



## 유산균 R&B Balance®의 대장염 억제 효과

안영태\* · 이호용 · 이정희 · 김동현<sup>1</sup> · 허철성

(주)한국야쿠르트 R&BD, <sup>1</sup>경희대학교 약학대학

### Anti-colitic Effect of Lactic Acid Bacteria R&B Balance®

Young-Tae Ahn\*, Hoyong Lee, Jung-Hee Lee, Dong-Hyun Kim<sup>1</sup>, and Chul-Sung Huh

R & BD, Korea Yakult Co., Ltd., Youngin 446-901, Korea

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Science, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

**Abstract:** The anti-colitic effect of lactic acid bacteria mixture (R&B Balance®) consisting of *Lactobacillus brevis* HY7401, *Lactobacillus helveticus* HY7801 and *Bifidobacterium longum* HY8004 was investigated in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitic mice. Treatment with R&B Balance® reduced severe colitic symptoms, including colon shortening, myeloperoxidase (MPO) activity and malondialdehyde (MDA). The oral administration of R&B Balance® significantly reduced the activities of fecal chondroitinase and the fecal genotoxicity. Changes of fecal microflora in mice treated with DSS with or without R&B Balance® were assessed by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). Cluster analysis of T-RFLP patterns demonstrated that microflora of DSS-induced colitic mice differed from that of normal mice and the oral administration of R&B Balance® could change the structure of gut microflora. These findings also suggest that R&B Balance® may improve colitis by inhibition of the production of harmful enzymes or toxic metabolites in intestine and influence the intestinal microbial diversity in DSS-induced colitic mice.

**Keywords:** anti-colitis, dextran sulfate sodium, lactic acid bacteria, R&B Balance®

## 서 론

궤양성 대장염 및 크론병과 같은 염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD)은 만성 장질환으로 장조직에서 호중구 유입 증가 및 염증성 cytokines의 생산이 증가한다(Binder 2004; Shanahan 2002). 이 질환의 발병기전은 장내 세균총과 같은 장내 환경적 항원(environmental antigens)에 대한 장 면역반응의 조절장애에 의한 것으로 추정되며 장내 세균이 많이 존재하는 회장말단과 대장 점막의 염증부위에 T-세포가 밀집된 침윤과 IL-6이 증가하는 것을 특징으로 한다(Atreya *et al.*, 2000; Raffi *et al.*, 1999). 그리고 무균동물(germ-free animal)에서는 IBD가 발생되지 않는 것으로 보아 장내세균이 대장염의 개시와 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Binder 2004; Chandran *et al.*, 2003).

정상 장내 세균총은 약 1,000여개의 박테리아 종으로 구

성되어 있으며(Zhu *et al.*, 2010), 회장말단과 대장에 높은 수준으로 존재한다(Hill and Drasar, 1995; Simon and Gorbach, 1984). 장내 세균총은 그람 음성균의 endotoxins과 같은 독소 그리고 cytotoxins과 암을 유발하는  $\beta$ -glucuronidase와 tryptophanase 같은 유해효소를 생산한다(Chung *et al.*, 1975; Ganguly *et al.*, 1978). Cytotoxin과 endotoxins은 innate immune response의 잠재적인 자극원으로 작용하는데, 장의 침단 표면부와 반응하여 장상피세포에서 전염성 cytokines 그리고 toll-like receptors(TLRs) 또는 cytokine receptors signaling을 경유하여 mucosal immune system의 염증반응을 활성화시키는 매개물질들을 생산하여, IBD를 유발한다(Berrebi *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 1995). 선천적 또는 후천적 점막 면역반응간의 주 연결고리로서 TLRs은 lipopolysaccharide(LPS)에 대한 세포반응에서 CD14와 함께 transmembrane coreceptors로서 작용한다(Chow *et al.*, 1999; Ingalls *et al.*, 1999). 한편, IBD 환자의 장점막에서 extracellular matrix glycosaminoglycans(GAGs)의 생합성이 증가하는 것으로 알려져 있으며(Belmiro *et al.*, 2005), 이 glycosaminoglycans은 장내 세균의 chondroitinase와 heparinase와 같은 GAG-degrading enzymes을 유도하는 것으로 보고되었다(Gesner and Jenkin, 1961; Salyers *et al.*, 1977)

\*Corresponding author: Young-Tae Ahn, R&BD, Korea Yakult Co., Ltd., Youngin 446-901, Korea.

Tel: 82-70-7835-6037, Fax: 82-31-8005-7830

E-mail: ytahn@re.yakult.co.kr

Received November 14, 2012; Revised December 29, 2012;

Accepted January 11, 2013

유산균은 장내 세균총의 균형 유지(Perdigon *et al.*, 1991) 및 장내 유익균의 증식에 도움을 주는 정장작용(Collins and Gibson, 1997), 당뇨 및 비만 등과 같은 대사성질환의 개선(Taranto *et al.*, 1998), 항암(Collins and Gibson, 1997), 그리고 체내 면역 조절작용(Kwon *et al.*, 2010), 등의 다양한 건강증진활성을 나타낸다. 그리고 최근에는 유산균을 이용하여 대장염을 예방 또는 증상을 개선하고자 하는 연구들이 많이 수행되었다. Chung 등(2007)은 *Lactobacillus casei*가 DSS에 의해 유도된 대장염 실험동물에서 염증성 cytokines의 발현을 억제하는 것으로 보고하였으며, Lee 등(2008)은 DSS로 유도된 대장염 실험동물에서 유산균이 전염성 cytokines의 발현, 장내 세균에 의해 생산되는 GAG 분해효소의 생성을 억제하는 것으로 보고하였다. 또한 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS)로 유도된 대장염 실험동물에서도 *L. casei*, *Lactobacillus acidophilus*, 그리고 *Bifidobacterium lactis*가 항염증 활성을 나타내는 것으로 보고되었다(Peran *et al.*, 2007). 이외에도 *Lactobacillus reuteri* (Madsen *et al.*, 1999), *Lactobacillus salivarius* UCC118(O'Mahony *et al.*, 2001), *Lactobacillus rhamnosus* GG(Dieleman *et al.*, 2001), *Lactobacillus plantarum* 299v(Schultz *et al.*, 2004), *Bifidobacterium infantis* 35624(Sheil *et al.*, 2006) 등의 유산균이 대장염 동물 모델에서 대장염을 감소시키고 장내 세균 조성을 변형시키며, 염증과 관련된 cytokine의 생성을 감소시키고 장점막 방벽의 기능을 개선시키는 등의 효과를 나타내는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 DSS로 유도된 대장염 동물모델에서 *L. brevis* HY7401, *L. helveticus* HY7801, *B. longum* HY8004으로 이루어진 복합유산균(R&B Balance®)의 IBD 개선 효과를 시험하고 장내 미생물 다양성을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 유산균

