열처리 살균 유산균을 이용한 알코올성 간독성 억제 효과

채효석¹ · 조향현¹ · 송우승¹ · 황권택²

¹(주)메디뉴트롤

²남부대학교 식품영양학과

Alcoholic Hepatotoxicity Inhibitory Effect Using Heat-Killed Lactic Acid Bacteria

Hyo-Seok Chae¹, Hyang Hyun Cho¹, Woo Seung Song¹, and Kwontack Hwang²

¹Medinutrol Co., Ltd.

²Department of Food and Nutrition, Nambu University

ABSTRACT The purpose of this study was to examine the effects of heat-killed lactic acid bacteria on acute alcoholic liver disease and alcoholic hangover. Histologic analysis exhibited no change except in the ethanol-treated group, but the EtOH + heat-killed *Lactobacillus plantarum* high dose-treated group ($P < 0.01$) showed a significant change in the fatty granules in hepatocytes. Similarly, the positive control group ($P < 0.01$) and the EtOH + HLPH (heat-killed *L. plantarum* high dose) group ($P < 0.05$) showed significant difference in the hepatic telangiectasis score. Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities were significantly decreased in the EtOH + HLPH group ($P < 0.001$ and $P < 0.01$ respectively). Inhibition of inflammation was assessed through cytokine expression. IL-1 β mRNA expression was significantly inhibited in all treatment groups, but IL-6 was inhibited only in the heat-sterilized lactic acid bacteria group ($P < 0.05$). While measuring the changes in the amount of ethanol and acetaldehyde in the blood before and after ethanol administration, it was observed that the heat-killed lactic acid bacteria group effectively decreased after ethanol administration ($P < 0.001$). In addition, it was confirmed that alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) activities were significantly increased in the heat-killed lactic acid bacteria group ($P < 0.001$). Therefore, it was observed that heat-treated and sterilized lactic acid bacteria like live bacteria had a significant effect on acute alcoholic liver disease.

Key words: alcohol-induced liver injury, ALDH, ADH, cytokine, heat treated lactic acid bacteria

서 론

프로바이오틱스(probiotics)는 적당량을 섭취하였을 때 숙주의 건강에 도움을 주는 살아있는 미생물을 일컫는다(FAO/WHO, 2002). 현재 식품의약품안전처에서는 해당 정의를 만족하는 군 5속 19종을 장 건강에 대한 기능성 원료로 선별하여 산업적인 이용을 허가하고 있다(Table 1).

이러한 프로바이오틱스는 장 건강 이외에 식약처가 인정한 기능성으로 면역과민반응에 의한 피부 상태 개선·코 상태 개선에 도움, 갱년기 여성 건강에 도움, 질 내 유익균 증식 및 유해균 억제에 도움, 체지방 감소에 도움 등이 있으며, 제품에 따라 일일섭취량이 다를 수 있고 표시된 방법에 따라

섭취해야 한다. 프로바이오틱스가 장내에서 보호적 기능, 구조적 기능, 대사적 기능을 한다는 것이 밝혀졌다(O'Hara와 Shanahan, 2006). 이러한 기능을 통해 gastroenteritis(Kluijfhout 등, 2020), intestinal hyperpermeability(Rao와 Samak, 2013), intestinal dysbiosis(de Oliveira 등, 2017), irritable bowel syndrome(Niu와 Xiao, 2020), Crohn's disease(Catt 등, 2019), colon cancer(Drago, 2019; Hendler와 Zhang, 2018), ulcerative colitis(Mallon 등, 2007; Iheozor-Ejiofor 등, 2020), peptic ulcer(Khoder 등, 2016) 등 소화기관과 관련된 염증성 질병을 프로바이오틱스 처리로 치료할 수 있다.

이러한 효과는 부분적으로 장내 살아있는 미생물의 대사

Received 25 August 2021; Revised 7 November 2021; Accepted 10 November 2021

Corresponding author: Kwontack Hwang, Department of Food Science and Nutrition, Nambu University, 1, Nambudae-gil, Gwangsan-gu, Gwangju 62271, Korea, E-mail: hwangskt@gmail.com

Author information: Kwontack Hwang (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. List of probiotics

Genus	Species
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>

활동에 기인하는 것으로 제안되었다. 그러나 최근 연구에 따르면 가열 살균 프로바이오틱스와 같이 사멸시킨 미생물도 숙주에서 유의한 효과를 나타낸다고 보고하였다(Inoue 등, 2014; Maruyama 등, 2016; Ting 등, 2015).

