

## Lipopolysaccharide로 유발한 급성 간손상 마우스 모델에서 와송과 발효 와송의 항산화 조절과 염증 예방 효과 비교 연구

강한은<sup>1#</sup>, 이아름<sup>2</sup>, 노성수<sup>2</sup>, 서영배<sup>1\*</sup>

1 : 대전대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

### Orostachydis Herba and Fermented Orostachydis Herba Enhances Anti-Inflammatory and Anti-oxidant Effect against Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Injury in Mice

HanEun Kang<sup>1#</sup>, AhReum Lee<sup>2</sup>, Seong-Soo Roh<sup>2</sup>, Young-Bae Seo<sup>1\*</sup>

1 : College of Korean Medicine, Daejeon University, Republic of Korea

2 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : This study aimed to evaluate the protective effect of Orostachydis Herba (OH) and Fermented OH (OHF) against the acute liver injury by lipopolysaccharide (LPS).

**Methods** : OHF by 4 lactic bacteria such as (*Lactobacillus hilgardii* (OHF1), *Leuconostoc mesenteroides* (OHF2), *Pediococcus acidilactici* (OHF3), *Saccharomyces cerevisiae* (OHF4)) were prepared. Samples were selected to OHF0, OHF2, OHF3 based on UPLC analysis, DPPH, ABTS radical scavenging activities. To evaluate the protective effect of OHF on liver injury mice, ICR mice were divided into 5 groups: Normal mice (Nor), LPS (20 mg/kg) treated mice (Veh), administrated OHF0, OHF2 OHF3 200 mg/kg body weight during 8 days before LPS injection. Serum and liver were collected 24 hours after LPS injection.

**Results** : The activity was high in order of OHF0 and OHF3 in DPPH and ABTS radical scavenging activities. The quercetin contents for bioactive ingredient of OH was 5.39, kaempferol contents was 9.94 by UPLC analysis. The LPS-treated vehicle group significantly increased liver weight, and aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels in serum. In contrast, administrated OHF3 group decreased liver weight, AST, ALT. In addition, OHF3 groups reduced the elevated levels of reactive oxygen species (ROS) in serum and tissues. Moreover, AP-1, iNOS and COX-2 were significantly decreased in OHF2 and OHF3. But NF- $\kappa$ B p65 and TNF- $\alpha$  only showed a significant reduction in OHF3.

**Conclusions** : Therefore, these results suggest that fermented Orostachydis Herba might be protective effect on liver injury through anti-oxidant effect.

**Key words** : Orostachydis Herba, anti-oxidation, anti-inflammation, liver injury, lipopolysaccharide.

## I. 서 론

와송 (Orostachydis Herba)은 일명 석송, 옥송, 작엽하초

\*Corresponding author : Young-Bae Seo, College of Korean Medicine, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon 34520, Republic of Korea,

· Tel : +82-42-280-2656 · Fax : +82-42-280-2644 · E-mail : genin@dju.ac.kr

#First author : HanEun Kang, College of Korean Medicine, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon 34520, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-280-2656 · Fax : +82-42-280-2644

· Received : 10 February 2017 · Revised : 28 February 2017 · Accepted : 15 March 2017

및 집우지기 (지부지기) 등으로 불리는 들나물과의 다년생 초본 식물인 와송의 전초로서, 여름부터 가을에 걸쳐 채취하며 뿌리를 제거한 후 사용한다.

와송에 대한 연구로는 자궁경부암<sup>1)</sup>, 위암, 간암 등에 대한 항암효과<sup>2)</sup>, 항돌연변이효과<sup>3)</sup>, 암세포의 apoptosis 유도효과<sup>4)</sup>, 항산화효과<sup>5-7)</sup> 항염증효과<sup>8,9)</sup>, 과산화지질 농도 개선<sup>10)</sup>, 항균 효과<sup>11)</sup>, 그리고 간장보호효능의 가능성과 지방간 개선 효과<sup>12)</sup> 등의 효능이 보고되어져있다.

와송에 존재하는 성분으로는 friedelin, epifriedlanol, glutinone 및 glutiniol과 같은 triterpenoid류와  $\beta$ -sisterol과 campesterol 등의 sterol 계열물질, fatty acid ester류, kamperol과 quercetin과 같은 flavonoid 류, 4-hydroxybenzoic acid와 3,4-dehydroxybenzoic acid, gallic acid 등의 aromatic acid 등이 분리되어 소화기 계통의 암에 효과가 있는 것으로 알려지면서 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>13)</sup>.

발효한약은 약효성분의 체내흡수율과 생체이용률을 모두 극대화시켜 약리적 기능성뿐만 아니라 한약의 제형 개량과 포제 방법을 향상시키고, 이를 통해 한약의 새로운 수요를 창출하고 고부가가치의 한약제품을 개발할 수 있어 최근 한의학계에서 관심을 받고 있다<sup>14)</sup>. 또한 천연물발효는 여러 효소와 세포의 조직에 있는 생리활성 물질들이 유리되므로 생체이용률이 높아진다고 알려져 있다<sup>15)</sup>.

따라서 본 실험에서는 와송이 간 보호 효과가 있을 것으로 예상하여 와송과 4가지 균주를 이용하여 제조한 발효 와송의 *in vitro* 에서 항산화 효능 평가와 *in vivo*에서 와송과 발효 와송을 급여한 마우스에 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 급성 간 손상을 유도한 후 항산화조절 및 염증개선 효과를 실험을 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

와송 (*Orostachydis Herba*)을 바른 한약 (서울, 한국)에서 구입하여 수세한 후, 40℃에서 3일간 저온 건조하였고, 미세 분말로 세분하였다. *Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Saccharomyces cerevisiae* 등 총 4종의 균을 각각 이용하여 액상발효하여 사용하였다(Table 1.).