본 연구에 사용한 유산균은 *L. brevis* HY7401, *L. helveticus* HY7801, 그리고 *B. longum* HY8004의 3가지 복합유산균주(R&B Balance®)로 이루어졌다. *L. brevis* HY7401, *L. helveticus* HY7801은 MRS 액체배지(Difco, USA)에서 37°C, 혐기적인 조건에서 배양하였다. *B. longum* HY8004는 BL 액체배지(Nissui Pharm. Co., Japan)에서 37°C, 혐기적인 조건에서 배양하였다. 600 nm에서 흡광도가 1.5-2.0 정도 되도록 배양한 균체를 10,000×g에서 30분간 원심분리한 후 PBS로 2회 세척하였다.

### 실험동물 및 사육 조건

4주령의 ICR 수컷 마우스(20-22 g)를 중앙실험동물(주)로부터 구입하였다. 모든 마우스는 습도 50±10%, 온도 25±2°C의 조절된 환경 조건에서 사육하였으며 조명은 12

시간 킨 후 12시간 끄는 것을 반복하였다. 사료는 표준 실험용 사료(Samyang, Korea)를 사용하였으며, 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 대장염 유발 및 실험 식이

Fukata 등(2006)의 방법에 따라 마우스에 DSS(분자량 36,000-50,000 Da, MP Biochemicals, USA)를 이용하여 대장염을 유발시켰다. 마우스를 각 군당 10마리씩 3개군 즉, 정상군, DSS군, R&B군으로 나누었다. 처음 7일간 정상군과 DSS군은 vehicle만이 포함된 음용수를 섭취하도록 하였고, R&B군은 R&B Balance®( $3 \times 10^9$  CFU/마리)를 1일 1회씩 7일간 경구투여하였다. 다음 7일간 정상군은 vehicle만이 포함된 음용수를 섭취하도록 하였고, DSS군은 2.5% DSS가 포함된 음용수를 섭취하게 하였으며, R&B군은 2.5% DSS가 포함된 음용수를 섭취하게 하면서 R&B Balance®( $3 \times 10^9$  CFU/마리)를 1일 1회씩 7일간 경구투여하였다. 실험 식이를 시작한 지 14일째 되는 날에 경추탈골로 동물을 희생하여 대장부위중 맹장(cecum)부터 항문(anus) 직전 부위까지의 대장을 적출하였다. 적출한 대장은 그 길이를 측정 후, 장내 미생물 분석을 위해 대장 내용물의 일부를 채취하여 -80°C에서 냉동 보관하였다. 대장 조직은 대장 내용물을 모두 제거하고, 생리식염수에서 세척한 뒤, 일부 시료는 병리조직용 시료로 사용하기 위하여 포름알데히드(10% neutral buffered formalin, NBF) 고정액에서 고정하였으며, 나머지 시료는 분자생물학적 분석을 위해 -80°C에서 냉동 보관하였다.

### 병리학적 분석

적출한 대장 조직은 통상적인 방법에 따라 수세 및 알코올 탈수과정을 거쳐 파라핀으로 포매(embedding)하였다. 포매된 대장 조직은 박절편기를 사용하여 3 µm 두께의 연속절편을 작성하여 hematoxylin-eosin(H&E) 염색한 후 현미경으로 관찰하였다(Cho *et al.*, 2007).

### 분변 내 chondroitinase 및 유전독성

#### 분변시료 준비

분변 내 염증 유발과 관계있는 chondroitinase 활성과 돌연변이원 등을 분석하기 위해 각 실험군의 분변을 차가운 생리식염수에 현탁하였다. 그 다음 500 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 침유질과 기타 불순물을 1차로 제거하고, 다시 8,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 상층액은 유전독성, 침전물은 chondroitinase 활성 측정에 사용하였다.

#### Chondroitinase 활성

분변내 chondroitinase 활성은 Aguiar와 Michelacci(1999)의 방법을 변형하여 시행하였다. 분변 침전물(25 µL)을

chondroitin sulfate A 용액(25  $\mu$ L)과 혼합한 다음 100 mM potassium phosphate 완충용액(450  $\mu$ L)을 첨가하였다. 37°C 항온수조에서 3시간 반응한 다음 8,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리를 하였다. 상층액(20  $\mu$ L)을 DMMB 용액(200  $\mu$ L)과 혼합한 다음 실온에서 5분간 방치한 후 UV-VIS Spectrophotometer(Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. Chondroitin sulfate A 용액은 chondroitin sulfate A(Sigma, USA)를 최종 농도가 5 mg/mL이 되도록 100 mM potassium phosphate(pH 7.0)에 용해시켜 사용하였다. Dimethylmethyle blue(DMMB) 용액은 DMMB(16 mg)를 glycine(3.04 g), NaCl(2.37 g), 그리고 0.1 M HCl(95 mL)이 함유된 증류수(1 L)에 넣어 용해시켜 pH 3.0에서 흡광도가 525 nm에서 0.31이 되도록 하였다.

#### 유전독성(genotoxic activity)

분변의 유전독성은 SOS Chromotest Version 6.3(Environmental Bio-Detection Products Inc., USA)을 이용하여 측정하였다. 유전독성은 돌연변이물질 또는 발암물질로 알려진 4-nitroquinoline-N-oxide(4-NQO)에 대한 양으로 표시하였다.

