

블루베리와 아로니아를 함유한 청국장 환 제품의 마우스 염증성 장질환 개선 효과

김하림 · 노은미 · 이승현 · 조종현* · 박미희** · †김선영***

(재)전주농생명소재연구원 연구원, *순창문옥레식품(주) 대표,

** (재)전주농생명소재연구원 선임연구원, *** (재)전주농생명소재연구원 융복합연구사업본부장

Effect of *Cheonggukjang* Pills Product Containing Blueberry and Aronia in Mouse Inflammatory Bowel Disease

Ha-Rim Kim, Eun-Mi Noh, Seung-Hyeon Lee, Jong Hyun Cho*, Mi Hee Park** and †Seon-Young Kim***

Researcher, Jeonju AgroBio-Materials Institute, Jeonju 54810, Korea

*Chairman, Soonchang Moonokrae Foods Corp., Sunchang 56048, Korea

**Senior Researcher, Jeonju AgroBio-Materials Institute, Jeonju 54810, Korea

***Head Manager, Convergence R&DB Division, Jeonju AgroBio-Materials Institute, Jeonju 54810, Korea

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of *Cheonggukjang* pills with aronia and blueberries on dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. There have been several reports that *Cheonggukjang* is effective for intestinal health, but the efficacy of *Cheonggukjang* containing fruits has not yet been reported. In this study, we showed the effect of *cheonggukjang* pills with blueberries and aronia (CPBA) on DSS-induced colitis in BALB/c mice. CPBA was obtained from Soonchang Moonokrae foods and orally administered once a day for 2 weeks before DSS treatment. Colitis was induced in mice by feeding 5% (w/v) DSS drinking water for 7 days. The results showed that CPBA treatment significantly alleviated DSS-induced disease activity index associated with a decrease in colon length. CPBA improved DSS-induced histological changes and intestinal epithelial barrier integrity in mice colon. In addition, CPBA administration significantly reduced the levels of DSS-mediated interferon- γ and interleukin-6 in serum and tumor necrosis factor- α in colon tissue. Moreover, the gene expression of COX-2 and iNOS, which are factors involved in inflammatory signaling, was significantly reduced by CPBA treatment. These results suggest that CPBA have a protective effect against DSS-induced mice colitis and may be a candidate for colitis treatment.

Key words: *Cheonggukjang*, blueberry, aronia, DSS-induced colitis, anti-inflammation

서 론

결장의 만성 염증 질환으로 알려진 궤양성 대장염은 장 점막 손상 및 장내 세균총의 변화와 관련이 있으며, 주요 임상적 증상은 체중감소, 설사, 복통 및 혈변 등이 알려져 있다 (Chelakkot 등 2018). 현재 궤양성 대장염의 원인은 명확히 알려져 있지 않으나 많은 연구를 통해 유전적, 식이적, 환경적

요인이 복합적으로 작용하여 염증에 기여한다고 보고되어 있다(Chassaing 등 2014; Zhang 등 2022). 궤양성 대장염 환자는 최근 몇 년 동안 전 세계적으로 빠르게 증가하고 있으며, 한국인의 경우 평균 35-40세의 연령에서 발병된다고 보고되고 있다(Yang & Yang 2009). 대장염이 치료되지 않고 지속적으로 발생할 경우 대장암으로 진행할 가능성이 크게 증가하므로 발병 초기에 약물로 치료하는 경우가 많으며, 주

† Corresponding author: Seon-Young Kim, Head Manager, Convergence R&DB Division, Jeonju AgroBio-Materials Institute, Jeonju 54810, Korea. Tel: +82-63-711-1053, Fax: +82-63-711-1004, E-mail: seon02@jami.re.kr

로 아미노살리실레이트, 코르티코스테로이드 등의 면역 억제제를 이용하거나 항종양괴사인자제(tumor necrosis factor- α)와 같은 생물학적 억제제를 이용하여 치료에 적용하고 있다(Buchman 등 2001; Burness & Keating 2013). 그러나 이러한 약제를 이용한 치료는 재발률이 높고 부작용에 대한 사례가 지속적으로 보고되고 있어, 부작용이 적은 천연 자원을 이용한 기능성 식품 및 식이 보조제를 이용한 대체 치료법에 대한 관심이 높아지고 있다(Kim 등 2003; Xiong 등 2022).

