

원저

청국장항염증 및 장점막 투과성 개선 효과

김형구 · 이명종 · 김호준 · 김기철 · Shambhunath Bose

동국대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Effects of Fermented Soybean upon Anti-inflammation and Intestinal Mucous Membrane Permeability

Hyung-Gu Kim, O.M.D, Myeong-Jong Lee O.M.D, Ho-Jun Kim O.M.D, Ki-Cheol Kim, Shambhunath Bose PH.D

Dept of Oriental Rehabilitation Medicine, Dongguk University, Seoul, Republic of Korea

Objectives

This study was designed to investigate the effects of fermented soybean upon anti-inflammation, cytotoxicity, antioxidant and intestinal mucous membrane permeability by measuring the cell viability, NO (nitric oxide) production, DPPH, Polyphenol, HRP and TEER in cells like Raw 264.7 and HCT 116 using fermented soybean.

Methods

Raw 264.7 cell and HCT 166 cell were used in this study. And fermented soybean powders were used for the experimental group and soybean powders for the control group. There was inflammation response upon using lipopolysaccharide(LPS). Fermented soybean powders and soybean powders were in a respectively different dose added to the cells with LPS. MTT assay, NO, DPPH and Polyphenol measurement, TEER, HRP were conducted for each cell. The results of this study were presented in mean and standard deviation.

Results

1. In Raw 254.7 cells added with 100 μ l/ml unfermented soybean powders, 104.95% higher than 62.59% was measured. In Raw 254.7 cells added with 100 μ l/ml fermented soybean powders, there was 74.90% measured higher than 62.59%, which was a significant result.
2. By a gradual increase of unfermented soybean powders like 0.1 μ l/ml, 1.0 μ l/ml, 10 μ l/ml, 100 μ l/ml, the measured NO were also gradually decreased 53.12 μ M, 47.57 μ M, 37.02 μ M, 28.16 μ M. In case of cells added with fermented soybean powders, 43.95 μ M NO was measured in 0.1 μ l/ml which is significant, and in other cases, mostly measured over 56.72 μ M.
3. It was inferred that fermented soybean powders have anti-inflammatory effects of maintaining intestinal mucous membrane permeability because the measured values of cells in both groups were all higher than 133.62 measured of cells added with only LPS. And measured values of cells in both groups were all lower than 2.26 measured of cells added with only LPS.
4. In case of experiment DPPH and polyphenol measurement, fermented group was all higher than unfermented group.

Conclusion

From the results of conducting MTT assay, NO measurement, and TEER, HRP by using cells Raw 264.7 and HCT-116, even though there was no significance in the correlation between cytotoxicity, anti-inflammatory effects, both unfermented soybean powders and fermented soybean powders were shown to have intestinal mucous membrane permeability improvement effects. This effects could be applicable for autoimmune diseases, chronic inflammatory diseases and so additional studies are expected in the future. From the results of conducting DPPH, Polyphenol measurement, Fermented soybean may be useful as potential antioxidant.

Key Words : fermented soybean, unfermented soybean, Bacillus subtilis, inflammatory, intestinal mucous membrane permeability, antioxidant

■ 교신저자 : 김호준, 경기도 고양시 일산동구 식사동 동국대학교 일산한방병원 한방재활의학과
Tel : (031)961-9111, fax : (031)961-9009, e-mail : kimklar@dongguk.ac.kr
■ 접수: 2012년 06월 01일 수정: 2012년 06월 02일 채택: 2012년 06월 20일

I. 서론

청국장은 전통발효식품의 하나로 단기간에 만들 수 있어 오래 전부터 우리 민족이 이용하였다. 청국장은 발효과정에서 고초균(*Bacillus natto* or *bacillus subtilis*)이 생성하는 효소의 작용으로 콩 단백질이 저분자의 펩티드로 분해되어 소화흡수가 쉽고 풍미가 특유하고 영양적으로 우수하고 여러 가지 생리적 기능을 나타내는 것으로 알려지고 있어 많은 사람들의 관심의 대상이 되는 식품이다.¹⁾ 청국장은 가을에서 이듬해 봄까지 메주콩을 쭈어 식기 전에 시루에 벗짚을 깔고, 그 위에 뜨거운 메주콩을 담은 뒤 아랫목에 이불을 씌워 40~50℃ 에서 2~3일간 발효시킨다. 그러면 콩과 벗짚에 붙어 있는 고초균이 번식하여 끈끈한 점물질이 생성되고 청국장이 만들어진다.^{2,3)}

청국장의 재료가 되는 콩은 한국인에게 주된 단백질 공급원으로 이용되어 왔으며 콩과 청국장에 대한 여러 가지 연구가 진행되고 있다. 콩의 항염증 및 항알레르기 효과에 대한 연구^{4,5)} 들도 찾아 볼 수 있고, 장 등⁶⁾은 청국장에서 분리한 *Bacillus* spp. 균주의 혈전용해능 및 면역증강활성에 대해 밝혔고, 손 등⁷⁾은 *Bacillus* 균주를 이용한 검정콩 청국장의 생리활성 및 Isoflavone 함량에 대해 연구를 하였다.

청국장은 위처럼 콩을 발효하여 만든 음식으로, 한약재에서 콩을 발효하여 만든 豆豉라는 약재와의 연관성을 생각해 볼 수 있고, 豆豉는 콩과에 속한 대두(콩, *Glycine max*(L.) Merill) 또는 야대두(들콩, *Glycine soja* Sieb, et. Zucc.)의 성숙종자 가운데 검은 콩을 발효 가공하여 만든 것이다. 豆豉는 大豆豉, 豉, 香豉, 香豆豉 등으로 불려지기도 하며 그 제법에 따라 淡豆豉, 鹹豆豉, 豉汁으로 구분되기도 한다⁸⁾. 豆豉는 解表, 除煩, 宣發鬱熱의

효능이 있어 感冒, 寒熱頭痛, 煩燥胸悶, 虛煩不眠을 치료하는 한약재⁹⁾로 豆豉의 주치 증상들이 염증의 증상들과 비슷한 것을 확인할 수 있다.