#### 대장 조직의 myeloperoxidase(MPO) 및 지질과산화

##### MPO 분석

마우스의 대장조직(10 mg)을 FastPrep Pro Green Kit(MP bio, USA)의 Matrix D에 넣은 다음 Protease inhibitor cocktail(Roche, Germany)이 함유된 200  $\mu$ L의 lysis buffer(200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% glycine)에 첨가하였다. FastPrep(MP bio)을 사용하여 속도 6, 시간 40초의 조건에서 2회 균질하였다. 그 후 1,500 g, 4°C에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 -80°C에서 보관하면서 MPO 분석에 사용하였다.

대장조직내 MPO는 Mouse MPO assay ELISA kit(Hbt HK210, USA)를 사용하여 분석하였다.

##### 지질 과산화물

마우스의 대장조직(25 mg)을 FastRNA Pro Green kit(MP bio)의 Matrix D에 넣은 다음 Protease inhibitor cocktail(Roche)이 함유된 250  $\mu$ L의 RIPA buffer[150 mM NaCl, 1% Triton X100, 0.1% SDS, 50 mM Tris(pH 8.0)]를 첨가하였다. FastPrep(MP bio, USA)을 사용하여 속도 6, 시간 40초의 조건에서 2회 균질을 하였다. 그 후 1,600  $\times$  g, 4°C에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 -80°C에서 보관하면서 지질 과산화 분석에 사용하였다.

대장조직 내 지질 과산화 정도는 TBARS assay kit(Cayman Chem, USA)를 사용하여 분석하였다. 표준물질로 malondialdehyde(MDA)를 사용하여 표준곡선을 작성하고 이것으로부터 생성된 MDA의 양을 측정하였다.

#### Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 분석

##### DNA 추출 및 정제

분변(200 mg)을 screw cap tube에 넣은 다음 500  $\mu$ L의 TE buffer(pH 8.0)를 첨가하여 분산한 후 14,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하였다. 상층액을 버리고 3회 반복하여 TE buffer로 세척하였다. Glass beads(200 mg), TE buffer(600  $\mu$ L), 차가운 phenol(600  $\mu$ L), 10% SDS(100  $\mu$ L) 첨가하고 Fast-Prep(MP Bio)으로 속도 4, 시간 20초의 조건에서 균질을 다음 70°C에서 10분간 정치하였다. 동일한 방법으로 Fast-Prep을 이용하여 세균을 파쇄한 다음 70°C에서 10분간 정치하였다. 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 새로운 튜브로 옮기고 3 M Na-acetate(60  $\mu$ L), 차가운 isopropanol(600  $\mu$ L)을 첨가하고 수 차례 뒤집기를 반복하였다. 14,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 상층액을 버리고 70% 에탄올(500  $\mu$ L)을 첨가하여 세척하였다. 70% 에탄올을 사용하여 세척을 반복한 후 상온에서 건조하고 TE buffer(200  $\mu$ L) 첨가하였다. PCR의 주형(template)으로 사용할 DNA의 정제는 High pure PCR template preparation kit(Roche)를 사용하여 실시하였다.

##### PCR

16S rDNA 유전자 증폭을 위해 사용한 primer는 Universal primer로 27F(5'AgAgTTTgATCCTggCTCAg3')와 942R(5'g-gTTACCTTgTTACgACTT3')를 Applied Biosystems(USA)에서 구입하여 사용하였다. 27F primer는 5'에 6-FAM(6-carboxyfluorescein)를 붙여서 구별하였다. PCR 반응은 Accu-Power HF PCR Premix(Bioneer, Korea)를 이용하여 50 ng/ $\mu$ L의 template DNA(5  $\mu$ L), 10 pmol/ $\mu$ L의 primer(2  $\mu$ L)를 혼합하여 총 50  $\mu$ L가 되게 하였다. PCR 반응은 95°C에서 3분, 다음 각 단계에서 95°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 90초 동안 16S rRNA를 증폭하는 반응을 30번 반복하고, 마지막으로 72°C에서 10분 동안 반응시켜 완결하였다. PCR 반응물은 1% agarose gel에서 100 V로 30분간 전기영동한 후 증폭결과를 확인하였다 PCR 반응물의 정제는 Wizard SV Gel and PCR Clena-Up System(Promega, USA)를 사용하여 실시하였다.

##### 제한효소 처리 및 Scanning

정제된 PCR 반응물을 TaKaRa(Japan)에서 구입한 20 U의 제한효소 *Hha* I과 *Msp* I으로 처리하였다. *Hha* I로 처리한 경우에는 PCR 반응물(2  $\mu$ L), 10 $\times$  M-buffer(1  $\mu$ L), *Hha* I (1  $\mu$ L), 증류수(6  $\mu$ L)를 혼합한 다음 37°C에서 3시간 반응시켰다. *Msp* I의 경우에는 PCR 반응물(2  $\mu$ L), 10 $\times$  T-buffer(1  $\mu$ L), BSA(0.1%)(1  $\mu$ L), *Msp* I(1  $\mu$ L), 증류수(5  $\mu$ L)를 혼합한 다음 37°C에서 3시간 반응시켰다. 그 후 제한

효소 반응물(1  $\mu$ L)에 formamide(8  $\mu$ L), DNA 단편 표준물질(DNA fragment length standard)(1  $\mu$ L)을 혼합하였다. DNA 단편 표준물질은 MapMaker 1000 ROX(BioVentures, USA)를 사용하였다. 말단 제한효소 단편(terminal restriction fragments, T-RFs)의 길이는 ABI PRISM 377 genetic analyser (Applied Biosystems)에 의해 GeneScan에서 수행하였다. 특정한 크기의 T-RF에 해당하는 군주는 Ribosomal Database Project II(RDP-II) web site의 T-RFLP analysis program(TAP)를 이용하여 확인하였다. 미생물총의 다양성은 Shannon index와 Simpson index 식으로부터 계산하였다(Dunbar *et al.*, 2000). T-RFLP 결과에 대한 군집분석(cluster analysis)은 BioNumerics version 2.5(Applied Maths, USA)를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 병리학적 관찰

