

대두, 홍삼, 진피로 구성된 발효 추출물의 항염증 효능에 관한 연구

이종록^{1#}, 김영우², 변성희², 김상찬², 박숙자^{2*}

1 : 대구한의대학교 제약공학과, 2 : 대구한의대학교 한의과대학 한의예과

Anti-inflammatory effects of the fermentation extracts consisting of soybean, red ginseng and *Citrus Unshiu* Peel

Jong Rok Lee^{1#}, Young Woo Kim², Sung Hui Byun², Sang Chan Kim², Sook Jahr Park^{2*}

1 : Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University

2 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Fermentation of herbs has been known to be helpful in improving the immune systems and protecting body against disease. The present study was conducted to evaluate anti-inflammatory effects of the fermentation extracts (FE) consisting of soybean, red ginseng and *Citrus Unshiu* Peel in lipopolysaccharide (LPS)-activated Raw264,7 cells.

Methods : FE were prepared by the fermentation with *Bacillus Subtilis* and then by extraction with ethanol (95%; prepared by the fermentation process). Cell viability was measured by MTT assay. Nitric oxide (NO) production was measured in culture media by Griess assay. The expression of nuclear factor (NF)- κ B and inhibitory kappa B alpha ($I\kappa$ B α) was determined by Western blot.

Results : LPS-induced production of NO and PGE₂ was dose-dependently decreased by the treatment of FE in Raw264,7 cells. These suppressive effects of FE on NO and PGE₂ production were related to the inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression. FE inhibited LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines, TNF- α , IL-6, and IL-1 β in a dose-dependent manner. Furthermore, FE inhibited the NF- κ B signaling pathway through the prevention of LPS-induced degradation of $I\kappa$ B α in cytosol and the nuclear translocation of NF- κ B.

Conclusions : These findings suggest that FE could have anti-inflammatory effects on LPS-induced inflammatory responses in macrophages.

Key words : Anti-inflammatory; fermentation extract; soybean; ginseng; *Citrus Unshiu* Peel; nitric oxide; cytokine; NF- κ B; Raw264,7 cells

서론

염증은 바이러스나 세균, 곰팡이와 같은 외부 병원체의 침입이나 국부적인 조직 손상으로부터 우리 몸을 보호하는 인체 방어 기전의 하나로, 면역 체계를 이루고 있는 다양한 염증 세포들에 의해 유도된다^{1,2)}. 이러한 급성 면역과 달리, 면역 반응이 강하면 자기의 세포나 조직을 공격하여 만성 면역 질

환을 일으키는 나쁜 의미의 염증 반응이 진행된다³⁾. 최근의 메르스 감염에서 살펴볼 수 있었던 것처럼, 젊고 건강한 환자들의 건강한 면역체계가 과잉 작동하면 사이토카인 폭풍 (cytokine storm)을 유도하면서 건강에 심각한 문제를 초래할 수도 있다는 것이다⁴⁾.

면역 반응으로 염증이 생기는 과정에는 다양한 물질이 관여하고 있다. 세균의 내독소인 LPS는 대식세포에서 NO, PGE₂

*Corresponding author : Sook Jahr Park, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Republic of Korea
· Tel : +82-53-819-1298 · Fax : +82-53-819-1860 · E-mail : haany@dhu.ac.kr

#First author : Jong Rok Lee, Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Republic of Korea
· Tel : +82-53-819-1804 · Fax : +82-53-819-1406 · E-mail : jrlee@dhu.ac.kr

· Received : 22 July 2015 · Revised : 02 October 2015 · Accepted : 02 October 2015

및 염증 매개 사이토카인(cytokine) 등의 생산을 자극함으로써 과도한 면역반응을 진행시키고 심한 염증을 일으키는 작용을 한다^{5,6)}. 극심한 염증은 신체 장기의 손상이나 부전을 동반하여 면역질환을 유발한다⁷⁾. 현대인들은 다양한 면역질환으로 고생하고 있으며 특히, 알레르기 질환이나 아토피, 비염 등은 몸의 면역체계가 무너져 생기는 질환 중에서 대표적이라고 할 수 있다⁸⁾.

발효는 미생물이나 균류 등의 효소작용에 의해 유기물을 분해하거나 다른 형태로 전환시킴으로써 새로운 물질을 만들어 내는 과정을 의미한다. 예로부터 발효는 술이나 된장, 간장과 같은 장류 등을 생산하는 제조 기술로 활용되어 왔으며⁹⁾, 유효성분을 보다 작은 분자단위로 분해하여 쉽고 빠르게 체내에 흡수될 수 있게 함으로써 면역력과 비위기능이 떨어지는 현대인들에게 적합한 제법으로 기대를 모으고 있다¹⁰⁾.

