

Original Article / 원저

## 알레르기 비염 동물 모델에서 유산균 발효辛夷의 효과

송민경 · 홍승욱

동국대학교 대학원 한의학과 안이비인후피부과교실

### The Effects of Probiotics-Fermented *Magnolia Denudata* in Ovalbumin Induced Allergic Rhinitis Animal Model

*Min-Kyung Song · Seung-Ug Hong*

Dept. of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology,  
College of Korean Medicine, Dongguk University

#### Abstract

**Objectives** : We aimed to determine therapeutic effects of probiotics-fermented *Magnolia denudata*(MD) in the allergic rhinitis model mice.

**Methods** : Polyphenol production, DPPH radical scavenging activity and NO inhibition of fermented MD by different bacterial strains were evaluated to select the one that is most suitable for fermentation. Thirty C57BL/6 mice were divided randomly into 5 groups as follows: normal group, ovalbumin(OVA)-treated plus water fed(CON group), OVA-treated plus unfermented MD fed(UMD group), OVA-treated plus fermented autoclaved MD fed(A-FMD group) and OVA-treated plus fermented unautoclaved MD fed(FMD group). After 9 weeks, we observed changes in the blood cell count, OVA-specific IgE level, nasal rubbing, nasal mucosal tissue and body weight.

**Results** : Extract of MD fermented by *Bifidobacterium breve*(BB) for 48 hours showed the highest anti-oxidant activity and anti-inflammatory activity out of all the other bacterial strains. The number of eosinophil count in A-FMD, FMD group and platelet count in FMD group showed statistically significant decrease( $p < 0.05$ ). OVA-specific IgE level decreased in all 3 experimental groups, significantly in UMD and A-FMD group. Nasal symptoms were attenuated in all 3 experimental groups, statistically significant in A-FMD and FMD group ( $p < 0.05$ ). Histologically, infiltration of eosinophils into the nasal mucosa decreased in all 3 experimental groups, especially marked decrease in FMD group.

**Conclusions** : According to the above results, it is considered that probiotics-fermented *Magnolia denudata* has inhibitory effects on the allergic rhinitis animal models.

**Key words** : *Magnoliae denudata*, Fermentation; Probiotics; Allergic Rhinitis.

© 2013 the Society of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal 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.

## 서 론

최근 한의학계에서는 미생물을 이용한 발효 한약에 대한 관심이 증가하고 있다. 발효법은 한약 修治法 중 하나로, 한약성분의 체내 흡수율과 생체 이용률을 극대화시킨 방법<sup>1)</sup>이다. 발효 한약제는 발효 전에 비해 대체로 그 성미, 약효, 안전성 등이 증가되어 약효가 뛰어나며 소화도 용이하고 유효성분의 흡수율이 훨씬 높아서<sup>2)</sup> 그 유용성이 인정되고 있다.

한편 辛夷(*Magnolia denudata*, MD)는 목련과 (*Magnoliaceae*)에 속한 낙엽 관목인 자목련 혹은 백목련의 花를 건조한 것으로<sup>3)</sup>, 性은 溫, 無毒하고 味는 辛하여 肺, 胃經으로 歸經하며, 散風寒 通鼻竅하는 효능이 있어 風寒頭痛, 鼻淵, 鼻塞不通, 鼻流濁涕 등을 主治<sup>4)</sup>하여 비염, 부비동염 등에 주로 사용된다.

성분으로는 magnolin, magnosalin, magnosalicin 등의 lignan계열의 물질,  $\alpha$ -pinene, cineole, citral, methylchavicol 등의 정유, liriodenine, remerine, anonaine, glaucine 등의 alkaloid 등이 알려져 있다<sup>5)</sup>. 약리작용으로는 수렴작용, 모세혈관 확장작용, 항염증작용, 혈압강하작용, 진통, 진정작용, 피부진균과 포도상구균 억제작용 등이 보고되었다<sup>6)</sup>.

辛夷에 관련한 실험 보고들로는 항염증효과에 관한 연구<sup>7,8)</sup>, 아나필락시스 반응에 관한 연구<sup>9,10)</sup>, 항알레르기 작용에 관한 연구<sup>11,12)</sup>, 알레르기 비염 모델에 대한 효과 연구<sup>13-15)</sup> 등이 있었으나, 광범위한 항알레르기 효과이거나 타 약제들과 함께 탕전된 형태의 연구들로, 알레르기 비염 동물 모델에 발효 辛夷의 효과를 살핀 것은 없었다.

이에 저자는 임상적으로 비염 및 부비동염에 다용되는 약재인 辛夷를 유익균을 사용하여 발효시킴으로써 알레르기 비염의 예방 및 치료에 있어 긍정적인

효과를 얻을 수 있으리라 기대하고 본 연구를 하였다. 발효에 가장 적합한 균주를 선별하기 위해 각 균주별 발효 辛夷의 폴리페놀 생산량과 DPPH radical 소거능을 측정하고, 항산화 효과가 가장 높은 균주를 택해 NO 생성 억제율을 측정하여 최적의 발효 시간을 정하였다. 발효 辛夷의 알레르기 비염에 대한 치료 효과를 검증하기 위해 흰 쥐에 난알부민(Ovalbumin, OVA)을 이용하여 알레르기 비염을 유발하고 발효 辛夷를 투여한 후, 혈액학적 변화와 면역학적 변화를 측정하고 행동 평가 및 조직학적 분석을 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. 약재 및 발효

실험에 사용한 辛夷는 바른 한약국(서울시 동작구 사당동)에서 건조 분말의 형태로 구입하였다. 辛夷 건조 분말 10 g을 200 ml의 멸균된 Milli-Q 용액에 용해시켜 5 g/100 ml 농도가 되도록 플라스크에 준비하여, 비발효 辛夷는 균주를 접종하지 않은 형태로 두었다. 발효 辛夷는 각각의 플라스크에 MRS배지를 넣어 5.5%(w/v)의 농도가 되도록 혼합하여 3시간 동안 70℃의 온탕에 담그고 지속적으로 흔들어 약제가 효율적으로 추출되도록 하였다. 추출물은 121℃에서 20분간 멸균처리 되었고 다시 37℃로 냉각하였다. 세 플라스크에 각각 *Lactobacillus plantarum* (LP), *Leuconostoc mesenteroides* (LM), *Bifidobacterium breve* (BB)를 접종하고, 균의 농도는  $2 \times 10^9$  CFU/ml의 농도로 유지되었다. 그 결과로 생긴 현탁액은 37℃에서 24시간, 48시간, 96시간 동안 발효시켰다.

### 2. In vitro studies

#### 1) 약물 내 총 폴리페놀 함량 측정

세 발효물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을

교신저자 : 홍승욱, 경기도 고양시 일산구 식사동 814  
동국대 일산한방병원 한방안이비인후과  
(Tel : 031-961-9085, E-mail : heenthisu@duih.org)  
• 접수 2013/1/14 • 수정 2013/2/3 • 채택 2013/2/10

응용하여 측정하였다. 시료 0.01 ml를 증류수 0.79 ml에 녹이고 2배 희석한 folin 시약 0.05 ml를 첨가하고 잘 혼합한 후 2분간 방치한 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.15 ml를 넣고 1시간 반응 시킨 후 UV/visible spectrophotometer를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 Gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

## 2) DPPH radical 소거 효과 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거 효과를 측정하였다. radical의 소거 활성은 각 시료의 DPPH radical에 대한 환원력을 측정하였다. Ethanol에 녹인 시료 100 µl와 60 µM DPPH 용액 100 µl를 96-well plate에 혼합하여 30분간 빛을 차단하여 실온에 방치시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 free radical 소거 효과를 백분율(%)로 나타내었다.