마우스나 랫트에 DSS를 투여할 경우 나타나는 주요 병변은 혈변, 체중 감소, 대장 축소, 및 점막 궤양 등이며, 장 상피세포에 직접 독성을 나타내어 점막 장벽의 완전성에 영향을 주는 것으로 알려졌다(Jung *et al.*, 2001; Wirtz *et al.*, 2007). 본 연구에서도 정상군과 비교하여 DSS만을 처리한 군에서 DSS 처리 1주 후 마우스들의 몸무게가 크게 감소하는 현상이 나타났다. 복합유산균과 DSS를 같이 투여한 군들도 정상군과 비교하여 몸무게가 감소하였지만 DSS만을 처리한 군에 비해 몸무게 감소 정도가 적은 것으로 나타났다(data not shown). 또한 본 저자들이 앞서 발표한 연구결과(Lee *et al.*, 2011)와 같이 DSS 처리에 의해 마우스의 대장 길이가 정상군에 비해 줄어드는 현상이 나타났으나 복합유산균과 DSS를 같이 투여한 군들은 DSS만을 처리한 군과 비교하여 대장 길이 감소 현상이 줄어드는 것으로 나타났다(Fig. 1). 그리고 DSS 처리에 의해 대장 조직이 두꺼워지고 궤양과 출혈 및 염증 소견이 나타났으나, 유산균을 투여할 경우 이러한 현상이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(data not shown).

대장조직을 H&E염색을 하여 관찰할 경우에는 정상군과 비교하여 DSS 처리에 의해 대량의 장부종(bowel edema)과 점막의 표면층에 침윤이 관찰되었으며, 심한 궤양에 의해 상피세포층이 파괴되어 있었다. 그러나 복합유산균과 DSS를 같이 투여한 군의 경우 대장염에 의한 대장 조직의 파괴 정도가 상당히 완화된 것으로 나타났다(data not shown). DSS에 의해 유도된 대장염에서 염증이 침윤된 장소에는 대식세포, 호중구, 호산구(eosinophil) 등이 많이 존재한다. 대식세포는 고유관과 점막하층 전체에 균일하게 분포하지만 DSS에 노출된 6일 후에는 염증이 침윤된 장소에 대식세포의 수가 증가하는데 대부분은 새롭게 불러 들어진 말초혈 단핵구가 분화한 것이다(Stevceva *et al.*, 2001). 본 연

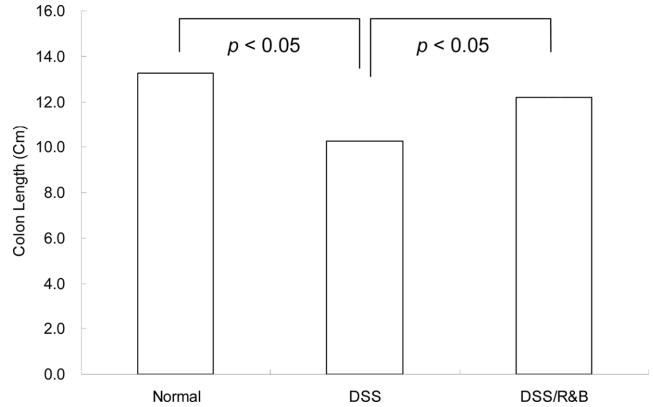


Fig. 1. Effect of administration of R&B Balance® on colon length of DSS-treated mice. NOR, Normal group; DSS, DSS treated group; R&B, R&B Balance® treated group.

구에서 DSS군에서 손상된 기저 움(crypt)에 많은 세포가 모여있는 것을 볼 수 있는데 이 세포들이 대식세포 또는 호중구일 것으로 판단된다.

### 대장조직의 MPO 및 지질과산화물

DSS를 투여할 경우 대장 조직의 MPO 활성과 지질과산화물인 MDA의 함량이 증가하고, 이들이 대장염의 병리학적 지수와 상당한 연관성이 있다고 알려졌다(Ahn *et al.*, 2001). 본 연구에서도 DSS 처리에 의해 정상군을 제외한 모든 시험군들의 대장조직 내 MPO 활성이 크게 증가한 것으로 나타났다(Fig. 2). 대장조직 내 MPO 활성은 대장조직 내 염증의 정도를 나타내주는 지표로서, DSS 처리에 의해 대장 내 염증증상이 크게 증가한 것을 나타내는데, 복합유산균을 투여한 군에서 MPO 활성이 감소하는 것으로 나타나 염증증상이 완화된 것을 확인할 수 있었다.

Lee 등(2010)은 이 연구에 사용한 R&B Balance®에 포함되어 있는 *B. longum* HY8004가 TNBS로 유도된 대장염 동물모델에서 대장조직의 lipid peroxidation을 억제시

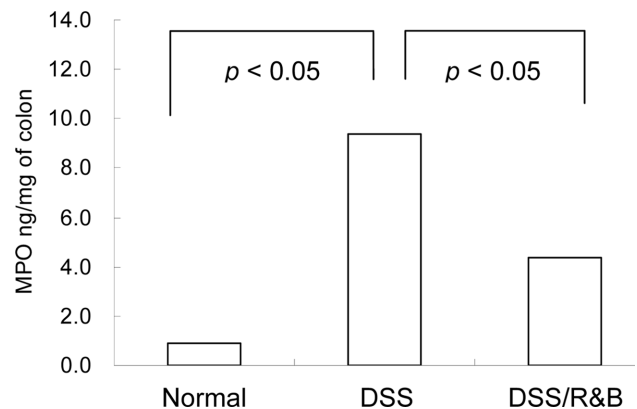
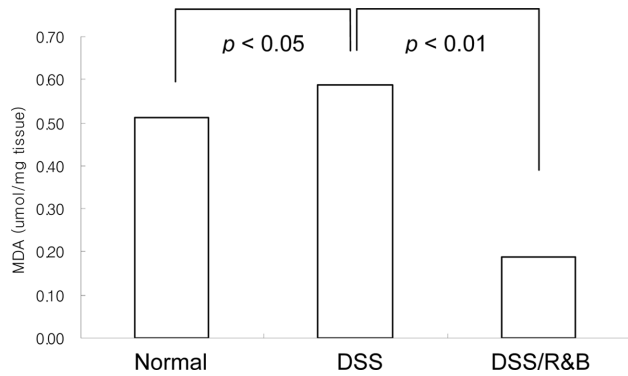


Fig. 2. Effect of administration of R&B Balance® on intestinal epithelial myeloperoxidase (MPO) activity of DSS-treated mice. NOR, Normal group; DSS, DSS treated group; R&B, R&B Balance® treated group.

