

Loperamide로 유도된 변비 증상에 유산균 제제가 미치는 영향

김은영 · 조경애 · 안소현 · 박성선* · 손흥수** · †한성희***

고려대학교 대학원 보건과학과, *종근당건강, **신안산대학교 식품생명과학과, ***고려대학교 생물신소재연구소

Effect of Lactic Acid Bacteria Powder on Loperamide-induced Constipation in Rat

Eun Young Kim, Kyungae Jo, So Hyun Ahn, Sung Sun Park*, Heung Soo Son** and †Sung Hee Han***

Dept. of Public Health Sciences, Graduate School, Korea University, Seoul 07249, Korea

**Research Center, Chong Kun Dang Healthcare Corporation, Seoul 02841, Korea*

***Dept. of Food Science and Biotechnology, Shin Ansan University, Ansan 15435, Korea*

****Institute for Biomaterials, Korea University, Seoul 07249, Korea*

Abstract

Probiotics is known improve the microenvironment of colon; however, the metagenomic DNA study of its lactic acid bacteria in constipation induced by loperamide is not clearly understood. In the present study, we investigated the reduction of the lactic acid bacteria in case of constipation, in normal and loperamide-induced rat. Lactic acid powder (lactic acid bacteria 19) was prepared from Chong Kun Dang Pharmaceutical Corporation. After 2 weeks of oral administration, the group treated with the higher concentration of lactic acid bacteria (10^9 CFU/mL per kg of body weight) following loperamide treatment was the most effective in increasing number, weight, and water content of feces. A similar but significant increase was found in the group treated with lower concentration of lactic acid bacteria (10^7 CFU/mL per kg of body weight) after loperamide treatment. The concentrations of acetic acid and propionic acid in feces in the loperamide-induced rat with high concentration lactic acid, were significantly higher than that of others. Furthermore, gastrointestinal transit ratio as well as the length and area of intestinal mucosa were significantly increased after treatment with lactic acid bacteria in loperamide-induced rat. Metagenomics DNA analysis indicated that the microorganism homology in cecum was similar between the groups of normal (NOR) and HIG. Our results show that lactic acid bacteria were effective in improving the constipation.

Key words: lactic acid bacteria, constipation, loperamide, gastrointestinal transit, H&E staining, metagenomic DNA

서 론

변비는 진단명이 아닌 하나의 증상으로, 대변보는 횟수가 적고, 변이 딱딱하여 변을 보기 힘든 상태를 말한다. 현대사회에서는 식생활 변화 및 스트레스 등 다양한 문화적, 환경적, 유전적, 사회·경제적 이유로 변비 증세를 가진 사람의 수가 늘어나고 있는 추세이며, 임상에서도 흔하게 알려진 증상이 다(Bharucha AE 2007). 변비의 일반적인 증상은 일주일에 세 번 미만으로 배변을 하는 횟수의 감소나, 매우 적은 양의 배

변, 통증을 수반할 정도의 힘든 배변, 단단하고 건조한 배변 및 변을 보고 나서 시원하지 않은 증상들을 지속적으로 나타나는 것이다(Kallman H 1983). 이러한 변비 증상은 특히 여성과 노인층에서 더 많이 발생하는 것으로 보고되고 있다(Faigel DO 2002). 변비의 원인은 운동 부족, 섬유질 섭취 부족으로 인한 일차적 원인과 암 종양, 신경이상, 호르몬 분비 이상 등에 의한 이차적 원인으로 구분할 수 있다(Alessi & Henderson 1988). 변비 환자들은 삶의 질의 저하를 호소하고(Siproudhis 등 2006), 결장 및 직장암이 유발될 위험성과 관계가 있는 것

† Corresponding author: Sung Hee Han, Institute for Biomaterials, Korea University, Seoul 07249, Korea. Tel: +82-2-3290-5622, E-mail: sungheeh3@gmail.com

으로 보고되어 있다(Watanabe 등 2004). 이러한 변비는 충분한 섬유질 섭취 증가로 완화될 수 있으나, 단지 섬유질 섭취를 늘리는 것만으로 변비가 해결되는 것은 아니므로(Muller-Lissner SA 1988) 이차적 방법으로 부피형성 완화제 및 삼투성 완화제의 약물을 사용한다. 이러한 완화성 약물은 복부 팽만, 설사 등이 동반될 수 있으며, 자극성 하제의 경우, 장기간 복용 시 여러 합병증을 유발할 수 있다(Smith B 1973). 이와 같은 약물치료의 부작용 등을 고려하였을 때, 장의 건강과 가장 밀접한 관련이 있는 기능성 식품은 유산균 소재이다. 유산균은 인체 유익균으로 적정량을 섭취했을 때 숙주의 건강에 유익한 영향을 미치는 살아있는 생물로 정의되고 있는 가장 대표적인 프로바이오틱스이다(Teitelbaum & Walker 2002). 유산균은 변비를 개선할 수 있는 lactose의 흡수를 돕고, 면역기능 향상, 혈액의 콜레스테롤 수치 저하, 비타민의 합성 등을 통해 장내 환경 개선과 유해한 박테리아의 성장을 억제함으로써 장내 환경이 원인이 되는 질병에 대한 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(Kim 등 2003; Menino 등 1993; Park 등 1999; Salminen 등 1998; Yun 등 2005). 따라서, 본 연구에서는 loperamide를 이용하여 변비를 유발시킨 실험동물에 유산균 제제를 투여하여 변비 증상에 대한 개선효과 정도를 알아보았다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 시약

