

백출 및 발효백출의 장점막 투과성 개선 효과 및 항염증효과

한경선 · 김기철 · 왕경화 · 김호준

동국대학교 일산한방병원 한방재활의학과

Effect of Unfermented and Fermented *Atractylodes macrocephalae* on Gut Permeability and Lipopolysaccharide-Induced Inflammation

Kyungsun Han, Kicheol Kim, Jinghua Wang, Hojun Kim

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, Dongguk University Ilsan Oriental Hospital

Received: May 28, 2013

Accepted: June 4, 2013

Correspondence to: Hojun Kim
Department of Oriental Rehabilitation
Medicine, Dongguk University Ilsan
Oriental Hospital, College of Oriental
Medicine, Dongguk University, 27
Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang
410-773, Korea
Tel: +82-31-961-9111
Fax: +82-31-961-9009
E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2013 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: The aim of this study is to investigate anti-inflammatory and protective effect for intestinal epithelial cells with *Atractylodes macrocephalae* (AM), a traditional Korean Herbal medicine and fermented *Atractylodes macrocephalae* (FAM) with *Lactobacillus plantarum*.

Methods: HCT-116 and Raw 264.7 cells were used in this study. Using NO assay, we measured lipopolysaccharide (LPS)-induced anti-inflammatory effect. We measured permeability of intestinal epithelial cells with transepithelial electrical resistance and horseradish peroxidase flux assay. Water soluble tetrazolium salt assay was used to see cell proliferation. All the results were presented in mean and standard deviation. We used Student's t-test for analyzing significance of results.

Results: In Raw 264.7 cells NO production decreased 22.4% with pre-treatment of AM and FAM, especially with FAM in high concentration. In HCT-116 cells LPS-induced intestinal permeability had a protective effect with both AM and FAM, which was also tend to be proportional to the concentration. Cell viability increased up to 135.52% after treatment of high concentration of FAM in HCT-116, while there was no significant change in Raw 264.7 cells with herb treatments.

Conclusions: These results show evidence that AM, especially fermented ones, significantly reduced intestinal membrane permeability. They also had a protective effect as well as an anti-inflammation effect for HCT-116 and Raw 264.7 cells. This suggest that FAM may be a therapeutic agent for Leaky gut syndrome by reducing intestinal permeability.

Key Words: Herbal fermentation, Leaky gut syndrome, Intestinal permeability, Probiotics, Anti-inflammation

서론

장내 상피세포는 위장관의 표면을 둘러싸고 있는 점막층으로 외부환경과 숙주 사이의 방어벽 역할을 함과 동시에 숙주가 생존에 필요로 하는 영양분을 선택적으로 흡수할 수 있도록 한다. 장점막 세포에는 미생물군이 분포하고 있어 병원균의 증식을 억제하고, 미세용모의 성장과 활동을 돕는 역할을 하며, 장관벽의 구조를 형성하는데 필요한 actin과

myosin의 생성을 돕는 등 장점막세포가 정상적인 기능을 수행하는 데 있어서 돕는 역할을 한다¹⁾.

이처럼 장내 상피세포와 장내 미생물 균총에 의해서 장내 면역기능이 정상적으로 유지되고 있는데, 만약 장내 미생물 균총의 변화가 생기게 되면 다양한 염증성 질환을 유발시키게 된다. 혐기성 세균의 증식은 직접적으로 장관벽의 손상을 일으키고, 내독소를 생산하거나 단백질분해효소와 같은 대사산물을 분배함으로써 직접적으로 장관벽에 손상을

입히게 된다²⁾. 이렇게 손상된 세포 간 치밀 결합(tight gap junction) 부위를 통해 정상상태에서는 흡수되지 못했던 세균, 진균, 기생충, 소화되지 않은 거대 단백질, 미생물에 의해 생산된 내독소 등이 흡수되게 되면 여러 가지 증상이 발현되고 질병의 발생과 악화에 관여하게 된다¹⁾. 이렇게 장점막 세포의 손상으로 장투과성이 증가되어 나타나는 일련의 장애를 통틀어 장누수증후군(leaky gut syndrome, LGS)이라고 하고, 제1형 당뇨병, 천식, 셀리악병, 염증성 장질환, 다발성 경화증 등의 임상형태로 나타날 수 있다^{3,4)}.

유산균은 인체에 이로운 영향을 주는 미생물로 장내 세포의 투과성을 조절하고 장관벽 기능을 강화시키는 등 인체에 유용한 효과들에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{5,6)}. 이를 응용하여 최근 발효한약에 대한 관심이 높아지고 있다. 한의학에서는 한약을 사용하기 위해 가공하는 포제법 중 하나로 미생물이 가지고 있는 효소를 통해 한약에 포함된 유기물이 분해되는 과정을 통해 유효한 산물을 얻어 한약의 효능을 증가시키는 방법을 발효라고 하였다. 발효한약을 사용한 선행연구로는 항암효과, 소염효과, 비만치료, 퇴행성질환 등에 대한 연구가 주를 이루며⁷⁾, 최근 장점막 투과성에 있어서 발효 금은화의 점막보호효과가 있다는 연구가 이루어진 바가 있다⁸⁾.