사균 유산균에 대한 연구를 보면, 면역조절 작용을 나타내는 사균체가 자가면역 질환의 원인인 만성염증의 예방과 치료에 광범위한 효과를 보인다고 발표하였는데, 아토피 피부염(Choi 등, 2016a; Kim, 2018; Jo와 Kang, 2012)이나 궤양성 대장염 등의 염증성 장 질환(Sang 등, 2015; Jin 등, 2020)에서 유산균 사균체가 농도 의존적으로 염증성 사이토카인의 발현을 억제하여 세포탈락과 조직괴사를 막고 부종을 완화하며 조직회복을 돕는 것이 확인되었다. 또한 유산균이 생산하는 박테리오파지에 의한 감염원의 세포사를 유도하는 것으로 진행된다. 사균체의 경우, 죽은 상태에서 새 물질을 생산하는 것은 불가능하기에 직접적인 세포독성에 의한 감염원의 제거는 어렵다. 유산균 사균체는 면역세포의 식균작용이나 염증성 사이토카인을 면역세포로부터 유도하여 감염원을 제거하게 도와주고, 또한 감염원과 결합, 비활성화하여 체외의 배출을 돕기도 한다. 이러한 특성은 박테리아뿐만 아니라 바이러스, 진균 등 다양한 형태의 미생물에 적용되며 상당히 효과적이다(Hara 등, 2018; Choi 등, 2019; Chen 등, 2017). 그리고 살균된 유산균의 균체 성분 중 peptidoglycan, lipoteichoic acid, β -glucan, mannose, nucleic acid 등이 TNF- α 등 사이토카인의 발현이나 macrophage나 NK 세포를 활성화하여 식균작용 및 세포사멸을 유도한다. 이는 특정 한 가지 성분의 영향보다도 각 성분의 시너지 효과로 유추할 수 있다(Gu 등, 2017). 일반적인 면역조절제는 면역의 증강 또는 억제의 편향된 활성을 이용한다. 살균된 유산균의 경우에는 lipopolysaccharide(LPS)를 과량 처리하여 대식세포에 강한 염증반응을 유도한 상태에서 열처리 사균 유산균 EF-2001을 처리하자 농도 의존적으로 염증반응을 억제하였고, LPS를 처리하지 않은 대식세포에서의 EF-2001 처리는 면역 증강이 유도되는 것이 확인되었다. 이는 생체의 상태에 따라 항상성을 유지해주는 immuno-modulator로서의 기능을 나타내고 있음을 알 수 있다(Rocha-Ramírez 등, 2020). 유산균은 유해균과 경쟁, 정장작용을 한다고 알려져 있는데, 살아있는 유산균과 마찬가지로 사균 유산균도 장내에 존재하던 유익균의 먹이가 되어 유익균의 prebiotics의 역할도 할 수 있다고 보고하고 있다(Sugahara 등, 2017). 이는 사균체의 항염작용이 더해져 항

상된 시너지 효과를 보이게 된다. 이러한 복합 작용에 기인하여 유산균 사균체는 단독으로도 synbiotics로 불리기도 한다.

한편 장에 서식하는 유해 미생물의 종류와 서식양에 따라 간경변증, 비알코올성 지방간, 알코올성 간 질환과 같은 유해한 간 기능 장애를 일으킬 수 있다. 특히 장내 세균과 장구균 및 연쇄상구균 종은 장 투과성 및 세균 전위의 상승을 유발하고 혈액에 높은 수준의 LPS 및 박테리아 물질이 존재하면 문맥 고혈압이 발생하고 간세포 손상을 유발하는데 유산균들이 효과적으로 회복시킨다는 보고들이 증가하고 있다(Law와 Brunt, 2010; Gu 등, 2019).

그러나 유산균 사균체를 이용한 다양한 건강 기능성에 대한 연구가 진행되고 있지만 알코올 독성에 대한 억제 및 간 보호효과에 대한 연구는 직접적으로 발표된 연구내용은 없는 상태이다. 따라서 본 연구에서는 유산균 사균체를 이용하여 알코올성 급성 간 질환과 숙취해소에 사균 유산균이 얼마나 효과적인지를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

유산균 배양 및 사균제의 제조

본 실험에서 사용한 유산균과 열처리 살균된 유산균은 (주)메디뉴트롤로(Yeonggwang, Korea)부터 공급받아 사용하였는데 제조과정을 간략하게 살펴보면, 유산균 배양물 및 가열살균제품(포스트바이오틱스 재료)은 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* V135(KCTC1879P)를 식용성분으로 대체한 변형 MRS(de Man, Rogosa 및 Sharpe)(Oxoid Ltd., Hampshire, UK) 배지에서 37°C에서 24시간 동안 배양하여 박테리아 농도가 2×10^9 CFU/mL로 조정하였다. 그다음 배양물을 104°C에서 3시간 동안 2회 열처리한 후 분무 건조기(Mini spray dryer B-290, BUCHI Labor-technik AG, Flawil, Switzerland)로 분말화하였고 이후 모든 시험의 기본 시료로 사용하였다.

실험동물

급성간염모델: 실험에 사용된 모델은 Fig. 1에 도식화 표시하였다. 실험에 사용된 동물은 6주령(20~22 g) 수컷 C57BL/6J 마우스를 (주)대한바이오파밍(Eumsung, Korea)에서 구입하였다. 실험동물은 온도 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조도 200~300 lux, 12시간 간격의 명암 주기 환경에

Fig. 1. Ethanol-induced acute hepatitis model.

Table 2. Experimental group composition of ethanol-induced acute hepatitis model

Group	No. of animal	Dose (mL/kg/d)	Volume (mL/kg/d)
NC	6	0	10
EtOH	8	0	10
PC	6	50 ¹⁾	10
LP-L	6	125	10
LP-H	8	250	10
HLP-L	6	125	10
HLP-H	8	250	10

¹⁾Ursodoxcolic acid.