실험에 사용한 동물은 생후 6주령된 평균 체중 170 g의 Sprague-Dawley를 대한바이오링크(Eumdeong, Chungbuk, Korea)로부터 제공받아 사용하였다. 실험동물은 5일 동안 환경에 적응시킨 후, 임의로 각 처리군당 6마리씩 4군으로 나누어 배치하였고, 1마리씩 분리하여 wire drop cage에 25일간 사육하였다. 실험동물 사육실 환경온도는 20~22°C, 상대습도는 50~55%로 유지하였고, 명암은 12시간 주기로 조절했으며, 물과 사료는 자유급식시켰다. 시료로 사용된 유산균 분말 제제(유산균분말 19)는 종근당건강(Dangjin, Chungnam, Korea)으로부터 제공받아 사용하였고, loperamide(L4762)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 실험동물 처치

실험 식이는 크게 4그룹으로 나누어 실시하였다. 제 1 group은 정상대조군으로 유산균과 loperamide를 투여하지 않은 군(NOR)이다. 변비를 유도한 후, 제 2 group은 유산균을 투여하지 않은 대조군(CON), 제 3 group은 실험동물의 체중 kg당 유산균을 10^7 CFU/mL로 투여한 저농도 투여군(LOW), 제 4 group은 실험동물 체중 kg당 유산균을 10^9 CFU/mL로 투여한 고농

도 투여군 (HIG)으로 하였다.

5일간의 적응 기간이 끝난 정상대조군(CON)은 0.9% 생리식염수만 투여하였고, 유산균분말 저농도 투여군(LOW) 및 고농도 투여군(HIG)은 일주일 동안 0.9% 생리식염수에 loperamide (5 mg/kg)를 녹여 1일 2회(오전 9시와 오후 6시) 총 14회 복강 투여하여 변비를 유발하였다. 실험동물의 변비 유발이 확인된 후부터는 14일 동안 저농도 유산균과 고농도 유산균을 각각 1일 1회 경구투여하였다.

3. 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험동물의 사료 섭취량, 음수량 및 체중은 1주일 간격으로 총 4회 측정하였고, 체중 증가량은 실험 최종일의 체중에서 실험 시작일의 체중의 차이로 나타냈다.

4. 변의 개수, 변 중량, pH 및 변의 수분 함량

변의 개수, 변 중량 및 변의 수분 함량의 측정은 변비 유발되기 전인 loperamide 투여 이전 기간과 loperamide 투여 후 변비가 유발된 기간으로 나누어 조사하였다. Loperamide 투여 기간 동안의 변의 수거는 loperamide 투여 당일부터 2일 1회 수거하였고, 변비 유발 후부터는 주 1회 수거하여 개체당 변의 개수와 변의 중량을 측정하였다. 변의 수분 함량은 변을 -50°C에서 48시간 동안 동결건조시켜 건 중량을 측정하고, 변 중량과 건 중량의 차이를 변 중량으로 나누어 계산하였다.

5. 장 통과시간, 통과속도 및 장 길이 측정

유산균 분말의 소화관 이동률은 Baik 등(2004)의 방법을 변형하여 측정하였다(Baik 등 2004). 활성탄 식이 이동 효과를 조사하기 위하여 8% 활성탄을 실험동물에 경구투여한 후, 30분 뒤에 희생시켜 위장관을 적출하였다. 장의 길이는 소장과 대장(맹장 제외)까지의 길이를 쥘 후 절개하여 측정하였고, 소화관 이동률은 활성탄 식이의 전체 장관거리를 이동거리로 나누어 산출하였다.

$$T (\%) = B/A \times 100$$

T: 투여한 활성탄의 소화관 이동률

A: 소화관 전체 길이

B: 활성탄의 최선단부까지의 이동거리

6. 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤 함량

혈청 중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량을 분석하기 위하여 투여가 모두 종료된 실험동물을 마취시킨 후, 개복하여 복대정맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액으로부터 원심분리한 혈청은 자동혈청분석기(Dri-chem

3500i, Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다. 혈청 중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량은 Fujifilm사의 측정용 kit(TG-0024, TCHO-0222, HDL-0233)를 이용하여 분석하였다.

7. 분변으로 유도된 단쇄지방산(Short chain fatty acid, SCFA)의 함량 측정

분변으로 유도된 단쇄지방산 함량을 측정하기 위해, 실험 종료 1일전 분변 1 g을 채취하여 5 mL의 메탄올을 이용해 추출한 다음 0.45 µm Millipore filter(Millipore, USA)를 통하여 여과 후 DB-FFAP 123-3253(50 m × 0.32 mm × 0.50 µM), flame ionization detector 및 autosampler(HT 300, Toung-Lin Co.)가 장착된 gas chromatography (YL-6100 GC system, Yong-Lin Co., Korea)를 이용하여 분석하였다. 시료의 주입량은 1 µL, 주입구 및 검출기 온도는 각각 200°C와 240°C였으며, 분석조건은 Demingne 등(1985)의 방법을 참고하였다. 검출된 acetic acid, propionic acid, butyric acid 및 valeric acid의 함량은 각각의 표준시약을 이용해 작성한 검량선(calibration curve)에 대입하여 도출하였다.

8. 헤마톡실린-에오신 염색(Hematoxylin and Eosin, H & E Staining)을 통한 장내 상피세포의 관찰

장내 조직을 관찰하기 위하여 paraffin embedding하여 절편한 조직을 xylene으로 탈파라핀하고, 에탄올 농도별(100, 90, 80 및 70%)로 각 5분씩 가수한 후, 헤마톡실린 용액(Sigma)에 3분 동안 염색하였다. 염색된 조직은 수세한 뒤 에오신 용액을 이용해 3분 동안 다시 염색시켰다. 염색이 완료된 후 흐르는 물에 잘 씻은 조직은 다시 에탄올을 이용하여 농도별(70, 80, 90 및 100%)로 각각 5분씩 탈수시키고, xylene을 이용하여 씻은 후 봉입하였다. 염색된 장 점막 세포는 광학현미경(ZEISS, Axiovert S100, Jena, Germany)으로 관찰하였다.