대두(大豆)는 필수아미노산의 함량이 높은 고단백식품으로 전통적으로 한국에서는 발효 숙성시킨 장류의 형태로 주로 섭취해 왔다. 발효과정에서 대두 단백질은 고초균(*Bacillus Subtilis*)의 효소작용에 의해 저분자의 아미노산으로 전환되고, 원료인 대두에 낮은 수준으로 존재하거나 함유되어 있지 않던 여러 대사산물들을 생산하게 된다¹¹⁾. 이러한 대사산물들에는 필수 아미노산, 이소플라본(isoflavone), 피틴산(phytic acid), 사포닌(saponin) 등이 있으며 발효대두가 나타내는 항산화¹²⁾, 혈압강화¹³⁾, 항비만¹⁴⁾ 등 생리활성 효과에 기여하는 것으로 보고되어져 있다. 한의학에서는 콩과(Leguminosae) 식물인 *Glycine max* Merrill의 종자 즉, 대두를 삶아서 발효시킨 것을 두시(豆豉)라고 하며 해표(解表), 제번(除煩), 선발울열(宣發鬱熱)의 효능이 있어 유행성 열병(熱病), 오한(惡寒), 학질(瘧疾), 두통(頭痛) 등을 다스리는데 사용되었다¹⁵⁾.

또한 *Aureobasidium pullulans*로 발효한 진피에서 배당체 형태의 플라보노이드가 체내 흡수율이 높은 aglycon 형태의 플라보노이드로 전환됨으로써 항당뇨와 같은 플라보노이드의 기능성이 강화됨이 보고되었다¹⁶⁾. 홍삼(紅蔘)과 같은 한약재도 발효를 통해 체내로 직접 흡수되지 않는 Rb1, Rb2, Rc 등의 사포닌 성분을 Rg3, compound K와 같은 최종대사산물로 전환함으로써 홍삼의 생리활성성분들이 잘 흡수될 수 있게 한다¹⁷⁾. 최근에 기존 사포닌이 발효과정에서 분해되어 생성된 Rg3, Rh2, compound K 등이 항산화, 항당뇨, 면역증진과 같은 다양한 생리 활성 효능을 가진다는 보고가 많아지고 있다^{18,19)}.

하지만 미생물의 효소작용으로 새로운 대사산물들이 생성되는 발효 물질은 식품, 의약품을 비롯한 다양한 분야에서 소재로 사용될 수 있으나 관련 연구의 부족으로 현재 그 응용범위가 많이 제한적인 상황이다. 이러한 측면에서 본 실험에 사용된 대두, 홍삼, 진피를 혼합하여 발효시킨 발효 추출물(FE)은 새로운 기능성 소재 탐색의 일레가 될 수 있을 것이다. 김은 이 세가지 약재를 적절한 비율로 배합하여 발효시킴으로써 항암능이 증진될 수 있음을 보여주었다²⁰⁾.

본 실험에서는 LPS로 활성화된 Raw264.7 cell에서의 NO 및 사이토카인 생성에 미치는 영향과 이러한 염증매개물질의 발현에 핵심적 역할을 하는 NF- κ B 신호전달 기작을 조사함으로써 FE의 항염증 효능을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약

Lipopolysaccharide (LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, DMEM, fetal bovine serum (FBS), antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였다. Actin, lamin A/C 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Bergheimer, Germany)에서 구입하였고, iNOS, COX-2, I κ B α , NF- κ B 항체는 Cell Signalling Technology (Irvine, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 발효 추출물의 준비

아래에 기술한 바와 같이 대두에 홍삼과 진피를 혼합하여 *Bacillus Subtilis*로 발효시킨 분말은 경북 포항에 위치한 (주)바이오빈P&F에서 공급받았다. 대두, 홍삼, 진피로 구성된 발효 분말을 준비하기 위해 대두는 삶아서 42~45℃의 온도를 유지하는 발효실에 넣고 48시간 1차 발효시킨 후, 대두의 5~10 중량%가 되도록 홍삼 분말을 혼합하여 25시간 2차 발효시켰다. 대두와 홍삼 혼합 발효물은 진피 분말을 25:75 중량비로 혼합하여 18시간 동안 3차 발효한 후에 제분(80 mesh)하였다.

