

Dextran Sodium Sulfate로 대장염을 유도한 흰쥐에서 케피어 원말의 장보호 효과

고영은* · 김미경** · 조한영** · 이인영** · 이선영**

충남대학교 생활과학대학 식품영양학과,* (주)더멋진바이오텍**

Protective Effect of Kefir Grain Against Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Rats

Ko, Young Eun* · Kim, Mi Kyoung** · Cho, Han Young** · Lee, In Young** · Ly, Sun Yung**

Department of Food and Nutrition,* Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
DMJ Biotechnology Research Institute,** DMJ Biotech Corp., Chungnam 339-824, Korea

ABSTRACT

Probiotics have emerged as a potential treatment modality for numerous gastrointestinal disorders, including IBD. However, few probiotics have undergone appropriate preclinical screening in vivo. Kefir is considered a probiotic, benefiting the host through its effects in the intestinal tract. Despite numerous studies examining the action of probiotics on the host organism, few have analyzed the effects on intestinal environment. We assessed the protective effect of kefir for three weeks before inducing colitis with 2% dextran sodium sulfate for five days. The DSS loads were similar in all DSS treatment group. The results of the experiment are as follows. Food intake and FER of experimental groups were not significantly different each other, but water consumption tended to be higher in all DSS treatment groups as compared with the normal control. And visual inspection of feces revealed mild diarrhea in rat given 2% DSS. The anti-inflammatory activity of kefir was determined by myeloperoxidase activity during the DSS treatment, and there was no significant difference in any group. The levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as a colonic lipid peroxidation were significantly lower in the kefir intake groups than in rats treated with 2% DSS alone. The DNA % in tail and tail moment values as a DNA damage level of the blood lymphocytes in kefir intake groups tended to be lower than 2% DSS treatment alone, especially tail lengths were significantly diminished. According to the colonic histopathological assay, there were a severe inflammation of lamina propria and submucosa and mild edema in mucosa and sub mucosa in DSS alone treated group. We found a slight regenerative change in kefir treatment groups. In our experiments, this means that ulcerative colitis related to oxidative injury might be prevented by kefir as a probiotic. Further studies of the potential benefits of kefir as a probiotic in inflammatory condition are encouraged. (Korean J Nutr 2008; 41(5): 391~401)

KEY WORDS: kefir, DSS-induced colitis, thiobarbituric acid reactive substances, DNA fragmentation.

서 론

염증성 장질환 (inflammatory bowel disease, 이하 IBD)은 궤양성 대장염 (Ulcerative colitis, 이하 UC)과 크론병 (Crohn's disease, 이하 CD)으로 분류되는데 이 중 UC는 서구를 중심으로 많이 발생하고 병인이 불분명하며 비특이적인 조직학적 변화를 특징으로 한다. UC와 CD는 체중 감소, 점막이나 혈액을 동반한 설사, 발열, 장 운동장애

에, 결장의 단축과 같은 장과 장외 병리학적 징후를 나타내며¹⁻³⁾ UC 환자의 3% 내지 13% 정도가 대장암으로 진행된다고 보고되어있다.⁴⁾ UC의 경우 상피세포의 괴사와 궤양에 따른 결장 손상부위에 호중구의 침윤을 그 특성으로 하며 crypts 손실, 무더짐 (blunting)과 점막층의 궤양을 보여준다.⁵⁾ 소장 상태는 대식세포와 같은 임파구의 활성화에 의해 조절되는데⁶⁾ 활성화된 수많은 호중구와 대식세포는 대장의 손상된 점막으로 들어가고 nitric oxide (NO)와 활성 산소의 과잉 형성을 초래하여⁷⁾ 세포 및 DNA의 손상을 유도할 수 있다. 그것은 또한 유전자의 변이를 거쳐 암으로 발전 할 수 있다.⁸⁾ 최근 여러 다양한 실험동물 모델의 개발, 새로운 연구 기술의 발전에 힘입어 유전적, 환경적 인자와 면역학적 이상이 염증성 장 질환에 복합적으로 작용

접수일: 2008년 7월 9일 / 수정일: 2008년 7월 15일

채택일: 2008년 7월 17일

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: sunly@cnu.ac.kr

용한다는 가설이 받아들여지고 있다.¹⁾

IBD 동물 모델 확립 방법에는 dextran sodium sulfate (DSS),⁹⁻¹¹⁾ trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)¹²⁾ 등의 화학약품을 사용하는 방법과 IL-2, IL-10, T 세포 수용체 결핍 생쥐 (cell receptor-deficient mice)를 만드는 방법¹³⁻¹⁵⁾ 등 여러 가지가 있으나 5% DSS로 케양성 대장염을 유발한 동물 모델이 유효 성분 에 대한 치료 효과를 연구하는데 있어서 가장 좋은 모델임이 보고되고 있다.¹⁶⁾ DSS로 대장염을 유도한 동물 모델은 Okayasu 등⁹⁾에 의해 처음 확립되었으며 이 모델은 사람의 급·만성 UC 증상과 유사한 표현형 (phenotype)으로¹⁷⁾ crypt 단축, crypt 탈락의 진행, 점막 염증과 상피의 미란 (erosion)같은 조직학적 변화를 일으킬 수 있다.¹⁾ 또한 대장 상피세포에 손상을 주어 주로 좌측 대장에서 케양과 대장 길이의 축소 등이 관찰되었으며 장기 투여시 발암단계의 초기변화인 aberrant crypt foci (ACF)가 관찰되면서 선암이 유발되기도 하고 임상적 증상으로 설사와 혈변이 나타나기도 한다.²⁾ 이러한 DSS 유도 모델은 식수에 DSS를 섞어 투여할 때 투여 용량에 따라 일정 정도의 염증이 유발되는 비교적 간단하고 재현성이 높은 방법이기 때문에 대장염 조절을 위한 새로운 합성 화합물의 효능평가에 많이 사용되는 가장 오래된 실험 모델 중 하나이다.^{10,18)}

현재 케양성 대장염의 치료제로는 주로 glucocorticoid와 sulfasalazine 등이 사용되고 있으나 이들은 심각한 부작용을 야기하는 것으로 보고되고 있어^{19,20)} 부작용이 없는 프로바이오틱스인 생균제가 대안으로 제시되어 많은 연구가 진행 중이다. 일반적으로 프로바이오틱스는 체내 사이토카인 조절, 항암, 면역증진, 염증성 장질환 완화, 점막 개선 효과 등의 건강 증진 작용을 나타내는 것으로 알려지고 있다.²¹⁾