백출(Rhizoma of *Atractylodes macrocephalae*)은 국화과에 속한 흰삽주의 뿌리줄기를 말린 회황색-황백색의 한약재로 일정하지 않게 구부러진 원주상의 모양을 하고 있다. 한의학적으로는 비위와 관련 질환 및 혈압강하, 항염제, 이뇨제 등으로 사용된다. 약리작용으로는 위장관 손상억제 효과 및 항염증, 항산화 효과⁹⁾, 면역조절 효과¹⁰⁾, 간보호 효과, 항관절염 효과¹¹⁾ 등이 있다고 알려져 있다.

본 연구에서는 위장관계 질환의 치료에 탁월한 효능이 있는 백출 및 유효균을 이용해 발효시킨 발효백출이 lipopolysaccharide (LPS)를 이용해 유발된 염증에 대한 항염증 효과가 있는지, 또 이로 인해 장점막의 항염증 및 장점막 보호효과가 있는지 *in vitro* 실험을 통해 알아보려고 하였다. 또한 마우스 대식세포와 사람대장암세포의 세포생존율에 대한 효과를 검증하여 LGS를 비롯한 전신적인 질병 치료에 있어서 응용될 수 있는지 가능성을 검증해보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험재료

Human Colorectal Carcinoma cell line인 HCT-116세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분주 받아 사용하였다. 세포배양은 McCoy's 5A medium에 10% FBS와 1% penicillin streptomycin이 함유된 배지를 사용하였다.

Macrophage cell line인 Raw 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분주 받아 사용하였다. 세포배양은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin streptomycin이 함유된 배지를 사용하였다.

2) 세포배양

HCT-116 세포는 CO₂ incubator 37°C, 5% CO₂, 90% humidity의 조건하에서 2일에 한 번씩 배양액을 바꾸어주며 세포분화가 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline (PBS)으로 세포를 세척한 후 trypsin-EDTA 용액으로 부착된 세포를 분리한 뒤 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포를 모은 후 세포와 배지를 혼합하여 계대 배양하여 사용하였다.

Raw 264.7 세포는 CO₂ incubator 37°C, 5% CO₂, 90% humidity의 조건하에서 2일에 한 번씩 배양액을 바꾸어주며 세포분화가 최대에 도달하였을 때까지 배양하였다. 세포분화가 최대에 도달하였을 때 PBS로 세포를 세척한 후 scraper를 이용해 부착된 세포를 분리한 뒤 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포를 모은 후 세포와 배지를 혼합하여 계대 배양하여 사용하였다.

3) 추출물 및 발효물 제조

백출 분말은 동국대학교 일산한방병원으로부터 제공받았다. 백출 추출물은 250 ml 비커에 백출 분말 30 g, Lactobacilli MRS broth 150 ml를 첨가하여 실온(15~20°C)에서 30분간 sonication한 뒤, shaking water bath를 이용하여 70°C, 70 rpm 조건하에 3시간 동안 열수 추출하였다.

발효 백출 추출물은 백출 추출물을 autoclave하여 121°C에서 15분간 멸균시킨 후 실온에서 충분히 식히고 *Lactobacillus plantarum*을 2×10^7 CFU/ml가 되도록 접종하여 24시간 동안 37°C에서 incubation시킨 후 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 얻은 상층액을 0.45 µm filter에 여과한 후 실험에 이용하였다. 모든 실험은 최종농도가 각기 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml가 되도록 실험을 진행하였다.

2. 방법

1) Nitrogen monoxide (NO) 생성량

배양액 내의 NO 농도는 Griess Reagent System (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다.

Raw 264.7 세포를 24-well plate에 5×10^5 cells/well로 분주한 후 0.2 µg/ml LPS를 처리하였다. 3시간 동안 배양한 후 농도별(0, 50, 100, 200, 400 µg/ml) 백출 및 발효백출을 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 다른 한 군은 백출과 발효백출을 먼저 처리한 후 3시간 동안 배양한 이후 0.2 µg/ml LPS를 처리하였다. 세포배양 상층액을 96-well plate에 50 µl씩 넣고, Sulphanilamide solution, N-(1-naphthyl)thylenediamine dihydrochloride (NED) solution을 각각 50 µl씩 첨가하여 10분간 상온에서 반응시켰다. 흡광도 측정은 UV ELISA microplate reader로 540 nm에서 하였고 NO의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

2) Transepithelial electrical resistance (TEER) 측정

HCT-116 세포를 24-well cell culture plate with polycarbonate and PET membranes, 0.4 µm (Millipore, Billerica, MA, USA)에 2×10^5 cells/well이 되도록 하여 400 µl씩 분주하였고, receiver plate (basolateral)에는 800 µl의 배양액만을 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 overnight으로 배양하였다. 이후 백출 및 발효백출을 농도별(0, 50, 100, 200, 400 µg/ml)로 150 µl씩 처리하고 24시간 배양하였다. 장점막 투과성 증가를 유발하기 위해 10 µg/ml LPS를 각 150 µl씩 처리한 시점부터 시간별(0, 3, 6, 12, 24 h)로 장 점막 투과성을 관찰하였다.

장 점막 투과성은 Millicell-ERS (Millipore, Bedford, MA, USA)를 이용하여 측정하였으며, 각 실험은 2개의 well 값을 측정한 평균값으로 구하였다. 결과는 LPS 처리를 하지 않은 대조군에 대한 TEER 값의 변화율(%)로 나타내었다.