9. 면역조직화학적 염색을 통한 장내 Interstitial cells of Cajal(ICC) 관찰

Interstitial cell of Cajal(ICC)은 장내 부드러운 근육층 안에 분포하고 있는 세포로, 장의 연동운동을 도와주는 세포이다(Takaki M 2003). 이 세포를 관찰하기 위하여 위의 H&E staining과 같은 방법으로 paraffin embedding한 장내 조직을 4 µL로 절편, xylene을 이용하여 탈파라핀하고, 에탄올을 농도별(100, 90, 80 및 70%)로 각 5분씩 가수시켰다. 조직만 남아있는 슬라이드 글라스는 98°C에서 20분간 열을 가하여 antigen retrieval을 일으킨 후에 pre-antibody blocking으로 ICC 이외의 세포는 염색이 되지 않도록 처리하였다. Primary antibody는 AB c-kit(Santa cruz; SC-168, Dallas, TX, USA)을 사용하였고, 1:200으로 희석

하여 4°C에서 하루 동안 반응시켰다. 반응시킨 후, antibody enhancer를 조직에 처리하여 10분 동안 배양하였다. Chromogen (DAB Substrate 1 mL + DAB Chromogen 1~2 drop)을 처리하여 5분 후에 흐르는 물로 1~2분 씻고, 헤마톡실린으로 반응시키고, PBS와 흐르는 물에 세척하여 mounting하였다.

10. 메타지노믹스(Metagenomics) DNA 분석

균총 변화는 메타지노믹스 DNA 방법으로 분석하였다(Li 등 2012). Barcode primer를 이용하여 PCR을 수행하는 전처리 과정에서는 전체 미생물의 다양성을 분석하기 위해 16s rRNA 유전자 중 가변영역인 V1~V3 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer를 제작하여 PCR 수행을 하였다.

장내 미생물 군집 변화의 데이터 분석은 bioinformatics tool을 이용하였다. CD-HIT-OTU program을 이용하여 sequencing error로 간주되는 noise data 제거와 sequence similarity cutoff (97%)에 의한 clustering을 수행하여 OUT를 생성하였다(Lim 등 2012). Taxonomic assignment & Diversity statistics를 수행하기 위해 QIIME program을 이용하였으며(Caporaso 등 2010), 통계분석은 alpha-diversity metrics, alpha-rarefaction, taxonomy composition, PCoA plot, UPGMA tree, OTU heatmap으로 분석하였다.

11. 통계분석

모든 결과의 통계적 분석은 SPSS(statistical package for social science, version 12.0) 통계 package를 사용하여 처리하였고, 각 실험군 간의 유의성 검증은 분산분석(ANOVA) 및 사후검정으로 Tukey's test를 실시하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험 기간 동안 변비 유발 rat의 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량 변화는 Table 1에 나타내었다. 정상 대조군(NOR)과 비교해 보았을 때, loperamide로 변비를 유발시킨 군(CON)의 사료 섭취량과 음수량이 감소하는 경향을 나타냈고, 최종 체중 증가에는 별다른 변화가 없었다. 이는 Shimotoyodome 등(2000)이 보고한 바와 같이, loperamide 투여는 사료 섭취량을 감소시키는데 영향을 미치지만, 최종 체중 증가에 영향을 미치는 정도가 아닌 것으로 사료되며, 각 실험군 간의 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

2. 변의 개수, 변 중량, 변의 pH 및 변의 수분 함량

변비를 유발시킨 실험동물의 변의 개수, 변 중량 및 변의 pH 변화는 Table 2에 나타내었다. 결과에서 보는 것과 같이,

Table 1. Effect of lactic acid bacteria on food intake, water intake, and body weight gain in normal and loperamide-induced rats

Group	Food intake (g/day)	Water intake (mL/day)	Body weight gain (g)
NOR	29.42±6.09 ^{ns}	32.92± 9.54 ^{ns}	162.17±29.85 ^{ns}
CON	26.17±0.99	20.83± 6.83	132.83±49.95
LOW	29.25±3.31	30.83±10.57	154.67±27.19
HIG	30.08±2.35	27.92± 7.81	122.67±14.21

Each value is mean ± S.D. (n=6). Different letters at each measurement indicate differences among groups ($p<0.05$). NOR: normal group, CON: loperamide-treat group, LOW: lactic acid bacteria (10^7 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group, HIG: lactic acid bacteria (10^9 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group. ns, not significant.

Table 2. Effect of lactic acid bacteria on number of fecal pellets, weight of fecal pellets and fecal pH in normal and loperamide-induced rats

Group	Fecal pellet number	Fecal pellet weight (g)	Fecal pH
NOR	55.25±6.80 ^a	33.51±5.95 ^a	7.70±0.63 ^{ns}
CON	36.00±1.00 ^b	21.76±1.09 ^b	7.97±0.76
LOW	48.67±5.13 ^a	32.77±5.02 ^{ab}	7.81±0.48
HIG	47.33±3.79 ^a	33.58±7.28 ^a	7.99±0.19

Each value is mean ± S.D. (n=6). Different letters at each measurement indicate differences among groups ($p<0.05$). NOR: normal group, CON: loperamide-treat group, LOW: lactic acid bacteria (10^7 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group, HIG: lactic acid bacteria (10^9 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group. ns, not significant.