최근 프로바이오틱스로서 그 기능성에 관한 연구가 진행 중에 있는 커피어 (kefir) 발효유²²⁾는 커피어 그레인 (kefir grain)이라는 미생물군체를 우유에 넣어 발효시켜 만드는 유산균 음료이다. 커피어 그레인은 유산균인 *Lactobacilli*, *Lactococci*, *Leuconostocs*와 효모의 복합체로서 일반 유산균과는 다른 특성을 지닌다. 커피어 발효유는 필수 아미노산을 함유하고 있으며 일반 유산균 발효 유제품과 달리 효모와 유산균에 의하여 생산된 biotin, niacin, pyridoxine, folic acid와 같은 비타민 B군을 풍부하게 함유하고 있다.^{22,23)} 또한 커피어 그레인의 살아있는 효모와 박테리아는 소화를 돕고 장내 환경을 깨끗하고 건강하게 유지시켜 줌으로써 발효유의 가장 보편적인 형태인 요구르트보다 더 높은 영양적인 가치를 제공한다고 하였으며 항균, 면역증강, 항암, 정장작용을 통한 소화촉진 작용 등이 보고되고 있

다.^{22,24,25)} 그러나 대부분의 커피어의 효능평가와 관련된 연구들이 면역 증강의 측면에서 보고되어 왔기 때문에 장기능 개선 효능에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

유럽계에서는 전 세계적으로 이러한 커피어의 이점에 대해 주목하기 시작하였다. 러시아연방국가에서는 전체 발효유 소비량의 70%를 차지할 정도로 커피어 발효유는 국민들이 애용하는 음료로 자리하고 있으며 동부 및 북부유럽 국가들, 또한 그리스, 브라질, 이스라엘 등에서도 커피어 음료는 잘 알려져 있다.

최근 미국에서는 이국풍의 음료로 커피어 음료가 유통되고 있으며 일본에서도 섭취인구가 늘어가는 추세이다. 한국에서도 이러한 건강상 이점을 취하기 위하여 한 때 많은 가정에서 커피어 발효유를 직접 제조하여 섭취하던 시기가 있었으나 발효기간이 조금만 길어져도 강한 신맛이 발생되고 발효 조건이 지켜지지 않으면 이취와 변색 등으로 인하여 커피어 발효유의 식감이 감소하는 등 지속적인 커피어 발효유 생산에 번거로운 면이 있어 점차 관심이 낮아져 왔다.

한편, 커피어 발효유를 대량 생산하기 위해서는 기존 유산균 음료와는 다른 발효온도, 배양시간, 유산균과 효모의 혼합배양 조건 등 별도의 생산라인을 갖추어야 하는 이유로 국내의 유럽계는 아직 대량 생산 체제를 갖추고 있지 못하고 있는 실정이다. 본 연구에서는 가정에서 커피어 발효유를 제조하는데 따른 불편함을 해소하고 보다 유익한 미생물체의 직접적인 섭취를 돕고자 생산된 커피어 원말체제의 건강기능성을 검토하고자 하였다.

이렇게 제조된 커피어 원말을 직접 섭취하였을 때 그의 건강기능성을 검토하기 위하여 3주 이상 커피어 원말을 섭취한 흰쥐에 2% DSS로 경증의 대장염을 유발시켰을 때 커피어를 섭취하지 않은 군들에 비해 어떠한 건강상 이점이 있는지를 비교 평가하고자 하였다.

연구방법

실험 재료

커피어 원말

실험에 사용한 커피어 원말은 (주)더멋진바이오텍으로부터 공급받아 실험에 사용하였으며 그 제조 방법은 다음과 같다. 살균한 전유에 10% *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus kefir*, *Kluyveromyces maxianus*로 구성된 커피어 그레인을 첨가하여 25°C에서 20시간 정치 배양하여 커피어 발효유를 제조하였다. 커피어 액상에서 커피어 그레인을 분리한 후 동결 건조 및 분쇄 과정을 거쳐 커피어 원말

을 제조하였다. 케피어 원말에는 10⁹ cfu/g 이상의 유산균과 10² cfu/g 이상의 효모가 포함되어 있다.

실험 동물 사육 및 사료

Samtaco Bio Korea (Osan, Korea)로부터 3주령의 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 구입하여 12시간 dark-light cycle로 조절된 실험실 내에 설치한 micro ventilation cage system (온도 23 ± 2℃, 습도 50 ± 5%) 내에서 사육하였다. 1주간 분말사료에 적응시킨 후 평균 체중이 비슷하게 네 군으로 나누어 4주간 실험사료로 사육하였다. 실험군은 정상대조군 (N군), DSS투여 대조군 (DC)과 두 군의 케피어 투여군으로 하였으며 실험 사료는 AIN-93M식이²⁶⁾를 기본으로 하여 대조군 사료와 케피어 원말을 각각 1.5%와 3.0% 혼합한 사료 (사료의 1.5%와 3.0%; 각각 DK-1.5군과 DK-3.0군)로 제조하였다. 케피어 원말은 전유에 케피어 원말을 접종하여 발효시킨 후 동결건조하여 분말화한 것으로 영양성분은 전지분유와 유사하므로 대조군 사료의 3%와 케피어 1.5%군 사료의 1.5%는 카제인 대신 전지분유로 대체하여 제조하였다 (Table 1).

대장염 유도

선행 연구결과^{18,27)}를 참고하여 dextran sodium sulfate (DSS, molecular weight, 36-44kDa)를 투여하여 대장염을 유도하였고 투여용량 역시 선행연구들과 예비실험을 통하여 최종 용용수 2% (W/V)로 5일간 투여하는 것으로 결정하였다. 3주간 케피어 식이를 한 후 같은 식이를 1주일간 더 유지하면서 대장염유도군 (DC, DK-1.5, 3.0군)에는 2% DSS 용액을 매일 조제하여 5일간 섭취시켰다. 총 DSS 섭취량과 섭취기간은 염증의 정도에 영향을 주므로 모든 동물의 1일 용용수 섭취량이 일정하도록 조절하였다.

실험 방법

시료수집 및 희생, 전처리

3주간 실험 식이를 섭취시키는 동안 체중 증가량은 일주일에 1회, 식이 섭취량은 2일에 한 번씩 측정하였다. 5일간 대장염을 유도하는 시기에는 식이 섭취량, 체중 증가량 및 용용수 섭취량을 매일 측정하였다. 변 수분함량은 대장염을 유도하는 5일 중 1, 3, 5일째의 변을 수거하여 측정하였다. 흰쥐의 항문을 자극하여 직장 내 보유된 신선한 변을 받아 105℃ dry oven에서 향량이 될 때까지 건조시킨 후 신선한 변의 무게와 건조된 변 무게의 차이로 변의 수분함량을 산출하였다. 희생 전 12시간 절식시킨 실험 동물을 diethyl ether로 가볍게 마취한 후 헤파린 처리한 주사기를 이용하여 heart puncture하였으며 전혈의 일부

Table 1. Composition of control and experimental diet (g/kg diet)

Ingredient	Normal	DK-1.5	DK-3.0
Corn starch	620.7	620.7	620.7
Casein	110	110	110
Whole milk powder	30	15	-
Kefir	-	15	30
Sucrose	100	100	100
Soybean oil	40	40	40
Cellulose	50	50	50
Mineral mix ¹⁾	35	35	35
Vitamin mix ²⁾	10	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
L-Cystine	1.8	1.8	1.8
<i>Tert</i> -butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008