염증(Inflammation)은 세포상해를 유발하는 다양한 자극에 대한 살아 있는 조직, 즉 혈관이 있는 조직의 복합적인 반응으로 발적, 종창, 발열, 동통 및 기능 상실 등의 증상이 나타난다. 염증반응은 cytokines, nitric oxide, free radical 등의 여러 가지 화학매개체들이 관여하게 된다¹⁰⁾.

여러 가지 한약재들의 항염증 효과에 대한 연구들 역시 이루어지고 있다. 서¹¹⁾는 청대 추출물의 항염증 효과에 대해 연구하였고, 곡 등¹²⁾은 연교가 LPS로 유발된 Raw 264.7 Cell에서 항염증 효과를 나타낸다는 것을 발표하였다. 천연 한약재뿐만 아니라 발효 한약재들에 대한 연구도 이루어지고 있다. 강 등¹³⁾은 발효 울금의 투여가 쥐의 간 기능 및 혈중 지질 함량에 영향을 준다는 연구를 발표하였고, Shen 등¹⁴⁾은 몇몇 발효 한약재들에 있어서 발효하지 않은 한약재들보다 좀 더 효과가 있다는 것을 연구하였다.

인체의 장관은 장내 세균의 저장소로서 점막 장벽기능(intestinal barrier), 면역글로블린 분비, 대식세포계 등과 같은 일련의 방어체계를 이루고 있다. 장관 내 장 점막층은 장내에 존재하는 다양한 세균 및 독소 등이 혈류로의 유입을 차단하는 방어벽 역할을 하며 상피세포층에 단단히 결합되어 있다. 즉 장 점막은 외부물질을 차단하는 장벽인 동시에 이들을 통과, 흡수시키는 이중적인 기능을 갖고 있는 것이다. 장 점막세포는 일정한 세포 사이의 간극을 유지하다가 소화 흡수 과정이 일어나는 동안 어떠한 자극이나 손상이 가해지면서 세포 사이의 틈으로 고분자 물질이 왕복할 수 있는 장 점막 투과성이 증가된 상황이 나타나게 된다. 장 점막 투과성의 증가나 손상으로 인해 병원체, 항원, 부패물질 등이 장 점막 내로 유입되어 염증반

응이 일어나고 내독소가 혈류로 유입되어 장내세균전위(Bacterial translocation), 장관내독소혈증(intestinal endotoxemia) 등을 야기하여 각종 염증 반응 및 면역 반응을 초래하게 된다. 그러므로 자가면역질환 및 만성염증질환의 원인병태생리를 설명하는데 있어 장 점막의 투과성이 필수적인 조건이 되었다^{15,30,31}).

본 연구에서는 Raw 264.7 Cell과 HCT-116 Cell에 다양한 측정인자를 사용하여 청국장의 항염증 작용 및 세포독성, 장점막 투과성의 개선효과에 대해 알아보려고 하였다. 본 연구의 In vitro 모델을 유발하고 측정인자를 측정하는 방법에 대한 것은 연교를 사용한 Raw 264.7 Cell 연구¹²)와 DSS를 사용하여 유산균 및 금은화의 장내 상피세포 점막 투과성에 대한 연구¹⁵), 박 등²⁹)의 연구를 참고하였다.

이번 연구에서는 Raw 264.7 Cell과 HCT-116 Cell을 이용하여 MTT assay, Transepithelial Electrical Resistance(TEER), Nitric Oxide(NO), HRP, DPPH, Polyphenol의 다양한 측정인자를 통해 청국장의 항산화 및 항염증 효과 및 장점막 투과성 개선효과, 세포독성에 대해 알아보려고 하였다. 그리고 실험군에 청국장 분말을 사용하고, 대조군에 생콩가루 분말을 사용하여 발효를 시켰을 때 상기 효능들에 어떠한 영향이 나타나는지에 대해 함께 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

Human Colorectal Carcinoma cell line인 HCT-116 세포는 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분주 받아 사용하였고, 세포배양은 McCoy's

5A medium(500ml)에 20% FBS(50ml)와 1% penicillin streptomycin이 함유된 배지를 사용하였다. CO₂ incubator 37°C, 5% CO₂ -95% O₂ 조건하에서 72시간 동안 배양하였다.

Macrophage cell line인 Raw 264.7 세포는 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분주 받아 사용하였고, 세포배양은 DMEM에 10% FBS와 2 mL-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 lg/ml streptomycin이 함유된 배지를 사용하였다. CO₂ incubator 37°C, 5% CO₂ -95% O₂ 조건하에서 배양하였다.

2. 세포배양

HCT-116 세포는 McCoy's 5A medium, 20% 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 원심 분리하여 세포를 모은 다음 세포와 배지를 잘 혼합하여 계대 배양하여 사용하였다.

Raw 264.7 세포는 DMEM에 10% FBS와 2 mL-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 lg/ml 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 원심 분리하여 세포를 모은 다음 세포와 배지를 잘 혼합하여 계대 배양하여 사용하였다.

3. 추출물 및 발효물 제조

청국장 분말(ORGA, Seoul, Korea)과 생콩가루 분말(ORGA, Seoul, Korea)을 5ml 당 1g 을 넣고 McCoy's, DMEM without serum 배양액을 사용한 다. 70°C에서 30분을 sonication한 후 3000rpm에서 6분 동안 원심분리를 시행한 이후 상층액을 가지고 0.45µm filter를 거친 후 NO와 MTT assay에 는 0.1µl/ml, 1µl/ml, 10µl/ml, 100µl/ml 의 4가지 dose를 만들어 실험을 진행하였고, TEER에는 1µl/ml, 10µl/ml, 100µl/ml의 3가지 dose를 만들어 실험을 진행한다.

4. LPS를 사용한 염증반응 유도

염증을 유발할 수 있는 물질 중 하나인 lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성균의 세포 외막에 존재하며, 대식세포 또는 단핵구에서 염증성 매개물질의 증가를 유발하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 LPS를 Raw 264.7 세포와 HCT 116 세포에 첨가하여 염증 반응을 유도하였다.

5. Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt, a type of tetrazole(MTT) assay

세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT)시약을 이용하여 세포 생존율(cell survival)을 측정하는 Mosman¹⁶⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. Raw 264.7 세포를 24-well plate는 4×10^5 cell/well 농도로 접종한 후 각 well에 검액을 투여하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24, 48 또는 72시간만큼 배양하였다. 배양 후 MTT 용액(5 µg/ml)을 첨가하고 4시간 후 상등액을 제거하고 DMSO (dimethylsulfoxide) 300 또는 100µl를 넣어 보라색의 formazan이 용출되도록 하여 micro plate

reader로 565nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

6. Nitric oxide(NO) 측정

안정된 NO 산화물인 NO₂(nitrite)는 Griess reagent system(Promega, USA)반응을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상층액을 50마이크로리터 씩 넣고 여기에 Griess 시약 sulfanilamide solution을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, 다시 N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride(NED) solution을 동량 첨가하여 10분간 반응 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. Transepithelial Electrical Resistance (TEER) 측정

장 점막의 투과성을 확인하기 위해 apical plate에 배양된 균주에 Millicell-ERS(Millipore, USA)기계를 이용하여 약 24시간째 되는 시점에서 TEER 값을 측정하였다. 각 실험은 1 well 당 8번 측정 한 값 중에서 유의성 있는 1개의 데이터를 선택하였으며 결과는 각각의 세포에 대한 전기저항의 크기로 나타내었다.

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.

8. Horseradish peroxidase(HRP) 투과성 측정

HCT-116 세포에 DSS를 첨가한지 24시간 되는 시점에서 24-well culture insert plate(apical)에 기존 배

지를 제거한 후 HRP(peroxide from Horseradish Type VI-A, Sigma) 60 μ l를 첨가하였다. 한 시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 90% humidity의 조건하에서 배양한 다음 receiver plate(basolateral)의 배지를 10000배 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(2M H₂SO₄) 100 μ l를 넣어 반응을 종결시키고, UV ELISA microplate reader를 이용하여 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

9. DPPH, Polyphenol 함량 측정

각 시료 추출물의 총 페놀 함량을 측정하기 위해 Folin-danis 방법을 이용하였다. 시료 용액(0.01ml)을 증류수로 80배 희석하고, Folin & Ciocalteu's phenol reagent(0.05ml)를 첨가하여 잘 섞은 후, 5분간 상온에서 반응시켰다. 혼합한 용액을 20% Na₂CO₃(0.15ml)를 넣어 다시 혼합하였다. 이 혼합 용액을 23 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 방치시킨 후, 760nm에서 흡광도를 측정하고, gallic acid를 이용한 표준 곡선에 따른 검량선을 작성하여 총 polyphenol 함량을 계산하였다.

전자공여능 측정(DPPH)은 우선 시료 1g을 용매 10ml에 녹이고 37 $^{\circ}$ C, 6000rpm에서 6시간 shaking을 시행한다. 이후 8000g, 40 $^{\circ}$ C에서 10분간 centrifuge를 시행한 후 상등액을 이용한다. 상등액에 DPPH를 가하여 혼합, 방치한 후 525nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였다. DPPH 라디칼 소거능으로 측정된 전자공여능은 아래식에 따라 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료구 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$

10. 통계처리

본 연구의 실험결과는 평균(mean)과 표준편차(SD)로 나타내었다. MTT assay, NO 측정, DPPH와 Polyphenol 함량의 측정은 한 번 실험 하였고, 한 번의 실험에서 well 4개를 사용하였다. TEER의 경우 한 well 당 8번 시행하여 그 중 유의성 있는 데이터 1회를 선별하였다. HRP 역시 유의성 있는 데이터 1회를 선별하여 결과를 나타내었다.

III. 결과

1. MTT assay

Raw 264.7 세포는 Macrophage cell line 으로 LPS를 통한 염증 반응에 민감하다. LPS만을 첨가하여 염증 반응을 일으켰을 경우 세포 생존율이 62.59%로 측정이 되었으므로 62.59%보다 높게 측정되었을 경우 세포독성에 유의성이 있다고 추론할 수 있다. Unfermented soybean powder(생콩가루) 100 μ l/ml, LPS를 첨가한 세포에서는 62.59%보다 높은 104.95%가 측정되었는데 100%보다 높게 측정된 것은 세포가 소멸하는 속도보다 성장하는 속도가 더 빠른 것 때문이라고 볼 수 있다. Fermented soybean powder(청국장 분말) 100 μ l/ml가 첨가된 세포 역시 62.59%보다 높은 74.90%로 유의성 있는 결과가 측정되었고 Unfermented soybean powder 0.1 μ l/ml, 1.0 μ l/ml 첨가된 세포에서도 세포 생존율이 80.06%, 65.43%로 측정되어 유의성 있다고 볼 수 있다. 이 외의 농도에서는 유의성을 찾기 힘들었다 (Fig. 1) (Table I).

Table I. Result of Cell Survival Measured by Conducting Unfermented Soybean Powders and Fermented Soybean Powders, and LPS in cell Raw 264.7

	Control	LPS	UF 0.1 μ l/ml	F 0.1 μ l/ml	UF 1.0 μ l/ml
Mean \pm sd	99.99 \pm 6.57	62.59 \pm 7.33	80.06 \pm 4.83	54.35 \pm 3.62	65.43 \pm 4.57
	F 1.0 μ l/ml	UF 10 μ l/ml	F 10 μ l/ml	UF 100 μ l/ml	F 100 μ l/ml
Mean \pm sd	61.84 \pm 5.84	49.33 \pm 8.29	30.49 \pm 3.26	104.95 \pm 6.95	74.90 \pm 2.97

UF : Unfermented soybean, F : Fermented soybean.