## 3) NO 생성 억제율 측정

NO 생산량의 측정을 위해, Mouse macrophage RAW 264.7 cell(KCLB, Seoul, Korea)을 24 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 분주하여 24시간 배양한 뒤, 시료를 농도별로 처리하고, 10 µg/ml의 LPS(Sigma Chemical Co., U.S.A)를 24시간 동안 처리하였다. NO의 생산량은 nitrite 생산량을 측정함으로써 알 수 있는데, Griess 시약(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 비색분석법(colorimetric assay)을 통해 파악하였다. 즉, 100 µl의 배지 상층액에 동량의 Griess 시약을 혼합하고, 상온에서 10분간 배양한 뒤, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 샘플의 nitrite 농도는 sodium nitrite의 표준 곡선으로 부터 구하였다.

## 3. In vivo studies

### 1) 동물

30마리의 수컷 C57BL/6을 조절된 온도(20±2℃)와

습도(40-60%)에서, 12시간 주기로 명암을 조절하여 주야를 구분하여 사육하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취할 수 있게 하였다. 7일간 적응을 마친 생쥐들을 임의로 5개의 그룹으로 분류하고 다음과 같이 OVA의 감작 여부 및 MD 처리 방법을 달리 하였다. 정상군 (NOR), OVA으로 전신 및 국소 감작하여 물을 투여한 대조군 (CON), OVA에 감작 후 발효하지 않은 MD를 투여한 실험군 1 (UMD), OVA에 감작 후, 발효하여 멸균처리를 거친 MD를 투여한 실험군 2 (A-FMD), OVA에 감작 후, 발효하여 멸균처리를 거치지 않은 MD를 투여한 실험군 3 (FMD)이다.

동물의 취급을 포함한 모든 실험과정은 국제적 가이드라인(*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, USA; National Academy Press: Washington D.C., 1996*)을 준수하였다. 본 실험의 이론, 설계, 프로토콜은 동국대학교 동물윤리위원회의 사전 승인을 얻었다.

### 2) 알레르기 비염의 유발

정상군 이외의 동물들은 복강 내 OVA을 감작하였다. Al(OH)<sub>3</sub> (4 mg) 이 들어있는 식염수 200 µl에 10 µg의 OVA(grade VII; crystallized and lyophilized, essentially salt-free, sigma)을 첨가하여, 실험 시작 당일, 7, 14, 21일 되는 날 복강에 주사하였다. 정상군은 OVA을 사용하지 않는 대신 동일한 양의 생리식염수를 위와 같은 날에 복강 내 주사하였다. 실험 28 일째부터 주3회, OVA이 첨가된 생리식염수(100 mg/ml, 2 µl per mouse)를 생쥐의 양쪽 비강에 micropipette로 주입하여 국소 감작을 하였다. 마지막 OVA 투여 다음날에는 histamine(10 µmol/mouse)을 양쪽 비강에 주입하여 과민반응을 유도하였다.

### 3) 약물 투여

약물은 실험 1일째부터 매일 동량(400 mg/kg/day)으

로 경구 투여 하였다. 정상군과 대조군은 MD를 투여 하지 않고 물을 경구 투여했다. 실험군 1에는 UMD, 실험군 2에는 A-FMD, 실험군 3에는 FMD를 투여하였다.

#### 4) 혈액 채취

9주간의 실험 기간 이후, 분석을 위한 혈액을 채취 하였다. 동물들은 마취 후 희생되었으며, 조직학적 분석을 위해 쥐의 머리 부분은 포르말린에 보관하였다. 혈액의 원심분리(1000×g for 15 min at 4℃)를 통해 얻은 혈청은 분석이 이루어지는 동안 -70℃에서 보관 하였다.

#### 4. 혈액학적 분석

혈액의 채취가 이루어지고 난 직후 적혈구, 백혈구, 혈소판 등 혈액 지표들의 분석을 외부 기관(Seoul Animal Medical Center)에 의뢰하였다. 혈청 내 OVA 특이 IgE (OVA-specific IgE) 항체는 mouse ovalbumin specific IgE kit(Abd Serotec, Oxford, UK)를 사용하여 면역효소법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)으로 측정하였다.

#### 5. 행동 평가

생쥐들은 적응을 위하여 약 10분간 observation cage에 유지하였다. 양쪽 비강에 micropipette을 사용해서 항원 용액(OVA 100 mg/ml, 2 µl per mouse 또는 histamine 10 µmol/mouse)을 주입한 이후 동물들을 다시 observation cage에 두었고, 이후의 행동을 비디오 촬영하였다. 비디오를 통해 30분간의 코를 긁는 횟수를 계측하였다.

#### 6. 조직학적 분석

쥐의 대뇌를 제거하고 난 후 비강 전체를 포함한 비강 주위 두개골 조직을 0.1 M phosphate buffer에 포함된 4% paraformaldehyde 용액으로 고정하였다.

비골조직의 석회질을 제거하기 위하여, 두개골은 45% formic acid와 15% 0.5M EDTA 용액(pH 8.0)에 7일간 처리하였다. 파라핀 연속 절편을 슬라이드 글라스에 얹은 후 xylene과 ethanol을 사용해 paraffin을 제거하였다. 이후 절편에 hematoxylin-eosin (HE) 염색을 한 다음, 현미경을 통해 관찰하고 이미지를 수집하였다.

#### 7. 통계 처리

통계 분석은 social science software program (SPSS, version 17.0)을 이용하였다. 자료는 one-way ANOVA를 통해 분석한 후, Fisher's Least Significant Difference로 사후 검정하였다. P < 0.05로 하였다.

### 결 과

#### 1. 체중 변화

실험 종료 시점에서 정상군, 대조군 및 모든 실험군 간의 체중을 측정하였을 때 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 1).

#### 2. 군주별 발효 후의 폴리페놀 생산 능력 평가

비발효 후는 13.5mg/ml의 폴리페놀을 생산하였다. 24시간 발효에서 LM 발효 후에서는 폴리페놀 생산량에 차이가 없었으며, LP와 BB로 발효한 후는 비발효 후에 비해 각각 35%와 37% 증가하였다. 48시간 발효에서 LP 발효 후는 비발효 후에 비해 폴리페놀 생산량에 특별한 차이가 없었으며, LM 발효 후는 11%, BB 발효 후는 78% 증가하였다. 96시간 발효에서 LP와 LM로 발효한 후의 폴리페놀 생산량은 비발효 후에 비하여 각각 18%와 8% 증가하였으나, BB 발효 후는 63% 증가하였다(Fig. 2).