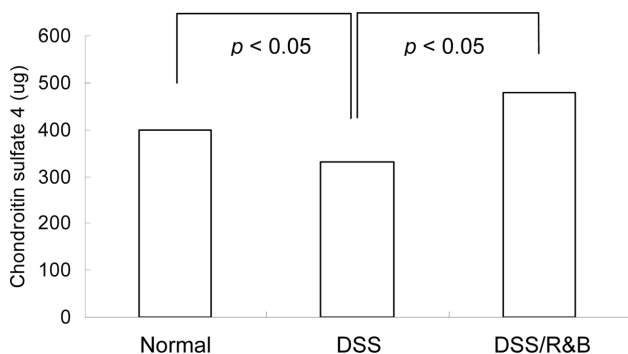


**Fig. 3.** Effect of administration of R&B Balance® on intestinal epithelial lipid oxidation of DSS-treated mice. NOR, Normal group; DSS, DSS treated group; R&B, R&B Balance® treated group.

킴으로써 대장염 증상을 개선한다고 보고하였다. 본 연구에서도 이러한 결과를 확인할 수 있었는데, DSS 처리에 의해 대장조직 내 MDA가 증가하는 것으로 확인되었으며, 복합유산균을 투여할 경우 MDA의 함량이 감소한 것으로 나타났다(Fig. 3). 한편, You 등(2009)은 항산화 활성을 가지고 있는 glutathione의 전구체인 N-acetylcysteine을 투여할 경우 DSS 만을 투여한 실험군보다 대장조직의 손상이 완화되었으며, 대장조직 내의 MPO 활성이 감소되었다고 보고하였다. 따라서 복합유산균에 의한 대장조직의 염증 완화 및 지질과산화 억제는 복합유산균의 항산화 활성에 의한 것으로 판단된다.

#### 분변 내 유해효소 활성 및 유전독성

DSS 처리에 의해 마우스의 분변 내 chondroitinase 활성이 증가하는 경향이 나타났으나 복합유산균과 DSS를 동시에 투여한 군에서는 분변 내 chondroitinase 활성이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4). DSS 처리에 의한 장내 chondroitinase 활성 증가에 대한 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다. 그러나 유독성에 차이가 있는 *Clostridium difficile*에 대해 점막 조직을 분해하는 효소의 활성을 조사한 결과 유독



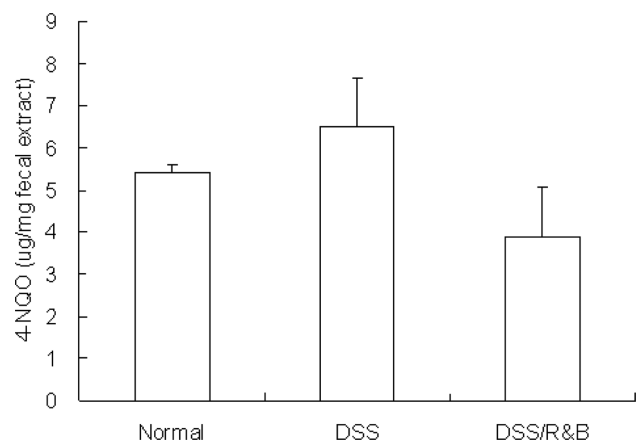
**Fig. 4.** Effect of administration of LAB on fecal chondroitinase activity of DSS-treated mice. NOR, Normal group; DSS, DSS treated group; R&B, R&B Balance® treated group.

성이 큰 균주는 점막 조직을 분해할 수 있는 효소를 보다 많이 가지고 있는 것으로 알려졌다(Seddon *et al.*, 1990). 이는 장내 유해균이 생성하는 chondroitinase가 장점막 방벽을 약화시켜 유해균이 대장 조직 안으로 침투해 들어와 대장염을 발생시킬 가능성이 있다는 것을 보여준다. 또한 Hori 등 (2001)은 DSS를 처리한 실험동물에서 chondroitin을 투여함으로써 장내 대장염 발생이 감소한 것으로 보고하였다.

분변 내용물의 유전독성을 측정한 결과, DSS 처리에 의해 분변 내 유전독성이 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 복합유산균을 투여한 군에서는 유전독성이 유의적으로 감소하였으며, 정상군보다 더 낮은 수준을 나타냈다(Fig. 5). 한편, R&B Balance®에 포함되어 있는 *L. brevis* HY7401이 DSS로 유도된 대장염 동물모델에서 분변 내 암을 유발하는  $\beta$ -glucuronidase와 tryptophanase 같은 유해효소의 생산을 억제하는 것으로 보고되어(Lee *et al.*, 2008), R&B Balance® 투여에 의한 분변내 유전독성 감소는 대장내 발암과 관련된 유해효소의 생산억제에 의한 것으로 판단된다.

#### 분변 내 미생물 다양성 분석

DSS에 의해 유도된 대장염 동물모델에서 장내 미생물의 다양성 변화를 T-RFLP를 이용하여 분석하였다. 그 결과 DSS 처리와 복합유산균 투여에 의해 장내 미생물총에 변화가 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6, 7). 각 실험군의 T-RFLP 패턴에서 나타난 T-RF에 대해 군집분석을 실시한 결과, 정상군, DSS군, 그리고 R&B군은 분변에 각각 다른 미생물총을 갖고 있는 것으로 나타났으며, 각 실험군 내의 마우스는 다른 실험군의 마우스보다는 비슷한 분변 미생물 조성을 갖고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 8). 제한효소 *Msp* I으로 처리한 경우 DSS군은 정상군에 비해 T-RF의 숫자가 줄어든 것으로 나타났으며, Simpson index와 Shannon index로 계산된 미생물총의 다양성도 정상군에 비



**Fig. 5.** Effect of administration of LAB on fecal genotoxicity of DSS-treated mice. NOR, Normal group; DSS, DSS treated group; R&B, R&B Balance® treated group.