청국장은 콩을 이용한 발효식품으로 *Bacillus subtilis*에 의해 콩 단백질이 분해되어 특유의 맛과 향을 갖는 영양학적 가치가 높은 고단백 식품이다(Kim 등 2021). 청국장은 발효시 생성되는 아미노산 등의 다양한 발효산물들이 작용하여 변비개선(Kim 등 2022), 혈전 분해(Lee 등 1991), 콜레스테롤 감소(Koh JB 2006)에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 최근에는 청국장이 급성 대장염을 완화시킨다고 보고되었다(Lim 등 2022). 블루베리는 관목성 식물로서 진달래과 산앵두나무속에 속한다고 알려져 있다(Westwood MN 1993). 아로니아는 북아메리카 장미과의 낙엽관목으로 토양 적응성이 우수하다고 알려져 있다(Hwang & Thi 2014). 국내에 재배되는 기능성 베리류는 블루베리, 블랙베리 및 아로니아 등이 있으며, 이들은 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌 등이 풍부하게 함유되어 있다(Bagchi 등 2004; Srivastava 등 2007). 기능성 베리류의 주요 생리활성 성분으로 알려진 페놀성 화합물은 산화적 스트레스를 조절하여 궤양, 설사, 당뇨, 항산화, 항염, 항암 및 심혈관계 질환 등을 조절하는 것으로 보고되어 있다(Seeram 등 2006). 본 연구에서는 청국장의 냄새와 맛을 개선하고, 청국장의 기능성을 향상시키고자 순창에서 생산되는 블루베리 및 아로니아 발효추출물을 첨가하여 생산한 청국장 환 제품의 급성 대장염 완화 효능을 확인하고자 한다.

Dextran sulfate sodium(DSS)에 의한 급성 대장염 모델은 DSS를 음수와 함께 섭취하면 대장 전반에 부종 및 궤양 등이 유발되며 혈변, 대장 길이의 축소 등의 증상이 발생한다(Lim 등 2022). 또한 급성 대장염이 유도된 마우스에서 interleukin(IL)-6, Interferon(IFN)- γ , tumor necrosis factor(TNF)- α 등의 전염증성 사이토카인이 다량 생산되며, 이 때 과잉 생산된 염증성 사이토카인이 다른 세포의 염증을 촉진한다고 알려져 있다(Cui & Kim 2019). 염증반응시 세포의 산화적 손상을 유발하는 산화질소(nitric oxide)와 프로스타글란딘(prostaglandin)은 주로 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase(COX)-2에 의해 조절된다(Coussens & Werb 2002).

따라서 본 연구는 블루베리와 아로니아가 함유된 청국장 환 제품의 DSS에 의한 급성 대장염 마우스 모델에서 염증 완화 효능을 연구하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 청국장 환은 시판되는 제품이며, 농업회사법인 순창문옥레식품(주)에서 제공받았다. 청국장 환은 대두(Korea) 92%, 블루베리발효액(Sunchang, Korea) 4%, 아로니아발효액(Sunchang, Korea) 4%를 함유한 제품이며, 해당 원료를 배합 후 성형, 건조(67 \pm 5 $^{\circ}$ C, 24 \pm 2시간) 후 제조된 제품이다. 본 실험에서 청국장 환은 분말화하여 실험에 사용하였다.

2. 실험동물

급성 대장염 동물모델에서 청국장 환 제품의 효능을 분석하기 위해 BALB/c 수컷 마우스(5주령, male)를 다물사이언스(Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 실험동물은 1주간 사육실 환경에 적응시켰으며, 사료와 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 군분리는 순화기간 종료일에 체중을 측정하여, 일반 증상 및 체중에 이상이 없는 동물을 무작위로 배치하였다. 실험동물 사육을 위한 온도는 24 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도는 55 \pm 5% 조건에서 사육하였으며, 명암은 12 시간/일(오전 9시부터 오후 9시) 주기로 자동 조절하였다. 본 실험은 (재)전주농생명소재연구원 실험동물운영위원회에서 검토 및 승인되었으며, 위원회 지침을 엄격히 준수하였다(JAMI IACUC 2021001).

3. 급성 대장염 모델 제작

급성 대장염은 DSS(MW 36-50 kDa, MP biomediclas)을 이용하여 유발하였다. 실험군은 정상군(N), 대조군(NC), 양성 대조군(PC, 50 mg/kg), 청국장 환 투여군(CPBA, 500 mg/kg)으로 구성하였으며 각 군당 8마리씩 실험하였으며, 급성 대장염을 유발하기 전 2주간 1일 1회 경구투여하였다. PC군은 염증성 장질환 치료시 사용되는 약물인 5-aminosalicylic acid(5-ASA)를 사용하였으며, 용량은 기존의 연구자료를 참조하여 처리하였다(Kim 등 2022). 청국장 환의 투여는 대장 세포주에서 염증을 완화시키는 세포실험의 용량을 바탕으로 설정하였다. 급성 대장염을 유발하기 위해 정상군을 제외한 나머지 군에 5% DSS 수용액을 7일간 음수로 공급하였으며, 마지막날 음용수로 교체하여 관찰하였다.

4. 질병활성도 분석

질병활성도(DAI, disease activity index)를 분석하기 위해 장염 유도 후 변의 굳기, 변이나 항문에서 육안적으로 관찰되는 혈변 유무를 매일 확인하였으며, 다음과 같은 지표를 이용하여 평가하였다(Table 1).