### 3. 군주별 발효 辛夷의 DPPH radical 소거 능력 평가

각기 다른 군주에 의한 발효 辛夷의 DPPH radical 소거능을 측정하였다. 비발효 辛夷의 DPPH radical 소거능은 76.48%였다. 24시간 발효에서는 세 군주 모두 비발효 辛夷보다 낮은 소거능을 보였다. 48시간 발효에서 BB 발효 辛夷는 비발효 辛夷에 비해 20%, LP 발효 辛夷는 16% 높은 소거능을 보였다. 96시간 발효에서 DPPH radical 소거능은 비발효 辛夷에 비해 LP 발효 辛夷는 16%, LM 발효 辛夷는 11%, BB 발효 辛夷는 7% 높았다(Fig. 3).

### 4. BB 발효 辛夷에서 NO 생성 억제 능력 평가

최종 선택된 군주인 BB로 발효한 辛夷의 항염증 효과를 살펴보았다. 자극되지 않은 정상 세포에서는 NO 생산량이 매우 낮았다. LPS만 처리한 경우, 대식 세포 활성이 유도되어 576배나 많은 NO를 생산하였다. LPS와 각기 다른 농도의 BB 발효 辛夷를 같이 처리하였을 때 발효 24, 48, 96시간 모두에서 LPS로 유도되는 NO 생산이 억제되었다. 0.05  $\mu\text{g/ml}$ 의 BB 발효 辛夷에서는 대조군에 비해 24, 48, 96시간에 각각 12%, 18%, 18% 감소하였으며, 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 BB 발효 辛夷에서는 24, 48, 96시간에 각각 4%, 15%, 8% 감소하였다. 0.05  $\mu\text{g/ml}$ 와 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 BB 발효 辛夷에서 농도 의존적인 차이는 없었으며, 공통적으로 48시간 발효에서 높은 NO 생성 억제율을 보였다(Fig. 4).

### 5. 혈구 수 및 혈액 지표 분석

#### 1) 적혈구

대조군에서 정상군에 비해 적혈구 수는 7.5% 감소(Fig. 5), 헤모글로빈 함량이 8.8% 감소(Fig. 6), 적혈구 용적율(hematocrit, HCT)이 8.3% 감소(Fig. 7)하였으나 통계적 유의성은 없었다. 다른 실험군에서는

각 항목에 대하여 유의한 변화를 보이지 않았다.

#### 2) 백혈구

호산구 수가 대조군에서는 정상군에 비해서 78% 증가하였고, UMD군에서는 대조군과 비교하여 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 반면 A-FMD군과 FMD군은 대조군에 비해 각각 62%, 59% 감소하여 정상군 수준으로 회복되었다(Fig. 8).

호중구의 수(Fig. 9), 림프구의 수(Fig. 10)와 단핵구의 수(Fig. 11)는 각 실험군 간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

#### 3) 혈소판

혈소판 수는 대조군이 정상군에 비하여 23% 감소하였고, UMD군에서는 유의한 차이가 없었다. A-FMD군의 혈소판 수는 대조군에 비해 25% 높았으나 이 변화는 통계적으로 유의하지 않았다. FMD군의 혈소판 수는 대조군에 비해 33% 증가하여 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Fig. 12).

### 6. OVA 특이 IgE 생산량 평가

정상군에서는 OVA 특이 IgE 항체 역가가 나타나지 않은 반면 대조군에서는 OVA를 반복적으로 감작시킴으로서 면역 반응을 유발하여 OVA 특이 IgE 항체에 638ng/ml의 역가를 나타내었다. UMD군과 A-FMD군은 모두 대조군에 비하여 항체 농도가 75% 감소하였다. FMD군에서는 38% 감소하였다(Fig. 13).

혈소판 수는 대조군이 정상군에 비하여 23% 감소하였고, UMD군에서는 유의한 차이가 없었다. A-FMD군의 혈소판 수는 대조군에 비해 25% 높았으나 이 변화는 통계적으로 유의하지 않았다. FMD군의 혈소판 수는 대조군에 비해 33% 증가하여 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Fig. 12).

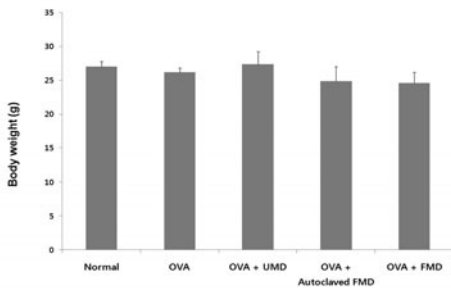


Fig. 1. The body weight of mice in different experimental groups at the end of the experimental period. No statistically significant difference has been found between the groups.

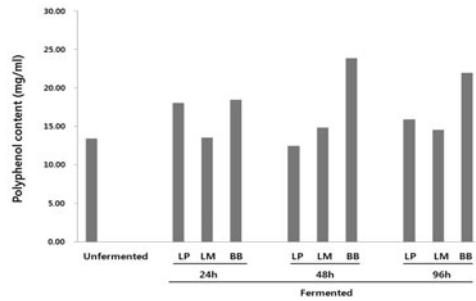


Fig. 2. The extent of fermentation of MD by the different bacterial strains as measured by polyphenol production at different time points.

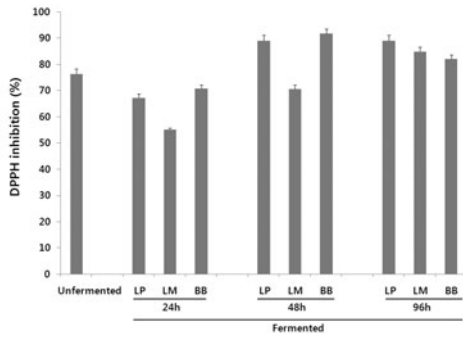


Fig. 3. The extent of fermentation of MD by the different bacterial strains as measured in terms of the scavenging of DPPH radical at different time points.

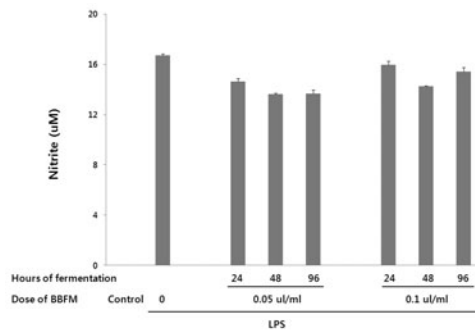


Fig. 4. The anti-inflammatory activity of BB-fermented MD extract as measured in terms of inhibition of nitrite production in LPS-induced RAW264.7 cells.

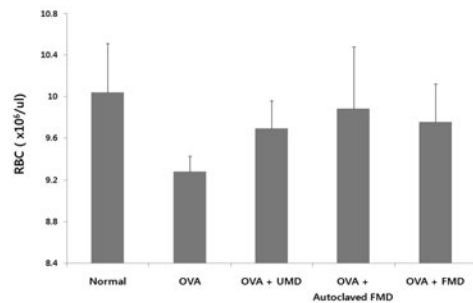


Fig. 5. Effect of different preparations of MD on the RBC count. No statistically significant difference has been found between the groups.