1) AIN-93M-MX composition (%): Calcium Carbonate (35.70), Potassium phosphate monobasic (25.00), Potassium Citrate: monohydrate (2.80), Sodium Chloride (7.40), Potassium Sulfate (4.66), Magnesium Oxide (2.43), Ferric Citrate (0.606), Zinc Carbonate (0.165), Manganous Carbonate (0.063), Cupric Carbonate (0.031), Potassium Iodate (0.001), Sodium Selenate (0.001), Ammonium Paramolybdate (0.001), Sodium Meta-silicate (0.145), Chromium Potassium Sulfate (0.028), Lithium Chloride (0.002), Boric Acid (0.008), Sodium Fluoride (0.006), Nickel Carbonate: hydroxide tetrahydrate (0.003), Ammonium Vanadate (0.001), Sucrose finely ground (20.95)

2) AIN-93M-VX composition (%): Nicotinic Acid (0.30), Calcium Pantothenate (0.16), Pyridoxine HCl (0.07), Thiamin HC (0.06), Riboflavin (0.06), Folic Acid (0.02), D-Biotin (0.002), Vitamin B12: 0.1% in mannitol (0.25), DL-Alpha Tocopheryl Acetate: 500IU/g (1.50), Vitamin A Palmitate: 500,000IU/g (0.08), Vitamin D3 50,000IU/g (0.02), Vitamin K (0.007), Sucrose finely ground (97.47)

는 Comet assay와 혈구 분석 (CBC)에 사용하고 나머지 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈장을 취해 -20℃에서 냉동 보관하였다가 혈장 성분 분석에 사용하였다. 채혈 후 ligament of Treitz로부터 회맹관까지의 소장 취하여 1/2씩 공장과 회장으로 나누어 생리식염수로 행군 후 각 장의 초기 부분 1 cm씩 잘라 DNA와 단백질 함량 측정에 사용하였다. 결장은 식염수로 내장을 세척하고 수분을 제거한 후 조직검사용 시료로 0.5 cm를 잘라 중성 포르말린에 담그고 나머지 결장을 반씩 잘라 앞부분은 지질과산화물 측정하는데 사용하였으며 나머지 결장 조직은 myeloperoxidase (MPO) 활성 측정에 사용하였다.

혈장과 결장의 지질과산화 측정

지질과산화는 Ohkawa²⁸⁾의 방법을 이용하여 혈장과 결장조직 내 생성된 malondialdehyde (MDA)의 수준을 thiobarbituric acid reactive substances로 측정하였다. 결장의 지질과산화 측정을 위해서 결장조직의 무게를 측정 후 1.15%의 KCl 완충용액으로 균질화한 10% 조직액을 시료로 이용하였다. 조직 균질액 200 μl에 8.1% SDS 200 μl와 400 μl의 20% acetic acid를 혼합한 후 200 μl의

0.8%의 TBA를 넣고 100°C의 항온수조에서 30분간 가열하였다. 냉각후 1,1,1,3-tetraethoxypropane (TMP)을 표준용액으로 사용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화물은 MDA nmol/mg protein으로 표기하였다.

소장 점막의 단백질 함량

소장 점막의 단백질 함량은 Bradford 법²⁹⁾에 의하여 제조된 Bio-Rad 사의 단백질 측정용 kit 시약을 사용하여 측정하였다. 0.1N NaOH 용액내에서 polytron homogenizer로 소장을 균질화한 후 30초간 초음파 파쇄하여 원심분리하였다. 상층액을 취해 발색시약 (Commassie brilliant blue G-250, Bio-Rad, USA)을 가하여 반응시킨 후 595 nm에서 흡광도를 읽어 단백질 함량을 측정하였다.

소장 점막의 DNA 함량

소장 점막의 DNA 함량은 Giles와 Meyer³⁰⁾ 등에 의하여 보완된 Burton³¹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 조직에 0.5N PCA (Perchloric acid)를 가하여 polytron homogenizer로 균질화 시킨 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 남은 침전물을 시료로 사용하였다. 시료를 0.5N PCA에 분산시키고 100°C에서 20분 동안 incubation 후 다시 원심 분리하여 얻은 상층액에 PCA와 diphenylamine 발색제를 가한 다음 냉암소에서 12시간 overnight하여 600 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 98 µg/ml의 DNA 표준용액 (SIGMA, USA)을 사용하였다.

결장의 MPO활성 측정

결장의 MPO측정은 Bradley²⁷⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 결장조직에 0.5% HTAB (hexadecyl-trimethylammonium bromide)를 가한 후에 얼음위에서 polytron homogenizer를 이용하여 균질화하였다. 조직균질액을 -70°C에서 30분간 냉동하고 해동함을 3회 반복한 다음 원심분리하여 상층액 0.1 ml를 취하고 여기에 반응시약 (0.167 mg/ml O-dianisidine dihydrochloride, 0.0005% hydrogen peroxide, 50 mM potassium phosphate, pH 7.0)을 가하여 반응시킨 다음 460 nm 파장에서 H₂O₂의 분해에 따른 흡광도의 변화를 측정하여 myeloperoxidase (MPO)의 활성도를 결정하였다.

DNA fragmentation 측정

혈액 백혈구의 DNA fragmentation을 측정하기 위하여 선행연구³²⁾에서 기술한 방법대로 alkaline comet assay를 실시하였다. 세포핵의 image는 Komet 5.5 image analyzing system (Andor, UK)을 이용하여 분석하였다. DNA 손상 정도는 핵으로부터 이동한 DNA파편의 거리 (tail length, TL)

와 tail 내의 DNA 파편 함량 (%), 그리고 tail 길이와 tail내 DNA 파편 (fragment)의 곱으로 표시한 tail moment (TM)로 나타내었다. 각 시료마다 준비된 2개의 slide에서 각각 50 개씩 총 100개의 세포핵을 무작위로 선택하여 측정하였다.

조직학적 분석

10% 중성 포르말린 용액 (NBF: natural buffered formalin)에 고정시킨 결장 조직을 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 µm 두께의 연속절편으로 제작하였다. 조직의 일반적인 성상을 관찰하기 위하여 절편한 조직을 Xylene을 이용하여 탈파라핀 (deparaffination)한 후, ethanol을 농도별로 거치면서 가수 (hydration)시킨 후 hematoxylin에서 5분 동안 염색하고, 다시 1% acid alcohol 용액을 거친 후 ammonia water로 처리하였다. 다시 eosin용액으로 염색한 후 ethanol을 농도별로 거치면서 탈수 (dehydration)시킨 후 xylene을 이용하여 cleaning하여 구조적 형상을 광학현미경으로 평가하였다.

통계처리

실험 자료는 Windows용 SPSS package program version12.0을 이용하여 통계처리하였고, 실험결과는 평균치 ± 표준편차로 표시하였다. 네 군간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 한 후, Duncan's multiple range test로 변인간의 차이를 검증하였다. 모든 통계적인 유의성은 $\alpha = 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결 과

식이 섭취량, 식이 효율 및 음용수 섭취량

4주간의 실험기간동안 식이섭취량은 네 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 식이효율은 정상대조군에 비하여 DSS를 공급받은 모든 군 (DC, DK-1.5, DK-3.0군)에서 낮아지는 경향을 보였다. 음용수 섭취량 역시 정상대조군에 비하여 DSS를 투여받은 모든 군에서 높은 경향을 보였다. DSS 투여군들의 DSS 부하량은 군 간에 차이가 없었다 (Table 2).