Table 1. Disease activity index

Weight loss (%)	Shape of stool	Occult blood/bloody stool	Score
0	Normal	Negative	0
1~5	Soft stool	Negative	1
6~10	Soft stool	Occult blood	2
11~15	Diarrhea	Occult blood	3
>15	Diarrhea	Blood stool	4

5. 혈액 및 조직학적 분석

실험 종료 후, 바이오 마커 분석을 위한 혈액은 마우스 안구에서 수집하였으며, 3,000×g에서 15분간 원심분리 한 후, 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈액 채취 후 마우스의 맹장에서 항문까지 이르는 장을 분리하여 장 길이를 측정하였고, 조직염색을 위해 결장 조직 일부를 고정하였다. 분리한 혈청 및 조직은 -70℃에 보관하였다. 혈액 내 염증 조절 관련 사이토카인 분석은 Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit, Mouse IFN- γ Quantikine ELISA Kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. 실험은 제조사의 지침에 준하였다. 조직학적 분석을 위해 4% 파라포름 알데히드에 24시간 동안 고정시킨 결장 조직은 파라핀 봉입하였다. 조직 절편(4 μ m)을 슬라이드 위에 올려놓고 Hematoxylin and eosin(H&E) 및 Alcian blue(AB)로 염색하였다. 염색된 조직 슬라이드는 광학 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 촬영 및 분석하였다.

6. 유전자 발현 분석

결장 조직의 염증 반응 조절 관련 유전자 발현은 mRNA를 이용하여 정량적 실시간 polymerase chain reaction(PCR)에 의해 분석되었다. 총 mRNA 추출은 TRI Reagent[®](MRC, Cincinnati, OH, USA)를 이용하였으며, 2×RT Pre-Mix kit(Bio-Fact, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. qPCR은 2 ×Real-Time PCR Master Mix(Including SYBR green) (Bio-Fact, Daejeon, Korea)를 이용하였으며, 시료의 β -actin 발현량을 이용하여 각각 보정하였다. 본 연구에 사용된 primer sequence는 Table 2에 나타낸 바와 같다.

7. 통계분석

모든 실험은 3회 반복 측정하여 평균±표준편차로 나타내었다. 실험결과와 통계처리는 Sigma-plot program(v16.0, San Jose, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 통계적 검증 결과는 $p < 0.05$ 수준에서 제시하였다. 각 군의 바이오마커 차이는 일원분산분석(one-way ANOVA)을 이용하여 분석하였고, 사후 검정은 Duncan's multiple range test를 실시하여 각 군간의 유

의적인 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

1. CPBA가 DSS로 유도한 대장염 마우스 모델에서 대장염 완화에 미치는 영향

DSS를 음용수에 희석한 후 마우스에 급수하여 대장염을 유발하는 경우, 대장의 축소, 혈변 및 점막 궤양 등이 유발되고 대장 상피세포의 손상이 일어나는 것으로 알려져 있다(Nam 등 2022). 보고된 연구에 따르면 BALB/c 마우스에게 DSS를 0, 1, 5, 10%의 농도로 서로 다르게 공급하고 대장염 증상을 분석한 결과 대조군에 비해 DSS를 공급한 군에서 대장 길이의 단축 및 대장의 점막조직이 파괴되고 DSS의 농도가 높을수록 대장염 증상 역시 악화되는 것으로 나타났으며, 정상 마우스에 비해 DSS로 유도된 대장염 마우스들은 질병 활성도가 높아지는 것으로 보고되었다(Okayasu 등 1990). 최근 다양한 연구결과에 따르면 천연물 소재에 의해 염증성 장질환이 억제된다는 보고가 많이 되어 있다. Kim HK(2019)의 결과에 따르면 열처리된 무추출물이 DSS로 유발된 대장염의 염증을 효과적으로 억제함을 증명하였다. 그리하여 본 연구에서는 블루베리와 아로니아가 첨가된 청국장 환의 장염 개선 기능성 평가를 수행하기 위해 BALB/c 마우스에 CPBA(500 mg/kg) 및 양성대조군(PC, 5-ASA, 50 mg/kg)를 장염을 유도하기 전 2주간 경구투여한 후, 5% DSS를 7일간 음수 공

Table 2. Primer sequence

Gene	Sequence
<i>iNOS</i>	F: 5'-CGAAACGCTTCACTTCCAA-3' R: 5'-TGAGCCTATATTGCTGTGGCT-3'
<i>COX-2</i>	F: 5'-TTTGGTCTGGTGCCTGGTC-3' R: 5'-CTGCTGGTTTGAATAGTTGCTC-3'
<i>TNF-α</i>	F: 5'-AACTAGTGGTGCCAGCCGAT-3' R: 5'-CTTCACAGAGCAATGACTCC-3'
<i>β-Actin</i>	F: 5'-CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT-3' R: 5'-CGTCACACTTCATGATGGAATTGA-3'