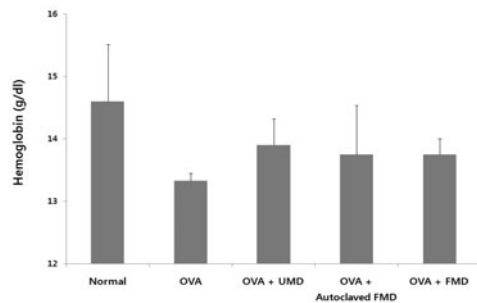


Fig. 6. Effect of different preparations of MD on the hemoglobin content. No statistically significant difference has been found between the groups.

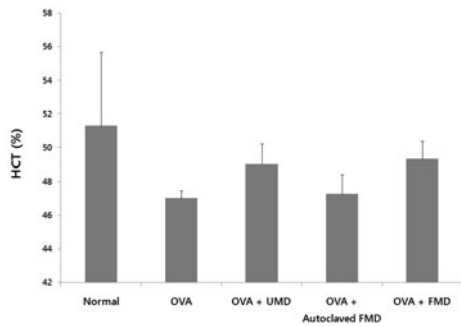


Fig. 7. Effect of different preparations of MD on the HCT content. No statistically significant difference has been found between the groups.

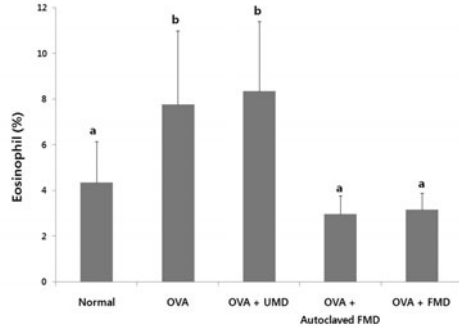


Fig. 8. Effect of different preparations of MD on the eosinophil count. Means without a common letter differed ( $P < 0.05$ ).

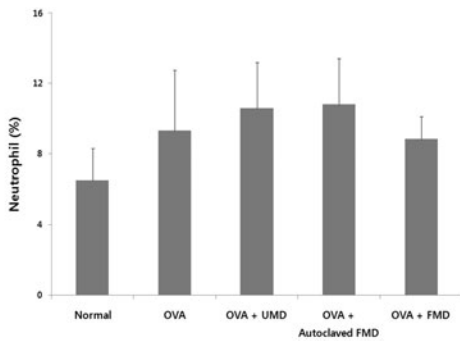


Fig. 9. Effect of different preparations of MD on the neutrophil count. No statistically significant difference has been found between the groups.

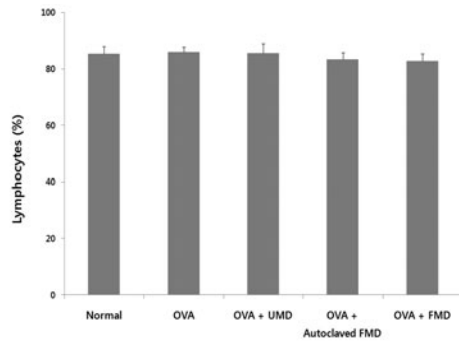


Fig. 10. Effect of different preparations of MD on the lymphocyte count. No statistically significant difference has been found between the groups.

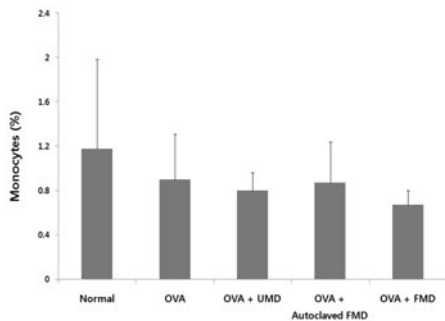


Fig. 11. Effect of different preparations of MD on the monocyte count. No statistically significant difference has been found between the groups.

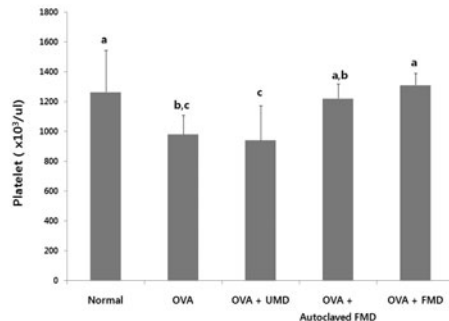


Fig. 12. Effect of different preparations of MD on the platelet count. Means without a common letter differed ( $P < 0.05$ ).

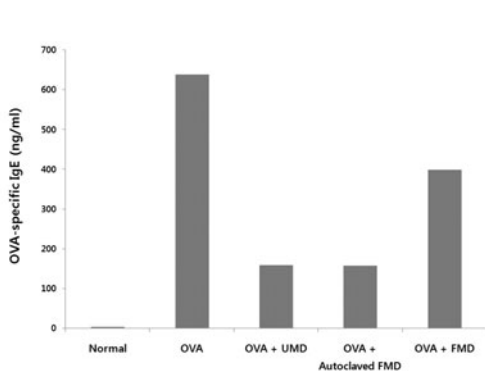


Fig. 13. Effect of different preparations of MD on the OVA-specific IgE production.

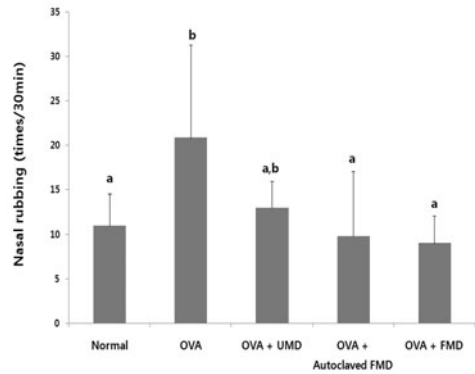


Fig. 14. Effect of different preparations of MD on the nasal rubbing at week 6. Means without a common letter differed ( $P < 0.05$ ).