대두, 홍삼, 진피로 구성된 발효 추출물은 주정(95% ethyl alcohol)을 사용하여 준비하였다. 먼저 발효 분말 1 kg 당 10 L의 주정에 담귀 72시간 동안 추출하여 filter paper (Watman, No.2)로 여과하였고, 60 ± 2℃에서 회전 감압농축기(EYELA, Tokyo, Japan)로 감압농축하고 freezer dryer (Labconco, USA)에서 동결건조하여 발효 추출물(fermentation extract, FE)로 사용하였다. 주정추출물의 수율은 9.4%였으며, 실험에 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

3. 세포 배양

Murine macrophage cell line인 Raw264.7 cells은 한국 세포주연구원(Seoul, Korea)에서 구입하여 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 모든 실험과정의 세포는 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 15 passages를 넘기지 않은 세포만 실험에 사용하였다.

4. MTT assay

Cell에 FE를 농도별로 처리한 후에 배양배지는 걷어내고 well당 50 µl의 MTT(0.1 mg/ml)시약을 넣고 4시간 동안 처리하여 생성된 dark formazan crystals을 dissolving solution (DMSO)에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader(Model MCC/340, Huntsville, AL)를 사

용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다²¹⁾. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) = 100 × (absorbance of treated sample) / (absorbance of control)].

5. 산화질소(nitric oxide, NO)생성량 측정

Raw264.7 cell을 LPS(1 µg/ml)로 activation하여 생성된 NO는 세포 배양액 중에 존재하는 nitrite ion(NO₂⁻)의 형태로 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 50 µl와 Griess시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 50 µl를 96 well plates에 혼합하고 암실에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader(Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다.

6. PGE₂의 측정

배양 배지속의 PGE₂를 측정하기 위하여 시판 ELISA kit(RnD Systems, MN, USA)를 사용하였다. 배양 배지는 coating된 96 well plate에 배지를 100 µl씩 첨가하고 primary antibody solution과 PGE₂ conjugate를 50 µl씩 각각의 well에 넣은 후 상온에서 2시간 동안 배양하였다. Washing buffer로 4회 세척하고 200 µl의 substrate solution에 30분간 반응시키고 stop solution을 50 µl를 처리한 후 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. Whole cell lysates 및 nuclear fraction의 준비

배양 세포는 10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 5 mM EDTA(pH 8.0), 130 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.2 M phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 함유하는 buffer로 녹였다. Cell lysates는 27-gauge needle로 3회 homogenizing하고 15분간 얼음에 방치한 후, 15,000 × g에서 15분간 원심분리하여 cell debris를 제거하고 상등액을 취하여 whole cell lysate로 사용하였다.

핵 속에 존재하는 NF- κ B 단백질 발현을 조사하기 위한 nuclear fraction은 시판되는 nuclear extraction kit (Chemicon International, Temecula, CA, USA)를 사용하여 준비하였다.

8. 단백질 농도 측정 및 Western blot analysis

단백질 농도는 Micro BCA protein assay reagent kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도로 측정하였고 bovine serum albumin (BSA)를 표준물질로 하여 standard curve를 작성한 후에 표준곡선에 따라 정량하였다. Total cell lysate 및 핵분획물은 30~50 µg의 단백질 양으로 취하여 10% gel의 전기영동으로 단백질을 분리하였고 nitrocellulose membrane으로 이전하였다. Nitrocellulose

membrane은 iNOS, COX-2, I κ B, NF- κ B, Actin, Lamine A/C 등의 1차 antibody를 가하여 반응시킨 후에 2차 antibody로 처리하였다. 면역반응성 단백질은 ECL chemiluminescence detection kit(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 확인하였다.

9. Cytokine 측정

Cytokine(TNF- α , IL-1 β , IL-6)은 ELISA Kit(Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따라 수행하였다. 배양배지는 수거하여 cytokine으로 coating된 96 well plate에 배지를 50 µl 씩 첨가하여 상온에서 2시간 동안 배양하였다. 50 µl의 biotinylated antibody reagent를 각각의 well에 처리하여 1시간동안 상온에서 반응시킨 후 3회 100 µl의 streptavidin-HRP solution을 각각의 well에 첨가하여 1시간 동안 상온에 반응하였다. 각각의 well에 TMB substrate 100 µl를 처리하고 30분간 반응시키고 stop solution 100 µl를 처리한 후 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10. 통계처리

연구 결과는 SPSS system(Statistical Package, SPSS Inc. USA)을 이용하여 ANOVA test 및 LSD로 $p < 0.05$ 수준에서 시료간의 유의성을 검정하였고, 모든 data는 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었다.