3) Horseradish peroxidase (HRP) 투과성 측정

HCT-116세포에 LPS를 첨가한 지 24시간이 되는 시점에 기존 배지를 제거한 후 PBS로 세척하였다. 이후 PBS에 100 µg/ml이 되도록 녹인 HRP를 400 µl 첨가하였다. 한 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 receiver plate (basolateral)의 배지를 PBS를 이용해 100배 희석한 후 96-well plate에 100 µl씩 분주하였다. 이후 HRP 기질 용액인 TMB SOL (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 50 µl를 혼합하여 약 10분간 실온에서 반응시켰다. 용액의 색이 진해지면 stop solution (2 M H₂SO₄) 50 µl를 넣어 반응을 종결시킨 후, UV ELISA microplate reader를 이용해 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4) 세포생존율 측정

세포생존율 측정은 water soluble tetrazolium salt (WST)를 이용한 EZ-Cytox enhanced cytotoxicity assay kit (iTSBiO, Seoul, Korea)를 사용하였다. HCT-116 세포와 Raw 254.7 세포를 각각 96-well plate에 1×10^3 cells/well의 농도로 분주한 후 백출과 발효백출을 농도별(0, 50, 100, 200, 400 µg/ml)로 가해 2시간 동안 배양하였다. 이후 well당 10 µl의 WST solution을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 반응시킨 후 UV ELISA microplate reader를 이용하여 450 nm와 참고치인 600 nm에서 흡광도를 측정해서 450 nm에서 600 nm을 뺀 값을 사용하였다.

5) 통계처리

실험결과는 평균(mean)과 표준편차(standard deviation)로 나타내었다. Cell viability, NO 측정, HRP flux 측정은 3개의 well을 사용해 측정한 평균값을 사용하였고, TEER 측정은 한 well당 5회 측정하여 그 중 유의성 있는 데이터를 3개를 선별해 평균을 구하였다. 유의성 검증은 Student's t-test를 실시하였으며 실험군 간의 유의성은 P<0.05 수준에서 검증하였다.

결 과

1. NO 생성량

항염증 효과를 확인하기 위해 Raw 264.7 세포에 염증유발 물질로 널리 사용되는 LPS를 처리하였다. 이 때 백출 및 발효백출의 염증치료효과와 염증에 대한 보호효과를 비교하기 위해 LPS를 백출 및 발효백출보다 먼저 처리한 군과 3시간 후에 처리한 군으로 나누어 실험을 진행하였다. 그 결과는 Fig. 1에 나타내었다.

LPS를 백출 및 발효백출에 앞서 처리한 군(Fig. 1A)에서는 대조군인 LPS만을 처리한 그룹보다 모든 실험군에서 NO의 생성량이 낮게 측정되었다. 이 중 가장 큰 변화량은 보인 것은 400 µg/ml의 발효백출을 처리한 군이며, 대조군과 비교해 90.74%의 NO를 생성하였다. 그러나 $P > 0.05$ 이상으로 유의성 있는 차이를 보이지 않았으며 농도의존적인 경향 또한 관찰되지 않았다.

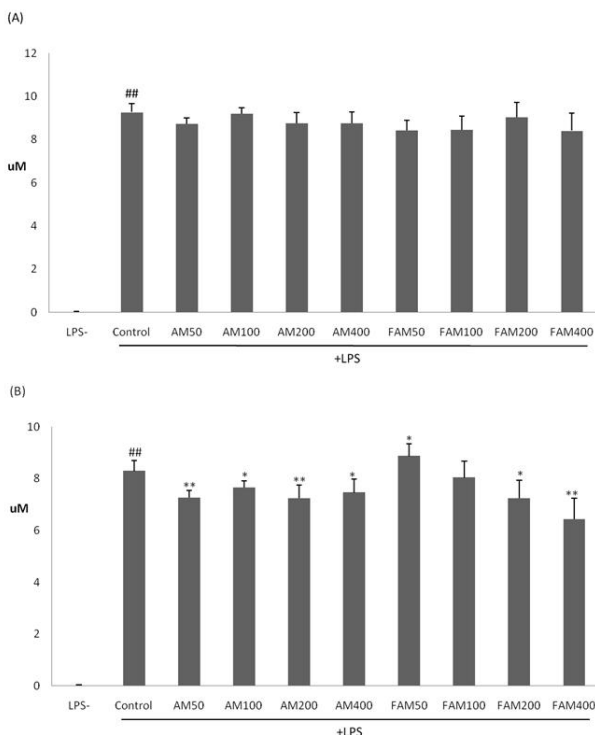


Fig. 1. Inhibitory effect of lipopolysaccharide (LPS)-induced NO production by *Atractylodes macrocephalae* (AM) and fermented *Atractylodes macrocephalae* (FAM). (A) Drug treatment after 3 hours of LPS exposure. (B) Drug treatment before adding LPS for 3 hours. [#]Data compared with group without LPS, ^{*}Data compared with control group, ^{**} $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

백출 및 발효백출을 먼저 처리한 후 LPS로 염증을 유발시킨 군(Fig. 1B)에서 백출은 대조군에 비해 NO의 생성량이 모두 감소하였으나 농도와는 큰 관련성을 찾을 수 없었다. 그러나 발효백출군에서는 농도에 비례하여 NO 생성량의 감소를 보였고 이 중 400 µg/ml 농도의 발효백출군에서 대조군의 77.6%로 NO 생성량이 가장 낮았다.