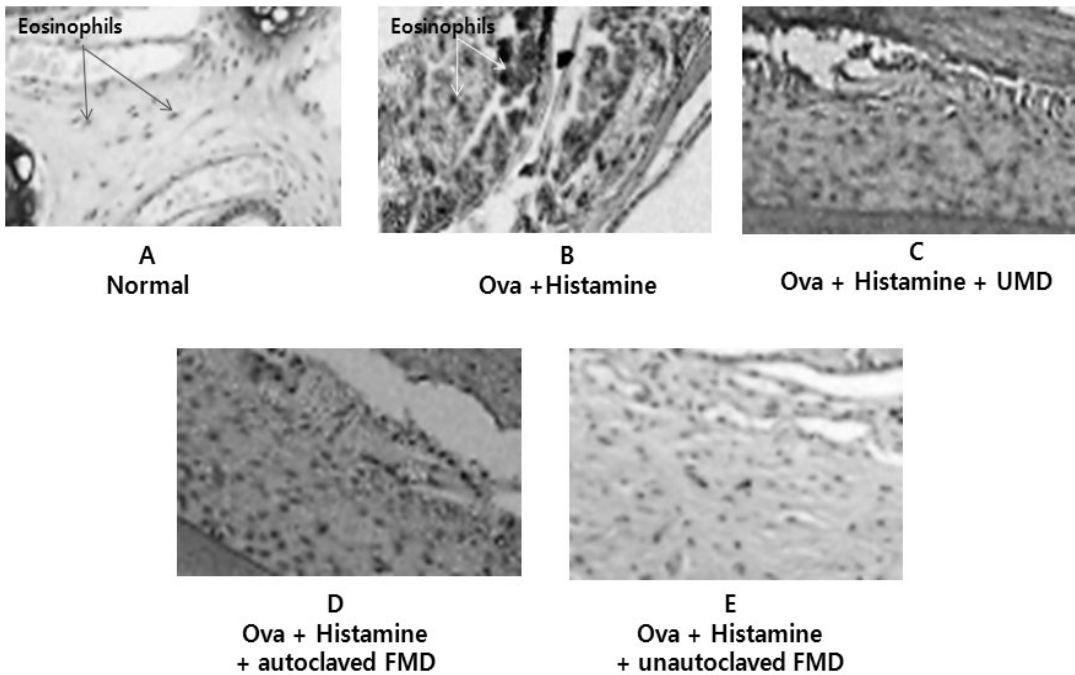


Fig. 15. Histological changes and infiltration of eosinophils into the nasal mucosa of OVA-sensitized animals challenged with OVA and histamine and treated with different preparations of MD. A clear indication of infiltration of eosinophils has been evident in the CON group(B) and marked decrease in the infiltration of eosinophils in the A-FMD group(D) and FMD group(E).



## 6. OVA 특이 IgE 생산량 평가

정상군에서는 OVA 특이 IgE 항체 역가가 나타나지 않은 반면 대조군에서는 OVA를 반복적으로 감작 시킴으로서 면역 반응을 유발하여 OVA 특이 IgE 항체에 638ng/ml의 역가를 나타내었다. UMD군과 A-FMD군은 모두 대조군에 비하여 항체 농도가 75% 감소하였다. FMD군에서는 38% 감소하였다(Fig. 13).

## 7. 행동 평가

실험 6주차에 코를 비비는 행동의 횟수를 측정하여 분석하였다(Fig. 14). 비강 내 OVA 접종은 감작되지 않은 쥐에서도 코 비비는 행동을 유발한다. 그러나 감작된 쥐에서 OVA의 민감성은 현저하게 증가하여 감작되지 않은 쥐에 비해 코비비는 횟수가 89% 증가하였다. UMD군에서는 코 비비는 횟수가 대조군에 비해 38% 감소하였다. A-FMD군과 FMD군에서 코 비비는 횟수는 대조군에 비하여 각각 53%와 57% 감소하여 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Fig. 14).

## 8. 비점막의 조직학적 변화

정상군에서는 정상적인 비점막의 분포와 호산구의 침윤을 볼 수 있었다(Fig. 15A). 반면 OVA에 감작된 대조군에서는 호산구의 침윤이 확연하게 증가하였다(Fig. 15B). UMD군에서는 대조군에서 보이던 호산구의 침윤이 감소한 것을 볼 수 있었으며(Fig. 15C), A-FMD군에서는 대조군에 비하여 호산구 침윤이 뚜렷하게 감소된 것을 볼 수 있었다(Fig. 15D). 또한 FMD군에서는 비점막에서 호산구의 침윤이 더욱 뚜렷하게 약화 되었다(Fig. 15E).

## 고 찰

알레르기 비염은 반복적인 재채기, 가려움증, 수양성 비루, 비폐색이 주요 증상인 비점막의 제 I형 과민

반응성 질환이다<sup>16)</sup>. 한의학에서 알레르기 비염은 鼻鼾, 鼻噴 등의 범주에 속하며 鼻塞證, 鼻涕證과도 연관된다. 辛夷는 《神農本草經》<sup>17)</sup>에 “辛夷味辛溫, 主五臟身體寒風, 頭腦痛, 面皯, 久服下氣, 輕身, 明目, 增年耐老” 라고 기재된 이래, 辛夷散, 通竅湯, 辛夷清肺飲, 蒼柏辛芎散 등 많은 처방에 적용되어, 비염, 부비동염에 해당하는 腦漏, 鼻淵, 鼻鼾, 鼻噴 등의 병증에 주로 사용되었던 약물이다<sup>18)</sup>.

한편 최근 한의학계에서는 미생물을 이용한 발효 한약에 대한 관심이 증가하고 있다. 장내 균총의 균형은 항생제와 같은 약물 및 염증 유발 식이 등으로 쉽게 붕괴되어 유해 미생물의 생육을 촉진시키고 특정 세균 종의 증가는 염증성 질환을 증가시킨다<sup>19)</sup>. 반면 유산균은 장내 유해균의 번식 억제 및 장내 유해물질의 배설촉진 등의 장내 환경 개선, 숙주의 에너지 대사에 관여, 혈중 콜레스테롤 조절, 면역 기능 조절 등의 효능이 있다<sup>20)</sup>. 이러한 유익균이 인체의 알레르기 발생, 염증 증상을 경감시킨다는 임상적 효과들<sup>21)</sup>이 많이 보고되고, 면역 활성화 signal transduction 기전에 관한 연구들도 진행되어 알레르기 예방 및 치료에 유익균의 이용을 제안하는 경우가 많다. 유산균은 한약의 발효에도 많이 사용 되는데, 발효 한약의 항염 효과, 항산화 효과, 항암 효과, 항균 효과 등을 확인한 연구들이 많으며, 특히 알레르기나 면역반응과 관련하여 많은 연구<sup>22-24)</sup>가 있다.

이에 저자는 임상적으로 비염 및 부비동염에 사용되는 약재인 辛夷를 유익균을 사용하여 발효시킴으로서 알레르기 비염의 예방 및 치료에 있어 긍정적인 효과를 기대할 수 있으리라 생각하고 본 연구를 시행하였다. 辛夷 자체의 생약으로서의 효과 이외에, 발효 辛夷는 biotransformation을 거치므로 약리 활성 증가, 체내 흡수 증가 등의 유익한 효과를 기대할 수 있다. 또한 발효 후 멸균 처리를 거치지 않은 제제는 생균을 함께 투여하게 되므로 유익균으로서의 작용을 유지하게 하여, 생약 투여나 발효 치료로 기대되는 항알레르기 작용 및 면역 조절 등에 시너지 효과를 낼

수 있는지 확인하고자 하였다.

본 실험 이전에, 辛夷의 발효에 최적의 유산균을 선별 하기 위해 항산화 효과 및 항염증 효과를 측정하는 실험을 진행하였다. 시험 균주로는 *Lactobacillus plantarum* (LP), *Leuconostoc mesenteroides* (LM), *Bifidobacterium breve* (BB)를 접종하였다. *Lactobacillus plantarum*은 김치 발효 후기에 작용하는 균종으로, 최근 국내·외에서 항균력과 콜레스테롤의 감소효과에 대한 많은 연구들이 보고되었다<sup>25)</sup>. *Leuconostoc mesenteroides*는 젓산균 중 야채류 발효에 관여하는 균주로 김치 발효 초기의 숙성균으로 알려져 있으며<sup>26)</sup> 여러 식중독균에 대해 탁월한 항균작용을 가지고 있는 것으로 보고되었다<sup>27)</sup>. *Bifidobacterium* 속은 장내 환경 개선, 소화흡수, 항알레르기, 항균성, 면역기능의 활성화 등에서 장내 미생물 중 가장 유익한 균주로 알려져 있는데<sup>21)</sup>, BB에서 장관 내 유해 효소 활성 억제 효과<sup>28)</sup> 등이 보고되었다.