결 과

1. FE의 세포독성 평가

실험에 사용할 FE의 최적 농도를 결정하기 위하여 농도별로 대식세포에 처리하여 48시간 동안 배양한 후에 MTT로 4시간 동안 반응시켜 세포독성을 조사하였다. FE는 100 µg/ml부터 2배씩 희석하여 2.5 µg/ml까지의 농도 범위를 사용하여 배양한 결과 10 µg/ml 이상의 농도에서 세포 독성이 관찰되었다(Fig. 1A). 이에, 저농도 범위에서 세포독성을 유발하지 않는 농도 범위를 조사하였으며, Fig. 1B에서 나타난 결과로부터 발효한약재 주정추출물이 세포독성을 유발하지 않는 농도로 0.3, 1, 3 µg/ml를 결정하였다.

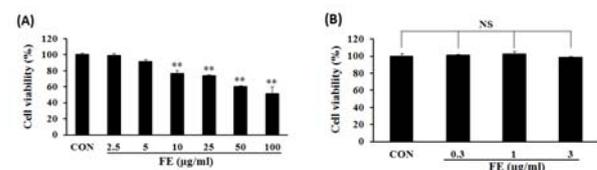


Fig. 1. Effect of FE on the cell viability in Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with FE for 48 h and then MTT cell viability assay was carried out. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments (, significant as compared to control, ** $p < 0.01$; NS, not significant).

2. FE의 NO 및 PGE₂ 생성에 대한 효과

LPS는 그람 음성균의 세포 외벽에 존재하는 내독소(endotoxin)로서 macrophage cell을 자극시켜 NO와 PGE₂ 같은 물질을 분비하여 염증 신호기작을 활성화시킨다. 따라서 과도하게 생성된 이 물질들에 대한 저해 효과를 살펴봄으로써 항염증 효능을 확인할 수 있다. 본 실험에서 FE가 NO와 PGE₂의 생성에 미치는 효과를 살펴본 결과, 세포독성을 유발하지 않는 농도 범위에서 FE(0.3, 1, 3 µg/ml)는 농도의존적으로 저해효과를 나타내었다(Fig. 2). NO는 LPS 단독 처리군에서 대조군(CON)에 비해 3.08배 증가하였으나 FE(3 µg/ml) 처리에 의해 2.08배로 감소하였다(Fig. 2A). 대조군에서 거의 관찰되지 않았던 PGE₂도 LPS에 의해 농도가 급격하게 증가(2761 pg/ml)하였으나 FE(3 µg/ml)에 의해 유의하게($p < 0.01$) 감소(1413 pg/ml) 되었다(Fig. 2B).

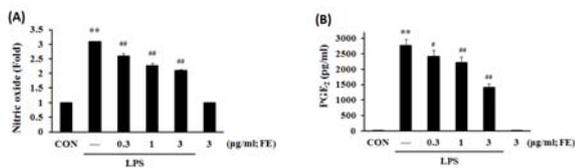


Fig. 2. Effects of FE on the production of NO and PGE₂ in LPS stimulated Raw264.7 cells.

The cells were treated with FE for 1h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and then further incubated for 24h. The cultured medium was collected and directly assayed for NO (A) and PGE₂ (B) as described in Methods. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments (*, significant as compared to control, ** $p < 0.01$; #, significant as compared to LPS alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$).

3. FE의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 대한 효과

LPS로 증가된 NO 및 PGE₂에 대한 FE의 억제효과가 이들을 생성하는 효소의 단백질 발현 감소에 기인하는지를 조사하기 위하여 western blot analysis를 실시하였다. iNOS와 COX-2는 정상상태에서는 존재하지 않고 LPS에 의해 유도되는 inducible enzyme으로서 대조군에서는 단백질 발현이 관찰되지 않았지만 LPS 처리에 의해 뚜렷하게 증가되었다. 하지만 iNOS와 COX-2 단백질 발현은 FE에 의해 농도의존적으로 유의하게($p < 0.01$) 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). LPS로 유도된 단백질에 대한 expression density를 1로 하였을 때, FE(3 µg/ml)에 의해 iNOS는 0.20, COX-2는 0.33의 density를 나타내었다(Fig 3B).

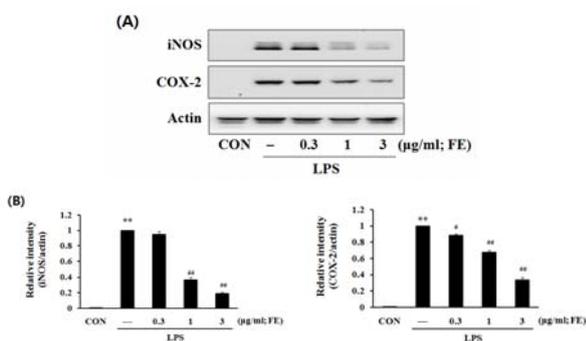


Fig. 3. Effect on the expression of iNOS and COX-2 proteins by FE. Expression levels of iNOS and COX-2 protein (A) were monitored 18h after treatment of cells with LPS (1 µg/ml) with or without ethanolic extracts of fermented herbs. Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. Expressions of iNOS and COX-2 protein were determined by western blot analysis using specific antibodies. Actin was used as a loading control. Bar graphs (B) show the densitometry of blot from all experiments in each group. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments (*, significant as compared to control, ** $p < 0.01$; #, significant as compared to LPS alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$).