급하며 장염을 유발하고 마지막날 음용수로 교체하여 관찰하였다(Fig. 1A). 5% DSS를 섭취한 후 궤양성 대장염이 유발된 음성대조군(NC)과 정상대조군(N)의 질병활성도를 측정하기 위해 매일 모든 실험군의 변의 묶기, 혈변 정도 및 항문의 혈액 유무를 확인하여 DAI 점수의 변화를 확인하였다. 실험 결과, 5% DSS를 섭취한 NC군에서는 설사 및 혈변이 증가하여 질병활성도가 지속적으로 증가하였으나, PC 및 CPBA 섭취군에서 장염이 유의적으로 완화되는 것을 관찰하였다(Fig. 1B). 또한 장질환은 결장의 축소를 유도하기 때문에 대장의 길이는 대장 보호 효과 판정을 위한 주요 지표로 사용되고 있다(Kim 등 2013; Myung NY 2014). 그리하여 실험종료 후, 마우스의 장 길이를 관찰한 결과 N군에 비해 NC군에서 장 길이가 유의적으로 감소하였으며, PC 및 CPBA 섭취군에서 유의적으로 회복됨을 확인하였다(Fig. 1C, Fig. 1D). 따라서 CPBA의 투여는 궤양성 대장염의 중증도를 판단할 수 있는

DAI의 평가 항목들을 억제하고 결장 축소를 억제함으로써 염증성 장질환에 대한 개선 효과를 나타낼 것으로 사료되었다.

2. CPBA 투여가 대장염 마우스 장조직의 병리학적 변화에 미치는 영향

DSS에 의해 염증성 장질환이 유도된 장 조직에서는 염증세포의 침윤 및 상피세포의 손실, 장벽의 비대 등의 특징을 보인다(Cui & Kim 2019). 본 연구에서는 DSS로 인한 궤양성 대장염 마우스 모델에서 CPBA가 대장염 증상 완화에 미치는 영향을 확인하기 위해 각 실험군별 결장 조직을 HE 염색을 통해 관찰하였다. H&E 염색을 통해 일반적인 조직 병리학적 변화와 병변 정도를 평가한 결과 NC군에서 DSS에 의해 결장 상피조직의 구조 및 크기가 불규칙하게 변하고 염증세포의 침윤이 증가되었으나, PC 및 CPBA 군에서 완화된 것을 관찰하였다(Fig. 2). 또한 장의 점액 분비 정도를 관찰하기