세 균주를 이용하여 辛夷를 발효시킨 뒤 항산화 효과, 항균, 항염, 항알레르기 등 다양한 생리활성을 나타내는 폴리페놀의 생산량을 측정한 결과, LP와 LM 발효 辛夷는 비발효 辛夷와 비슷하였고 BB 발효 辛夷에서 폴리페놀 생산량이 급격히 늘었으며, 특히 48시간 발효에서 가장 높은 생산량을 보였다. 그리고 DPPH radical 소거능을 살펴본 결과, 48시간 BB 발효 辛夷에서 가장 높았으며, 다음으로는 48시간, 96시간 LP 발효 辛夷에서 높은 소거능을 보였다. 두 지표를 종합적으로 본 결과, BB 발효 辛夷에서 공통적으로 높은 항산화 능력을 보여 이후의 실험에는 BB를 발효 균주로 선택하였다.

항염증 효과를 알아보기 위해 RAW 264.7 cell과 LPS를 이용하여 NO 생성 억제율을 측정하였다. 배지만 처리한 그룹에서는 NO를 거의 방출하지 않은 반면, LPS만 처리한 경우 생산량이 576배 증가하여 본 염증 모델이 타당함을 알 수 있다. LPS와 BB 발효 辛夷를 농도별로 처리한 경우 모두 NO 생산이 억제되었으나 농도 의존적인 효과를 보이지는 않았으며 공통적

으로 48시간에 NO 생산 억제정도가 가장 높았다.

폴리페놀 생산량, DPPH radical 소거능, NO 생성 억제율 등을 종합한 결과, 48시간 동안 BB로 발효했을 때 辛夷가 최대로 발효되며 발효물의 항산화 능력 및 항염증 효과 역시 최대치에 도달하는 것으로 볼 수 있다. 따라서 비발효 辛夷(Unfermented MD, UMD)와 48시간 BB 발효 辛夷를 멸균 처리 한 것(Autoclaved Fermented MD, A-FMD)과 멸균시키지 않은 것(Fermented MD, FMD)을 준비하여 알레르기 비염의 동물 모델에 투여하였다.

OVA을 감작하여 알레르기 비염 동물 모델을 만든 뒤 각종 혈액 지표를 분석하였다. 우선 적혈구에 관련된 지표들에서는 각 실험군 간에 유의한 변화가 없었다. 백혈구는 면역체계에 관련하여 방어 작용을 하는데, 호산구는 IgE 매개 알레르기 질환에서 가장 중요한 효과기 세포의 하나로서 아토피 개체의 기관지, 비강, 피부 등에 다량 침착하여 활성화 및 탈과립에 필요한 과립단백을 분비함으로써 조직 손상을 유발하여 알레르기 질환을 일으킨다<sup>29)</sup>. 대조군에서는 정상군에 비해 호산구의 수가 78% 증가하여 OVA을 처리한 동물에서 알레르기 반응이 나타난 것을 알 수 있었다. UMD군에서는 호산구 수에 유의한 변화가 없었으나, A-FMD군과 FMD군에서는 모두 호산구 수를 현저하게 감소시켰다. 이는 항원으로 유발된 알레르기 반응을 낮추는데 있어서 발효 과정을 거친 辛夷가 유익한 역할을 한다는 것을 명백하게 보여준다. 이외 호중구, 림프구, 단핵구에서는 각 실험군 간에 유의한 차이가 없었다.

혈소판은 면역반응에서 내재면역에 관여하는 세포로 항원 등에 의해 활성화되어서 염증반응을 유도하는 역할을 한다<sup>30)</sup>. 대조군에서는 혈소판의 수가 감소하여 OVA을 처리한 동물에서 유해한 반응이 나타났음을 알 수 있었고, FMD군에서 혈소판 수는 대조군에 비해 유의하게 상승하였다. UMD군과 A-FMD군은 대조군과는 유의한 차이가 없었으나 두 군 간에서 A-FMD군의 혈소판 수가 UMD군에 비해 유의하게

높았다. 이는 OVA으로 유발한 혈소판 관련 유해 반응에 대해 발효균이 비발효균에 비해 효과적이며, 특히 발효 후 멸균하지 않은 것은 유익균을 제공함으로써 멸균균에 비해서도 우수한 효과가 있음을 알 수 있다.

한편, 항원 자극에 의해 생산된 IgE는 비만세포 또는 호염기구 표면에 있는 Fc receptor와 결합하게 되며, 다시 항원이 들어오게 되면 특이 항체 IgE와 결합함으로써 이들 세포에 탈과립을 일으켜 histamine, leukotriene 등을 방출시킨다. 이로 인해 혈관투과성 증가, 국소 부종 등의 알레르기 반응이 나타난다<sup>31)</sup>. 본 실험에서도 OVA 특이 IgE를 측정하여 각 실험군이 IgE 매개 알레르기 반응에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 정상군에서는 OVA 특이 IgE 항체 역가가 나타나지 않았으므로 본 실험의 항체 분석이 타당함을 보여주며, 대조군에서는 638ng/ml의 역가를 나타내어 일차 감작되었음을 알 수 있다. 辛夷를 투여한 세 군 모두에서 항체 농도가 감소하였는데 특히 UMD와 A-FMD에서 크게 감소하여 辛夷 자체 및 발효 과정을 거친 辛夷의 항알레르기 효과를 알 수 있었다. 반면 FMD에서는 다른 군의 절반 수준으로 감소하여, OVA 특이 IgE와 관련된 기전에서는 유익균이 효능을 발휘하지 못하는 것으로 추측할 수 있다.

더불어 알레르기 비염으로 인한 증상의 호전도를 살펴보기 위해, 대표 증상 중 하나인 소양감의 변화를 생쥐가 코비비는 행동의 횟수를 측정하여 평가하였다. OVA 감작 후의 행동을 비디오로 관찰하였는데, 그 중 실험 6주차의 행동이 각 군별로 유의성이 있었다. 정상군에 비하여 대조군에서 코를 비비는 횟수가 두드러지게 증가하여 OVA 감작을 통해 알레르기 비염 반응이 확실히 유도되었음을 나타내고, 본 실험 동물 모델의 타당성을 보여주었다. UMD군에서 코 비비는 횟수가 상당히 감소하였으며, 특히 A-FMD군과 FMD군에서는 정상군 수준으로 감소하였다. 이 결과는 발효 과정이 辛夷의 약성을 변화시켜 항알레르기 효과를 높이는데 도움을 준다는 것을 명확하게 나타내지

만, 한편으로는 코비비는 행동 측정이 용이하지 않고 모든 주에서 유의성 있는 결과가 나타나지 못했으므로 객관성이 다소 떨어진다고 생각된다.