4. FE의 사이토카인 생성에 대한 효과

Raw264.7 cell에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6를 포함하는 염증매개 사이토카인들은 LPS 자극에 의해 과도하게 생성되어 다양한 경로의 염증반응을 촉매하게 된다. 따라서 FE가 이러한 사이토카인의 과도한 생성에 미치는 영향을 살펴본 결과, FE는 염증매개 사이토카인에 대해 유의한($p < 0.01$) 억제효과를 보였다(Fig. 4). TNF- α 는 1, 3 µg/ml의 농도에서 유의한 억제효과가 나타났으며(Fig. 4A), IL-1 β 와 IL-6의 분비는 실험에 사용한 전농도 (0.3, 1, 3 µg/ml)에서 유의하게 감소되었다(Fig. 4B, C).

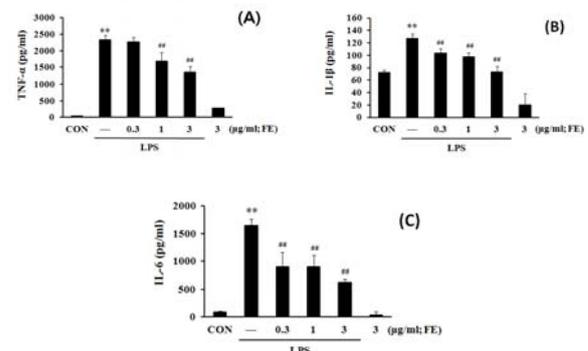


Fig. 4. Effect of FE on LPS-stimulated cytokine production. Production of TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) were measured in the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1 µg/ml) in the presence or absence of FE for 12 h. The amount of each cytokine was measured by immunoassay as described in Methods. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments (*, significant as compared to control, ** $p < 0.01$; #, significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$).

5. FE의 NF- κ B 신호전달경로에 대한 효과

본 실험에서 FE는 iNOS 및 COX-2의 발현을 저해하는 효과를 나타냈기 때문에 NF- κ B의 신호전달계에 연관이 있을 것으로 사료되어 western blot을 실시하여 I κ B α 와 NF- κ B 단백질 발현량을 조사하였다. I κ B α 의 단백질 발현은 LPS 처리에 의해 세포내에서 급격하게 감소하였으나, FE에 의해 그 감소정도가 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 그리고 핵분획에서의 NF- κ B는 LPS 처리에 의해 유의하게 증가하였으나, FE에 의하여 NF- κ B량이 유의성있게 ($p < 0.01$) 감소하였다. FE의 단독 처리에 의한 I κ B α 및 NF- κ B의 발현량 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 5B).

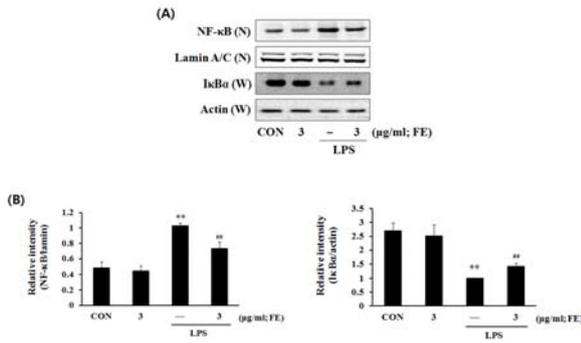


Fig. 5. Effects on the expression of $I\kappa B\alpha$ and $NF-\kappa B$ by FE. Expression level of $I\kappa B\alpha$ and $NF-\kappa B$ protein (A) were monitored 15 min and 60 min after treatment of cells with LPS (1 $\mu g/ml$) with or without FE (3 $\mu g/ml$). Actin and lamin A/C were used as loading controls for nuclear fractions (N) and whole cell lysates (W), respectively. Bar graphs (B) show the densitometry of blot from all experiments in each group. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments ($\bar{}$, significant as compared to control, $**p < 0.01$; #, significant as compared to LPS alone, $##p < 0.01$).