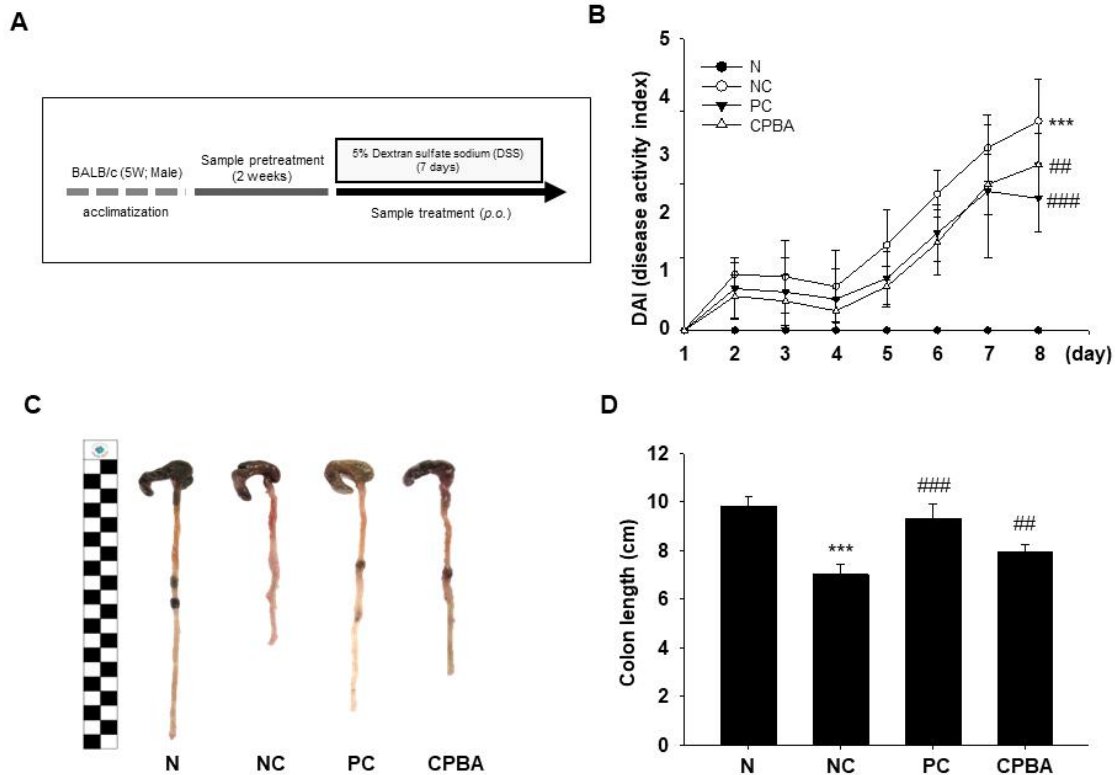


Fig. 1. Effect of CPBA on DAI and colon length. (A) Time schedule of this study. DAI was measured daily during 5% DSS administration (B). Large intestines were obtained after the DSS administration (C) and their lengths was measured (D). Data shown are the mean±S.D. *Indicates a significant difference from the N group (** $p<0.001$). #Indicates a significant difference from the NC group (## $p<0.01$, ### $p<0.001$). N, group received water without DSS; NC, group received 5% DSS in drinking water for 7 days; PC, group pre-treated with 5-ASA for 2 weeks and then, received 5% DSS and oral administration with 5-ASA for 7 days; CPBA, group pre-treated with CPBA for 2 weeks and then, received 5% DSS and oral administration with CPBA for 7 days.

위해 AB 염색을 통해 관찰한 결과, 점막층이 진한 파란색으로 염색된 N군에 비해 NC군에서 염색 정도가 감소하였으며, PC 및 CPBA 섭취에 의해 개선되는 것을 관찰하였다(Fig. 2). 이상의 결과를 통해 CPBA의 처리에 의해 대장염의 증세인 염증세포 침윤이 완화되었으며, 장내 점막의 보호기능이 증가됨으로써 염증성 장질환의 개선 효능이 있는 것으로 사료되었다.

3. CPBA가 혈액 및 대장 조직내 염증관련 사이토카인 함량에 미치는 영향

사이토카인은 활성화된 림프구와 대식세포에 의해 분비되는 물질로 주로 면역반응에 관여하는 다른 세포들의 기능을 조절하며 염증반응에도 중요한 역할을 한다(O'Shea & Murray 2008). 그들은 고유면역계와 적응면역계에서 중요한 생물학적인 세포기능을 조절하고 면역세포의 확산과 분화를 조정한다(O'Shea & Murray 2008). 염증성 장질환에 있어서 사이토카인에 대한 연구는 병태생리학적인 면역조절 장애과정을 이해할 수 있다는 점에서 중요한 역할을 한다(Pizarro & Cominelli 2007). 급성 대장염이 유도된 마우스에서 IL-6, IFN- γ , TNF- α 등의 전염증성 사이토카인이 다량 생산되며, 이 때 과잉 생산된 염증성 사이토카인이 다른 세포의 염증을 촉진한다고 알려져 있다(Cui & Kim 2019). 또한 전염증성 사이토카인은 염증성 장질환 환자의 장 조직에서 증가되어 있으며, 점막 염증의 병리에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Rogler & Andus 1998). 따라서 CPBA의 투여에 따른 IL-6, IFN- γ 와 같은 염증성 사이토카인의 함량을 측

정한 결과, N군에 비해 NC군에서 IL-6 함량이 유의적으로 증가하였으며, PC 및 CPBA 섭취군에서 증가된 IL-6 함량이 유의적으로 감소된 것을 확인하였다(Fig. 3A). 또한 IFN- γ 함량을 측정된 결과 N에 비해 NC에서 IFN- γ 함량이 유의적으로 증가하였으며, PC 및 CPBA 섭취군에서 증가된 IFN- γ 함량이 유의적으로 감소된 것을 확인하였다(Fig. 3B). 또한 대장 조직 내에서 TNF- α 함량을 측정된 결과 N에 비해 NC에서 TNF- α 함량이 유의적으로 증가하였다(Fig. 3C). 또한 PC 및 CPBA 섭취군에서 TNF- α 함량 증가가 유의적으로 억제되었다. 다양한 연구결과에 따르면 천연물 발효추출물 소재의 의해 염증성 사이토카인이 억제된다는 보고가 많이 되어 있다. Mun 등(2015)의 연구에 따르면 *Lactobacillus casei*로 발효한 톳 추출물이 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성 억제와 COX-2, iNOS의 발현을 억제함으로써 염증을 억제한다는 보고가 되어 있다. 본 결과 또한 천연물인 CPBA가 염증성 장질환을 유발하는 염증성 사이토카인인 IL-6, IFN- γ , TNF- α 의 분비를 억제함으로써 염증성 장질환에 대한 억제 효과가 있는 것으로 판단된다.