변의 성상 및 수분함량

대장염을 유도하는 5일 동안 대조군에 비하여 DSS투여군들의 변의 경도가 감소하는 경향을 보였으나 혈변이나 변에 점액이 묻어나오는 등 심한 염증성 변화는 볼 수 없었다. 변내 수분함량은 정상대조군에 비하여 모든 DSS 처치군 (DC, DK-1.5, DK-3.0군)에서 유의적으로 높았으나 ($p < 0.001$) DK-1.5군과 DK-3.0군 간의 차이는 보이지 않았다 (Table 3).

Table 2. Food intake, food efficiency ratio, water/DSS intake and DSS load in rats during experimental period

Group	Food intake (g/day)	FER ¹⁾	Water intake (ml/day)	DSS load ²⁾ (mg/g BW)
Normal	19.18±2.72 ³⁾	0.25±0.07	17.72±3.93	0.00±0.00 ^{a4)}
DC	19.08±1.92	0.19±0.04	21.34±3.74	0.43±0.07 ^b
DK-1.5	17.81±1.95	0.18±0.06	20.81±2.06	0.42±0.04 ^b
DK-3.0	18.05±1.93	0.21±0.05	21.68±2.52	0.43±0.05 ^b
p-value	0.486	0.081	0.069	0.000

1) Food efficiency ratio = weight gain (g)/food intake (g)

2) DSS load = total drink intake (ml) × DSS concentration (mg/ml)/initial body weight (g)

3) Values are mean ± S.D. (n = 8)

4) Values with different superscript within the same column indicate significant differences (p < 0.05) among groups by Duncan's multiple range test

Normal: fed the normal diet group, DC: Induction of colitis with control diet fed group, DK-1.5: Induction of colitis with 1.5% Kefir containing diet fed group, DK-3.0: Induction of colitis with 3% Kefir containing diet fed group

Table 3. Effect of kefir grain on fecal water content

Group	1day	3day	5day
Normal	44.55±14.14 ^{1)a2)}	49.53±3.81 ^a	47.11±6.59 ^a
DC	60.82±5.94 ^b	60.92±2.88 ^b	60.92±2.54 ^b
DK-1.5	61.74±5.88 ^b	62.65±5.15 ^b	61.31±3.33 ^b
DK-3.0	59.37±5.53 ^b	59.52±6.42 ^b	64.45±8.19 ^b
p-value	0.001	0.000	0.000

1) Values are Mean ± S.D. (n = 8)

2) Values with different superscript within the same column indicate significant differences (p < 0.05) among groups by Duncan's multiple range test

조직학적 소견

각 군의 결장 조직 절편 중 정상 대조군의 시료 2개와 DC 군 및 kefir 투여군들(DK군들)의 시료 4개씩을 무작위 추출하여 조직 검사한 결과는 다음과 같다. 정상대조군의 결장 조직에는 어떠한 부종이나, 염증 증세를 보이지 않았으나 2% DSS로 대장염을 유도한 군에서는 점막층(muco-sa)과 점막하층(submucosa)에서 경미한 부종(edema) 현상이 관찰되었고 고유층(lamina propria)과 점막하층에서 심한 염증(Fig. 1B-D)을 관찰할 수 있었다. 케피어 투여 군에서는 점막하층에서 여전히 부종과 염증반응(Fig. 1C, D), 미란(erosion), crypt microabscess(미세농양)(Fig. 1C) 등이 보이고 있기는 하였으나 DK-3.0군에서는 부분적으로 erosion에 따른 재생성 변화가 보이고 있었다(Fig. 1D).

소장 단백질 및 DNA 함량

소장 점막의 단백질 함량은 회장에서 정상대조군에 비하여 DSS투여 대조군(DC군)에서 감소하는 경향을 보였으며 DK-3.0군에서는 증가하는 경향을 보여주었으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. DNA 함량은 처리군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 4).

혈장 및 결장에서의 TBARS와 MPO 활성

염증모델에서 지질과산화 지표인 TBARS (thiobarbitu-

ric acid reactive substances)는 혈장에서는 모든 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 염증 유발 부위인 결장에서는 정상대조군에 비하여 DC군이 유의적으로 높았다. 케피어를 섭취시킨 군들의 결장조직에서는 유의적으로 감소하여(p < 0.003) 정상대조군과 같은 수준을 보여주었으나 DK-1.5군과 DK-3.0군 간의 차이는 보이지 않았다. 염증지표인 MPO(Myeloperoxidase)의 활성은 모든 군에서 차이가 보이지 않았다(Table 5).

혈장 백혈구에서의 DNA 손상 정도

혈장 백혈구의 DNA fragmentation 정도를 관찰한 결과 tail-DNA함량(%)은 DC군이 N군에 비하여 증가하는 경향을 보였으며 케피어 섭취군에서는 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 아니었다. DC 군의 tail length는 N 군에 비하여 26% 높아 증가하는 경향을 보였으며 DC 군에 비하여 케피어를 섭취시킨 군(DK-1.5군, DK-3.0군)에서 유의적으로 감소하였다(p < 0.05). Tail moment 역시 유의적인 차이는 아니었으나 DC 군이 다른 군들에 비하여 높은 경향을 보여주었고 N 군과 DK 군들은 같은 수준에 있었다(Table 6).

고 찰

케피어 원말은 일반 요구르트의 경우와 달리 유산균과 효모를 함유하고 있으며 이들 미생물이 생산한 다당체와 비타민 B군을 풍부하게 지니고 있는 케피어 음료의 균주이다. 일반 가정에서 제조하여 섭취하는 케피어 음료(kefir milk)에 비하여 유산균과 효모, 다당체와 영양성분들을 훨씬 많이 함유하고 있는 케피어 원말을 그대로 섭취할 수 있다면 건강상 이점이 더욱 클 것이므로 케피어 원말 자체를 섭취할 수 있도록 가공한 케피어 제제는 그 나름대로 의의를 갖는다. 본 연구실에서는 이러한 목적으로 생산한 케피어 원