그리고 비점막의 조직학적인 분석을 통하여 점막 내 호산구 침윤정도를 살펴보았다. 일반적으로 비점막 기저층 상부에는 호산구나 호염기구가 없고, 염증에 의해 중등도의 호중구 침윤이나 약간의 세균이 관찰된다. 그러나 알레르기성 비점막에서는 이런 균형이 붕괴되면서 호산구 및 호염기구의 증가, 혈관투과성의 증가 등을 특징으로 하는 각종 변화가 일어나게 되고<sup>32)</sup>, 이러한 호산구성 염증의 정도는 중증도와 연관되기도 한다.

정상군에서는 정상적인 비점막의 분포와 호산구의 침윤이 보였으나, 대조군에서는 호산구의 침윤이 확연하게 증가하여 알레르기 반응이 나타났음을 알 수 있었다. 각기 다른 辛夷를 투여한 세 실험군 모두 대조군에 비해 호산구 침윤이 감소하여, 모두 항알레르기 작용이 있음을 확인하였다. UMD군에서의 변화는 辛夷 자체의 항알레르기 효과를 시사한다. A-FMD군에서는 호산구 침윤이 뚜렷하게 줄어, 辛夷의 항알레르기 작용에 발효가 상당히 유익하다는 것을 알 수 있었다. 또한 FMD군에서는 비점막에서 호산구의 침윤이 더욱 뚜렷하게 약화 되었다. 이는 발효 辛夷를 항알레르기 제제로 사용할 때, BB를 멸균하지 않고 투여하여 유익균을 제공함으로써 비점막의 호산구 침윤의 감소에 더욱 유익한 효과를 가지는 것으로 생각할 수 있다.

실험 종료 시점에서 각각의 실험군 간의 체중을 측정하였을 때 통계적으로 특별한 차이점은 관찰되지 않았으며, 이는 OVA의 처리나 각기 다른 辛夷 투여가 동물의 체중 및 생육에 부정적인 영향을 끼치지 않음을 의미한다.

辛夷의 처리방법에 따라 살펴보면 비발효 辛夷는 OVA 특이 IgE 수치, 행동 평가, 조직학적 분석에서 호전 반응을 나타내어 辛夷 자체가 알레르기 비염의 염증 상황을 개선하는데 효과가 있음을 알 수 있었다.

발효 멸균 辛夷는 혈액 내 호산구, 혈소판, OVA 특이 IgE 수치, 행동 평가, 조직학적 분석에서 항알레르기 효과를 나타내었다. 기존의 발효 한약에 대한 연구들에서 약제의 흡수능력 향상, 약성의 변화, 새로운 약성의 생성 등의 과정이 발효 약제의 약리적 효과를 증가시킨다고 알려져 있는 것처럼, 본 실험에서도 발효 과정을 통해 辛夷의 약리 효능이 증가하여 더욱 높은 항알레르기 효과를 가진다는 것을 알 수 있었다.

발효 생균 辛夷는 혈액 내 호산구 및 혈소판, 행동 평가, 조직학적 분석에서 다른 辛夷 처리군에 비해 우수한 효과를 나타내어, 미생물에 의해 辛夷의 성분이 특이적으로 전환되었을 뿐만 아니라 유용한 미생물을 유익균으로서 공급할 수 있어 기능적으로 우수해졌다고 볼 수 있다. 특히 혈액 내 혈소판의 수와 비점막의 조직학적 변화에서는 발효 멸균 辛夷군에 비해서도 우수하여, 생균의 투여는 혈소판과 관련된 염증 반응 및 비점막 조직에서의 알레르기 반응에 대하여 강점을 보이는 것으로 생각 된다. 반면 OVA 특이 IgE 수치에서는 다른 辛夷 처리군에 비해 호전도가 낮아 발효 생균 辛夷는 OVA 특이 IgE 이외의 기전에 작용하여 알레르기 비염에 효과를 나타내는 것으로 생각해 볼 수 있다. 이와 관련하여 추후 연구가 필요할 것으로 보인다.

본 연구를 통해서 발효에 따른 약제의 효능 변화를 확인 하였고, 경구 투여하는 한약은 장내 미생물들에 의한 대사로 활성이 전환되므로, 이와 관련하여 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 균주를 다양화하거나 복합 균주를 사용할 수 있고, 발효 시간이나 pH 등을 조절하여 최적의 발효 조건을 연구할 수 있겠다. 그리고 다른 지표들의 분석 및 유산균 투여군, 항히스타민제 투여군 등 다른 대조군의 설정을 통해 효과를 비교해 보아도 유용할 것으로 생각된다. 아쉽게도 본 연구에서 효과 증진의 기전을 알 수 없어 추후 발효 辛夷 투약시의 장 투과성 변화, 장내 유산균 증식 효과, 유해 효소의 활성 변화 등을 살펴봄으로써 장내 미생물 균총 및 장내 환경에 미치는 영향을 알

아보고, 동반되는 증상 변화와의 상관관계를 찾아 약리 효과가 증가된 기전을 파악한다면 질병의 예방이나 치료에 발효 및 유익균을 적용하는데 도움이 될 것으로 생각된다. 그리고 辛夷의 여러 약리 성분 중 어떤 성분이 발효 후 항알레르기 효과를 높이는지, 성분 별로 대사 전과 장내 미생물에 의한 대사 후의 유도체에서 나타나는 항알레르기 효과를 비교 평가 하는 것도 유용할 것으로 생각된다.

본 실험을 통해 발효 辛夷를 알레르기 비염 동물 모델에 투여하고 혈액학적, 면역학적, 행동, 조직학적 측면에서 분석한 결과 유의한 효과가 있음을 확인하였다. 추후 지속적인 연구를 통해서 기전을 파악하고 발효 과정을 더욱 최적화한다면 알레르기 비염의 예방과 치료에 더욱 효과적일 것으로 생각된다.

## 결 론

실험적으로 유발한 알레르기 비염 동물 모델에서 발효 辛夷의 항알레르기 효과를 알아보기 위하여, 균주별 발효 辛夷의 항산화 및 항염증 효과를 관찰하여 최적의 발효 균주와 조건을 조사하고, C57BL/6 mouse에 Ovalbumin으로 알레르기 비염을 유발시킨 후 비발효 辛夷, 발효 辛夷, 발효 후 멸균 辛夷를 투여하였다. 이후 혈액 중 적혈구와 백혈구, 혈소판, OVA 특이 IgE를 측정하였다. 그리고 비염 증상에 대한 행동 평가 및 비점막의 조직학적 변화를 분석하였으며 이에 다음과 같은 결론을 얻었다.

*Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bifidobacterium breve*로 다른 시간 동안 발효한 辛夷의 폴리페놀 함량, DPPH radical 소거능, NO 생성 억제율을 조사한 결과, BB를 이용하여 48시간 발효한 辛夷에서 활성이 최대로 나타났다.

혈중 호산구 수는 BB 발효 辛夷 투여군과 BB 발효 멸균 辛夷 투여군에서 현저하게 감소하였다. 혈중

혈소판 수는 BB 발효 辛夷 투여군에서 유의한 수준으로 증가하였고, BB 발효 멸균 辛夷 투여군에서는 증가하였으나 유의하지 않았다. 적혈구 수, 헤모글로빈 수치, 적혈구 용적률, 호중구 수, 림프구 수, 단핵구 수는 모든 실험군에서 유의한 변화가 없었다.