서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 적응 기간에 일반식이를 공급하였으며 식수로 멸균수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

급성간염모델의 실험군은 Table 2와 같이 구성하였으며 용량 상관성을 고려하여 시험물질당 저농도(125 mg/kg) 및 고농도(250 mg/kg)로 설정하고 대조군(normal control, NC), 간염모델군(ethanol-treated, EtOH), 양성대조군(positive control, PC; ursodeoxycholic acid), 유산균 분말투여군(LP) 및 사균 유산균 분말투여군(HLP) 총 7군으로 구성하였으며, 각 군당 동물 마릿수는 6 또는 8마리로 설정하였다. 실험 기간은 총 10일이었으며, 1일 1회 positive control로 ursodeoxycholic acid 50 mg/kg, 유산균 분말(LP100) 및 사균 유산균 분말(HLP100) 125 및 250 mg/kg을 경구로 투여(오전 9시~오전 10시)하였고, 실험 9일차 및 10일차에는 EtOH 투여 1시간 전에 투여하였다.

급성간염모델을 확립하기 위해 60% EtOH(10 mL/kg, 5 g/kg 투여기준)을 12시간 간격으로 1회, 3회, 5회 투여 후 4시간 및 12시간 뒤 각각 부검하여 간세포 손상지표인 혈청 aspartate aminotransferase(AST)와 alanine aminotransferase(ALT)를 측정(데이터가 표시되지 않음)하였으며, AST 및 ALT의 측정결과 편차가 적고 대조군과 비교하여 수치 증가가 나타나는 조건으로 60% EtOH, 3회 투여, 12시간 뒤 부검하는 일정의 알코올성 간염모델을 확립하여 사용하였다.

숙취모델: 실험에 사용된 숙취모델은 Fig. 2에 도식화 표현되어 있는데, 수컷 C57BL/6 마우스(7주령)를 사용하여 급성간염모델과 동일하게 적응 및 식이 공급을 하였다. 숙취모델의 실험군은 Table 3과 같이 구성하였으며 용량 상관성을 고려하여 시험물질당 200 mg/kg으로 설정하고 대조군(normal control, NC), 간염모델군(ethanol-treated, EtOH), 양성대조군(positive control, PC; milk thistle), 사균 유산균 분말투여군(HLP) 총 4군으로 구성하였으며, 각 군당 동물 마릿수는 6 또는 8마리로 설정하였다. 실험 기간은 7주령

Table 3. Experimental group composition of ethanol-induced hangover model

Group	No. of Animal	Dose (mL/kg/d)	Volume (mL/kg/d)
NC	6	0	10
EtOH	8	0	10
PC	6	milk thistle 200	10
HLP	6	200	10

Fig. 2. Ethanol-induced hangover model.

마우스를 ethanol(25% EtOH, 10 mL/kg) 경구 투여 30분 전 사균 유산균(HLP, 200 mg/kg, 500 µL), 양성대조군(PC, milk thistle 200 mg/kg)을 투여한 군과 ethanol(25% EtOH, 10 mL/kg) 경구 투여 30분 후로 나누어 설정하였고, 1, 3, 5시간마다 간 혈청을 추출하여 분석시료로 사용하였다. 본 실험은 두 모델을 동시에 한국생명공학연구원 동물실험윤리위원회의 승인 하에 시행하였다(기관동물실험 승인 번호: KRIBB-AEC-19080).

간 조직학적 분석

간 조직을 적출한 후 10% 중성 완충 포르말린으로 고정 한 후 파라핀에 넣고 5 µm의 관상 절편으로 제작하였다. Xylene으로 파라핀을 제거하고 알코올로 친수화시킨 다음, hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경을 통해 조직병리학적 간세포의 괴사, 염증세포의 침윤, 카운실만 소체의 괴사를 군간 비교하여 간 조직을 관찰하였다.

혈청 아미노산 전이효소 활성 및 cytokine 측정

-20°C에 보관한 혈청은 혈액생화학분석기(Olympus, Melville, NY, USA)를 이용하여 AST, ALT를 측정하였고, 각 세포를 24-well(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 4×10^5 cells/mL로 조정 후 PMA(Sigma-Aldrich) 1 µg/mL를 처리하고, 대조군(normal control, NC), 간염모델군(ethanol-treated, EtOH), 양성대조군(positive control, PC; ursodeoxycholic acid), 유산균 분말투여군(LP) 및 사균 유산균 분말투여군(HLP) 총 7군의 시료를 처리하고, 0, 4, 8, 12시간 배양 후 상층액을 모아 enzyme-linked immune-sorbent assay(ELISA) kit(BD Bioscience, Oxford, UK)을 이용하여 IL-1β와 IL-6를 측정하였다.