4. 대장 조직에서의 염증 반응 조절 관련 신호전달 인자 발현 분석

염증반응이 일어날 때 MAP kinase 활성화에 의해 NF- κ B가 활성화되며(Schulze-Osthoff 등 1997; Janssen-Heininger 등 2000), 이는 COX-2와 iNOS의 유전자 발현 증가와 염증성 사이토카인 증가로 이어지게 된다. 이에 CPBA가 염증 반응 조절에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 iNOS와 COX-2의 발

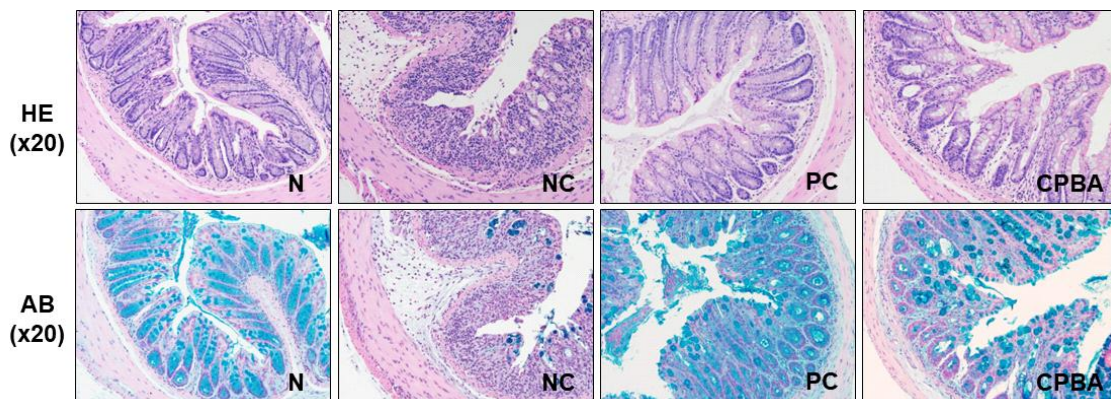


Fig. 2. Effect of CPBA on the histological pathology of colitis. Histopathological change of large intestine. The rectum of mouse was stained with hematoxylin and eosin (HE) or alcian blue (AB). The upper figure shows representative HE staining images of the N, NC, PC and CPBA groups. The lower figure presents the AB staining images. N, group received water without DSS; NC, group received 5% DSS in drinking water for 7 days; PC, group pre-treated with 5-ASA for 2 weeks and then, received 5% DSS and oral administration with 5-ASA for 7 days; CPBA, group pre-treated with CPBA for 2 weeks and then, received 5% DSS and oral administration with CPBA for 7 days.

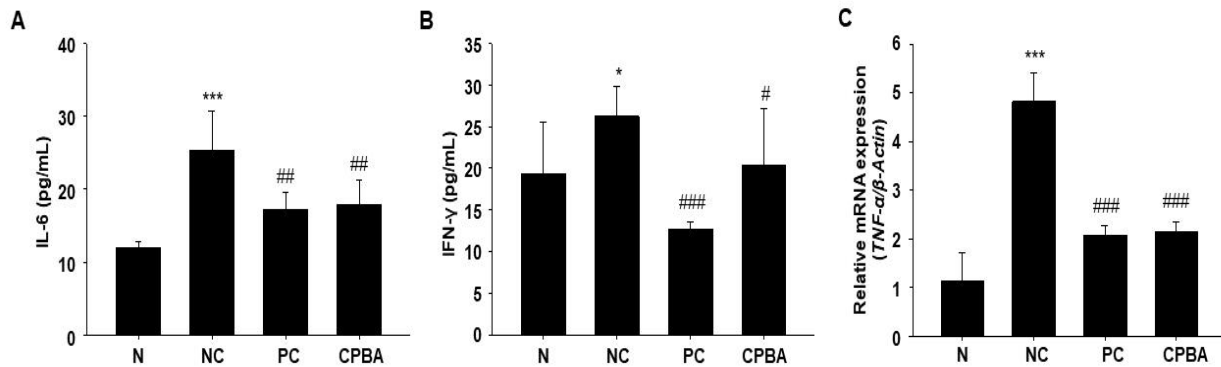


Fig. 3. Effect of CPBA on the level of pro-inflammatory cytokines in plasma and in colorectal tissue. The levels of plasma (A) IL-6 and (B) IFN- γ were determined in experimental groups. (C) TNF- α mRNA expression in colorectal region was measured by qRT-PCR. Data shown are the mean \pm S.D. *Indicates a significant difference from the N group (* p <0.05, *** p <0.001). #Indicates a significant difference from the NC group (# p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001). N, group received water without DSS; NC, group received 5% DSS in drinking water for 7 days; PC, group pre-treated with 5-ASA for 2 weeks and then, received 5% DSS and oral administration with 5-ASA for 7 days; CPBA, group pre-treated with CPBA for 2 weeks and then, received 5% DSS and oral administration with CPBA for 7 days.

현량을 분석하였다. 측정된 결과 N에 비해 NC에서 유전자 발현량이 유의적으로 증가하였으며, PC 및 CPBA 섭취군에서 iNOS 발현이 유의적으로 감소된 것을 확인하였다(Fig. 4A). COX-2도 마찬가지로 N에 비해 NC에서 유전자 발현량이 유의적으로 증가하였으며, PC 및 CPBA 섭취군에서 모두 유의적으로 감소된 것을 확인하였다(Fig. 4B). 본 결과를 통해 CPBA가 염증관련 신호전달 인자인 NF- κ B의 발현을 억제 시킴으로써 염증반응을 조절하는 단백질인 COX-2와 iNOS

의 발현을 저해함으로써 염증성 장질환 유발을 억제하는 것으로 사료된다.