2. 백출 및 발효 백출을 첨가한 세포의 점막 투과성 변화

백출 및 발효 백출의 장점막 투과성에 대한 효과를 확인하기 위해 HCT-116 세포에 LPS 처리하지 않은 세포를 대조군으로 설정하였다. TEER의 변화율은 농도별(0, 50, 100, 200, 400 µg/ml)로 백출 및 발효백출을 처리한 세포에 LPS 처리를 하여 매 시간마다 대조군에 대한 백분율로 환산하여 Fig. 2에 표기하였다. Percentage of control은 다음과 같이 계산하였다.

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

TEER 값의 변화를 살펴본 결과, 시간에 따라 측정된 percentage of control 값은 LPS만을 처리한 군에서 모든 시간대에 가장 낮게 측정되었으며, 시간에 따라 LPS 처리 시작시점에서는 99.36%, 3시간 경과 시 90.75%, 6시간 경과 시 91.91%, 12시간 경과 시 89.06%, 실험종료시점인 24시간에서는 89.66%로 점차 감소하는 추이를 보였다.

LPS를 처리한 실험 시작시점에서 TEER의 측정결과를 살펴보면, 백출을 처리한 군에서 50 µg/ml를 처리했을 때 101.17%, 100 µg/ml는 102.82%, 200 µg/ml는 103.95%, 400 µg/ml를 처리한 경우 103.18%로 농도의존적인 경향으로 장점막 투과성이 감소한 것을 볼 수 있었다. 마찬가지로 발효백출을 처리한 군에서도 50 µg/ml에서 102.01%, 100 µg/ml에서 103.46%, 200 µg/ml에서 104.66%, 400 µg/ml에서는 105.08%로 농도의존적으로 장점막 투과성이 감소하였다. LPS로 인한 염증에 대해 장점막투과성 보호효과는 백출에 비해 발효백출에서 농도의존적으로 가장 높았다. 그 중 400 µg/ml의 발효백출을 처리한 군에서 3시간에서 100.46%, 6시간에서 104.58%, 12시간은 102.93%, 24시간에서 104.80%로 가장 대조군에 대해 TEER 값이 높게 나타났다.

HRP 투과성 측정은 HRP 활성정도가 증가할수록 점막

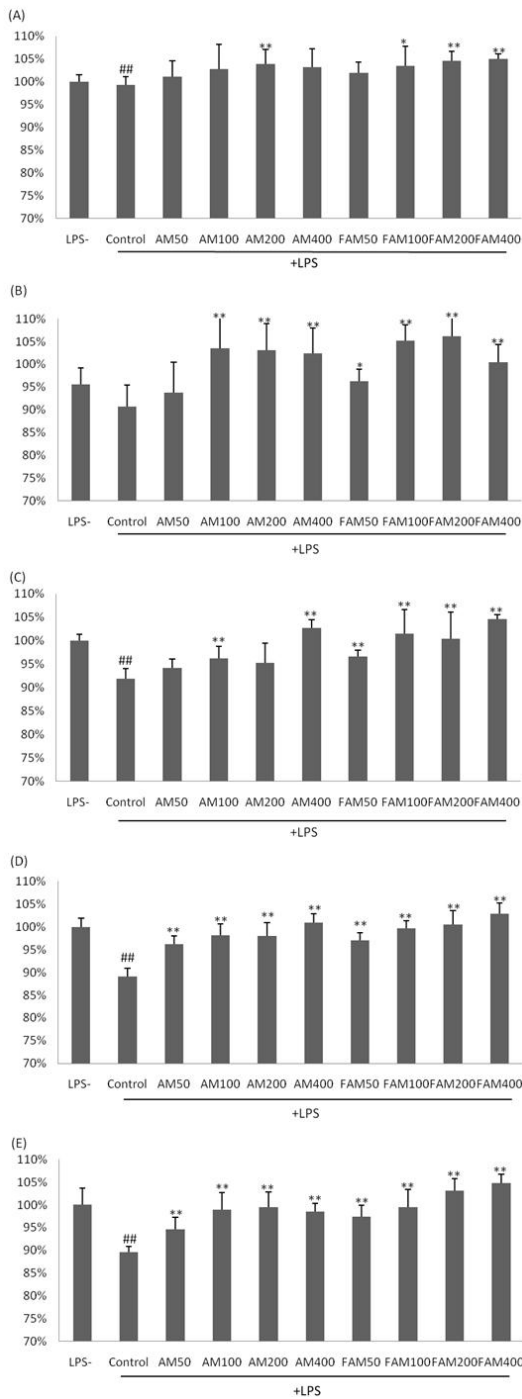


Fig. 2 TEER measurements of HCT-116 cells in five different time points. Results are expressed as percentage of control. (A) Results measured at the starting point of the experiment, which is the time of LPS exposure. (B) 3 hours after LPS treatment. (C) 6 hours after LPS treatment. (D) 12 hours after LPS treatment. (E) 24 hours after LPS treatment.

TEER: Transepithelial electrical resistance, LPS: *Lipopolysaccharide*, AM: *Atractylodes macrocephalae*, FAM: Fermented *Atractylodes macrocephalae*.