알코올 처리 전후의 간 조직 alcohol dehydrogenase (ADH) 및 acetaldehyde dehydrogenase(ALDH) 활성 측정

숙취모델에서 알코올 처리 전후의 살균된 유산균의 처리에 따른 효과를 알아보기로 ADH, ALDH 활성을 측정하였다. ADH 활성(Choi 등, 1995)은 Racker(1955)의 방법을 변형하였는데, spectrophotometer를 이용하여 340 nm에서 형성되는 NADH의 흡광도를 측정하였다. 시험관에 alcohol 0.1 mL NAD 수용액 0.5 mL, 시료 0.1 mL를 첨가하고 0.01 M glycine-NaOH 완충용액(pH 8.8)을 총 부피가 1.8 mL가 되게 첨가한 후 25°C 항온수조에서 10분간 반응시키고 ADH 0.25 mL를 가하여 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 이때 대조구는 시료 대신 증류수를 넣은 것으로 하였다. ADH의 활성은 반응 종료 시의 최대 흡광도를 대조구의 최대 흡광도에 대한 비율로 나타내었으며 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{ADH activity} = (B/A) \times 10$$

A: 대조구의 최대 흡광도, B: 실험구의 최대 흡광도

ALDH의 활성도는 Tottmar 등(1973)의 방법을 변형하여 Choi 등(2016b)을 따라 NADH 생성에 따른 흡광도의 변화를 340 nm에서 측정하였다. ALDH의 활성도 측정을 위해 증류수 2.1 mL, 1 M tris HCl, 3 M KCl, 시료 0.1 mL, NAD 0.1 mL, 2-mercaptoethanol 0.1 mL, acetaldehyde 0.1 mL를 혼합한 다음 25°C에서 10분간 반응시키고 ALDH 0.1 mL를 가하여 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 이때 대조구는 시료 대신 증류수를 넣은 것으로 하였다. Positive control은 ADH 활성 영향 측정에서 사용한 것으로 하였으며, ALDH의 활성은 ADH 활성 계산식에 따라 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 최소 3회 이상의 반복 실험을 통해 결과를 도출했으며, 실험 결과는 통계처리 프로그램(SAS ver 9.3 SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 통계 분석을 하였다. 각각의 시료들의 특성에 대한 유의적인 차이는 ANOVA, Tukey's multiple comparison test($P < 0.05$)로 검증하였다.

결과 및 고찰

사균 유산균 처리에 대한 조직학적 개선의 분석

사균 유산균의 급성간염모델에서 간 보호 활성에 대한 가능성을 알아보기로 동물모델에서 실험하였다. Fig. 1의 실험 조성처럼 1일 1회 양성대조군으로 ursodeoxycholic acid 50 mg/kg, 유산균 분말(LP100) 및 사균 유산균 분말(HLP 100) 125 및 250 mg/kg을 경구로 투여(오전 9시~오전 10시)하였으며, 실험 9일차 및 10일차에는 EtOH 투여 전 1시간에 투여하였고 이후 실험동물 간 조직으로부터 Fig. 3의 결과를 얻었다. 앞서의 소개처럼 급성간염모델을 확립하기 위해 60% EtOH를 12시간 간격으로 1회, 3회, 5회 투여 후 ALT, AST를 측정하여 모델을 확립하여 사용하였다.

조직학적 개선의 결과는 Fig. 3과 4에 나타내었다. Fig. 3에서 나타난 결과로, EtOH 처리군은 대조군에 비해 약간 작은 크기와 분열되어 있는 모습을 보이고 있으며 EtOH와 함께 처리된 모든 군들도 대조군 대비 간소엽의 크기가 작게 보이고 있고 전체적으로 모든 군에서 간소엽의 구조가 잘 유지되고 있다. 간세포는 뚜렷한 등근 핵을 가지고 있으면서 그 간격이 일정하며 세포 간극이 좁은 잘 짜여진 소엽구조를 하고 있다. EtOH와 양성대조군, EtOH와 생유산균군들, EtOH와 사균 유산균군들이 EtOH 처리군에 대해서만 시료에 대하여 경시적 차이를 보일 뿐 군 간의 차이점은 알아보기 어려웠다.

한편 Fig. 4에서 염증세포 침윤 score에서는 EtOH 처리군 대비 모든 군에서 염증세포 침윤이 완화된 것을 확인할 수 있었으나 통계적으로 유의하지는 않았고, 간의 울혈(congestion)에서는 EtOH 처리군과의 비교에서 양성대조군과 EtOH와 사균 유산균 고농도 처리군에서 완화되는 차

Fig. 3. Histologic analysis of liver tissue in chronic ethanol-induced acute hepatitis model. EtOH, ethanol; PC, positive control; LPL, *L. plantarum* low dose; LPH, *L. plantarum* high dose; HLPL, heat killed *L. plantarum* low dose; HLPH, heat treated *L. plantarum* high dose group.

이를 보였으나 이 또한 통계적 유의성은 없었다. 그러나 간 세포에서 지방립의 변화를 측정한 결과(Fig. 4B)에서는 EtOH 처리에 따라 지방립의 크기가 급격하게 확대되었다. 그리고 양성대조군, 생유산균군, 살균 처리된 유산균들에서 모두 지방립의 크기가 축소되었고, ursodeoxycholic acid를 처리한 양성대조군($P<0.001$)과 EtOH와 함께 유산균 분말

투여군($P<0.01$)에서만 유의성을 보여 효과가 제한적으로 보였다. 또한 간모세혈관확장 score(Fig. 4C)에서도 유사하게 양성대조군($P<0.01$)과 EtOH와 유산균 분말투여군($P<0.05$)에서 유의적인 완화 경향을 보여 염증 완화 효과가 있음을 알 수 있었다.