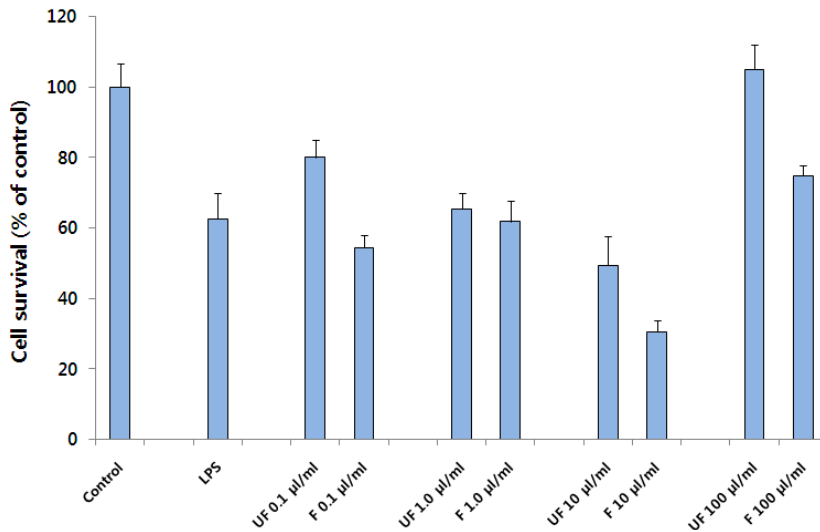


Fig. 1. Result of cell survival measured by conducting unfermented soybean powders and fermented soybean powders, and LPS in cell Raw 264.7.

HCT-116 세포의 경우 LPS로 염증 반응을 일으키고, 각각의 용액을 첨가한 세포들의 세포 생존율을 측정된 결과 Unfermented soybean powder 100 μ l/ml를 첨가한 세포가 110.52%로 유의성 있는 결과가 측정되었다 (Fig. 2) (Table II).

본 실험에서는 생콩가루를 사용하였을 경우에

청국장 분말을 사용하였을 때보다 세포 독성에 대한 유의성을 좀 더 예측해 볼 수 있었다.

2. Nitric oxide(NO) 측정

염증 반응이 일어나게 되면 NO가 발생하게 되

Table II. Result of Cell Survival Measured by Conducting Unfermented Soybean Powders and Fermented Soybean Powders, and LPS in cell HCT 116.

	Control	LPS	UF 0.1 μ l/ml	F 0.1 μ l/ml	UF 1.0 μ l/ml
Mean \pm sd	100 \pm 7.09	110.58 \pm 9.02	94.64 \pm 4.52	92.26 \pm 5.52	104.20 \pm 2.87
	F 1.0 μ l/ml	UF 10 μ l/ml	F 10 μ l/ml	UF 100 μ l/ml	F 100 μ l/ml
Mean \pm sd	96.13 \pm 2.51	100.20 \pm 3.66	105.01 \pm 5.54	110.52 \pm 3.58	95.97 \pm 1.72

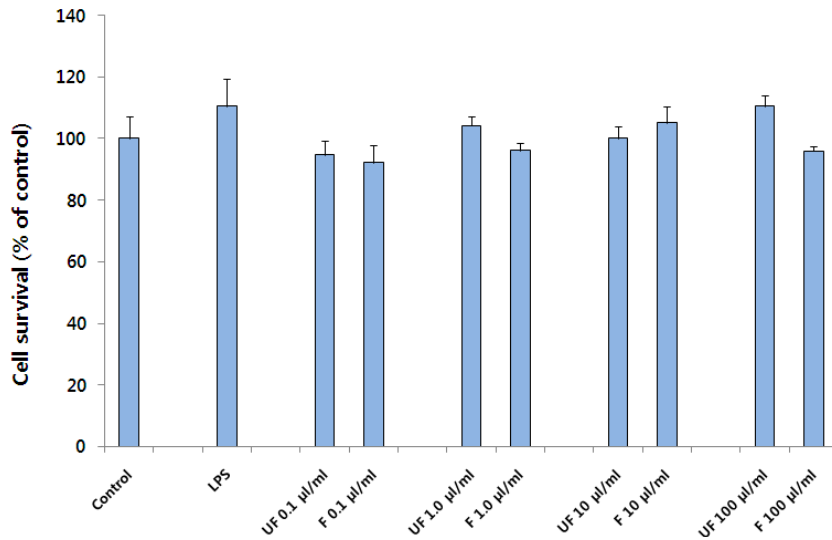


Fig. 2. Result of cell survival measured by conducting unfermented soybean powders and fermented soybean powders, and LPS in cell HCT 116.

Table III. Result of NO Measurement in Cell Raw 264.7 to which Unfermented Soybean Powders and Fermented Soybean Powders, and LPS were Added.

	Control	LPS	UF 0.1 μ l/ml	F 0.1 μ l/ml	UF 1.0 μ l/ml
Mean \pm sd	5.76 \pm 0.24	56.72 \pm 3.77	53.12 \pm 0.33	43.95 \pm 0.11	47.57 \pm 0.11
	F 1.0 μ l/ml	UF 10 μ l/ml	F 10 μ l/ml	UF 100 μ l/ml	F 100 μ l/ml
Mean \pm sd	70.71 \pm 0.34	37.02 \pm 1.95	109.18 \pm 2.82	28.16 \pm 3.81	70.15 \pm 1.83

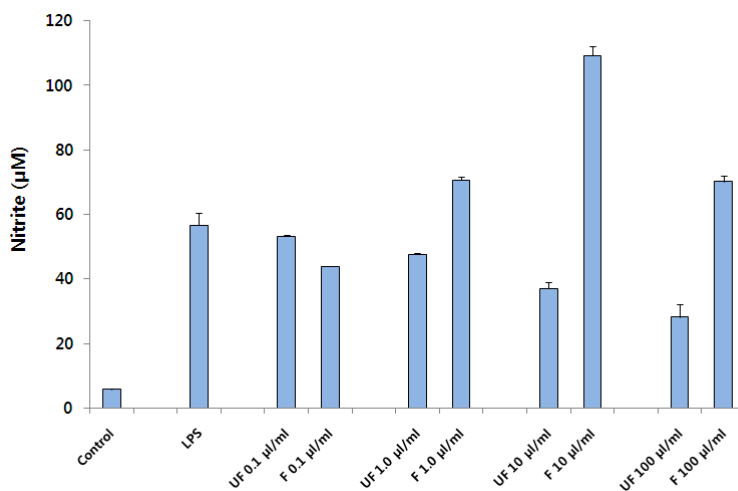


Fig. 3. Result of (NO measurement in cell Raw 264.7 to which unfermented soybean powders and fermented soybean powders, and LPS were added.