OVA 특이 IgE 수치는 모든 辛夷 투여군에서 감소하였으며, 특히 비발효 辛夷 투여군과 BB 발효 멸균 辛夷 투여군에서 크게 감소하였다.

행동 평가에서 모든 辛夷 투여군은 대조군에 비해 코를 비비는 횟수가 감소하였다. 특히 BB 발효 辛夷 투여군과 BB 발효 멸균 辛夷 투여군에서 현저하게 감소하였다.

비점막 조직에서 모든 辛夷 투여군은 대조군에 비해 호산구의 침윤이 감소하였다. 감소 정도는 BB 발효 辛夷 투여군에서 가장 뚜렷하였으며, 다음은 BB 발효 멸균 辛夷 투여군, 그 다음은 비발효 辛夷 투여군의 순서였다.

이상의 결과로 알레르기 비염을 유발한 동물 모델에 유산균 발효 辛夷를 투여하여 혈액학적, 면역학적, 행동 및 비점막의 조직학적 측면에서 우수한 항알레르기 효과가 있음을 확인하였다.

## 참 고 문 헌

1. Jung YJ, Han DO, Choi BH, Park C, Lee HJ, Kim SH, et al. Effect of Fermented Herbal Extracts, HP-1 on Enzyme Activities and Gene Expressions Related to Alcohol Metabolism in Ethanol-loaded Rats, Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2007;21(2):387-91.
2. Kim YM. A Study on the Trend of Researches in Fermented Herb Medicines. Master's Thesis, Kyungwon University. 2009.
3. National College of Oriental Medicine Herbology. Herbology. Seoul:Younglimsa, 2000:133-4.
4. The Chinese Medicine Dictionary Compilation Committee. Chinese Medicine Dictionary. Seoul:Jungdam. 1998:3429-34.
5. The Pharmacognosy Textbook Compilation Committee. Pharmacognosy. Seoul: Dongmyungsa. 2006:577-9.
6. Noh JH. Phylogenetic Analysis and Identification for Molecular Markers of Magnoliae Flos based on the trnL-F and ndhF Sequences. Master's Thesis, Kyunghee University. 2009.
7. Lim JP, Park YS. Anti-inflammatory Activity of the Ethanol Extract from Magnoliae Flos on PAR2-mediated Edema. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2005;13(6):245-9.
8. Kim DY, Jeong WS, Moon HC, Park SJ. Water Extract of Flowers of Magnolia Denudata Inhibits LPS-induced Nitric Oxide and Pro-inflammatory Cytokines Production in Murine Peritoneal Macrophage by Inhibiting NF-kB Activation. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2007; 21(4):916-20.
9. Han YM, Lim GS. Studies on the Inhibitory effect of anaphylactic reaction by Shinisan. The Journal of Oriental Medical Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology. 1999;12(1): 1-17.
10. Choi SH, Bae EO, Lim DK, Kim YR. Effects of Some Medicinal Plants on 48-hour Homologous Passive Cutaneous Anaphylaxis and Chemical Mediators. Yakhak Hoeji. 1992;36(4):357-69.
11. Kim WS, Seo YB, Kil GJ, Lee YC. The

- Effects of the Extracts form Magnolia Flos(OMF) on an Anti-allergic Action on B cells and Mast cells of the BALB/c Mice Activated by rHRF. Korean J. Oriental Medical Physiology & Pathology. 2001;15 (6):917-26.
12. Jeon CK, Hwang CY. Inhibitory Effect of Immediate-Type Allergic Reaction by Magnoliae flos. The Journal of Oriental Medical Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology. 1999;12(1):36-46.
  13. Lee YG, Chae BY. An Experimental Study of Sinichengpaeum on the anti-allergic effect. The Journal of Oriental Medical Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology. 2000;13 (2):165-81.
  14. Kang SH, Shim SY, Byun HS, Kim KJ. An Experimental Study of Sinichengpaeum on the allergic rhinitis. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2005;18(3): 18-25.
  15. Kim UH, Kim KJ. The Effects of Sinichengpae-um in Allergic Rhinitis Model Rats. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2006;19(3):60-7.
  16. Korean Society of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. Otorhinolaryngology. Seoul:Ilchokak, 2007:269-80.
  17. Son SY, Son BI edit. Sinnongbonchogyong. Taiwan:Wu zhou publisher, 1985:41.
  18. Park EJ, Jung KM. A Literature Study on Chronic Sinusitis in childhood. J. Korean Oriental Pediatrics. 1989;3(1):23-40.
  19. Bradley SM, Neumann VC, Barr K, Troughton PR, Astbury C, Bird HA, et al. Study of bacterial antibody levels and faecal flora in rheumatoid arthritis patientis taking sulphasalazine. Rheumatology. 1993;32(8):683-8.
  20. Back YM, Kim KS, Lee YW, Jo JK, Yu HS. Health Improvement and Treatment Effect of Probiotics. Journal of the Institute of Oriental Medicine, Daejeon University. 2010;19(1): 25-34.
  21. Park MS, Ji GE. Research Trends in Bifidobacterium. KSBB Journal. 2010;25(4): 319-29.
  22. Han HS, Park WS, Lee YJ. Studies on the Immuno Modulating Activity of Fermented Artemisiae Argyi Folium Extract. J. herbology. 2008;23(3):103-12.
  23. Park EK, Sung JH, Trinh HT, Bae EA, Yun HK, Hong SS, et al. Lactic acid bacterial fermentation increases the antiallergic effects of Ixeris dentate. J. Microbiol. Biotechnol. 2008;18(12):308-13.
  24. Kang DH, Kim HS. Functionality Analysis of Korean Medicine Fermented by Lactobacillus Strains. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 2011;39(3):259-65.
  25. Lee SG, Han KS, Jeong SG, Oh MH, Jang AR, Kim DH, et al. A Study on the Sensory Characteristic of Yogurt and Antimicrobial Activity of Lactobacillus plantarum LHC52 Isolated from Kimchi. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 2010;30(2):328-35.
  26. Hui YH, Meunier-Goddik L, Hansen AS, Josephsen J, Nip WK, Stanfield PS, et al. Kimchi: Handbook of food and beverage fermentation technology. New York:Marcel Dekker, 2004:621-34.

27. Chang SK, Kim HJ. Studies on the development of sausage fermented by *Leuconostoc citreum*. Korean J Food Cookery Sci. 2005;21(1):33-9.
28. Lee SH. The Effects of Anti-cancer Response of *Bifidobacterium breve*. Master's Thesis, Sungkyunkwan University. 1995.
29. Lee JS. Eosinophil and PAF. Korean Journal of Asthma, Allergy and Clinical Immunology. 1993;15(2):173-4.
30. Pitchford SC. Defining a role for platelets in allergic inflammation. Biochem Soc Trans. 2007;35(5):1104-8.
31. Niers LE, Timmerman HM, Rijkers GT, Bleek GM, Uden NO, Knol EF, et al. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which downregulate T helper type 2 cytokines. Clin Exp Allergy. 2005;35(11):1481-9.
32. Kim JY, Choi YO, Ji GE. Effect of oral probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) administration on ovalbumin-induced food allergy mouse model. J Microbiol Biotechnol. 2008;18(8):1393-400.