유산균에 의한 간염 억제 활성화에 대하여 Lee 등(2014)은

Fig. 4. The histological score of ethanol-induced acute hepatitis liver. The score of histological damage in hepatitis liver were decided by 0: normal, 1: mild, 2: moderate, 3: severe (A, B). The score of inflammatory cell infiltration and lipid droplet. Congestion have no significant difference (C, D). The score of dilated sinusoid score and congestion compared with EtOH group. EtOH, ethanol; PC, positive control; LPL, *L. plantarum* low dose; LPH, *L. plantarum* high dose; HLPL, heat killed *L. plantarum* low dose; HLPH, heat killed *L. plantarum* high dose group. ### $P<0.001$ compared with the control group, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$ compared with the EtOH group.

Fig. 5. The levels of liver enzymes. The levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in the EtOH treatments. EtOH, ethanol; PC, positive control; LPL, *L. plantarum* low dose; LPH, *L. plantarum* high dose; HLPL, heat killed *L. plantarum* low dose; HLPH, heat killed *L. plantarum* high dose group. ^{##} $P<0.01$, [#] $P<0.05$ compared with the control group, ^{***} $P<0.001$, ^{**} $P<0.01$, ^{*} $P<0.05$ compared with the EtOH group.

유산균으로 발효시킨 마늘추출물이 oleic acid로 유도한 비알코올성 지방간에 대하여 매우 효과적으로 개선시켰다는 결과가 있었고, 와송을 유산균으로 발효시킨 추출물을 이용하여 EtOH를 투여한 쥐에서 간의 지질개선, 과산화 물질의 개선과 더불어 간에서의 AST, ALT에서 괄목할만한 개선이 관찰되었다는 보고가 있었다. 또한 같은 연구그룹 Ahn 등 (2013)의 연구에서 *Bacillus subtilis* 및 *Aspergillus kawachii* 균주로 누에를 발효시켜 orotic acid 유발 지방간 모델 흰쥐에 급여시킴으로써 지방간 개선 효과를 관찰할 수 있었다고 보고하였다.

혈청 아미노산 전이효소 활성 변화

알코올 처리에 따른 간 손상의 임상적 지표로 사용되고 있는 ALT, AST 활성 측정을 통하여 효능을 검증한 결과, Fig. 5에 나타내었다. 혈청 ALT 및 AST 활성은 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로 간 손상 지표의 중요한 단서가 된다(Baldi 등, 1993; Cha 등, 2009). 인산모노에스테르(phosphomonoester)를 가수분해하는 효소로 알려진 ALP는 조직에 널리 존재하고 있으며, 간암, 급성 간염, 부갑상선 기능 항진증 등에 의해 활성이 증가하고 있다.

ALT, AST 활성은 EtOH만 처리한 군에 비하여 양성대조군을 포함한 모든 투여군에서 억제를 나타내었다. 그러나 AST의 경우, EtOH와 양성대조군군, EtOH와 저농도 유산균 분말투여군, EtOH와 고농도 유산균 분말투여군 그리고 EtOH와 사균 유산균 분말 저농도투여군은 EtOH 처리군에 비해 ALT, AST 활성의 감소하는 경향이 유의하지는 않았다. 또한 AST 활성의 경우 양성대조군($P<0.01$)과 EtOH와 사균 유산균 분말투여군($P<0.001$)은 통계상 유의적인 차이를 보여 억제 활성이 있음을 확인하였다. ALT의 경우 AST와 유사한 경향을 보였으나 ALT의 활성을 억제한 EtOH와

사균 유산균 분말투여군($P<0.01$)을 제외하고는 모두 통계적인 유의성을 보이지 않았다. 따라서 사균 유산균의 처리가 ALT, AST 효소 활성을 EtOH와 사균 유산균 분말투여군에서 유의적으로 감소시키므로 알코올성 간 질환을 개선할 수 있는 가능성이 있는 것으로 판단된다.

Cytokine 측정 변화

Extracellular signal-regulated kinase(ERK) 경로와 c-Jun N-terminal kinase(JNK) 경로를 통해서 전사인자 NF- κ B(nuclear factor κ B)는 만성 염증성 질환 유발 인자로서 염증 관련 유전자 발현의 조절을 통해서 면역력을 촉진하며(Baker 등, 2011), NF- κ B는 여러 염증 관련 단백질(예; IL-1 β , IL-6, TNF- α) 혹은 LPS 등의 내독소(endotoxin)에 의해 그 생성이 촉진된다(Anisowicz 등, 1991). 알코올의 투여로 유도되는 염증의 발현과 사균 유산균의 염증 억제 효과를 알아보기 위하여 염증과 관련된 cytokine을 확인하였다. Fig. 6A에 나타난 바와 같이 양성 대조군을 비롯한 모든 군에서 IL-1 β 의 mRNA의 발현이 현저히 감소한 것을 알 수 있다($P<0.001$). 그중에서도 EtOH와 사균 유산균 분말투여군에서는 정상대조군과 유사한 수준으로 감소하여 매우 효과적으로 염증반응을 억제했음을 알 수 있다. 한편 Fig. 6B에서는 EtOH의 처리에 의해 IL-6 mRNA 발현이 증가하였지만, 양성대조군, EtOH와 양성대조군, EtOH와 저농도 유산균+LPL, EtOH+LPH에서는 감소의 경향을 확인하기 어려웠고 다만 EtOH와 사균 유산균분말 저농도투여군($P<0.05$)과 EtOH와 사균 유산균분말 고농도투여군($P<0.05$)에서 억제 활성이 작동하는 것을 확인할 수 있었다.