#Data compared with group without LPS, *Data compared with control group, #,*P < 0.05, ##,**P < 0.01.

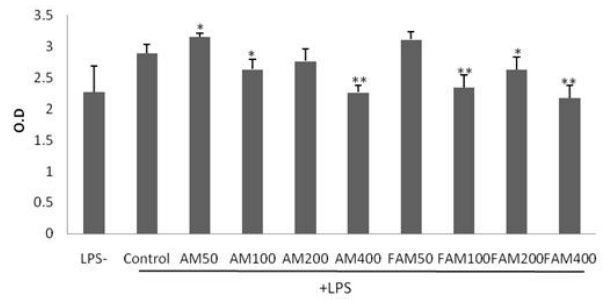


Fig. 3. Horseradish peroxidase (HRP) flux measurements of HCT-116 cells after 24 hours lipopolysaccharide (LPS) treatment. AM: *Atractylodes macrocephalae*, FAM: Fermented *Atractylodes macrocephalae*, O.D: Optical density. *Data compared with control group, *P < 0.05, **P < 0.01.

투과성이 증가하여 receiver plate로부터 얻은 배양액의 흡광도가 높아지는 원리에 의한 것으로, Fig. 3에 나타내었다. 대조군은 광학밀도(optical density, OD)가 2.27인 데 비해 LPS만 처리한 군에서는 2.89로 증가한 것을 볼 수 있었다. 그러나 백출과 발효백출 모두에서 50 µg/ml의 농도로 약물을 처리했을 때를 제외하고는 모두 HRP 투과성을 감소시켰다. 그 중에서도 400 µg/ml 백출을 처리한 군에서는 2.26으로 대조군과 유사한 수준으로 감소하였고, 발효백출을 400 µg/ml 처리한 군에서는 2.17로 대조군보다도 장점막 투과성을 감소시키는 것을 알 수 있었다. 그 다음으로는 백출 200 µg/ml (2.76 OD)에 비해 100 µg/ml (2.63 OD)에서 흡광도가 낮아졌고, 발효백출에서도 마찬가지로 200 µg/ml (2.63 OD)에 비해 100 µg/ml (2.34 OD)에서 흡광도가 두 번째로 낮게 측정되었다.

3. 세포생존율

HCT-116의 세포생존율을 시간변화에 따라 관찰한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 백출을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하는 대부분의 군에서는 P > 0.05로 유의성 있는 변화를 보이지 않았으나, 400 µg/ml의 발효백출에서는 약물 처리시점부터 24시간 후에는 133.45%, 48시간에는 128.8%, 72시간 후에는 135.52%로 세포생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 5에는 Raw 264.7 세포생존율을 나타냈다. 시간에 따라 고농도(200 µg/ml, 400 µg/ml)의 백출과 발효백출을 처리한 군에서의 세포생존율이 감소한 데 비해, 저농도(50 µg/ml, 100 µg/ml)의 백출 및 발효백출은 대조군과 비슷한

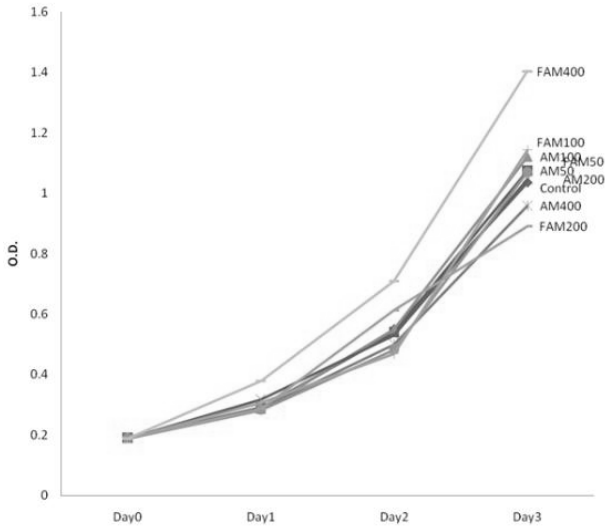


Fig. 4. HCT-116 cell proliferation in different time points after herb treatments.
AM: *Atractylodes macrocephalae*, FAM: Fermented *Atractylodes macrocephalae*, O.D.: Optical density.

수준의 세포생존율을 나타내었다. NO 생성량을 측정할 시 점인 24시간에서는 백출을 처리한 군 모두 변화가 컸으나, 발효백출을 처리한 군에서는 $P > 0.05$ 로 유의성 있는 변화를 보이지 않았다(Fig. 6).