고찰

최근 전 세계적으로 발효식품이 체내 흡수율도 높고 생리 활성 작용도 뛰어나다는 연구 결과가 이어지면서 발효에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히, 건강 지향적 소비자들 사이에서 한약재에 발효 기술을 접목함으로써 그 효능을 극대화시킨 발효 한약에 대한 관심이 증대되고 있다¹⁰⁾. 발효한약의 유효성으로는 녹용 발효추출물의 흰쥐 장골(長骨) 길이 성장효과²²⁾, 발효 동충하초의 고혈압 개선 효과²³⁾ 등이 발표되었으며, 사삼, 오가피, 상백피 등 10여종의 한약재를 유산균으로 처리한 발효한약(신당노방)의 혈당 강하 효과²⁴⁾도 보고되어 있다.

발효 한약에 대한 관심 증가와 더불어 주목받고 있는 발효 기술은 한의학에서 근래에 급부상한 것이 아닌 수천년 동안 여러 질환을 다스리는데 활용되어져 온 제법 중의 하나이다. 대두를 삶아 발효시킨 두시(豉豲)를 비롯하여, 밀가루 또는 밀기울, 적소두(赤小豆), 행인니(杏仁泥), 개똥쥬즙(靑蒿汁), 도꼬마리즙(蒼耳汁), 버들여뀌즙(野薺汁) 등의 재료를 반죽하여 발효시킨 신곡(神麴)이 대표적 발효한약의 예라 할 수 있다. 신곡은 비(脾)를 튼튼히 하고 위(胃)를 조화시키며 소화를 촉진시키고 위기(胃氣)를 고르게 하는 데 사용되어 왔다²⁵⁾. 또한 동의보감에는 소젓이나 말젓, 양젓 등을 발효시킨 낙(酪, 타락), 수(酥, 졸인 젓), 제호(醞醐)를 한약으로 사용했다는 기록도 있다²⁶⁾.

본 연구에서는 FE의 항염증효과를 평가하기 위하여, LPS로 활성화된 Raw264.7 cell에서 발효한약재의 전처치가 염증 매개물질에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 그 결과, 발효한약재는 LPS로 유도된 NO와 PGE₂의 생성을 유의하게 저해하였을 뿐만 아니라 염증매개 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6도 저해함을 확인하였다. IL-1 β 는 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙, NK cell의 activity를 활성화하는 사이토카인이며²⁷⁾, TNF- α 는 macrophage와 mast cell 등에서 분비되어 LPS반응의 주요 매개체로서 만성염증 등의 면역반응의 수

행에 관여한다²⁸⁾. 또한, IL-6는 B-cell이 plasma세포로 분화되도록 촉진시키고 항체의 분비를 자극하는 사이토카인으로 염증 부위에서 항상 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 발효한약재는 이러한 사이토카인의 생성을 조절함으로써 과잉 작동한 면역시스템에서 유도되는 병적(病的)인 염증 반응을 조절하는데 관여할 수 있을 것으로 사료된다.

염증반응에 관여하는 것으로 알려진 $NF-\kappa B$ 는 iNOS와 COX-2의 발현을 조절하는 전사인자로 apoptosis의 억제, cell cycle의 조절, oncogenesis와 관련이 있으며³⁰⁾, TNF- α 등의 사이토카인 발현에도 관여하는 것으로 보고되어져 있다³¹⁾. 일반적인 상태에서 $NF-\kappa B$ 는 세포질에서 억제단백질인 I κB 와 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS 등의 자극에 의해 I κB 의 인산화가 진행되면서 $NF-\kappa B$ 로부터 분해 (degradation)가 일어나게 된다³²⁾. I κB 가 떨어져 나가 자유로워진 $NF-\kappa B$ 는 핵으로 전위하여 COX-2, iNOS 및 사이토카인 등의 전사를 유도하게 된다³²⁾. 본 연구에서 세포질 I κB 단백질의 발현은 LPS에 의해 감소하였으나 발효한약재에 의해 회복되었다. 핵분획에서의 $NF-\kappa B$ 는 LPS에 의해 증가되었고 발효한약재에 의해 감소하였다. 이 결과들은 I κB 의 발현감소로 자유로워진 $NF-\kappa B$ 가 핵으로 전위되는 과정을 발효한약재가 효과적으로 억제하고 있음을 의미한다.