Seo 등(2013)의 발표에 따르면 꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*)을 발효하여 열매 추출물을 처리 시 효과적으로 IL-1 β , IL-6를 억제 조절한다는 것을 제시하였고, Kim 등(2017)의 보고에 따르면 면역결핍 모델에서 β -1,3/1,6-glucan과 유산균을 이용한 *in vivo* 면역 활성 조절 시험에서

Fig. 6. The expression levels of cytokines mRNA. (A) mRNA expression levels of cytokines (IL-1 β) in EtOH treatment. (B) Changes in the level of cytokines (IL-6) upon EtOH treatment. EtOH, ethanol; PC, positive control; LPL, *L. plantarum* low dose; LPH, *L. plantarum* high dose; HLPL, heat killed *L. plantarum* low dose; HLPH, heat killed *L. plantarum* high dose group. ### $P<0.001$ compared with the control group, *** $P<0.001$, * $P<0.05$ compared with the EtOH group.

β -1,3/1,6-glucan 뿐만 아니라 유산균 처리군에서도 효과적으로 IL-1 β , IL-6를 억제 조절할 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 실험의 결과는 IL-6의 유산균에서의 결과 외에 모두 유사한 결과로 생각되어 염증을 조절하는 효과의 가능성을 확인하였다.

사균 유산균의 처리 후의 EtOH와 acetaldehyde의 변화

Fig. 2의 조건에 따라 진행된 숙취모델에서 사균 유산균

의 알코올 분해 활성을 확인하였다. 혈중 알코올 농도는 EtOH 경구 투여 후 약 30분 이내에 섭취량의 60~90%가 체내로 흡수되며, 60~90분 사이에 최고 농도에 도달한다고 하였다(Shumate 등, 1967). Fig. 7에 나타난 바와 같이 PC 군과 HLP군은 각각 에탄올 처리 30분 전(A, B)과 후(C, D)에 밀크씨슬과 사균 유산균을 경구 투여하였다. Fig. 7A, C에서 HLP 그룹의 에탄올 함량은 투여 후 5시간에서 EtOH 그룹에 비해 유의하게 감소($P<0.001$)하였으나, Fig. 7B, D

Fig. 7. The contents of ethanol and acetaldehyde in the blood serum. The PC and HLP groups were treated with milk thistle and postbiotics 30 min before (A, B) and after (C, D) ethanol treatment, respectively. EtOH, ethanol; PC, positive control; HLP, heat killed *L. plantarum* group. *** $P<0.001$, * $P<0.05$ compared with the EtOH group.

Fig. 8. The activity of alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) in the liver tissue. EtOH, ethanol; PC, positive control; HLP heat killed *L. plantarum* group. ### $P < 0.001$, # $P < 0.05$ compared with the control group, *** $P < 0.001$ compared with the EtOH group.

에서는 EtOH군 대비 acetaldehyde 함량은 모든 군에서 유의한 감소를 나타내지 않았다. 본 결과는 사균 유산균이 EtOH 처리 시점과 상관없이 혈중 EtOH 함량을 낮추는 데 유의하게 기여하는 것으로 확인되었다. 그러나 숙취의 원인으로 알려진 acetaldehyde의 양에서는 유의성이 없는 것으로 보인다.

알코올 처리 전후의 간 조직 alcohol dehydrogenase(ADH) 및 acetaldehyde dehydrogenase(ALDH) 활성 측정

알코올 분해 활성은 ADH 활성 및 acetaldehyde를 분해하는 ALDH 활성을 알코올 분해와 숙취에 효과가 있는 것으로 보고된 밀크씨슬을 positive control로 하여 분석하였다. Fig. 8에서 보는 것처럼 PC군과 HLP군은 각각 에탄올 처리 30분 전(A, B)과 후(C, D)에 밀크씨슬과 포스트바이오틱스를 처리하였다. ADH 활성에서는 EtOH군에 대비하여 HLP군에서만 매우 유의하게 상승하였음을 알 수 있었다($P < 0.001$). 그리고 ALDH 효소의 활성에서도 알코올 처리 시점과 상관없이 경향이 동일하였는데, EtOH 처리군과 PC군에서 ALDH의 활성은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 그러나 HLP군에서 ALDH의 활성은 EtOH군에 비해 유의하게 증가하였다($P < 0.001$). 체내에서 흡수된 알코올의 분해시 생성되는 대사산물인 acetaldehyde는 숙취의 주요 원인 성분이며 뇌로 전달되어 홍조, 오심, 구토, 맥박증가, 발한 등의 증상을 일으킨다(Park, 1993). 지속적으로 다량의 음

주를 하는 알코올 중독자 중 약 15%가 알코올성 간경변증을 일으킨다고 알려져 있는데, 이는 다량의 음주만이 알코올성 간경변증을 유발하는 것이 아님을 말한다(Kee 등, 2003). 사균 유산균이 알코올 투여 전후에 상관없이 ADH와 ALDH의 활성을 유의하게 증가시켜 알코올 분해를 촉진하여 숙취 해소에 도움이 되는 것으로 평가된다.