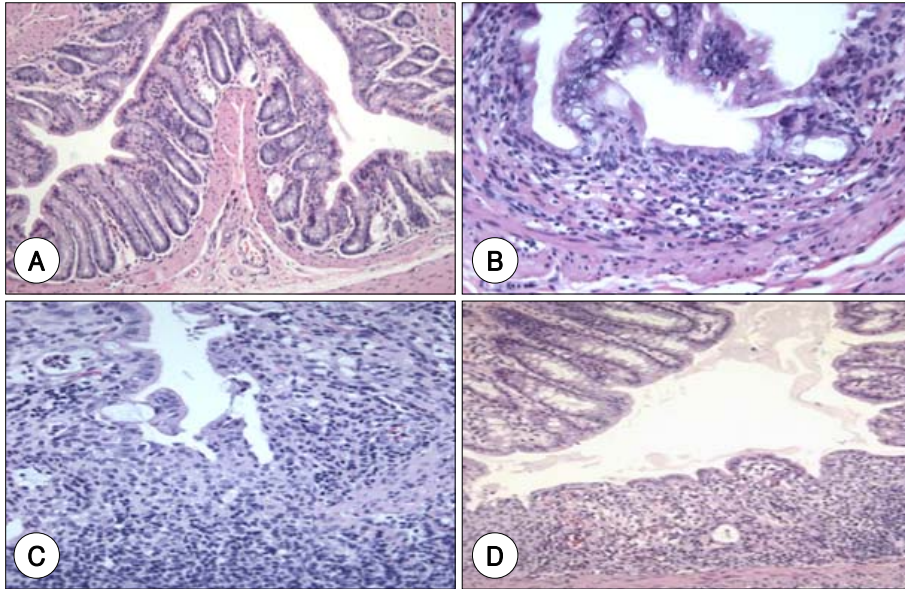


Fig. 1. Appearance of the colon in a normal group (A), a DSS treated group (B), a group receiving DSS plus Kefir 1.5% (C), and a group receiving DSS plus Kefir 3.0% (D). Hematoxylin and eosin staining. Magnification; × 200 (A, D) and × 400 (B, C). A: No sign of edema and inflammation. B: Severe inflammation of lamina propria. C: Severe inflammation with crypt microabscess of lamina propria & slight regenerative change. D: Slight regenerative change of erosion.

Table 4. Effect of kefir grain administration on intestinal levels of protein and DNA in rats

Group	Protein		DNA	
	Jejunum (mg/g tissue)	Ileum (mg/g tissue)	Jejunum (mg/g protein)	Ileum (mg/g protein)
Normal	90.27 ± 24.73 ¹⁾	73.47 ± 9.64	35.81 ± 7.31	44.73 ± 7.37
DC	73.13 ± 11.11	64.89 ± 7.14	41.69 ± 8.36	51.73 ± 9.77
DK-1.5	80.10 ± 30.77	64.86 ± 9.53	46.09 ± 23.46	48.97 ± 12.49
DK-3.0	79.46 ± 15.75	70.10 ± 8.43	44.61 ± 7.65	42.79 ± 6.55
p-value	0.509	0.159	0.464	0.235

1) Values are Mean ± S.D. (n = 8)

Table 5. Effect of kefir grain on TBARS and MPO activity in colon of rats

Group	TBARS		MPO
	Colon (nmole/mg protein)	Plasma (nmole/ml)	Colon (unit/g protein)
Normal	0.71 ± 0.08 ^{1)a2)}	4.69 ± 1.51	55.08 ± 32.70
DC	1.00 ± 0.37 ^{b)}	3.64 ± 1.21	67.52 ± 36.76
DK-1.5	0.57 ± 0.14 ^{a)}	3.36 ± 1.67	61.25 ± 44.95
DK-3.0	0.66 ± 0.13 ^{a)}	3.05 ± 1.07	58.94 ± 20.10
p-value	0.003	0.146	0.913

1) Values are Mean ± S.D. (n = 8)

2) Values with different superscript within the same column indicate significant differences (p < 0.05) among groups by Duncan's multiple range test

말의 *in vivo* 활성에 대한 연구가 필요하게 되었으며 본보에서는 특히 케피어 원말의 장기능 개선에 대한 효능을 알아보고자 하여 경증의 대장염을 유도한 동물모델을 사용하여 혈액과 소장, 대장에서 염증관련 지표 및 산화 관련 지표를 측정함으로써 케피어 원말이 대장의 보호효과를 나타낼 수 있는지를 확인하고자 하였다.

일반적으로 DSS로 대장염을 유도할 때는 5%의 용액을

Table 6. Inhibitory effect of kefir grain on DNA damage of blood leucocytes in rats

Group	Tail-DNA (%)	Tail Length (μm)	Tail Moment
Normal	11.23 ± 2.00 ¹⁾	42.90 ± 9.90 ^{ab2)}	6.55 ± 2.20
DC	12.94 ± 1.98	54.14 ± 14.76 ^{b)}	9.87 ± 3.60
DK-1.5	11.37 ± 3.29	35.47 ± 17.93 ^{a)}	6.49 ± 5.08
DK-3.0	10.67 ± 1.62	35.05 ± 13.98 ^{a)}	5.25 ± 2.79
p-value	0.259	0.044	0.086

1) Values are Mean ± S.D. (n = 8)

2) Values with different superscript within the same column indicate significant differences (p < 0.05) among groups by Duncan's multiple range test

용액으로 투여하므로 본 연구실에서도 5% DSS 용액을 사용하여 대장염을 유발하여 보았으나 혈변과 점액성 분비물의 배설 등 증세가 심각하게 나타났으므로 치료를 위한 약제가 아닌 건강기능식품의 예방 효과를 검증하기에 적합한 모델은 아닌 것으로 판단되었다. 따라서 보다 경한 대장염 증세를 유도하기 위하여 2%의 DSS를 5일간 투여하였으며 그 결과 분변에는 육안으로 보아 분별이 가능한 혈변이나 점액성 물질에 의한 변화가 보이지는 않았으나 변의 수

본 함량이 많아지고 동물의 수분섭취량이 증가하는 경향 등 경한 설사 증세가 발생하고 있었으므로 본 연구의 실험 동물 모델로 선택하였다. 이후 실험 종료시 실시한 조직병리학적 관찰을 통하여 이러한 사실이 확인되었는데 대조군에서는 염증과 관련된 어떠한 소견도 보이지 않았으나 2% DSS 유도군 들에서는 점막 및 점막하층에 경미한 부종과 염증소견이 보였으므로 2% DSS의 5일간 투여로 인하여 염증반응이 유도되었음을 확인할 수 있었다. Kefir 투여군의 경우 여전히 부종과 염증, 미란의 소견이 보이고 있으나 부분적으로 erosion에 따른 재생성 변화가 관찰되어 DC 군에 비하여 장 보호 효과를 예측할 수 있었다. 최근 연구들에 의하면 프로바이오틱스 (probiotics) 들은 회장낭염³³⁾과 궤양성대장염³⁴⁾을 포함하는 수많은 염증 질환에 대한 치료 및 예방 효과를 보이고 있다. 이러한 프로바이오틱스는 숙주에 정착하여 산을 생성함으로써 유해 세균의 번식을 억제하거나, 병원체의 생장을 저해하여 crypt cell의 증식을 유도하고 세포괴사를 저해하며,^{35,36)} proinflammatory cytokine 발현 감소, 장 면역계 조절,³⁷⁾ 항돌연변이, 항암 활성,³⁸⁾ 점막 점착형 병원균과 경쟁 작용^{37,39)} 등 수많은 기전을 통하여 건강 증진 효과를 나타낸다고 보고되고 있다. 현재 프로바이오틱스로 이용되는 균주로는 *Bifidobacterium*속, *Lactobacillus*속, *Enterococcus*속, *Clostridium butyricum*, *Lactobacillus sporogenes*, *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus polyfermenticus* 등이 있다.^{40,41)} DSS로 유도한 대장염 동물 모델을 사용한 연구에서도 프로바이오틱스 혼합체인 VSL#3 (4 *Lactobacillus*, 3 *Bifidobacteria*, 1 *Streptococcus* 균주)가 결장의 손상정도를 감소시키고⁴²⁾ 궤양성 대장염³⁴⁾과 회장낭염³³⁾에 유익한 효과가 있다고 보고된 바 있으며 이외에도 프로바이오틱스가 DSS로 유도된 대장염의 진전을 억제하였다는 연구결과들이 산발적으로 보고되어왔다.⁴³⁻⁴⁵⁾ 그러나 Doron 등은 미생물들의 작용기전은 모두 다르기 때문에 모든 프로바이오틱스가 동일한 작용기전으로 대장 염증이거나 설사증세를 개선하는 것이라고 볼 수 없다고 하였다.⁴⁶⁾ 본 연구에 사용되었던 캐피어 원말은 유산균과 효모, 그리고 발효시 생산되는 다당류와 영양소의 혼합체로서 일반 유산균에 비하여 더 다양한 생리활성을 기대할 수 있다.