고, 측정된 NO의 수치가 감소하게 되면 항염증 효과를 가지는 것으로 추론할 수 있다. RAW 264.7 세포에 LPS만을 첨가하여 염증을 유도했을 때 NO는 56.72 μ M 측정되었다. Unfermented soybean powder를 0.1 μ l/ml, 1.0 μ l/ml, 10 μ l/ml, 100 μ l/ml 로 농도를 점차 늘려나갔을 때, 측정된 NO 역시 53.12 μ M, 47.57 μ M, 37.02 μ M, 28.16 μ M으로 감소하였다. Unfermented soybean powder의 경우 농도가 짙어짐에 따라 항염증 효과도 높아지고 있다고 추론할 수 있다. Fermented soybean powder를 첨가한 세포의 경우 0.1 μ l/ml에서 NO가 43.95 μ M 측정되어 유의성이 있었고, 이외에는 56.72 μ M보다 높게 측정되었다 (Fig. 3) (Table III).

HCT-116 세포의 경우 LPS만 첨가하였을 때 2.57 μ M이 측정되었고, Unfermented soybean powder와 Fermented soybean powder 양 쪽 모두 100 μ l/ml에서는 9.57 μ M, 4.55 μ M이 측정되어 NO가 더 많이 생성된 것을 관찰 할 수 있었다. 이 외의 농도에서는 LPS만을 첨가했을 경우 측정된 수치와 유사하거나 감소하였다 (Fig. 4) (Table IV).

3. Transepithelial Electrical Resistance (TEER) 측정

TEER 수치의 감소는 장 점막의 투과성이 증가되었다는 것을 의미하며, TEER 전기저항의 수치가

Table IV. Result of NO Measurement in Cell HCT 116 to which Unfermented Soybean Powders and Fermented Soybean Powders, and LPS were Added.

	Control	LPS	UF 0.1 μ l/ml	F 0.1 μ l/ml	UF 1.0 μ l/ml
Mean \pm sd	1.88 \pm 0.07	2.57 \pm 0.19	2.24 \pm 0.17	2.28 \pm 0.31	2.57 \pm 0.19
	F 1.0 μ l/ml	UF 10 μ l/ml	F 10 μ l/ml	UF 100 μ l/ml	F 100 μ l/ml
Mean \pm sd	2.33 \pm 0.21	3.65 \pm 0.13	2.45 \pm 0.20	9.58 \pm 5.75	4.56 \pm 0.05

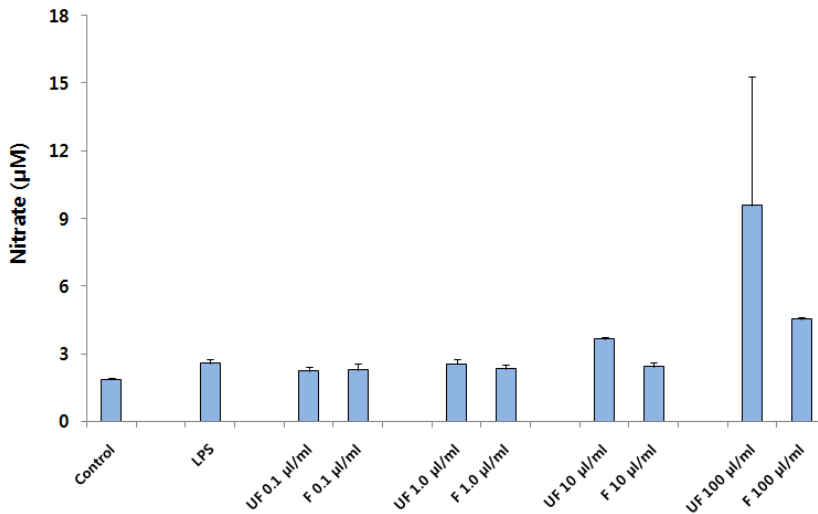


Fig. 4. Result of NO measurement in cell HCT 116 to which unfermented soybean powders and fermented soybean powders, and LPS were added.

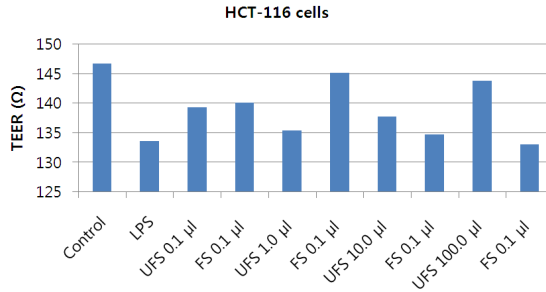


Fig. 5. Fig. Result of TEER measurement in cell HCT 116 to which unfermented soybean powders and fermented soybean powders, and LPS were added.

높다면 염증반응에 대한 보호효과가 높다고 추론이 가능하다. Unfermented soybean powder을 사용한 그룹의 경우 100μl/ml 첨가한 세포에서 TEER 143.8Ω이 측정되어 가장 높았고, Fermented soybean powder을 사용한 그룹의 경우 1.0μl/ml을 첨가한 세포에서 145.12Ω로 가장 높았다. 두 그룹 모두 어떠한 농도에서든 측정된 수치가 LPS만 첨가한 세포에서의 전기저항 133.62Ω보다 높게 측정되어 장점막의 투과성 개선 효과가 있다고 추론할 수 있다 (Fig. 5).

4. HRP 측정

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 파

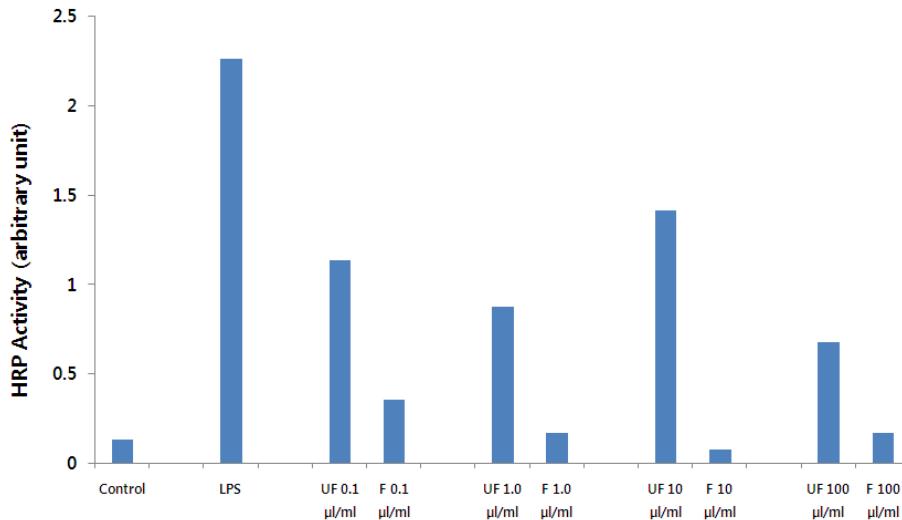


Fig. 6. Result of HRP measurement in cell HCT 116 to which unfermented soybean powders and fermented soybean powders, and LPS were added.