본 실험에서 확인한 FE의 항염증 효과는 발효 과정을 새로이 생성되었거나 함량이 증대된 대사산물들에 기인할 것으로 사료된다. 이미 보고되어진 FE의 항암성 증진 효과도 발효과정에서 생성된 신규 단백질에 기인하는 것으로 밝혀졌다²⁰⁾. 발효과정에서 고초균, 유산균과 같은 미생물은 한약재의 구성성분을 분해하여 새로운 유용성분을 생성하게 되는데, 홍삼은 구성 사포닌을 발효를 통해 체내흡수가 용이한 Rg1, Rg3, compound K와 같은 저분자 물질로 전환함으로써 인체 흡수율을 증가시키는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. Compound K는 항당뇨, 면역증진 등의 효능이 보고되었으며^{18,19)}, 발효홍삼이 발효를 하지 않은 홍삼에 비해 더 높은 항염증, 항산화 활성을 나타낸다는 연구결과도 발표되었다^{33,34)}. 대두는 발효과정에서 대두단백질이 펩티드(peptide)나 여러 아미노산으로 분해되어 항당뇨 효능을 나타내며³⁵⁾, 이소플라본의 함량이 증진됨으로써 폐경기 장애의 완화 및 골다공증의 예방에 기여하는 것으로 보고되었다³⁶⁾. 체내에 바로 흡수될 수 있는 형태의 aglycone 플라보노이드의 함량이 극히 낮은 진피도 장내 미생물에 따른 효소활성의 차이에 의해 흡수되는 정도가 달라지며³⁷⁾, 치마버섯을 이용한 진피 발효 배양물에서는 플라보노이드 배대체가 aglycone 화합물로 생물전환 되어 항산화 및 항염증 효과를 증대시킬 수 있음이 보고되었다³⁸⁾. 본 연구에서 확인된 FE의 활성에 기여한 성분에 대한 이해를 돕기 위해서는 FE의 발효 대사산물에 대한 분석 및 그들이 어떻게 항염증 활성에 상호작용하는지에 대한 후속 연구가 진행되어야 할 것이다.

결론

본 연구에서는 LPS로 자극한 Raw264.7 cell에서 FE의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. LPS에 의해 과도하게 생성된 NO 및 PGE₂는 FE (0.3, 1, 3 µg/ml) 처리에 의해 유의하게 감소되었다.
2. FE에 의한 NO 및 PGE₂ 분비 감소 효과는 이 물질들을 생성하는 효소인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 감소로부터 기인하는 것으로 나타났다.
3. LPS에 의해 과도하게 생성된 염증매개 사이토카인 (TNF- α , IL-6, IL-1 β)은 FE에 의해 유의하게 감소되었다.
4. FE의 처리는 세포질 내 I κ B α 의 발현은 증가시키고, NF- κ B의 핵으로의 이동을 유의하게 감소시킴으로써 염증신호전달경로를 차단시켰다.

이상의 결과로부터 FE가 NF- κ B 신호전달경로 차단을 통해 염증매개인자들의 분비를 조절함으로써 항염증효과를 나타낼 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 중소기업청에서 지원하는 2011년도 산학협력 기술개발사업(No. 2011-115-5)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

1. Brevetti G, Giugliano G, Brevetti L, Hiatt WR. Inflammation in peripheral artery disease. *Circulation*. 2010 ; 122(18) : 1862-75.
2. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol*. 1997 ; 15 : 323-50.
3. Taub DD, Oppenheim JJ. Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther Immunol*. 1994 ; 1(4) : 229-46.
4. Clark IA. The advent of the cytokine storm. *Immunol Cell Biol*. 2007 ; 85 : 271-3.
5. Butchar JP, Parsa KV, Marsh CB, Tridandapani S. Negative regulators of toll-like receptor 4-mediated macrophage inflammatory response. *Curr Pharm Des*. 2006 ; 12(32) : 4143-53.
6. Agard M, Asakrah S, Morici LA. PGE(2) suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 ; 3 : 45.
7. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 2005 ; 307(5717) : 1920-5.
8. Leung DY, Boguniwicz M, Howl MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest*. 2004 ; 113 : 651-7.
9. Park KY. Increased health functionality of fermented foods. *Food Ind Nutr*. 2012 ; 17(1) : 1-8.
10. Choi YK, Sul JU, Park SK, Yu SN, Kim SH, Rhee MS, Ahn SC, Shin MS. Research trends of fermented medicinal herbs - based on their clinical efficacy and safety assessment. *J Life Sci*. 2012 ; 22(12) : 1729-39.
11. Park JW, Lee YJ, Yoon S. Total flavonoids and phenolics in fermented soy products and their effects on antioxidant activities determined by different assays. *Korean J Food Cult*. 2007 ; 22 : 353-8.
12. Son JH, Ha BJ. Antioxidative and antiaging effects of fermented soybean, rice bran, and red ginseng by mixed ratios. *J Fd Hyg Safety*. 2013 ; 28(4) : 354-9.
13. Shin ZA, Nam CW, Lee HS, Lee HJ, Moon TH. Fractionation of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J Food Sci Technol*. 1995 ; 27 : 230-4.
14. Nam EY, Kim DI, Choi MS, Kim HJ. Effects of fermented soybean on body weight, body fat and serum lipid in obese women. *J Korean Obstet Gynecol*. 2015 ; 28(1) : 58-72.
15. Professors of herbalogy, Colleges of Korean medicine in Korea. *Herbalogy*. Seoul : Younglimsa, 2010 : 194-5.
16. Park CD, Jung HK, Park CH, Jung YS, Hong JH, Ko HS, Kang DH, Kim HS. Isolation of citrus peel flavonoid bioconversion microorganism and inhibitory effect on the oxidative dDamage in pancreatic beta cells. *KSBB J*. 2012 ; 27 : 67-74.
17. Park SJ, Kim DH, Kim SS. Preparation and quality characteristics of the fermentation product of ginseng by lactic acid bacteria (FGL). *J Ginseng Res*. 2006 ; 30 : 88-94.
18. Kim DH. Metabolism of ginsenosides to bioactive compounds by intestinal microflora and its industrial application. *J Ginseng Res*. 2009 ; 33 : 165-76.
19. Trinh HT, Han SJ, Kim SW, Lee YC, Kim DH. Bifidus fermentation increases hypolipidemic and hypoglycemic effects of red ginseng. *J Microbiol Biotechnol*. 2007 ; 17 : 1127-33.
20. Kim TY. Method for preparing new protein having fungtion and anticancer effects. Korea patent. 2011 : number 10-1144471.
21. Sargent JM. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples. *Recent Results Cancer Res*. 2003 ; 161 : 13-25.
22. Lee S, Son J, Sohn J, Kim W, Lee S, Lee PJ, Leem K. Effects of herbal composition and fermented *Cervi Pantotrichum Cornu* on longitudinal bone growth in adolescent male rats. *Kor J Herbol*. 2009 ; 24(1) : 121-31.