장 점막내 DNA 함량의 증가는 점막의 증식이나 세포의 turnover를 시사한다.⁴⁷⁾ Fabia 등⁴⁸⁾은 대장염 유발 동물모델을 사용한 연구에서 DSS 대장염 유도군의 점막내 DNA 함량이 정상대조군보다 높다고 하였으며 이는 점막의 손상보다 점막의 재생이 더 빠르게 진행되기 때문이라고 하였다. 이에 반해 methotrexate로 장염을 유발한 군은 정상대조

군에 비하여 장내 DNA 함량이 낮았다고 보고되었다.⁴⁹⁾ 이때 외인성 *Lactobacilli*인 *L. plantarum*의 발효물을 투여한 군에서는 장염 유발군에 비하여 DNA 함량이 유의적으로 증가하였는데 이러한 결과는 균주의 투여가 점막의 영양학적 조성을 개선시킬 수 있음을 시사한다고 보고된 바 있다.⁴⁹⁾ Souza 등⁵⁰⁾은 대장염을 유발하였을 때 장점막의 DNA 함량이 낮아졌으며 프로바이오틱스를 투여한 경우는 대장 점막의 DNA 함량이 높아져 점막의 trophism이 증가하였다고 하여 위의 경우와 동일한 결과를 보고하고 있다. 본 연구결과 정상대조군에 비하여 DSS를 처치한 군의 회장에 국한하여 장 점막의 단백질 함량은 감소하고 DNA 함량은 증가하는 경향을 보여 Fabia 등의 연구 결과⁴⁸⁾와 유사한 결과를 보여주었다. 단, 이러한 결과가 통계학상 유의하지 않게 나타난 이유는 DSS 투여량이 적어 비교적 경미한 대장염이 유도된 결과로 볼 수 있다. 캐피어 섭취는 역시 통계학상 유의한 결과는 아니었으나 DC군에 비하여 DK-3.0군에서 정상대조군에 가까운 결과를 보여주어 투여 용량이나 기간을 조정한다면 좀 더 유의한 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

IBD의 주요 병리학적 특성은 다형핵 백혈구와 단핵구의 결장조직으로의 침윤이다. 호중구는 급성 장 염증이 일어나는 동안 손상된 점막으로 들어가고 활성산소종을 다량 생성하게 된다.⁵¹⁻⁵²⁾ 염증조직에 호중구가 침윤하면 외부항원을 파괴하고 손상된 조직을 재생하게 된다. 이러한 호중구 침윤의 측정방법 중 한 가지는 결장 점막의 MPO 활성을 측정하는 것으로 DSS로 유도된 급성 대장염에서 심각한 조직손상의 지표로 이용할 수 있다. Togawa 등⁵³⁾이 실험동물에 3일간 lactoferrin을 투여한 후 2.5%의 DSS를 7일간 투여하여 대장염을 유발하였을 때 결장조직의 MPO 활성은 정상대조군에 비하여 DSS를 처치받은 군에서 유의적으로 증가하였으며 lactoferrin을 투여한 군에서는 DSS 처치군보다 활성이 유의하게 저하되었으며 조직학적 분석 결과 호중구의 침윤 역시 감소하였다. 이러한 결과는 lactoferrin이 DSS를 투여한 대장의 점막 손상을 감소시키는 예방적 인자로 작용하고 호중구의 축적을 저해할 수 있는 인자임을 시사한다. 그러나 이러한 연구 결과들과는 달리 본 연구에서는 DSS 투여 후나 캐피어 투여 군에서 통계학상 유의한 MPO 활성의 차이가 보이지 않았고 정상대조군에 비하여 DSS를 투여한 군에서 증가하는 경향만을 보여주었는데 이는 개체간의 차이가 큰데서 비롯되는 결과로 볼 수 있다.

궤양성 대장염 모델의 동물에서 지질과산화는 조직 손상을 악화시키기 때문에 malondialdehyde (MDA)는 대장염 실험 모델에서 염증반응과 관련된 지표로 평가된다. 산화

적스트레스는 염증성 장 질환에서 점막 손상의 중요한 병인으로 여겨져 왔다.⁵⁴⁾ 또한 급성기의 IBD 환자에서는 정상인에 비하여 호중구와 단핵구 (macrophages)가 활성 산소 (oxygen-derived free radicals)를 다량 생성하여 과잉의 활성산소종 (ROS)이 생성되는 것으로 보고되어있다.⁵⁵⁾ 활성산소와 질소종은 단백질, 지방 그리고 핵산과 교차결합 (세포의 기능장애, 손상 및 최종적 사멸)함으로써 지질 과산화물을 유도하고 다른 세포내 산화적 스트레스를 유도하는 세포독성을 유발하므로⁵⁶⁾ 궤양성 대장염과 대장염 동물 모델의 결장 점막에서는 지질 과산화가 증가하게 된다. 이러한 산화적 스트레스는 glutathione같은 내적 항산화제를 고갈시키고 생체의 방어 시스템을 파괴한다.⁵⁷⁾ 따라서 항산화능을 가진 기능성 물질의 섭취는 대장염 증세를 개선시킬 수 있다. 현재 다양한 항산화제와 항염증제제가 궤양성 대장염 치료제로 이용되며 이들은 대장의 MDA의 수준을 감소시킨다고 보고되어왔다.⁵⁸⁻⁶¹⁾ DSS는 염증반응을 통하여 활성산소를 생성하고⁶²⁾ 세포의 DNA에 산화적 손상을 초래한다.^{47,56)} 반면, 녹차의 폴리페놀, dehydroepiandrosterone 등 항산화물질은 대장염의 증세의 악화를 완화시키는데 효과적이라는 것이 확인되었다. 본 연구 결과 정상대조군에 비하여 DSS를 투여한 흰쥐의 결장점막 조직내 TBARS가 유의하게 높아졌으나 커피어를 섭취시킴으로서 DSS 투여 후에도 TBARS의 수준이 낮게 유지되었다. DSS 투여로 인한 TBARS 수준의 증가는 8% DSS로 대장염을 유도한 동물의 MDA 수준이 정상 대조군에 비하여 높았다고 보고한 Naito 등⁵⁶⁾의 연구 결과나 만성 대장염 흰쥐 모델에서 결장내 MDA 수준이 증가되고 acetic acid로 대장염 유도 시 높은 MDA 수준을 나타낸 Girgin 등^{63,64)}의 연구 결과에서도 볼 수 있다. Güven 등⁶⁵⁾의 연구에 의하면 사염화탄소로 산화적 손상을 초래한 동물에서 커피어는 항산화효소 활성을 유의적으로 증가시켰다. 또한 Tsutomu 등⁶⁶⁾은 손상된 세포에 커피어 액상 추출물을 투여함으로써 세포내 활성산소종의 소거, 형태학적 변화 억제 등의 효과를 보여 커피어가 손상된 세포내 DNA를 회복시킬 수 있음을 제시하였다. 본 연구에서 혈장 백혈구의 DNA fragmentation를 살펴본 결과, DSS 단독투여군에서는 DNA 손상이 증가하였으며 커피어 원말 투여군에서는 정상대조군 수준으로 감소하여 위의 연구결과들과 유사한 결과를 도출하였다. 따라서 본 연구에서 사용한 커피어 원말이 DSS로 유도된 염증을 통한 산화적 스트레스에 대응하여 DNA 손상을 방어하는데 기여했다고 생각할 수 있으며 이 기전을 좀 더 명확하게 규명하기 위해서는 커피어 원말의 항산화 효능에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. TNBS로 대장염을