장의 빛을 통과시켰을 때 용액은 그 빛을 흡수 혹은 산란시킬 수 있고 이 때 흡수된 빛의 양은 용액의 세포농도에 비례함을 이용한 것이다. 그러므로 HRP 활성정도가 증가할수록 장 투과성이 증가하여 receiver plate의 농도가 증가했다는 것을 확인할 수 있다.¹⁵⁾

HRP의 경우 TEER과 반대로 측정 수치가 낮을수록 염증반응에 대한 보호효과가 높다고 해석할 수 있다. Unfermented soybean powder와 Fermented soybean powder 둘 다 LPS만을 사용했을 때보다 수치가 낮아 유의성이 있는 것으로 볼 수 있고, 특히 Fermented soybean powder를 사용했을 경우 Unfermented soybean powder보다 결과치가 더 좋은 것을 그래프에서 확인할 수 있다 (Fig. 6).

5. DPPH 및 Polyphenol 측정

식물성 식품 속에 함유되어 있는 많은 생리활성 물질 중 페놀은 가장 많이 함유되어 있으며, 또한 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. DPPH의 측정결과가 높을 수록, Polyphenol의 함량이 클수록 항산화 효과가 크다고 추론할 수 있다.

DPPH는 32배, 64배, 128배, 256배 총 4가지 농도로 희석을 하여서 측정하였고, Unfermented soybean powder와 Fermented soybean powder를 비교하였을 경우 모든 농도에서 Fermented soybean powder를 사용한 쪽이 더 높았다<Table V><Fig. 7>.

Table 5. Result of DPPH Measured by Conducting Unfermented Soybean Powders and Fermented Soybean Powders.

UFS	32X	64X	128X	256X
Mean ±sd	47.89 ± 4.10	45.52 ± 0.51	45.20 ± 1.56	45.02 ± 3.18
FS	32X	64X	128X	256X
Mean±sd	72.05 ± 0.80	62.75 ± 4.57	54.94 ± 1.77	52.82 ± 6.50

UFS : Unfermented soybean, FS: Fermented soybean

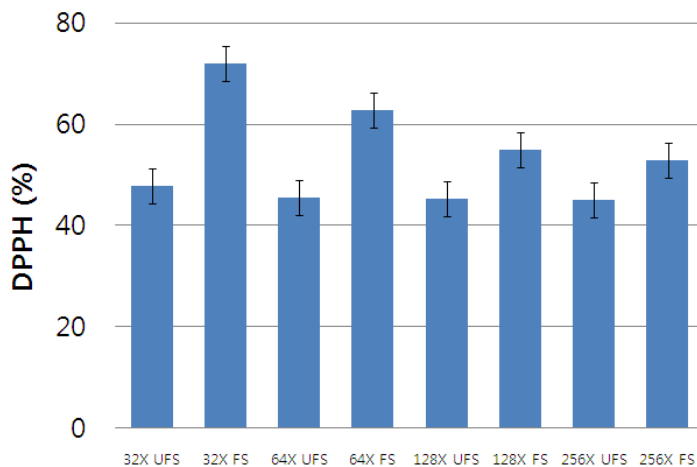


Fig. 7. Result of DPPH measurement by conducting Unfermented Soybean Powders and Fermented Soybean Powders.

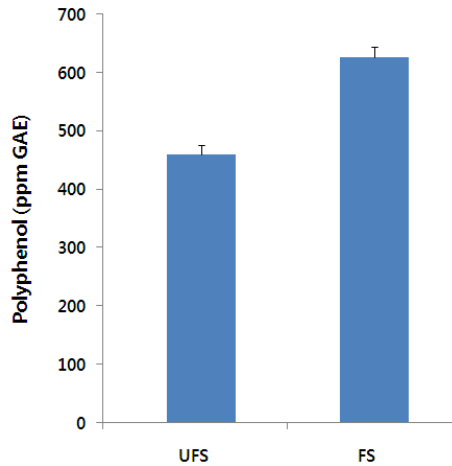


Fig. 8. Result of polyphenol measurement by conducting Unfermented Soybean Powders and Fermented Soybean Powders.

GAE: Gallic acid equivalent

그리고 Polyphenol의 함량 역시 Unfermented soybean 사용시 460.37, Fermented soybean 사용시 626.22로 Fermented soybean이 좀 더 높게 측정되었다 (Fig. 8).

상기의 결과를 보았을 경우 Fermented soybean powder의 경우 Unfermented soybean powder보다 항산화 효과가 더 좋다고 추론할 수 있다.

VI. 고찰

이번 연구에서는 Fermented soybean powder와 Unfermented soybean powder를 이용하여 전신 면역체계를 개선시키는 치료로 응용될 수 있는 청국장의 항염증, 항산화 효과 및 장점막 투과도 개선효과를 알아보려고 하였다.

염증반응을 일으킬 수 있는 세포에 외부 자극이 가해지면, interleukin-1 β 와 tumor necrosis factor- α 등의 전-염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 발현이 유도되고, 유도된 전-염증성 사

이토카인이 호중구를 활성화하여 염증 부위로 이동시킨다. inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenases(COX)-2를 코딩하는 유전자의 발현을 자극함으로써 염증반응에 관여하는 NO, PGE2의 반응성 물질을 생성하게 하여 염증 반응이 일어나게 되는데, 이 중, NO는 혈관 확장 및 조직 손상에 주로 관여하고, PGE2는 통증과 발열의 전달에 주로 관여하는 중요한 염증매개물질로 알려져 있다.