23. Liu RL, Ren SF, Wang YZ. Influence of the fermentation Cordyceps sinensisfy powder on blood uric acid and lipid in the cases of essential hypertension. *World Clin Drugs*. 2006 ; 27 : 498-502.
24. Kim HY, Choi BH, Hwang HJ, Kim H, Lee KM, Hahm DH, Shim I, Lee HJ. Effect of the new diabetic formula on streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2004 ; 18(5) : 1331-6.
25. Kim DG, Kim MB, Kim H, Park JH, Lim JP, Hong SH. *Herb Medicinal Pharmacognosy*. Seoul : Shinilbooks, 2005 : 231-2.
26. Heo J. *Donguibogam*. Seoul : Namsandang, 2004 : 81.
27. Huang H, Patel DD, Manton KG. The immune system in aging: roles of cytokines, T cells and NK cells. *Front Biosci*. 2005 ; 10 : 192-215.
28. Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett*. 2013 ; 328 : 222-5.
29. Cassim B, Mody G, Bhoola K. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. *Pharmacol Ther*. 2002 ; 94 : 1-34.
30. Luqman S, Pezzuto JM. NF- κ B: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res*. 2010 ; 24 : 949-63.
31. Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002 ; 2 : 725-34.
32. Magnani M, Crinelli R, Bianchi M, Antonelli A. The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor- κ B (NF- κ B). *Curr Drug Targets*. 2000 ; 1 : 387-99.
33. Kim HJ, Chae IG, Lee SG, Jeong HJ, Lee EJ, Lee IS. Effects of fermented red ginseng extracts on hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ginseng Res*. 2010 ; 34 : 104-12.
34. Kim HJ, Lee SG, Chae IG, Kim MJ, Im NK, Yu MH, Lee EJ, Lee IS. Antioxidant effects of fermented red ginseng extracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ginseng Res*. 2011 ; 35 : 129-37.
35. Ra KS, Choi JW. Enhancement of cyclo-His-Pro (CHP) content from soybean fermented with *Bacillus amyloliquefaciens* CHP-12 and its anti-diabetic effect. *KSBB J*. 2011 ; 26 : 41-8.
36. Yoo HW, Chang MJ, Kim SH. Fermented soybeans by *Rhizopus oligosporus* reduce femoral bone loss in ovariectomized rats. *Nutr Res Pract*. 2014 ; 8(5) : 539-43.
37. Rhyu MR, Kim EY, Bae IY, Park YK. Contents of naringin, hesperidin and neohesperidin in premature Korean citrus fruits. *Kor J Food Sci Technol*. 2002 ; 34 : 132-5.
38. Song MH, Bae JT, Ko HJ, Jang YM, Lee JD, Lee GS, Pyo HB. Anti-oxidant effect and anti-inflammatory of fermented *Citrus Unshiu* peel extract by using *Schizophyllum commune*. *J Soc Cosmet Sci Korea*. 2011 ; 37(4) : 351-6.