정상 대조군(NOR)에 비하여 대조군(CON)의 변의 개수와 변 중량이 34.5% 유의적으로 감소함으로써 loperamide에 의하여 변비가 유발된 것으로 확인되었다. 변비 유발 후 유산균을 저농도(LOW)와 고농도(HIG)로 투여한 결과, 대조군에 비하여 유산균을 저농도(LOW)로 투여한 실험군은 배변량이 11.5% 유의적으로 증가하였고, 고농도(HIG)로 투여한 실험군은 14.5% 유의적으로 증가하는 결과를 나타냈다. 유산균의 투여 농도 구배에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았으나, 유산균의 투여가 변비 완화에 유의적인 효과가 있음을 알 수 있었다. 변의 중량 결과는 배변량과 유사한 결과를 나타냈으며, 각 실험군별 변의 pH 변화는 크게 차이 나지 않는 것으로 나타났다.

변의 수분 함량 결과는 Fig. 1에서 보는 것과 같이, 정상대조군(NOR)에 비하여 loperamide를 단독 투여한 대조군(CON)의 수분 함량이 유의적으로 크게 감소하였다. 이는 Table 1의

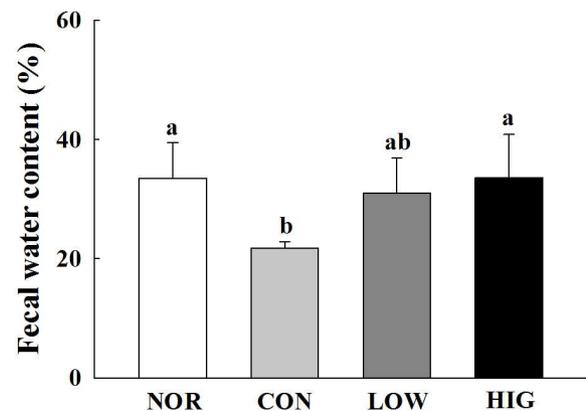


Fig. 1. Effects of lactic acid bacteria on water content of feces in normal and loperamide-induced rat. Bars represent mean ± S.D. (n=6). Different letters (a,b) in the bar mean significant difference at $p<0.05$ level by Tukey's test. NOR: normal group, CON: loperamide-treat group, LOW: lactic acid bacteria (10^7 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group, HIG: lactic acid bacteria (10^9 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group.

배변량과 변 중량 결과와 같이, loperamide에 의한 변비가 유발되었음을 확인할 수 있었다. 실험동물의 변비 유발을 위해 종종 사용되는 loperamide는 설사치료에 사용되는 약물이기도 하지만, 장 운동을 억제하여 배변 시간을 연장시키는 것으로도 알려져 있다(Lawrence 등 1984). 또한, 대조군(CON)에 비하여 유산균을 투여한 군들의 변의 수분 함량이 유의적으로 증가하는 결과를 나타냈다. 대조군(CON)의 변 수분 함량이 21.7%였던 것에 비하여 유산균을 저농도(LOW)로 투여한 군은 변의 수분 함량이 31.0% 유의적으로 증가하였고, 유산균을 고농도(HIG)로 투여한 군은 변의 수분 함량은 33.6%로 증가한 결과를 보였다. 그리고, 투여한 유산균의 농도에 따른 유의적인 차이도 확인할 수 있었다. 따라서, loperamide로 유발된 변비 증상을 유산균이 완화시킬 수 있음을 확인하였고, 유산균의 농도가 증가함에 따라 그 개선 효과가 증가할 수 있다고 판단된다.

3. 소화관 이동률

Fig. 2에 나타낸 바와 같이, 활성탄 식이의 장관 이동성을 통해 소화관 이동률을 측정된 결과, 정상 대조군(NOR)의 이동률이 52.6%에 비하여 loperamide를 단독 투여한 대조군(CON)의 이동률의 경우 36.7%로 유의적인 감소를 보여 변비가 유발되었음을 알 수 있었다. 변비가 유발된 대조군(CON)에 비교했을 때, 유산균을 저농도(LOW)로 투여한 군은 48.6%, 고농도(HIG)로 투여한 군은 47.7%로 소화관 이동률이 유의

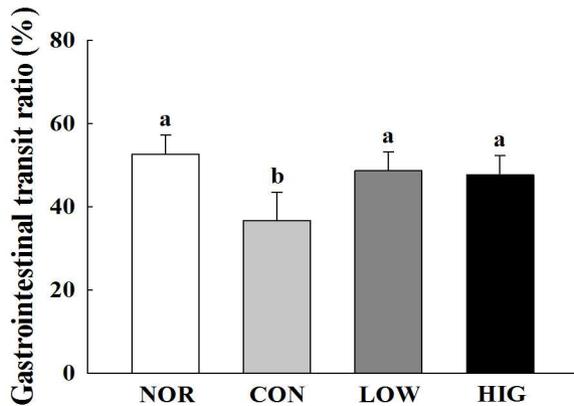


Fig. 2. Effect of lactic acid bacteria on gastrointestinal transit ratio in normal and loperamide-induced rats. Bars represent mean \pm S.D. (n=6). Different letters (a,b) in the bar mean significant difference at $p < 0.05$ level by Tukey's test. NOR: normal group, CON: loperamide-treat group, LOW: lactic acid bacteria (10^7 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group, HIG: lactic acid bacteria (10^9 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group.

적으로 증가하였다. 투여한 유산균 농도에 따른 유의적인 차이는 크게 나지 않았으나, 대조군(CON)에 비하여 소화관 이동률이 유의적으로 증가하였고, 그 정도가 정상대조군(NOR)과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이는 유산균 투여에 의하여 정상대조군(NOR)과 유사한 수준으로 소화관 이동률을 개선할 수 있으리라 사료된다.