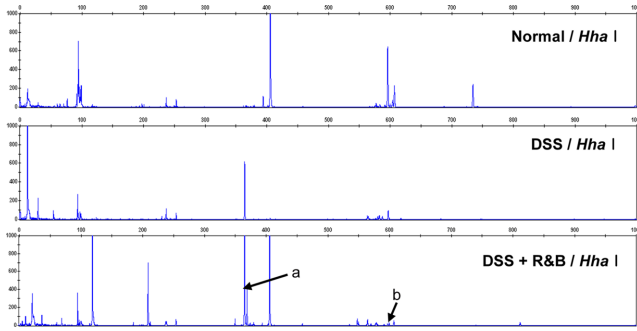


Fig. 6. T-RFLP patterns of fecal microbiota in DSS-treated mice (I). PCR products were digested with *Hha* I. NOR, Normal group; DSS, DSS treated group; R&B, R&B Balance® treated group; a, *Bifidobacterium* spp.; b, *Lactobacillus* spp.

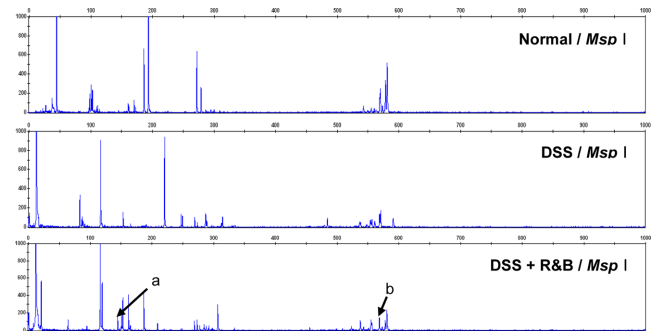


Fig. 7. T-RFLP patterns of fecal microbiota in DSS-treated mice (II). PCR products were digested with *Msp* I. NOR, Normal group; DSS, DSS treated group; R&B, R&B Balance® treated group; a, *Bifidobacterium* spp.; b, *Lactobacillus* spp.

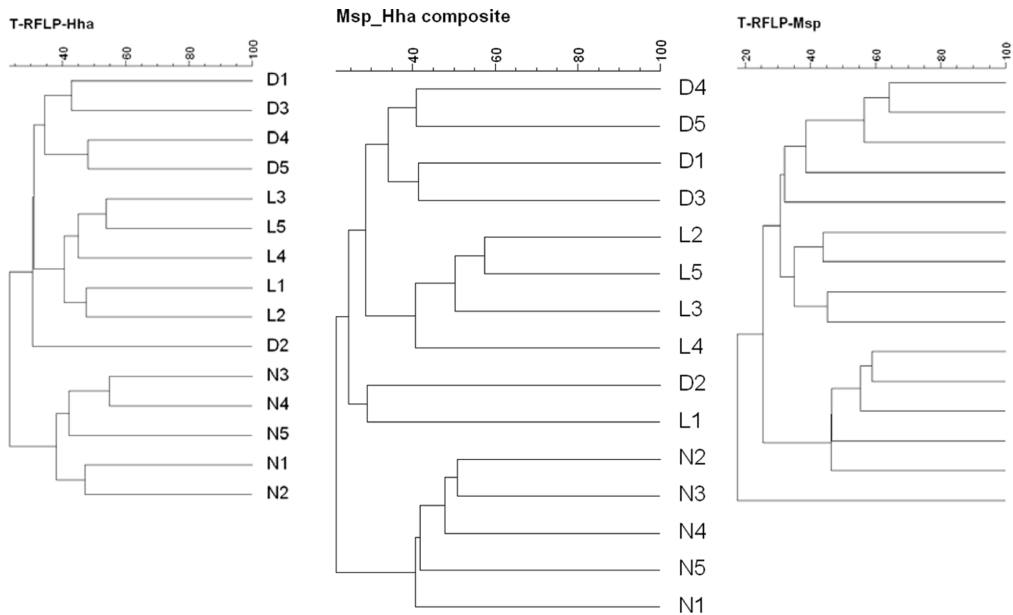


Fig. 8. Cluster analysis of T-RFLP patterns of fecal microbiota in DSS-treated mice. PCR products were digested with *Hha* I or *Msp* I. N1-N5, Normal group; D1-D5, DSS treated group; L1-L5, R&B Balance® treated group.

해 DSS군에서 감소한 것으로 나타났다(Table 1). IBD 환자의 경우 정상인에 비해 전체적인 장내 미생물총의 다양성이 감소한다고 알려졌다(Ott *et al.*, 2004). 즉, 마우스에 DSS를 처리하여 대장염을 유도할 경우에도 IBD 환자와 마찬가지로 미생물총의 다양성이 감소한 것으로 나타났다.

T-RFLP 패턴에서 보면 *Hha* I로 처리할 경우 405 bp의 T-RF가 정상군과 R&B군에서는 관찰되었지만 DSS군에서는 관찰되지 않았다(Fig. 6). TAP에서 *Hha* I로 처리할 경우 402에서 408 bp의 T-RF를 생성하는 균주를 검색한 결과 *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, clone env. ops 12(AF018195), *Spirosoma linguale* ATCC23276, *Lactobacillus fermentum* ATCC14931 등의 균주가 검색되었다. 한편 장내 상재균인 *Bacteroides* 속의 균주들중에는 *Bacteroides vulgatus*와 같이 IBD의 발병과 관련이 있는 종이 있지만 대부분의 *Bacteroides*는 유해하지 않다. IBD 환

자의 경우 오히려 *Bacteroides* 속의 균주가 감소하는 것으로 알려졌다(Peterson *et al.*, 2008). 본 연구에서도 *Hha* I로 처리할 경우 *Bacteroides* 속의 균주에 해당하는 98 bp 부근의 T-RF의 높이가 DSS군의 경우 많이 줄어들었고, *Msp* I로 처리할 경우 *Bacteroides* 속의 균주의 해당하는 98 bp 부근의 T-RF의 숫자가 감소한 것으로 나타났다. DSS와 복합유산균을 같이 투여한 군에서도 정상군과 비교하여 이 영역에서 T-RF의 높이가 감소한 것으로 나타났지만 DSS군보다는 감소 폭이 작은 것으로 나타났다.