고찰

최근 장내미생 물과 장점막의 변화에 따른 인체의 병리적인 변화에 대한 관심이 증가하고 있다. 장점막 투과성이 병리적으로 증가하게 되면 당뇨병, 비만과 같은 대사증후군 뿐만 아니라 면역 관련질환 등 여러 병리적인 변화가 초래된다. 이처럼 적합하지 않은 식이나 독소, 기생충, 감염, 의약품 등으로 인해 장벽의 투과성이 증가하여 발생하는 일련의 임상증상들을 통틀어 LGS라고 한다. 실제로 소화기계에는 인체 면역시스템의 70%가 위장관계에 분포하고 있는 만큼 위장관계의 기능은 면역전반에 걸쳐 상당히 중요한 역할을 하고 있다¹²⁾. 대사성 질환을 일으키는 체내의 만성적인 염증반응에도 장점막 투과성이 깊게 관여하고 있다. 고지방 식이를 지속적으로 섭취했을 경우 장내 미생물에 변화가 생기게 되며, 장내 상피세포 간의 치밀결합을 형성하는 단백질 발현을 감소시킴으로 인해 장투과성을 증가시킨다¹³⁾. 이로 인해 혈청 내 LPS 농도가 상승하게 되면 그람음성균 세포벽의 구성성분인 endotoxin의 혈중 농도가 증가하게 되

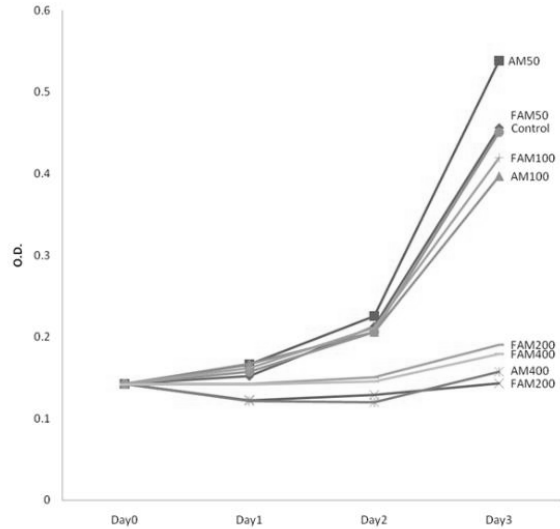


Fig. 5. Raw 264.7 cell proliferation in different time points after herb treatments.
AM: *Atractylodes macrocephalae*, FAM: Fermented *Atractylodes macrocephalae*, O.D.: Optical density.

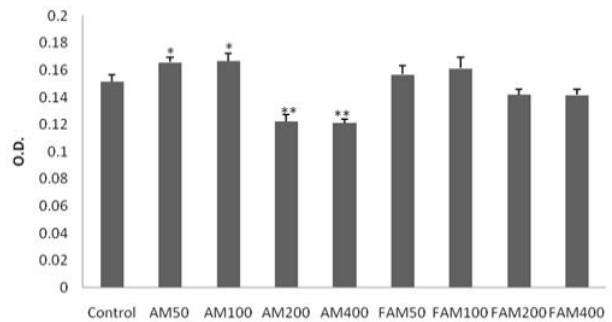


Fig. 6. RAW 264.7 cell viability after 24 hours of herb treatment.
AM: *Atractylodes macrocephalae*, FAM: Fermented *Atractylodes macrocephalae*, O.D.: Optical density.
*Data compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

므로 내독소혈증 및 대사성 염증을 일으키게 된다¹⁴⁾. 더불어 면역반응, 외상, 장내미생물 변화 등 어떠한 원인에 의해 장점막의 투과성이 증가하게 되면 완벽히 분해되지 않은 작은 단백질과 폴리펩타이드가 체내로 흡수되어 질병을 야기한다. 이밖에도 독소나 항생제의 사용, 섬유질이 적은 음식, 위장관계 질환, 외상 등에 의해서도 LGS가 올 수 있다고 설명하고 있다¹⁵⁾. 게다가 장점막 내로의 물질 유입이 과도하게 되면 간에서 독소를 분해하는 데 한계가 오게 되므로 전신적인 독성 반응이 일어나게 되고 이로 인해 면역계에 지장을 주게 된다는 가설 또한 다양한 임상실험에 의해 설명되고 있다¹⁶⁾.

이에 한의학적으로 위장관계 질환의 치료 및 간보호, 항

염증 등에 좋은 효능이 있는 백출에 LGS 치료의 가능성을 지닌 probiotics로서 유효균(*L. plantarum*)을 접종하여 발효시켜 실험을 진행하였다. 그리고 체내 대사성 염증과 내독소혈증을 유발시키는 물질인 LPS를 이용해 장투과성변화 및 염증을 유발시켰다.

NO는 체내 염증과정에서 iNOS 및 COX-2 등에 의해 생성되는 염증인자로서 NO가 과잉 생산되면 신경독성, 혈관 확장 등의 작용을 갖고, 궁극적으로는 만성 염증, 자가면역질환, 류마티스성 관절염 등을 유발하게 된다¹⁷⁾. 이를 바탕으로 Raw 264.7 세포에 LPS로 염증을 유발한 후 백출 및 발효백출을 처리하여 염증치료효과를 검증하고자 하였으나 NO 생성량이 감소하는 경향을 보일 뿐 유의성 있는 결과는 얻지 못하였다. 그러나 백출 및 발효백출을 농도에 따라 처리한 후 LPS로 염증을 유발시킨 경우에는 약물을 후처리한 경우보다 NO 생성량에 대한 감소폭이 더 큰 것을 확인할 수 있었다. 또한 백출만을 처리한 군에 비해 발효백출을 처리한 군에서 NO 생성량 감소에 있어 농도의존적으로 우수한 효과가 있음을 확인하였다. 이는 백출 및 발효백출의 면역세포에 대한 보호효과를 기대할 수 있는 근거가 된다.