4. 혈청 중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량

실험 최종일 모든 실험동물의 복대정맥에서 혈액을 채취하여 혈청 중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량 변화를 측정 결과를 측정하였다(Table 3). 정상대조군(NOR)과 대조군(CON)의 혈청 중 중성지방의 함량의 경우, 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 대조군(CON)에 비하여 유산균을 투여한 경우들의 중성지방 함량이 감소하는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 총 콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤의 결과에서도 유사하게 나타났다.

5. 분변 중 단쇄지방산 측정

아세트산(acetic acid), 프로피온산(propionic acid) 및 부티르산(butyric acid)과 같은 단쇄지방산은 장 점막으로부터 빨리 흡수되어 대장 점막 세포의 주요한 에너지원으로 이용된다고 알려져 있다. 사람 또는 쥐의 대장점막세포는 에너지의 5~10%를 단쇄지방산으로부터 공급받고 있으며, 이로 인해 대장점

Table 3. Effects of lactic acid bacteria on plasma triglyceride, total cholesterol and HDL-cholesterol level in normal and loperamide-induced rats (mg/dL)

Group	Triglyceride	Total cholesterol	HDL-cholesterol
NOR	140.67 \pm 23.22 ^{ns}	92.00 \pm 18.14 ^{ns}	58.50 \pm 13.31 ^{ns}
CON	141.75 \pm 11.56	90.50 \pm 39.94	47.83 \pm 10.07
LOW	92.20 \pm 14.38	69.83 \pm 17.51	42.17 \pm 9.81
HIG	105.17 \pm 14.50	83.33 \pm 8.33	50.67 \pm 4.89

Each value is mean \pm S.D. (n=6). Different letters at each measurement indicate differences among groups ($p < 0.05$). NOR: normal group, CON: loperamide-treat group, LOW: lactic acid bacteria (10^7 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group, HIG: lactic acid bacteria (10^9 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group. ns, not significant

막 세포의 증식작용을 하는 것으로 보고되어 있다(Thompson DB 2000). 그리고, 단쇄지방산은 물, 전해질의 흡수촉진작용, 중탄산 이온의 분비 항진작용 및 대장점막의 혈류 증가작용 등을 나타내는 것으로 알려져 있다(Lim 등 2004). 그러므로, 장 건강 증진에 도움을 주는 단쇄지방산 생성에 유산균 투여가 미치는 영향을 알아보기 위하여, 분변 중의 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 발레르산 및 총 단쇄지방산 함량을 GC로 분석하였다(Fig. 3). 그 결과를 보면, 정상대조군(NOR)에 비하여 대조군(CON)의 각 아세트산, 프로피온산, 부티르산

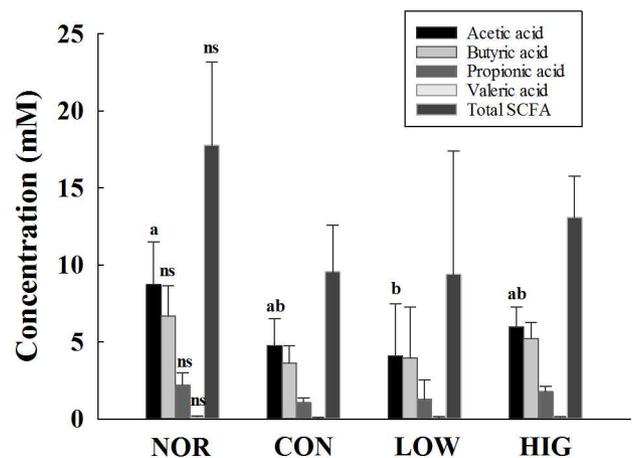


Fig. 3. The concentration of acetic acid, butyric acid, propionic acid, and total short chain fatty acid on feces in normal and loperamide-induced rat. Bars represent mean \pm S.D. (n=6). Different letters (a,b) in the bar mean significant difference at $p < 0.05$ level by Tukey's test. NOR: normal group, CON: loperamide-treat group, LOW: lactic acid bacteria (10^7 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group, HIG: lactic acid bacteria (10^9 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group. ns, not significant.

및 총 단쇄지방산 함량이 유의적으로 감소되어 변비 증상이 유발되었음을 알 수 있었다. 대조군(CON)에 비하여 유산균을 투여한 경우, 총 단쇄지방산, 부티르산 및 발레스산의 함량이 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나, 각각의 단쇄지방산 함량이 증가하는 결과를 나타냈다. 특히, 고농도 유산균을 투여한 HIG군에서는 프로피온산과 아세트산의 함량이 유의적으로 증가하는 것으로 볼 때, 유산균의 섭취가 분변으로의 단쇄지방산을 유도했음을 확인할 수 있다.

6. 헤마톡실린 및 에오신 염색을 통한 장 내 상피세포의 관찰

연구에 사용된 실험동물의 대장 조직을 5 μm 두께의 파라핀 절편으로 만들어 헤마톡실린 및 에오신 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 변비가 유도된 경우에는 장점막내의 점액 분비의 기능이 감소한다고 보고된바 있으며, loperamide 투여 시 대장운동 저하뿐만 아니라, 대장관내 점액 분비가 감소함으로써 대장 내용물의 이동에

저해를 준다고 알려져 있어, 대장 조직의 변화 관찰은 매우 중요하다(Cepinskas 등 1993). 대조군(CON)에 비하여 저농도(LOW) 및 고농도(HIG)로 유산균을 투여한 경우에는 유의적으로 장 점막의 길이가 증가하는 것으로 나타났고, 투여한 유산균의 농도가 증가할수록 장 점막의 길이도 유의적으로 증가함을 알 수 있었다. 장 점막의 넓이는 loperamide로 변비를 유발한 대조군(CON)이 정상 대조군(NOR)에 비하여 유의적으로 감소하였고, 유산균을 투여한 군에서 유의적으로 장 점막이 넓어진 것을 확인할 수 있었다. 유산균이 고농도로 투여된 군(HIG)에서 장 장막의 넓이는 정상 대조군(NOR)에 비해서 높아진 효과를 나타냈고, 장 점막의 넓이에 대한 유산균의 영향이 농도의존적인 효과를 나타내지는 않았다.