이와 같은 염증매개물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하여 각종 염증성 질환을 유발시키고 악화시키게 된다. 특히 만성염증에서는 NOS, COX와 같은 효소 및 signaling proteins의 상승 조절 작용을 일으켜, NO와 prostaglandins (PG)를 과량 생성하게 되고, 이는 다발성 경화증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 대장암과 같은 질환의 병인이 된다. 따라서 NO와 PGE2의 생성을 억제하고, 그 원인인 iNOS, COX-2의 발현을 억제할 수 있는 물질을 발견한다면, 류마티스 관절염과 같은 각종 면역질환을 포함한 염증성질환 치료에 중요한 도움이 될 것이다²⁸⁾.

HCT-116세포는 대장암에서 유래된 세포주로서 24-well culture plate의 polycarbonate membrane 상에서 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 띠게 된다²⁸⁾.

MTT assay는 세포 독성을 나타내는 지표로 측정된 수치가 높을 수록 세포 생존율이 높은 것이고, 염증 반응의 결과로 발생하는 NO는 적게 측정될 수록 염증 억제 효과가 있음을 나타내는 것이다.

HRP 및 TEER값은 투과 장벽의 역할을 하는 장 점막 세포의 기능을 보여주기 때문에 세포간의 접촉상태(tight junctions)를 평가하는데 사용된다. Tight junction 상태가 잘 유지되면 점막이 단단하게 부착되어 있어 세포와 세포 사이로 흐르는 전류가 세포사이를 통과할 때 큰 저항을 발생시키기에 TEER 값이 높게, HRP 값은 작게 나타난다. 고로 투과성이 증가되어 있는 상태에서 TEER값은 낮게, HRP 값은 높게 나타나게 된다¹⁵⁾.

지금까지 청국장의 생리활성에 대한 연구로는 항암성 및 면역기능개선¹⁷⁻¹⁸⁾, 지질대사 개선¹⁹⁾, 고혈압 예방²⁰⁾, 심장병 및 콜레스테롤 저감 효과²¹⁻²²⁾, 골다공증 예방 또는 치료²³⁻²⁴⁾, 항산화 및 tyrosinase 저해²⁵⁾, 신경세포 보호효과 등²⁶⁾의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 임 등²⁷⁾은 청국장과 같은 콩을 발효하여 만든 된장을 사용하여 SRB Assay에 의해 암세포 증식 억제에 효과가 있다는 것을 발표하였다.

LPS로 염증반응을 유도한 상황에서 세포 생존율을 측정하였을 때, Raw 254.7 cell에서 Unfermented soybean powder와 Fermented soybean powder 각

각 100 μ l/ml를 첨가하였을 경우 측정된 수치가 LPS만 첨가한 세포보다 높았지만 나머지 다른 농도에서의 수치는 유의성이 발견되지 않아 세포독성에 효과가 있다고 추론할 수 없었다. HCT-116 cell에서도 수치상의 유의성을 찾기 힘들었다. 또한 LPS로 염증반응을 유도한 상황에서 NO를 측정하였다. Raw 254.7 cell에서 Unfermented soybean powder를 사용한 경우, 농도가 커질수록 NO 수치도 감소하여, 농도가 커질수록 염증 효과가 증대된다는 것을 추론할 수 있다. Fermented soybean powder를 사용한 경우 Unfermented soybean powder와 비교했을 때 큰 유의성을 찾을 수 없었다. HCT-116 cell에서는 LPS만을 첨가하여 측정된 수치와 유사하거나 감소된 결과를 얻었다. 본 연구에서 청국장 분말과 생콩가루 분말을 사용한 결과를 비교하였을 경우 MTT assay와 NO 측정, TEER에서 청국장 분말이 생콩가루에 비해 좋은 결과를 얻을 수 없었다. HRP 측정에서는 청국장 분말의 결과가 생콩가루 분말의 결과보다 좋았다. 항산화를 위해 DPPH와 Polyphenol 측정시, 청국장 분말이 생콩가루 분말보다 항산화에 더 효과적이라고 추론할 수 있었다. 상기에서 유의성이 나타나지 않은 결과에 대해 청국장의 추출 방법의 차이를 생각해 보았다. 본 실험에서는 다른 용매를 사용하지 않고 물 5ml 당 분말 1g을 섞어 용액을 만들었으나 이외의 다른 청국장 실험에서는 메탄올등²⁶⁾을 사용하여 추출한 실험들이 있었다. 추출 방법에 따른 결과 변화의 가능성도 있을 수 있어 추출 방법을 달리한 추가 실험이 필요하다. TEER 측정시 LPS만 첨가한 세포보다 Unfermented soybean powder와 Fermented soybean powder를 첨가한 대다수의 세포가 TEER 측정치가 커서 염증 반응 시 보호효과가 있음을 추론할 수 있고, HRP 측정 결과도 작아서 염증을 대한 보호효과가 있다고 생각해 볼 수 있다.

농도와 염증 효과와의 관계성은 Fermented

soybean powder의 NO 측정 결과에서 추론할 수 있는 것 외에는 관찰하기 힘들었고, Unfermented soybean powder를 첨가한 세포에서 Fermented soybean powder를 첨가한 세포보다 염증에 대한 수치가 더 좋게 나온 것도 있었다. 추후 추가적인 지표들을 이용하여 Unfermented soybean powder와 Fermented soybean powder의 비교연구가 필요할 것으로 생각된다.

이번 연구에서 청국장과 콩가루 모두 장 점막의 투과도 개선 효과가 있음을 시사하고 있어 설사와 변비 등의 장 질환 치료에 효과가 있을 수 있다고 추론할 수 있다.