장내 상피세포의 밀착결합(tight junction)을 이루고 있는 claudin과 같은 단백질 구성에 변화가 생기게 되면 투과성 상피세포의 전기적 저항성과 세포 투과성에 변화가 생기게 된다¹⁸⁾. 이에 밀착결합 형성 정도와 장점막 투과성은 TEER 값과 HRP 투과성으로 판단할 수 있다. 세포 간 접촉 상태가 잘 유지될 경우 세포 사이로 흐르는 전류에 큰 저항을 발생시키게 되므로 TEER 값이 증가하게 되고 반대로 장점막 투과성이 증가한 경우 TEER 값은 감소하게 된다. HRP 투과성 분석법은 과산화효소-항과산화소복합체가 상피세포의 치밀결합에 결합을 하는 특징을 이용한 방법으로, LPS를 이용해 장점막 투과성이 증가시켜 통과되는 항원-항체 복합체의 흡광도를 측정하는 방법이다. 즉, 흡광도인 OD 값이 증가했다는 것은 장점막 투과성이 증가하여 이를 통과한 HRP 복합체가 많다는 것을 시사한다. 본 실험에서는 HCT-116 세포에 백출 및 발효백출을 첨가하여 배양한 후, LPS로 장점막에 염증을 유발시켰다. 그 시점부터 TEER 값의 변화추이를 살펴본 결과, 백출의 농도가 높을수록 장점막 투과성을 감소시켜 점막보호효과가 있는 것을 알 수 있었다. 이 중에서도 고농도의 발효백출이 발효시키지 않은

군보다 높은 TEER 값을 보여 유효균으로 발효시키는 것이 점막보호효과를 더욱 증가시키는 것을 알 수 있었다. HRP 투과성 역시 고농도의 백출 및 발효백출에서 가장 낮은 흡광도를 나타내어 백출 및 발효백출 모두 농도의존적인 경향으로 장점막의 염증변화로 인한 투과성변화에 대해 보호효과를 갖는다는 것을 알 수 있었으며, 이 중 백출보다 발효백출에서 더욱 효과가 분명히 나타났다. 특히 고농도(400 µg/ml)의 백출과 발효백출 모두 각각 75.16%, 78.22%로 대조군에 비해 HRP 투과성이 감소되었고, 이때 흡광도는 염증을 유발시키지 않은 군과 차이를 보이지 않는 것으로 유추해볼 때, 발효백출이 위장관 내의 치밀결합을 보호하는 효과가 뚜렷한 것으로 볼 수 있다.

세포생존율 및 세포독성을 알아보기 위한 실험방법으로는 MTT assay가 가장 많이 사용되나 일회적인 실험이면서도 과정이 번거롭고 세포손실의 위험성이 있다는 단점이 있다. 반면 WST assay는 민감성이 높음에도 연속적인 관찰이 가능하고 실험과정 또한 편리하다. 따라서 본 실험에서는 수용성 tetrazolium salt로 살아있는 세포와 반응해 오렌지색 수용성의 formazan을 생성한 결과물로 흡광도를 측정하는 WST assay를 이용했다. Raw 264.7과 HCT-116의 세포생존율을 비교해보면 Raw 264.7 세포는 고농도의 백출 및 발효백출을 처리한 군에서 세포독성을 나타내는 것을 알 수 있었으나 HCT-116의 경우 대조군과 비교했을 때 생존율의 차이를 보이지 않았다. 오히려 HCT-116 세포에서는 고농도의 발효백출을 처리한 군(400 µg/ml)에서 발효백출을 첨가한 지 3일 후, 대조군과 비교했을 때 135.52%의 세포생존율을 보였다. 결론적으로, 앞서 설명한 장점막투과성 실험결과와 비교해보면 사람의 대장점막층을 모델로 한 HCT-116의 경우에는 백출 및 발효백출 모두에서 고농도로 사용하였을 때 점막보호효과를 지녔다는 것을 알 수 있다. 특히, 발효백출군에서 TEER과 HRP flux 결과가 염증하지 않은 군과 유사한 수준으로 결과가 나온 것은 고농도의 발효백출이 세포보호에 우수한 효과를 지니며, 이것은 사람대장암세포인 HCT-116 세포를 통한 세포생존율 결과로서 설명할 수 있다. 세포생존율에 있어 발효백출을 처리한 군에서는 대조군보다도 월등히 세포생존율이 증가한 것으로 보아, 세포 보호효과뿐만 아니라 장상피세포의 분화에 긍정적인 효과를 기대할 수 있을 것이며 향후 추가적인 연

구가 필요하다. 반면, Raw 264.7 세포에서의 NO 생성량은 농도에 따라 NO의 생성물이 감소하는 것이 염증억제의 기전이 아닌 세포독성에 의한 것일 수 있으므로 향후 추가적인 실험이 필요할 것으로 보인다. NO 측정시점인 약물 처리 후 24시간 후만 비교해보면 백출을 처리한 군에서는 유의성 있는 수준으로 세포생존율의 변화가 있었던 데 비해 발효백출에서는 대조군과 거의 비슷한 생존율을 보이는 것으로 추론해 볼 때, 백출을 발효시키는 것이 세포독성을 억제시키는 역할을 함과 동시에 위장관에서는 더욱 좋은 점막 보호효과를 동시에 지닐 수 있다는 것을 의미한다고 볼 수 있다.