7. 면역조직화학적 염색을 통한 장 내 ICC 관찰

Interstitial cells of Cajal(ICC)를 관찰하기 위하여 c-kit primary antibody를 사용하여 IHC Staining을 하였다. RGB 값을

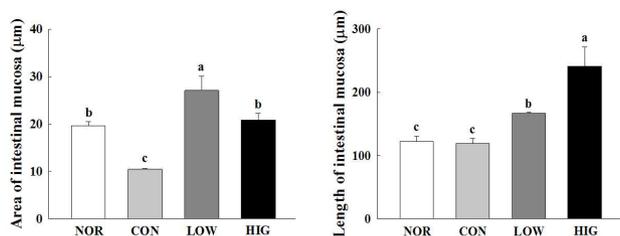
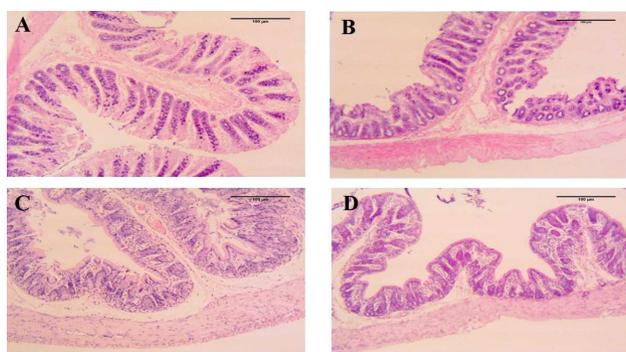


Fig. 4. The cross section of distal colonic mucosa included fecal pellet. Different letters (a,b,c) in the column mean significant difference at $p < 0.05$ level by Tukey's test. (A) NOR (B) CON (C) LOW (D) HIG. NOR: normal group; CON: loperamide-treat group; LOW: lactic acid bacteria (10^7 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group; HIG: lactic acid bacteria (10^9 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group. The mucus is strongly stained with fecal pellet and increased mucus in crypt cells. Rat distal colon containing a fecal pellet stained with H&E staining (400×).

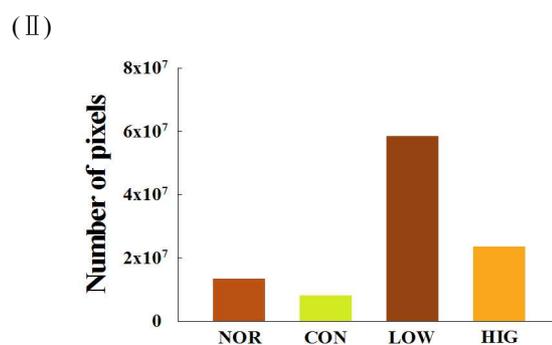
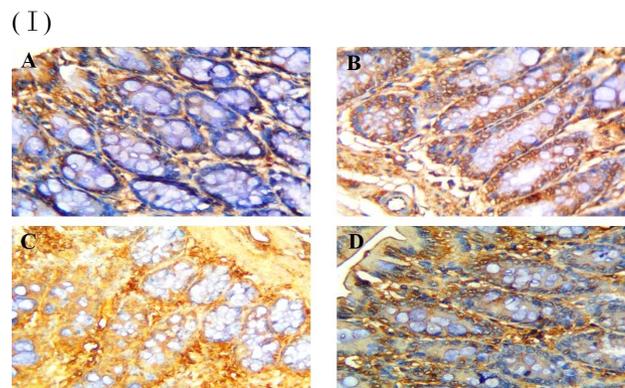


Fig. 5. (I) Immunohistochemically staining of interstitial cells of Cajal (ICC) by c-kit(400×). (A) NOR (B) CON (C) LOW (D) HIG (II) Number of pixels of the interstitial cells of Cajal (ICC) by immunohistochemically staining. NOR: normal group; CON: loperamide-treat group; LOW: lactic acid bacteria (10^7 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group; HIG: ; lactic acid bacteria (10^9 CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group.

[180, 112, 52]로 고정하고, 각 군의 RGB값에 해당하는 색의 pixel값을 MATLAB을 사용하여 비교한 결과, 정상대조군(NOR)에 비하여 loperamide를 투여해 변비를 유도한 대조군(CON)이 낮은 pixel값을 나타냈다. 유산균을 각각 저농도(LOW) 및 고농도(HIG)로 투여한 군에서는 대조군(CON)에 비하여 높은 pixel값을 나타내었다(Fig. 5). ICC는 장내에 분포하며, 장을 부드럽게 만들어 효과적인 장의 연동 운동을 할 수 있도록 한다고 알려져 있다(Takaki M 2003). 따라서, 실험 결과 내의 pixel의 증가는 장의 연동 운동이 효과적으로 이루어질 수 있다는 것을 의미하며, 유산균의 투여가 장을 부드럽게 만들어 장의 연동 운동을 돕는다고 판단할 수 있겠다.