*Hha* I로 처리할 경우 *Lactobacillus* 속의 균주의 T-RF 길이는 598 bp 부근이다. DSS군에서 이 부근의 T-RF의 높이가 상당히 감소된 것으로 나타났으며, 유산균 투여군에서도 상당히 감소된 것으로 나타났다. 27F primer와 *Hha* I을 사용하여 T-RFLP 분석을 하였을 때 *Bifidobacterium* 속의 균주는 약 370 bp 정도 크기의 T-RF가 생성되지만 T-

**Table 1. Diversity indices calculated from *Hha* I and *Msp* I T-RF profiles of fecal microbiota**

Restriction enzyme	Diversity indices	Normal	DSS	DSS/R&B
<i>Hha</i> I	Number of T-RF	23.6±7.2	22.4±14.3	15.2±4.0*
	Simpson index <sup>1</sup>	0.873±0.034	0.752±0.092*	0.804±0.028*
	Shannon index <sup>2</sup>	3.72±0.29	2.95±0.47*	2.92±0.23*
<i>Msp</i> I	Number of T-RF	29.8±3.5	23.8±13.8	24.0±6.8
	Simpson index <sup>1</sup>	0.923±0.013	0.744±0.227	0.789±0.107*
	Shannon index <sup>2</sup>	4.21±0.21	3.09±1.11*	3.18±0.47*

\*Significant differences compared with normal group :  $p < 0.05$ .

<sup>1</sup>Simpson index(D) was calculated as follow:  $D = 1 - \sum(P_i)^2$ , where  $P_i$  is the proportion of an individual peak height relative to the sum of all peak heights.

<sup>2</sup>Shannon index(H) was calculated as follow:  $H = 1 - \sum(P_i)(\log_2 P_i)$ , where  $P_i$  is the proportion of an individual peak height relative to the sum of all peak heights.

**Table 2. Predicted terminal restriction fragment (T-RF) lengths of several bacterial strains**

T-RF size(bp)		Species or phylotype	Accession no.
<i>Hha</i> I	<i>Msp</i> I		
37	181	<i>Fusobacterium</i> sp.	AB064908
36	181	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	AJ413954
37	281	<i>Eubacterium siraeum</i>	L34625
95	164	str. JTB16	AB015240
94	265	<i>Helicobacter heilmannii</i>	AF058768
95	164	clone STA-63	AJ009471
96	91	<i>Bacteroides forsythus</i> FDC338	
104	99	<i>Bacteroides ovatus</i> NCTC11153	
102	97	<i>Bacteroides uniformis</i> ATCC8492	
218	74	<i>Enterococcus</i> sp. GvF410	AB015233
238	143	<i>Bacillus subtilis</i>	AF008220
233	522	<i>Clostridium baratii</i> ATCC43756	
698	520	<i>Clostridium butyricum</i> ATCC43755	
1074	521	<i>Clostridium botulinum</i> ATCC25765	
256	570	<i>Lactobacillus animalis</i> ATCC35046	
256	570	<i>Lactobacillus murinus</i> ATCC35020	
406	581	<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC14931	
407	26	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	
598	572	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC8014	
598	572	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC14869	
598	573	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC393	
609	583	<i>Weissella minor</i> ATCC35413	

RF의 높이는 상당히 작게 나타난다. 이는 primer 27F가 *Bifidobacterium* 속 균주의 16S rDNA 염기서열과 차이가 많이 나기 때문에 27F primer를 사용하여 조성된 16S rRNA 유전자 library에서 T-RFLP 분석에 의해 *Bifidobacterium* 속의 균주를 찾는 것은 적합하지 않기 때문인 것으로 판단된다.

본 연구결과들을 종합해 볼 때, *L. brevis* HY7401, *L. helveticus* HY7801, 그리고 *B. longum* HY8004의 복합유산균 R&B Balance®는 DSS로 유도된 대장염 동물에서 대장의 축소, 대장조직의 염증 및 지질과산화 등과 같은 대장염 증상을 개선해주고 분변내 독성 효소나 유독한 대사산물을 생성을 억제함으로써 대장염을 개선하는 것으로 판

단되고 대장염 동물의 장내 미생물 다양성에도 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

## 요 약

*L. brevis* HY7401, *L. helveticus* HY7801 및 *B. longum* HY8004의 복합유산균 R&B Balance®의 대장염 개선 효과를 DSS 처리 마우스에서 평가하였다. R&B Balance® 섭취에 의해 대장길이 축소, MPO 활성과 같은 대장염 증상이 감소하였으며, 분변내 chondroitinase 활성과 분변 유전독성을 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다. T-RFLP



pattern의 군집 분석 결과, DSS-유도 대장염 마우스의 미생물총은 정상적인 마우스와 다르며, R&B Balance®의 투여는 장내 미생물총의 다양성에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다. 따라서 R&B Balance®는 DSS로 유도된 대장염 동물에서 대장염 증상을 개선해주고 분변 내 독성 효소나 유독한 대사산물을 생성을 억제함으로써 대장염을 개선하는 것으로 판단되고 대장염 동물의 장내 미생물 다양성에도 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