이번 연구에서는 *in vitro* 모델을 통해 백출 및 발효백출이 Raw 254.7의 염증반응을 억제시키고, HCT-116 세포의 점막투과성에 대한 보호효과와 세포생존율 증가효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 본 실험에서 백출의 위장관계의 보호효과를 다시 한 번 입증하였으며, 백출의 단독사용보다는 유익균을 이용한 발효백출의 효과가 뛰어난 것을 확인하였다. 따라서 LGS 치료의 새로운 방법으로 대두되는 probiotic의 효과와 한약재 자체의 효능을 동시에 이용한다면 위장관계질환뿐만 아니라 장점막 투과성 증가로부터 올 수 있는 전신적인 질병의 치료에서 응용할 수 있을 것이다. 이에 백출 및 발효백출을 장점막 투과성 증가로 인한 LGS의 치료에 사용할 수 있는 가능성을 높이기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

결론

1. 백출 및 발효백출 모두 농도의존적으로 TEER값을 증가시켰다.
2. 백출 및 발효백출 처리 후 염증유발 전에도 대조군에 비해 장점막 투과성 감소효과를 보였다.
3. HRP 투과성 역시 농도의존적 경향으로 장점막 염증 변화에 대한 투과성 감소효과를 가졌다.
4. 장점막 투과성 실험결과 모두 발효백출이 백출에 비해 장점막 보호효과가 우수한 것으로 나타났다.
5. HCT-116세포에서는 고농도의 발효백출을 처리한 군에서 대조군보다도 높은 세포생존율을 보여, 장상피세포 분화에 긍정적인 효과를 기대할 수 있을 것으로 예상된다.

6. NO 생성실험 결과, 백출 및 발효백출의 면역세포에 대한 보호효과는 기대할 수 있으나 염증 치료효과에는 유의성 있는 결과를 얻지 못했다.

7. 백출에 비해 발효백출에서 농도의존적으로 NO 생성량 감소를 보였으나, Raw 264.7 세포의 생존율 실험결과 고농도의 백출 및 발효백출에서 세포독성을 나타낸 것으로 보아 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다.

9. 본 실험에서는 백출의 위장관계 보호효과를 다시 한번 입증하였으며, 백출의 단독사용보다는 유익균을 이용한 발효백출의 효과가 더욱 뛰어난 것을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(2010-0024412) 지원을 받아 수행된 것임.

References

1. Farhadi A, Bana A, Field J, Keshavarizan A. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003 ; 18(5) : 479-97.
2. Marik PE, Iglesias J. Intestinal mucosal permeability: mechanism and implications for treatment. *Crit Care.* 1999 ; 27(8) : 1650-1.
3. Fasano A. Leaky gut and autoimmune diseases. *Clinic Rev Allerg Immunol.* 2011 ; 42 : 71-8
4. Lieu Z, Li N, Neu J. Tight junctions, leaky intestines, and pediatric diseases. *Acta Paediatr.* 2005 ; 94 : 386-93.
5. Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, Engelhardt R, Seidler U, Hansen W, et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One.* 2007 ; 12 : e1308.
6. Patel RM, Myers LS, Kurundkar AR, Maheshwari A, Nustrat A, Lin PW. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *Am J Pathol.* 2012 ; 180(2) : 626-35.
7. Choi YK, Sul JU, Park SK, Yu SN, Kim SH, Rhee MS, et al. Research trends of fermented medicinal herb - based on their clinical efficacy and safety assessment. *J Life Sci.* 2012 ; 22(12) : 1729-39.
8. Lee SJ, Lee MJ, Jung JE, Kim HJ, Bose S. In vitro profiling of bacterial influence and herbal applications of *Lonicerae flos* on the permeability of intestinal epithelial cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012 ; 41(7) : 881-7.

9. Li X, Lin J, Han W, Mai W, Wang L, Li Q, et al. Antioxidant ability and mechanism of rhizoma atractylods macrocephalae. *Molecules*. 2012 ; 17 : 13457-72.
10. Shin SW, Lee YS, Park JH, Kwon TK, Suh SI, Kwon YK. Comparison of immunomodulatory effects of water-extracted ginseng radix, pilose asia-bell, astragali radix, atractylodes rhizoma alba and dioscoreae rhizoma. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2004 ; 18(4) : 1140-6.
11. Kim SH, Park YK. Effects of atractylodis rhizoma alba extract on collagen-induced arthritis in mice. *Korean J Herbology*. 2012 ; 27(3) : 1-6.
12. Spaeth G, Berg RD, Specian RD, Deitch EA. Food without Fiber promotes bacterial translocation from the gut. *Surg*. 1990 ; 108(2) : 204-47.
13. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet- induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008 ; 57 : 1470-81.
14. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007 ; 56 : 1761-72.
15. Pizzorno J. *Textbook of natural medicine*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livinstone. 1999.
16. Cantor IS, Rosenzweig S. Anthroposophic perspective in primary care. *Prim Care*. 1997 ; 24(4) : 867-87.
17. Hilliquin P, Borderie D, Hervann A, Menkes CJ, Ekindjian OG. Nitric oxide as S-nitrosoproteinsin rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1997 ; 40 : 1512-7.
18. Schneeberger EE, Lyunch RD. The tight junction: a multi-functional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 ; 286(6) : C1213-C28.