8. 메타지노믹스 유전자 분석

맹장내의 균총 변화를 확인하고자 metagenomic DNA를 분석한 결과(Fig. 6), 실험군들 가운데 가장 많이 관찰되는 균주는 *Lactobacillus* sp.로 확인되었다. 유산균을 투여한 군들에서 *Bacteroides* sp.가 나타났고, 유산균을 고농도로 투여한 군(HIG)에서는 다른 군에 비하여 특이적으로 많은 비중을 나타냈다. *Bacteroides* sp.는 나이가 들어감에 따라 증가하는 유해균으로, 이러한 유해균이 고농도 유산균을 경구 투여할 경우, 분변으로 다량 배출되는 결과를 나타내는 것은 유산균의 투여가 장내 환경 개선에 매우 효과적임을 보여주는 결과이다.

실험군 사이의 미생물의 상동성을 비교한 결과는 Fig. 7과 같다. 본 결과에 따르면 정상대조군(NOR)과 비교해 보았을 때, 대조군(CON), 유산균 저농도 투여군(LOW) 및 유산균 고농도 투여군(HIG) 사이에는 미생물 분포의 유사성을 보이지 않았다. Loperamide를 투여하여 변비를 유발한 대조군(CON)과 저농도의 유산균을 투여군(LOW) 사이에서는 미생물 분

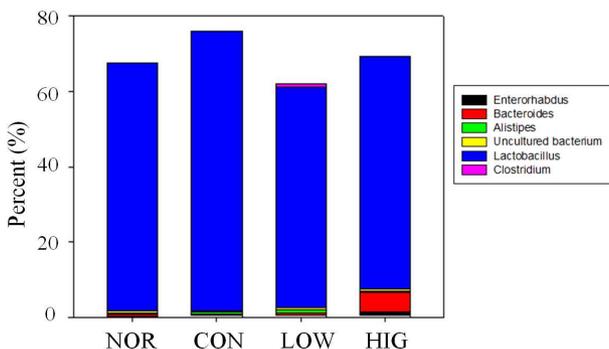


Fig. 6. Metagenomics DNA analysis for changing of microflora. NOR: normal group; CON: loperamide-treat group; LOW: lactic acid bacteria (10⁷ CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group; HIG: lactic acid bacteria (10⁹ CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group.

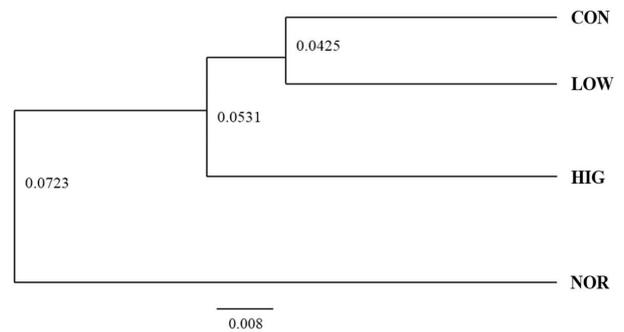


Fig. 7. Microorganism homology analyzed by metagenomics DNA. NOR: normal group; CON: loperamide-treat group; LOW: lactic acid bacteria (10⁷ CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group; HIG: lactic acid bacteria (10⁹ CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group.

포의 유사성을 보이는 반면, 고농도의 유산균 투여군(HOW)과는 미생물 분포의 상동성을 보이지 않았다. 정상대조군(NOR)은 *Lactobacillus animals*의 비중이 가장 높게 나타났고, 이에 비해 대조군(CON), 유산균 저농도 투여군(LOW) 및 유산균 고농도 투여군(HIG)은 *Lactobacillus johnsonii*의 비중이 높게 나타났다. 특히 유산균 고농도 투여군(HIG)의 경우에는 *Lactobacillus reuteri*의 비중이 높게 나타났었다(Fig. 8). *Lactobacillus reuteri*는

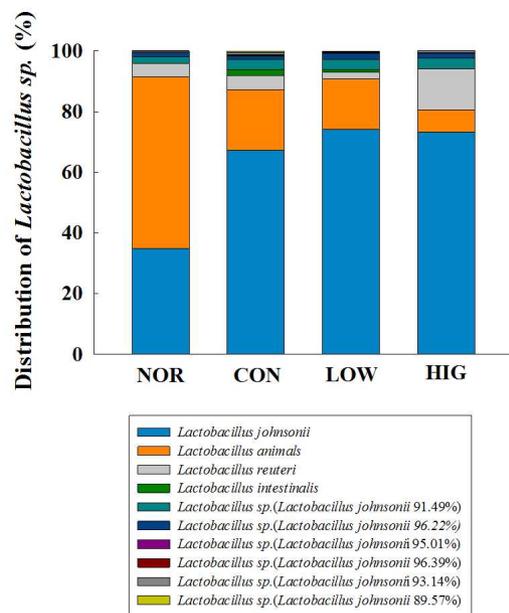


Fig. 8. Distribution of *Lactobacillus* sp. analyzed by metagenomic DNA. NOR: normal group; CON: loperamide-treat group; LOW: lactic acid bacteria (10⁷ CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group; HIG: lactic acid bacteria (10⁹ CFU/mL per kg of body weight) and loperamide-treat group.

항균물질인 루테린을 생산해 병원성 미생물에 대한 항균활성이 있어 장내 환경 개선에 영향을 주는 균으로, *Lactobacillus reteri*의 비중이 높게 나타났다는 것은 유산균 투여에 의하여 장내 환경이 개선되어 변비 증상을 완화시켰다고 판단할 수 있겠다.