요약 및 결론

CPBA를 2주간 사전 경구투여한 후, 5% DSS를 공급하며 마우스의 체중변화 및 질병활성도를 관찰한 결과 DSS 섭취 5일째부터 체중 감소가 관찰되었으며, 설사 및 혈변이 증가하

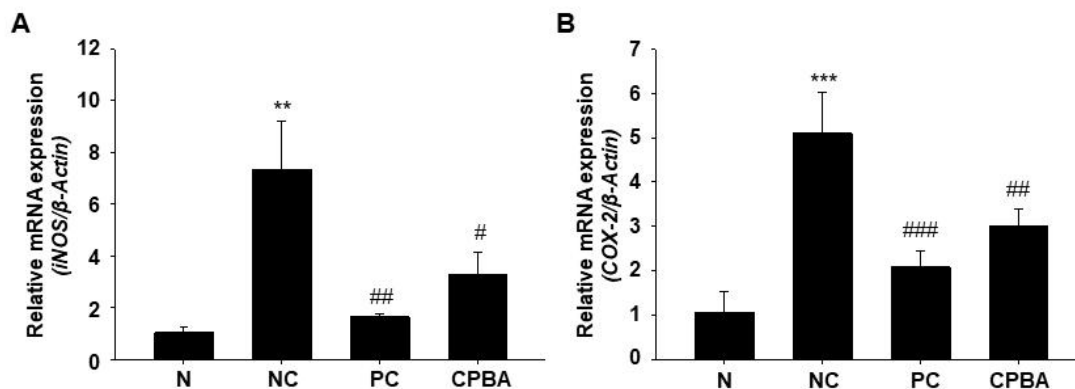


Fig. 4. Effect of CPBA on the expression of inflammatory genes in colorectal tissue of mice. iNOS (A) and COX-2 (B) mRNA expression in the large intestine were analyzed by qRT-PCR. Data shown are the mean \pm SD. *Indicates a significant difference from the N group (** p <0.01, *** p <0.001). #Indicates a significant difference from the NC group (# p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001). N, group received water without DSS; NC, group received 5% DSS in drinking water for 7 days; PC, group pre-treated with 5-ASA for 2 weeks and then, received 5% DSS and oral administration with 5-ASA for 7 days; CPBA, group pre-treated with CPBA for 2 weeks and then, received 5% DSS and oral administration with CPBA for 7 days.

여 질병활성도가 지속적으로 증가하였으나, PC군 및 CPBA군에서 장염이 완화되는 것을 관찰하였다. 실험종료 후, 마우스의 장 길이를 관찰한 결과 N군에 비해 NC군에서 장 길이가 유의적으로 감소하였으며, PC 및 CPBA군에서 유의적으로 회복됨을 확인하였다. 염증성 장질환이 유도된 마우스의 결장 조직을 HE 염색을 통해 일반적인 조직 병리학적 변화와 대장병변 정도를 평가한 결과 NC군에서 DSS에 의해 결장 표면을 형성하는 상피조직의 구조 및 크기가 불규칙하게 변하고 염증세포의 침윤이 증가되었으나, PC 및 CPBA 섭취에 의해 완화된 것을 관찰하였다. 장의 점액 분비 정도를 관찰하기 위해 AB염색을 통해 관찰한 결과, 점막층이 진한 파란색으로 염색된 N군에 비해 NC군에서 염색 정도가 감소하였으며, PC 및 CPBA 섭취에 의해 개선되는 것을 관찰하였다. 혈액 내 IL-6와 IFN- γ 와 대장 조직 내 TNF- α 함량은 N군에 비해 NC군에서 유의적으로 증가하였으며, PC 및 CPBA군에서 감소된 것을 확인하였다. 또한 iNOS와 COX-2 유전자 발현량을 측정된 결과 N군에 비해 NC군에서 유의적으로 증가하였으며, PC 및 CPBA군에서 모두 감소되었다. 본 연구를 통해 CPBA가 염증관련 신호전달 인자인 NF- κ B의 발현을 억제시킴으로써 염증성 사이토카인인 IL-6, IFN- γ , TNF- α 의 분비를 저해하고, 염증반응을 조절하는 단백질인 COX-2와 iNOS의 발현을 억제함으로써 염증성장질환에 대한 억제 효과가 있는 것으로 판단된다. 본 결과를 통해 블루베리 및 아로니아 함유 청국장 환이 마우스 모델에서 대장염에 대한 유의한 억제 효과를 확인함으로써 해당 제품의 장건강 개선 가능성을 검증하였으며, 향후 건강기능식품 기능성 원료로 개발 가능성이 기대된다.