유도한 다른 연구에서 *L. fermentum*의 장 보호효과를 규명하고 이 방어기전은 결장내 glutathione의 수준 유지, proinflammatory cytokine 생성 감소와 단쇄지방산의 증가 같은 다양한 항산화 기전에 의한 것이라고 하였다.⁶⁷⁾ 따라서 커피어 원말의 장 보호효과 기전을 설명하기 위해서는 장내 단쇄지방산의 변화, 염증 반응 조절, 점막 barrier 안정성, 결장내 미생물 군주의 변화 등과 같은 다양한 잠재적 요인에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

요 약

커피어 원말은 유산균, 효모, 다당 및 여러 영양성분을 다량 함유하고 있으며 장기능 개선 효능을 살펴보기 위하여 3주령의 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 4군으로 나누어 정상대조군 (N군), DSS투여 대조군 (DC군)과 두 군의 커피어 투여군으로 하여 대조군 사료와 커피어 원말을 각각 1.5%와 3.0% 혼합한 사료로 3주간 사육하였다. 이 후 DSS 투여 대조군과 커피어 투여군들에 5일간 2% DSS 음용수 동일한 양을 투여하여 경미한 대장염을 유도하였다. 대장염 유도 후 희생하여 소장 단백질 및 DNA 함량, 혈장 및 결장의 조직검사와 결장조직에서 TBARS와 MPO 활성, 혈장 백혈구에서의 DNA 손상 정도를 측정하였다. 실험 자료는 Windows용 SPSS package program version12.0을 이용하여 통계 처리하였고, 네 군간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 한 후, Duncan's multiple range test로 변인간의 차이를 검증하였다. DSS 투여군 들에서 변 수분함량이 증가하고 음용수 섭취량이 증가하는 경향과 함께 결장의 조직검사 결과 DSS 투여군에서는 염증과 부종 증상을 관찰할 수 있었으며 식이무게의 3% 커피어 원말 투여군에서는 재생성 변화를 볼 수 있었다. DSS를 투여받은 군들의 소장 점막 단백질 함량은 감소하는 경향을 보였으며 커피어 3.0% 식이섭취한 군들에서는 증가하는 경향을 보였으나 DNA 함량에서는 차이를 볼 수 없었다. DSS 투여군에서는 결장 조직의 TBARS 값이 유의적으로 증가하였으며 커피어 투여군에서는 감소하였으나 커피어 투여 용량에 따른 차이는 보이지 않았다. 혈장 TBARS와 결장조직의 MPO 활성은 군 간에 유의한 차이가 없었다. DSS 투여군에서는 혈액 백혈구 DNA의 tail length가 유의하게 증가하였으며 커피어 투여군에서는 감소하였다. 따라서 약 4주간 커피어 원말의 투여는 2%의 DSS로 경미한 대장염을 유도한 흰쥐에서 결장 조직의 산화적 스트레스에 대한 저항력을 증가시켜 대장 점막을 보호할 수 있는 기능이 있음을 확인할 수 있었다.

■ **감사의 글**

연구는 2007-2008년도 대덕밸리바이오산업인력양성사업단 (NURI 사업단)의 산업체요구과제공동연구의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

Literature cited

- 1) Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205
- 2) Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(1): 79-94
- 3) Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; 87: 1344-1350
- 4) Weitzma SA, Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 1990; 76: 655-663
- 5) Stadnichi A, Cloman RW. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp* 2003; 51(3): 149-155
- 6) Grip O, Janciauskiene S, Lindgren S. Macrophages in inflammatory bowel disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003; 2: 115-160
- 7) Yoshida N, Yoshikawa T, Yamaguchi T, Naito Y, Tanigawa T, Murase H, Kondo M. A novel water-soluble vitamin E derivative protects against experimental colitis in rats. *Antioxid Redox Signal* 1999; 1: 555-562
- 8) Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 1994; 305: 253-264
- 9) Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98(3): 694-702
- 10) Ohkusa T. Production of experimental ulcerative colitis in hamster by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora. *Jpn J Gastroenterol* 1985; 82: 1327
- 11) Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994; 107(6): 1643
- 12) Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1983; 96(3): 795-803
- 13) Kimura I, Nagahama S, Kawasaki M, Kataoka M, Sato M. Study on the experimental ulcerative colitis model induced by dextran sulfate sodium in rat. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1996; 108(5): 259-266
- 14) Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient-mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75: 263-274
- 15) Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993; 75: 274-282
- 16) Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 109: 1344
- 17) Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein BE, Buchler MW. Characterisation of acute murine dextran sodium sulfate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* 2000; 62: 240-248
- 18) Kitajima S, Takoma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp. Animal* 1999; 48: 137-143
- 19) Msiewicz JJ, Lennard-hones JE, Connell AM. controlled trial of sulfasalazine in maintenance therapy for ulcerative colitis. *Lancet* 1965; 1: 185-188
- 20) Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 1993; 119: 1198-1208
- 21) Guamer F, Schaafsma GJ. Short communication Probiotics. *Int. Jour of Food Microbiol* 1998; 39: 237-238
- 22) Kandler O, Kunath P. *Lactobacillus kefir sp.*, component of microflora of kefir. *Syst. Appl Microbiol* 1983; 4: 286-294
- 23) Dong Shin Kim, Sang Kyo Park, Kwak Hae Soo, Kil Wang Lee. Isolation, Identification and Characterization of Lactose Non-fermenting Yeast from Kefir Cultures. *Korean J food Sci Resour* 1994; 14(2): 175-178
- 24) Garrote GL, Abraham AG, De Antoin GL. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *J. Food Prot* 2000; 63: 364-369
- 25) Shiomi MK, Sasaki M, Murofushi K. Aibara. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Jap J Medical Science and Biology* 1982; 35: 75-80
- 26) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123(11): 1939-1951
- 27) Bradley PR, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of Neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78(3): 206-209
- 28) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358
- 29) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
- 30) Giles KW, Myers A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1965; 206: 93
- 31) Burton KA. Study of conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 1965; 62: 315
- 32) Park SY, Seo DY, Suh KS, Ly SY. Oxidative stress of mouse fed with γ -Irradiated soybean diet. *Korean J Nutr* 2007; 40(2): 138-146
- 33) Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidini P, Vitali B, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Pro-

- phylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003; 124: 1202-1209
- 34) Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, Matteuzzi D, Campieri M. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 1999; 13: 1103-1108
 - 35) Ichikawa H, Huroiwa T, Inagaki A, Shineha R, Nishihira T, Satomi S, Sakata T. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. *Digestive Disease and Sciences* 1999; 44: 2119-2123
 - 36) Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 50959-50965
 - 37) Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, Sartor RB. Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* 2003; 52: 370-6
 - 38) Fuller R, Gibson GR. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand J Gastroenterol* 1977; 222: 28-31
 - 39) Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-519
 - 40) Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc* 2001; 101 (2): 229-238
 - 41) Furrie E. Probiotics and allergy. 2005; 64 (4): 465-469
 - 42) Biloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen, KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *American Journal of Gastroenterology* 2005; 100: 1539-1546
 - 43) Fujiwara M, Kaneko T, Iwana H, Taketomo N, Tsunoo H, Kanno J, Ohkusa T, Okayasu I. Inhibitory effects of Bifidobacterium longum on experimental ulcerative colitis induced in mice by synthetic dextran sulfate sodium. *Digestion* 2003; 67: 90-95
 - 44) Setoyama H, Imakka A, Ishikawa H, Umesaki Y. Prevention of gut inflammation by bifidobacterium in dextran sulfate treated gnotobiotic mice associated with bacteroids strains isolated from ulcerative colitis patients. *Microbes and Infection* 2003; 5: 115-122
 - 45) Osman N, Adawi D, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G. Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of Lactobacillus and Bifidobacterium. *Digestive Diseases and Sciences* 2004; 49: 320-327
 - 46) Doron S, Gorbach SL. Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006; 4 (2): 261-275
 - 47) Oz HS, McClain CJ, Nagasawa H, Mukunda R, Chen TS. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *Journal of Nutritional biochemistry* 2005; 16: 297-304
 - 48) Fabia R, Willen R, Ar'Rajab A, Andersson R, Ahrén B, Bengmark S. Acetic acid-induced colitis in the rat: a reproducible experimental model for acute ulcerative colitis. *Eur Surg Res* 1992; 24: 211-225
 - 49) Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, Adawi D, Stenram U, Morin G, Jeppsson B. The effects of Lactobacillus strains and Oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996; 111 (2): 334-344
 - 50) Souza MM, Aguilar-Nascimento JE, Gomes-da-Silva MH, Carlos Junior R. Effects of budesonide and probiotics enemas on the colonic mucosa of rats with experimental colitis. *Acta Cir Bras* 2007; 22 (1): 34-38
 - 51) Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Digestive Diseases and Sciences* 1988; 33: 6S-15S
 - 52) Lu J, Wang A, Ansari S, Hershsberg RM, McKay DM. Colonic bacterial superantigens evoke an inflammatory response and exacerbate disease in mice recovering from colitis. *Gastroenterology* 2003; 125 (6): 1785-1795
 - 53) Togawa J, Nagase H, Tanaka K, Inamori M, Nakajima A, Ueno N, Saito T, Sekihara H. Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002; 17 (13): 1291-1298
 - 54) Kurutas EB, Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kantarceken B. Effects of antioxidant therapy on leukocyte myeloperoxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase and plasma malondialdehyde levels in experimental colitis. *Mediators of inflammation* 2005; 6: 390-394
 - 55) Williams JG, Hughes LE, Hallett MB. Toxic oxygen metabolite production by circulating phagocytic cells in inflammatory bowel disease. *Gut* 1990; 31 (2): 187-193
 - 56) Naito Y, Takagi T, Ishikawa T, Handa O, Matsumoto N, Yagi N, Matsuyama K, Yoshida N, Yoshikawa T. The inducible nitric oxide synthase inhibitor ONO-1714 blunts dextran sulfate sodium colitis in mice. *European Journal of pharmacology* 2001; 412: 91-99
 - 57) Liu LN, Mei QB, Liu L, Zhang F, Liu ZG, Wang ZP, Wang RT. Protective effects of Rheum tanguticum polysaccharide against hydrogen peroxide-induced intestinal epithelial cell injury. *World J Gastroenterol* 2005; 11 (10): 1503-1507
 - 58) Mahgoub AA, El-Medany AA, Hager HH, Mustafa AA, El-Sabah DM. Evaluating the prophylactic potential of zafirlukast against the toxic effects of acetic acid on the rat colon. *Toxicol Lett* 2003; 145 (1): 79-87
 - 59) Mabley JG, Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Hasko G, Marton A, Szabo C, Salzman AL. Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284 (1): 138-144
 - 60) Cuzzocrea S, Mazzon E, Serraino I, eV, nova ML, oA, Caputi. Melatonin reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Pineal Res* 2001; 30 (1): 1-12
 - 61) Embvani E, Tardieu D, Jaeg JP, Corpet DE, Petit C. Dextran sulfate enhances the level of an oxidative DNA damage biomarker, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in rats colonic mucosa. *Toxicology Letters* 1998; 95 (1): 190
 - 62) Stucchi AF, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, Mcclung J, Shebini K, Moore F, O'brien M, Becker JM. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am J Physiol* 2000; 279: 1298-1306
 - 63) Girgin F, Karaoglu O, Erkus M, Tuzun S, Ozutemiz O, Dincer C, Batur Y, Tanyalcin T. Effects of trimetazidine on oxidant/antioxidant status in trinitrobenzenesulfonic acid-induced chronic colitis.

- J Toxicol Environ Health A* 2000; 59(8): 641-652
- 64) Girgin F, Karaoglu O, Tuzun S, Erkus M, Ozutemiz O, Dincer C, Batur Y, Tanyalcin T. Effects of trimetazidine in ethanol and acetic acid induced colitis: oxidant/anti-oxidant status. *Colorectal Disease* 1999; 1: 338-346
- 65) Güven A, Gülemez M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *J Vet Med* 2003; 50: 412-416
- 66) Tsutomu N, Junko N, Kiichirou T, Yoshinori K, Sun-yup S, Ken-ichi K, Sennosuke T, Koichiro T, David WB, Sanetaka S. Suppression of UVC-induced cell damage and enhancement of DNA repair by the fermented milk, Kefir. *Cytotechnology* 2002; 40: 125-137
- 67) Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Adrio JL, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. Lactobacillus fermentum, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *International Journal of Colorectal Disease* 2006; 21: 737-746