V. 결론

Raw 264.7 세포와 HCT-116 세포를 이용하여 MTT assay, NO 측정, TEER, HRP, DPPH, Polyphenol 측정을 시행한 결과 청국장 분말을 생콩가루와 비교하였을 경우 세포독성, 항염증에 대한 유의성을 찾기는 힘들었다. 하지만 TEER 및 HRP에서 Unfermented soybean powder와 Fermented soybean powder 2가지 다 항염증 및 장점막 투과 개선 효과가 있어 자가면역질환 및 만성 염증성 질환 등에서의 활용 가능성이 예상되며, DPPH와 Polyphenol 측정시 항산화에 대한 효과도 유의성이 있어, 이 내용들에 대한 앞으로의 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Koh Jin-Bog. Effects of Cheonggukjang on Lipid Metabolism in Hyperlipidemic Female Rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2006;39(4):331-7.
2. Kim KJ, Ryu MK, Kim SS. Chungkook-jang Koji Fermentation with Rice Straw. Korean J. FOOD SCI. TECHNOL. 1982;14(4):301-8.
3. Choi SH, Ji YA. Changes in Flavor of Chungkook-jang During Fermentation. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 1989;21(2):229-34.
4. Chung EK, Seo EH, Park JH, Shim HR, Kim KH, Lee BR. Anti-inflammatory and Anti-allergic Effect of Extracts from Organic Soybean. KOREAN JOURNAL OF ORGANIC AGRICULTURE. 2011; 19(2):245-53.
5. Shin TY, Shin HY, Lim JP, Kim DK, Chae BS, Kwon YE, Oh CH, Cho MG, Lee TK, Park JS, Lee JH, and Jeon H. Small Black Soybean(Glycine max Merr.) Inhibits Mast Cell-mediated Allergic Reaction and Inflammatory Cytokine Secretion. Natural Product Sciences. 2007;13(3):263-7.
6. Chang JH, Shim YY, Kim SH, Chee KM, Cha SK. Fibrinolytic and Immunostimulating Activities of Bacillus spp. Strains Isolated from Chungkuk-jang. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 2005; 37(2):255-60.
7. Shon MY, Seo KI, Park SK, Cho YS, Sung NJ. Some Biological Activities and Isoflavone Content of Chungkugjang Prepared with Black Beans and Bacillus Strains. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2001;30(4):662-7.
8. 안덕균, 이영종. 두시의 제법과 효능에 관한 문헌연구. 대한본초학회지. 1987;2(1):87-90.
9. 전국한의학과대학본초학교수. 본초학. 영림사. 2010: 194-5.
10. 대한병리학회 대구경북지부학회. 간추린 병리학. 정문각. 2008:49-62.
11. Hyeong-Sik Seo. The Experimental Study on Anti-inflammation and Anti-oxidation of Indigo Naturalis and Rehmanniae Radix. The Journal of

- Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2008;21(3):104-10.
12. Chu CK, Jung SK, Jung HJ, Kim JJ. Research on Anti-inflammatory Effects of Forsythiae Fructus. Korean J. Orient.Int. Med. 2010;31(2):242-53.
 13. Kang JK, Kang HJ, Seo JH, Kim SO, Choi JH, Cho DY, Park CG, Lee HY. Effects of Fermented Turmeric(*Curcuma longa*) by *Bacillus natto* Supplementation on Liver Function and Serum Lipid Parameters in Mice. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2009;38(4):430-5.
 14. Shen FY, Ra JH, Kim JJ, Jung SK. The Screening of Fermented Medicinal Herbs to Identify Those with Anti-inflammatory Properties. Korean J. Orient.Int. Med. 2009;30(1):64-73.
 15. Lee SJ, O.M.D, Lee MJ O.M.D, Jung JE, Kim HJ O.M.D, Shambhunath Bose PH.D. Antimicrobial Effects of Fermented *Coptidis rhizoma* and *Lonicerae Flos* against pathogen. Journal of Society of Korean Medicine for Obesity Research. 2011;11(1):35-46.
 16. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunologic methods. 1983;65(1-2):55-63.
 17. Hong SW, Kim JY, Lee BK, Chung KS. The bacterial biological response modifier enriched cheonggukjang fermentation. Korean J. Food Sci. TECHNOL. 2006;38(4):548-53.
 18. Kwak CS, Kim MY, Kim SA, Lee MS. Cytotoxicity on human cancer cells and anti-tumorigenesis of cheonggukjang, a fermented soybean product, in DMBA-treated rats. Korean J. Nutr. 2006;39:347-56.
 19. Yang JL, Lee SH, Song YS. Improving effect of powders of cooked soybean and cheonggukjang on blood pressure and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2003;32(6):899-905.
 20. Kim YT, Kim WK, Oh HI. General microbiology, physiology and metabolism; Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from cheonggukjang. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 1995;23:1-5.
 21. Anthony MS, Clarkson TB, Hughes JrCL, Morgan TM, Burke GL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. J. Nutr. 1996;126:43-50.
 22. Merz-Demlow BE, Duncan AM, Wangen KE, Xu X, Carr TP, Phipps WR, Kurzer MS. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. 2000;71:1462-9.
 23. Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JrJW. Soy protein and isoflavones; Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. AM. J. Clin. Nutr. 1998;68:1375-9.
 24. Ishida H, Uesugi T, Hirai K, Toda T, Nukaya H, Yokotsuka K, Tsuji K. Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin, and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. Biol. Pharm. Bull. 1998;21:62-6.
 25. Choi HK, Lim YS, Kim YS, Park SY, Lee CH, Hwang KW, Kwon DY. Free-radical-scavenging and tyrosinase-inhibition activities of cheonggukjang samples fermented for various times. Food Chem. 2008;106:564-8.
 26. Jeong CH, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Jeong

- HR, and Heo HJ. Neuronal Cell Protective Effects of Methanol Extract from Cheonggukjang Using in vitro System. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 2010;42(6):768-72.
27. Lim SY, Pa KY, Rhee SH. Anticancer Effect of Doenjang in in vitro Sulforhodamine B(SRB) Assay. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 1999;28(1): 240-5.
28. L. Hidalgo, T. Raub, R. Borchardt. Characterization of the human colon carcinoma cell line(caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. Gastroenterology. 1989;96:736-49.
29. 박정우, 이영진, 윤선. 발효 대두 식품의 폴리페놀, 플라보노이드 함량과 다양한 측정 방법에 따른 항산화 활성 비교. 한국식생활문화학회지. 2007;22(3): 353-8.
30. 한문종, 이승, 임재규, 이현민, 한민석, 김우진, 박인형, 손승철. 복수가 동반된 간경변증 환자에서 폴리에틸렌 글리콜을 이용한 장 투과성 평가. 전남의대학술지. 2008;44(2)87-92
31. 전우규. 장건강 및 면역질환의 보완통합의학적 접근. 한양의대 학술지. 2010;30(2)109-14.