요 약

Loperamide를 통해 변비가 유발된 실험동물에 유산균 투여가 미치는 영향을 알아보기 위하여 14일 동안 저농도(10^7 CFU/mL per kg of body weight)의 유산균과 고농도(10^9 CFU/mL per kg of body weight)의 유산균을 투여한 후, 변비개선 효과를 측정하였다. 그 결과, 변비 유발 후 유산균을 투여한 실험동물들의 경우, 대조군(CON)에 비하여 변의 개수, 변 중량 및 수분 함량이 유의적으로 증가하였다. 또한 소화관 이동률을 조사한 결과, 대조군(CON)에 비하여 변비 유발 후 유산균을 투여한 군에서 정상대조군(NOR)인 군과 유사한 이동성을 보이는 것을 확인하였다. 변비가 유발된 실험동물의 혈청 중성 지방, 총 콜레스테롤 함량, HDL-콜레스테롤 함량에는 유산균 투여 유무 및 유산균의 농도에 대한 영향을 크게 받지 않은 것으로 보여진다. 고농도의 유산균을 섭취시킨 실험동물군(HIG)의 경우, 분변으로 유도된 아세트산과 프로피온산의 함량이 유의적으로 높게 나타났다. 또한 헤마톡실린 및 에오신 염색을 통한 장내 상피세포 관찰을 통해 유산균 분말 투여 시 장 점막의 길이와 넓이가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 메타지노믹스 유전자 분석을 통한 미생물 분포의 상동성을 비교해 본 결과, 고농도의 유산균 투여군(HIG)이 정상대조군(NOR)과 가장 흡사한 분포 특성을 가지고 있음을 보여주었다. 이상의 결과에 따라 유산균 제제는 변비 개선 효과가 있다고 볼 수 있다.

References

Alessi CA, Henderson CT. 1988. Constipation and fecal impaction in the long-term care patient. *Clin Geriatr Med* 4:571-588

Baik S, Kim H, Lee Y, Kim Y. 2004. Preparation of active fraction from radish water extracts for improving the intestinal functions and constipation activities. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47:315-320

Bharucha AE. 2007. Constipation. *Clinical Gastroenterology* 21: 709-731

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich K, Gordon J, Huttley GA, Kelley ST, Knight D, Koenig JE, Ley RE,

Lozupone C, McDonald D, Muehhe BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Tumbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7:335-336

Cepinskas G, Specian RD, Kvietys PR. 1993. Adaptive cytoprotection in the small intestine: Role of mucus. *The American Journal of Physiology* 264:G921-927

Faigel DO. 2002. A clinical approach to constipation. *Clinical Cornerstone* 4:11-21

Kallman H. 1983. Constipation in the elderly. *American Family Physician* 27:179-184

Kim JH, Kim HJ, Son JH, Chun HN, Yang JO, Choi SJ, Paek NS, Choi GH, Kim SK. 2003. Effect of *Lactobacillus fermentum* MG590 on alcohol metabolism and liver function in rats. *J Microbiol Biotechnol* 13:919-925

Lawrence RS, Carol A, Stephen G, John S. 1984. Mechanism of the antidiarrheal effect of loperamide. *Gastroenterology* 86:1475-1480

Li W, Fu L, Niu B, Wu S, Wooley J. 2012. Ultrafast clustering algorithms for metagenomic sequence analysis. *Briefings in Bioinformatics* 13:656-668

Lim B, Lee C, Kim J. 2004. Study on immunoregulatory function of dietary fiber. *Food Ind Nutr* 9:26-30

Menino MJ, Cutrin C, Vieira R, Barrio E, Parafita MA. 1993. Colchicine alters lactate utilization in isolated hepatocytes of rats treated with ccl4 and ethanol. *Life Sciences* 52: P113-P118

Muller-Lissner SA. 1988. Effect of wheat bran on weight of stool and gastrointestinal transit time: A meta analysis. *Br Med J* 296:615-617

Park SY, Ji GE, Ko YT, Jung HK, Ustunol Z, Pestka JJ. 1999. Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide, and cytokine production in RAW 264.7 macrophage cells exposed to human and commercial isolates of *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol* 46:231-241

Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, De Voe WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila ST. 1998. Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int J Food Microbiol* 44:93-106

Shimotoyodome A, Meguro S, Hase T, Tokimitsu I, Sakata T. 2000. Decreased colonic mucus in rats with loperamide-induced constipation. *Comp Biochem Physiol Part A, Molecular & Integrative Physiology* 126: 203-12

- Siproudhis L, Pigot F, Godeberge P, Damon H, Soudan D, Bigard MA. 2006. Defecation disorders: A French population survey. *Dis Colon Rectum* 49:219-227
- Smith B. 1968. Effect of irritant purgatives on the myenteric plexus in man and the mouse. *GUT* 9:139-143
- Smith B. 1973. Pathologic changes in the colon produced by anthraquinone purgatives. *Dis Colon Rectum* 16:455-458
- Takaki M. 2003. Gut pacemaker cells: The interstitial cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res* 39:137-161
- Teitelbaum JE, Walker WA. 2002. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr* 22:107-138
- Thompson DB. 2000. Strategies for the manufacture of resistant starch. *Trends in Food Science & Technology* 11:245-253
- Watanabe T, Nakaya N, Kurashima K, Kuriyama S, Tsubono Y, Tsuji I. 2004. Constipation, laxative use and risk of colorectal cancer: The miyagi cohort study. *European Journal of Cancer* 40:2109-2115
- Yun JH, Yim DS, Kang JY, Kang BY, Shin EA, Chung MJ, Kim SD, Baek DH, Kim K, Ha NJ. 2005. Identification of *Lactobacillus ruminus* SPM0211 isolated from healthy Koreans and its antimicrobial activity against some pathogens. *Arch Pharm Res* 28:660-666

Received 19 October, 2015

Revised 5 November, 2015

Accepted 28 November, 2015