References

- Bagchi D, Sen CK, Bagchi M, Atalay M. 2004. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Mosc)* 69:75-80
- Buchman AL, Fife C, Torres C, Smith L, Aristizibal J. 2001. Hyperbaric oxygen therapy for severe ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 33:337-339
- Burness CB, Keating GM. 2013. Adalimumab: A review of its use in the treatment of patients with ulcerative colitis. *BioDrugs* 27:247-262
- Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. 2014. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol* 104:15.25.1-15.25.14
- Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. 2018. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med* 50:1-9
- Coussens LM, Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867
- Cui X, Kim E. 2019. Anti-inflammatory effects of mulberry twig extracts on dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model. *J Nutr Health* 52:139-148
- Hwang ES, Thi ND. 2014. Quality characteristics and antioxidant activities of cheongpomook added with aronia (*Aronia melanocarpa*) powder. *Korean J Food Cookery Sci* 30: 161-169
- Janssen-Heininger YMW, Poynter ME, Baeuerle PA. 2000. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor κ B. *Free Radic Biol Med* 28:1317-1327
- Kim HK. 2019. Effect of heated radish extract on DSS-induced ulcerative colitis and anti-inflammatory effect. *J Adv Eng Tech* 12:163-171
- Kim HR, Park IS, Park SB, Yang HJ, Jeong DY, Kim SY. 2022. Comparison of laxative effects of fermented soybeans (cheonggukjang) containing toxins and biogenic amines against loperamide-induced constipation mouse model. *Nutr Res Pract* 16:435-449
- Kim N, Lee I, Seo MJ, Lee YY, Choi H, Sim EY, Yun HT. 2021. Comparison of quality properties for choosing appropriate varieties of saengcheonggukjang. *Korean J Food Nutr* 34:381-389
- Kim S, Park J, Ryu B. 2013. Effects of *Aucklandia lappa* on dextran sulfate sodium-induced murine colitis. *Korean J Orient Int Med* 34:134-146
- Kim YS, Jung HJ, Park YS, Yu TS. 2003. Characteristics of flavor and functionality of *Bacillus subtilis* K-20 chunggukjang. *Korean J Food Sci Technol* 35:475-478
- Koh JB. 2006. Effects of cheonggukjang added *Phellinus linteus* on lipid metabolism in hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35:410-415
- Lee BY, Kim DM, Kim KH. 1991. Physico-chemical properties of viscous substance extracted from chungkookjang. *Korean J Food Sci Technol* 23:599-604
- Lim HJ, Kim HR, Jeong SJ, Yang HJ, Ryu MS, Jeong DY, Kim SY, Jung CH. 2022. Protective effects of fermented soybeans (cheonggukjang) on dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in a mouse model. *Foods* 11:776
- Mun OJ, Kwon MS, Bae MJ, Ahn BN, Karadeniz F, Kim M,

- Lee SH, Yu KH, Kim YY, Seo Y, Kong CS. 2015. Anti-inflammatory activity of *Hizikia fusiformis* extracts fermented with *Lactobacillus casei* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 30: 38-43
- Myung NY. 2014. The inhibitory effect of *Orostachys japonicus* on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Korean J Herbol* 29:29-34
- Nam AY, Lee DS, Shin KS. 2022. Improvement effects on inflammatory bowel disease of ethanol extract isolated from *Saururus chinensis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 51:205-212
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98:694-702
- O'Shea JJ, Murray PJ. 2008. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28:477-487
- Pizarro TT, Cominelli F. 2007. Cytokine therapy for Crohn's disease: advances in translational research. *Annu Rev Med* 58:433-444
- Rogler G, Andus T. 1998. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 22:382-389
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Riehemann K, Wesselborg S. 1997. Regulation of NF- κ B activation by MAP kinase cascades. *Immunobiology* 198:35-49
- Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, Heber D. 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *J Agric Food Chem* 54:9329-9339
- Srivastava A, Akoh CC, Fischer J, Krewer G. 2007. Effect of anthocyanin fractions from selected cultivars of Georgia-grown blueberries on apoptosis and phase II enzymes. *J Agric Food Chem* 55:3180-3185
- Westwood MN. 1993. Temperature-zone Pomology: Physiology and Culture. pp.100-110. Timber Press
- Xiong T, Zheng X, Zhang K, Wu H, Dong Y, Zhou F, Cheng B, Li L, Xu W, Su J, Huang J, Jiang Z, Li B, Zhang B, Lv G, Chen S. 2022. Ganluyin ameliorates DSS-induced ulcerative colitis by inhibiting the enteric-origin LPS/TLR4/NF- κ B pathway. *J Ethnopharmacol* 289:115001
- Yang DH, Yang SK. 2009. Trends in the incidence of ulcerative colitis in Korea. *Korean J Med* 76:637-642
- Zhang Y, Guo C, Li Y, Han X, Luo X, Chen L, Zhang T, Wang N, Wang W. 2022. Alginate oligosaccharides ameliorate DSS-induced colitis through modulation of AMPK/NF- κ B pathway and intestinal microbiota. *Nutrients* 14:2864

Received 04 November, 2022

Revised 23 November, 2022

Accepted 08 December, 2022