## 참고문헌

- Aguiar JA and Michelacci YM (1999) Preparation and purification of *Flavobacterium heparinum* chondroitinases AC and B by hydrophobic interaction chromatography. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**, 545-550.
- Ahn BO, Ko KH, Oh TY, Cho H, Kim WB, Lee KJ, Cho SW, and Hahn KB (2001) Efficacy of use of colonoscopy in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in rats: the evaluation of the effects of antioxidant by colonoscopy. *Int. J. Colorectal. Dis.* **16**, 174-181.
- Atreya R, Multer J, Fintoo S, Millberg J, Jostock T, Wirtz S, Schtz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schrmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, and Neurath MF (2000) Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn's disease and experimental colitis in vivo. *Nat. Med.* **6**, 583-588.
- Belmiro CL, Souza HS, Elia CC, Castelo-Branco MT, Silva FR, Machado RL, and Pavao MS (2005) Biochemical and immunohistochemical analysis of glycosaminoglycans in inflamed and non-inflamed intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Int. J. Colorectal Dis.* **20**, 295-304.
- Berrebi D, Languelin J, Ferkdadj L, Foussat A, De Lagausie P, Paris R, Emilie D, Mougnot JF, Cezard JP, Navarro J, and Peuchmaur M (2003) Cytokines, chemokine receptors, and homing molecule distribution in the rectum and stomach of pediatric patients with ulcerative colitis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **37**, 300-308.
- Binder V (2004) Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 463-479.
- Chandran P, Sathapom S, Robins A, and Eremin O (2003) Inflammatory bowel disease: Dysfunction of GALT and gut bacterial flora (II). *Surgeon* **1**, 125-136.
- Cho JY, Chang HJ, Lee SK, Kim HJ, Hwang JK, and Chun HS (2007) Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of beta-caryophyllene, a sesquiterpene. *Life Sci.* **80**, 932-939.
- Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, and Gusovsky F (1999) Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**, 10689-10692.
- Chung KT, Fulk GE, and Slein MW (1975) Tryptophanase of fecal flora as a possible factor in the etiology of colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **54**, 1073-1078.
- Chung YW, Choi JH, Oh TY, Eun CS, and Han DS (2007) *Lactobacillus casei* prevents the development of dextran sulfate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 mutant mice. *Clin. Exp. Immunol.* **151**, 182-189.
- Collins MP and Gibson GR (1999) Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, s1052-1057.
- Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, and Sartor RB (2003) *Lactobacillus* GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* **52**, 370-376.
- Dunbar J, Ticknor LO, and Kuske CR (2000) Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2943-2950.
- Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, Xu R, Inoue H, Arditi M, Dannenberg AJ, and Abreu MT (2006) Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterol.* **131**, 862-877.
- Ganguly NK, Kingham JG, Lloyd B, Lloyd RS, Price CP, Triger DR, and Wright R (1978) Acid hydrolases in monocytes from patients with inflammatory bowel disease, chronic liver disease, and rheumatoid arthritis. *Lancet* **1**, 1073-1075.
- Gesner BM and Jenkin CR (1961) Production of heparinase by bacteroides. *J. Bacteriol.* **81**, 595-604.
- Hill MJ and Drasar DS (1975) The normal colonic bacterial flora. *Gut* **16**, 318-323.
- Hori Y, Hoshino J, Yamazaki C, Sekiguchi T, Miyauchi S, and Horie K (2001) Effects of chondroitin sulfate on colitis induced by dextran sulfate sodium in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **85**, 155-160.
- Ingalls RR, Heine H, Lien E, Yoshimura A, and Glenbock D (1999) Lipopolysaccharide recognition, CD14, and lipopolysaccharide receptors. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **13**, 341-353.
- Jung HC (2001) Animal model for inflammatory bowel disease. *Korean J. Gastroenterol.* **37**, 69-75.
- Jung HC, Eckmann I, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Worblewska E, and Kagnoff MF (1995) A distinct array of proinflammatory cytokine is expressed in human colon epithelia cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* **95**, 55-65.
- Kwon HK, Lee CG, So JS, Chae CS, Hwang JS, Sahoo A, Nam JH, Rhee JH, Hwang KC, and Im SH (2010) Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 2159-2164.
- Lee HS, Han SY, Bae EA, Huh CS, Ahn YT, Lee JH, and Kim DH (2008) Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 574-580.
- Lee H, Ahn YT, Park SH, Ahn YM, Shim JJ, Lee JH, Lee JS, Surh YJ, Huh CS, and Kim DH (2011) Evaluation of anti-



- colitic effect of Chung-Jang-Hwan CC-mix) in mice. *Biomol. Ther.* **19**, 52-58.
- Lee IA, Bae EA, Lee JH, Lee H, Ahn YT, Huh CS, and Kim DH (2010) *Bifidobacterium longum* HY8004 attenuates TNBS-induced colitis by inhibiting lipid peroxidation in mice. *Inflamm. Res.* **59**, 359-368.
- Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, and Fedorak RN (1999) *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterol.* **116**, 1107-14.
- O'Mahony L, Feeney M, O'Halloran S, Murphy L, Kiely B, Fitzgibbon J, Lee G, O'Sullivan G, Shanahan F, and Collins JK (2001) Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **15**, 1219-1225.
- Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Flisch UR, Timmis KN, and Schreiber S (2004) Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* **53**, 685-693.
- Peran L, Camuesco D, Comalada M, Bailon E, Henriksson A, Xaus J, Zarzuelo A, and Galvez J (2007) A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 836-844.
- Perdigon G, de Jorrot WEB, de Petrino SF, and de Budeguer MV (1991) Effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on various biological functions of the host. *Food Agric. Immunol.* **3**, 93-102.
- Peterson DA, Frank DN, Pace NR, and Gordon JI (2008) Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe.* **3**, 417-427.
- Raffi F, van Embdin R, and van Lieshout LMC (1999) Changes in bacterial enzymes and PCR profiles of fecal bacteria from a patient with ulcerative colitis before and after antimicrobial treatments. *Dig. Dis. Sci.* **44**, 637-642.
- Salyers AA, Vercellotti JR, West SEH, and Wilkins TD (1977) Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 319-322.
- Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, Tonkonogy SL, and Sartor RB (2002) *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm. Bowel Dis.* **8**, 71-80.
- Seddon SV, Hemingway I, and Borriello SP (1990) Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model. *J. Med. Microbiol.* **31**, 169-174.
- Shanahan F (2002) Crohn's disease. *Lancet* **359**, 62-69.
- Sheil B, MacSharry J, O'Callaghan L, O'Riordan A, Waters A, Morgan J, Collins JK, O'Mahony L, and Shanahan F (2006) Role of interleukin (IL-10) in probiotic-mediated immune modulation: an assessment in wild-type and IL-10 knock-out mice. *Clin. Exp. Immunol.* **144**, 273-280.
- Simon GL and Gorbach SL (1984) Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterol.* **86**, 174-193.
- Stevceva L, Pavli P, Husband AJ, and Doe WF (2001) The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it. *BMC Clin. Pathol.* **1**, 3.
- Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, and Valdez GF (1998) Evidence for hypoglycemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J. Dairy Sci.* **81**, 2336-2340.
- Wirtz S and Neurath MF (2007) Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1073-1083.
- You Y, Fu JJ, Meng J, Huang GD, and Liu YH (2009) Effect of *N*-acetylcysteine on the murine model of colitis induced by dextran sodium sulfate through up-regulating PON1 activity. *Dig. Dis. Sci.* **54**, 1643-1650.
- Zhu B, Wang X, and Li L (2010) Human gut microbiome: the second genome of human body. *Protein Cell* **1**, 718-725.