요 약

사균 유산균의 알코올성 급성 간 질환과 알코올성 숙취해소에 대한 효과를 확인하고자 하였다. 조직학적 조사에서 EtOH 처리군 이외에 변화는 없었으나, 간세포에서 지방립의 변화에서 EtOH와 사균 유산균분말 고농도투여군($P < 0.01$)에서 유의성을 보였다. 그리고 간모세혈관확장 score에서도 유사하게 양성대조군($P < 0.01$)과 EtOH와 사균 유산균분말 고농도투여군($P < 0.05$)에서 유의적인 완화를 보였다. 간 손상의 지표인 AST 활성의 경우 EtOH와 함께 사균 유산균 분말 고농도투여군($P < 0.001$)에서 유의적인 감소를 보였고, ALT의 활성에서도 EtOH와 함께 사균 유산균 분말 고농도투여군($P < 0.01$)에서 억제시켰다. 한편 염증지표로서 cytokine 발현을 보았는데, IL-1 β mRNA 발현이 모든 처리군에서($P < 0.001$) 매우 유의하게 억제되었지만 IL-6는 사균 유산균군($P < 0.05$)에서만 억제되었다. EtOH 투여 전후의 EtOH와 acetaldehyde양의 변화에서 EtOH 투여 전후

EtOH 감소 효과가 사균 유산균군에서 감소 효과를 보였다 ($P<0.001$). 한편 ADH와 ALDH 활성은 EtOH 투여와 상관 없이 사균 유산균군에서 매우 유의하게 증가시키는 것을 확인하였다($P<0.001$). 따라서 사균 유산균이 알코올성 급성 간 질환들에 유의한 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2020년 전라남도와 전남테크노파크의 산학연 연계 농공단지 연구개발 지원사업의 지원을 받아 수행된 연구이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn HY, Cha JY, Park KR, Kim YR, Cho YS. Improvement effect of fermented silkworm (*Bombyx mori* L.) powder against orotic acid-induced fatty liver in rats. *J Life Sci*. 2013. 23:789-795.
- Anisowicz A, Messineo M, Lee SW, Sager R. An NF-kappa B-like transcription factor mediates IL-1/TNF-alpha induction of gro in human fibroblasts. *J Immunol*. 1991. 147:520-527.
- Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-kB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab*. 2011. 13:11-22.
- Baldi E, Burra P, Plebani M, Salvagnini M. Serum malondialdehyde and mitochondrial aspartate aminotransferase activity as markers of chronic alcohol intake and alcoholic liver disease. *Ital J Gastroenterol*. 1993. 25:429-432.
- Catt H, Hughes D, Kirkham JJ, Bodger K. Systematic review: outcomes and adverse events from randomised trials in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019. 49:978-996.
- Cha JY, Kim HS, Kang SC, Cho YS. Alcoholic hepatotoxicity suppression in alcohol fed rats by glutathione-enriched yeast FF-8 strain. *Food Sci Biotechnol*. 2009. 18:1411-1416.
- Chen MF, Weng KF, Huang SY, Liu YC, Tseng SN, Ojcius DM, et al. Pretreatment with a heat-killed probiotic modulates monocyte chemoattractant protein-1 and reduces the pathogenicity of influenza and enterovirus 71 infections. *Mucosal Immunol*. 2017. 10:215-227.
- Choi EJ, Iwasa M, Han KI, Kim WJ, Tang Y, Hwang YJ, et al. Heat-killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 ameliorates atopic dermatitis in a murine model. *Nutrients*. 2016a. 8:146. <https://doi.org/10.3390/nu8030146>
- Choi JH, Kang DH, Kim HS. Separation and characteristics of ADH and ALDH activators in fermented *Lycii fructus* extract. *KSBB*. 2016b. 31:134-143.
- Choi JT, Joo HK, Lee SK. The effect of *Schizandrae Fructus* extract on alcohol fermentation and enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Chem Biotechnol*. 1995. 38:278-282.
- Choi YJ, Lim HJ, Shin HS. Immunomodulatory effects of seven viable and sonicated *Lactobacillus* spp. and anti-bacterial activities of *L. rhamnosus* and *L. helveticus*. *Korean J Microbiol*. 2019. 55:392-399.
- de Oliveira GLV, Leite AZ, Higuchi BS, Gonzaga MI, Mariano VS. Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases. *Immunology*. 2017. 152:1-12.
- Drago L. Probiotics and colon cancer. *Microorganisms*. 2019. 7:66. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030066>
- FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of FAO/WHO Working Group. 2002. London, Canada.
- Gu YH, Choi H, Yamashita T, Kang KM, Iwasa M, Lee MJ, et al. Pharmaceutical production of anti-tumor and immune-potentiating *Enterococcus faecalis*-2001 β -glucans: Enhanced activity of macrophage and lymphocytes in tumor-implanted mice. *Curr Pharm Biotechnol*. 2017. 18:653-661.
- Gu Z, Liu Y, Hu S, You Y, Wen J, Li W, et al. Probiotics for alleviating alcoholic liver injury. *Gastroenterol Res Pract*. 2019. Article ID 9097276. <https://doi.org/10.1155/2019/9097276>
- Hara K, Nakao K, Kawaguchi S. Effect of heat-killed lactic acid bacteria *Enterococcus faecalis* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infected mice. *J New Rem Clin*. 2018. 67(3):32-43.
- Hendler R, Zhang Y. Probiotics in the treatment of colorectal cancer. *Medicines*. 2018. 5:101. <https://doi.org/10.3390/medicines5030101>
- Iheozor-Ejiofor Z, Kaur L, Gordon M, Baines PA, Sinopoulou V, Akobeng AK. Probiotics for maintenance of remission in ulcerative colitis (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2020. doi: 10.1002/14651858.CD007443.pub3.
- Inoue Y, Kambara T, Murata N, Komori-Yamaguchi J, Matsukura S, Takahashi Y, et al. Effects of oral administration of *Lactobacillus acidophilus* L-92 on the symptoms and serum cytokines of atopic dermatitis in Japanese adults: a double-blind, randomized, clinical trial. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014. 165:247-254.
- Jin J, Wu S, Xie Y, Liu H, Gao X, Zhang H. Live and heat-killed cells of *Lactobacillus plantarum* Zhang-LL ease symptoms of chronic ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in rats. *J Funct Foods*. 2020. 71:103994. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103994>
- Jo YR, Kang SM. *Lactococcus lactis* culture methods for the enhanced depression of inducers in atopic diseases. *Korean J Microbiol Biotechnol*. 2012. 40:310-318.
- Kee JY, Kim MO, You IY, Chai JY, Hong ES, An SC, et al. Effects of genetic polymorphisms of ethanol-metabolizing enzymes on alcohol drinking behaviors. *Kor J Hepatol*. 2003. 9:89-97.
- Khoder G, Al-Menhali AA, Al-Yassir F, Karam SM. Potential role of probiotics in the management of gastric ulcer (Review). *Exp Ther Med*. 2016. 12:3-17.
- Kim MS, Kim JS, Ryu MJ, Kim KH, Hwang K. Immunomodulatory effects of β -1,3/1,6-glucan and lactic acid bacteria in LP-BM5 murine leukemia viruses-induced murine acquired immune deficiency syndrome. *Korean J Food Preserv*. 2017. 24:1158-1167.
- Kim WJ. Understanding of killed lactic acid bacteria as a probiotics. *Korean J Commun Pharm*. 2018. 4:115-122.
- Kluijfhout S, Trieu TV, Vandenplas Y. Efficacy of the probiotic probiotical confirmed in acute gastroenteritis. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2020. 23:464-471.
- Law K, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*. 2010. 14:591-604.
- Lee HS, Lim WC, Choi JH, Yu HJ, Kim KH, Lee SH, et al. Ameliorating effects of lactic acid-fermented garlic extracts on oleic acid-induced hepatic steatosis. *Korean J Food Sci Technol*. 2014. 46:762-768.
- Mallon PT, McKay D, Kirk SJ, Gardiner K. Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007. 3:CD005573. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005573.pub2>
- Maruyama M, Abe R, Shimono T, Iwabuchi N, Abe F, Xiao JZ. The effects of non-viable *Lactobacillus* on immune function in the elderly: a randomised, double-blind, placebo-con-

