 209: 184-192.

(2012년 3월 15일 접수; 2012년 6월 11일 채택)