- trolled study. *Int J Food Sci Nutr*. 2016. 67:67-73.
- Niu HL, Xiao JY. The efficacy and safety of probiotics in patients with irritable bowel syndrome: Evidence based on 35 randomized controlled trials. *Int J Surg*. 2020. 75:116-127.
- O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 2006. 7:688-693.
- Park SC. Ethanol oxidation is accelerated by augmentation of malate-aspartate shuttle with aspartate. *Kor J Biochem*. 1993. 25:137-143.
- Racker E. Alcohol dehydrogenase from baker's yeast. *Meth Enzymol*. 1955. 1:500-503.
- Rao RK, Samak G. Protection and restitution of gut barrier by probiotics: nutritional and clinical implications. *Curr Nutr Food Sci*. 2013. 9:99-107.
- Rocha-Ramírez LM, Hernández-Ochoa B, Gómez-Manzo S, Marcial-Quino J, Cárdenas-Rodríguez N, Centeno-Leija S, et al. Evaluation of immunomodulatory activities of the heat-killed probiotic strain *Lactobacillus casei* IMAU60214 on macrophages in vitro. *Microorganisms*. 2020. 8:79. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010079>
- Sang LX, Chang B, Wang BY, Liu WX, Jiang M. Live and heat-killed probiotic: effects on chronic experimental colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. *Int J Clin Exp Med*. 2015. 8:20072-20078.
- Seo MJ, Kang BW, Park JU, Kim MJ, Lee HH, Kim NH, et al. Effect of fermented *Cudrania tricuspidata* fruit extracts on the generation of the cytokines in mouse spleen cells. *J Life Sci*. 2013. 23:682-688.
- Shumate RP, Crowther RF, Zarafshan M. A study of the metabolism rates of alcohol in the human body. *J Forensic Med*. 1967. 14:83-100.
- Sugahara H, Yao R, Odumaki T, Xiao JZ. Differences between live and heat-killed bifidobacteria in the regulation of immune function and the intestinal environment. *Benef Microbes*. 2017. 8:463-472.
- Ting WJ, Kuo WW, Hsieh DJY, Yeh YL, Day CH, Chen YH, et al. Heat killed *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 reduces fibrosis effects on the liver and heart in high fat diet-hamsters via TGF- β suppression. *Int J Mol Sci*. 2015. 16:25881-25896.
- Tottmar SOC, Petterson H, Kiessling KH. The subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenase in rat liver. *Biochem J*. 1973. 135:577-586.