Table 1. Fermentation fungi and samples of *Orostachydis Herba*

Sample	Label name	Fermentation fungi
Orostachydis Herba (OH)	OHF0	Not fermented
Fermented OH 1	OHF1	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
Fermented OH 2	OHF2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Fermented OH 3	OHF3	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Fermented OH 4	OHF4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

### 2. 실험 동물

모든 실험은 대구한의대학교 동물실험 윤리위원회의 승인

(DHU 2015-054) 을 얻어 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다. 생후 6주령 체중 25g 내외의 ICR mouse (Orient bio Inc., Seongnam, Korea)을 일주일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사료는 고품사료 (조단백질 22.1 % 이상, 조지방 8.0 % 이하, 조섬유 5.0 % 이하, 조회분 8.0 % 이하, 칼슘 0.6 % 이상, 인 0.4 % 이상, 항생제 무첨가) (Samyang corporation, Seoul, Korea)와 물을 충분히 공급하였다. 실험동물의 체중은 전자체중계로 1회/1일으로 동일 시간 동일 조건에서 측정하였고, 투여 종료일 체중에서 투여 전 체중을 빼서 체중 증가량 (body weight gain (g))을 산출하였다. 식이섭취량은 2일 동안 제공된 사료에서 2일간 섭취하고 남은 사료량을 제한 후 각 실험군의 하루 사료섭취량을 산출하였다. 한편, 각 쥐의 체중 증가량을 동일 사육기간의 사료섭취량으로 나누어 사료효율 (FER : food efficiency ratio)을 구하였다.

### 3. 시약

미생물의 배양에 사용된 시약은 모두 Difco (Difco Laboratory, Detroit, MI, USA) 제품을 사용하였으며, 전처리에 사용된 효소혼합액은 한국 화학연구원 융합화학연구팀에서 제공한 Cellulclast, HTec2, Amyloglucosidase 등의 1:1:1 혼합액을 사용하였다. LPS from *Escherichia coli* (serotype O55:B5, L2880), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)는 Sigma aldrich (MO, USA)에서 구입하였고, Nitrocellulose membranes는 GE Healthcare (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였고, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B p65), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), Histone,  $\beta$ -actin과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, Activator protein-1 (AP-1)은 Cell signaling (CA, USA)에서 구입하였다. Protease inhibitor mixture, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. 또한, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)와 Dihydrorhodamine 123는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 ECL Western Blotting Detection Reagents는 GE Healthcare로부터 구입하여 사용하였다. 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다

### 4. 실험 기기

건조기 (HDG-222, HyunDaeEnetech, Gyeonggi-do, Korea)에서 40℃로 저온건조를 실시하였고, 초미립자분쇄기 (Jet Mill, Ducksan, Gyeonggi-do, Korea)에서 제분하였다. 발효를 위해서는 30℃에 맞추어진 항온배양기 (Jeio Tech, DaeJeon, Korea)와 진탕배양기 (Shaking Incubator, Jeio Tech, DaeJeon, Korea)를 사용하였다. 발효 후 동결건조기 (LYOPH-PRIDE 20R, Ilshinbiobase, Gyeonggi-do,

Korea)에서 동결건조 하였고, 성분분석은 UPLC (shimadzu, japan)를 사용하였다. Western Blot Analysis을 위해서 tissue grinder (BioSpec Product, Oklahoma, USA), Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co, Ltd., Seoul, Korea)을 사용하였으며, 실험동물 체중 측정을 위해서 전자 체중계 (CAS, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하였다.

## 5. 시료 추출

구입한 와송을 40℃ 72시간 저온건조를 실시하여, 미세분말 후 다음과 같이 사용하였다. 먼저 사각 투명 밀폐용기에 각각 라벨을 붙이고, 시료를 각각 5 g씩 칭량하여 넣는다. 45 ml의 멸균 증류수를 첨가하여 현탁한다 (10% w/v). 시료가 포함된 용기마다 미리 혼합된 복합 효소액 0.5 mL를 첨가하고 하룻밤 반응시킨다. 복합 효소액은 5가지의 각종 효소를 같은 양으로 혼합하여 사용한다. 시료에 따라 정해진 균주 현탁액을 0.5 ml씩 접종하여 섭씨 35℃ 인큐베이터에서 정치 배양한다. 균주 현탁액은 배양액과 50 ml의 과즙배지를 혼합한 것으로, 현탁 후 50 ml/0.5 ml씩 접종 (약 1%)하거나 또는 107-108 cell/ml의 균체 농도를 지닌다. 균주 농도는 107-108 cells/ml이다. 샘플에 따라 간헐적으로 흔들여 준다. 매일 같은 시간에 발효상태 (pH)를 확인하고 발효의 지속여부를 결정한다. 사각 투명 밀폐용기에 각각 라벨을 붙이고, 시료를 샘플 하나당 2 개씩 (총 100 g) 각각 50 g씩 칭량하여 넣는다. 250 ml의 멸균 증류수를 첨가하여 현탁한다 (20% w/v). 시료가 포함된 용기마다 미리 혼합된 복합 효소액 2 ml를 첨가하고 하룻밤 반응시켰다. 시료에 따라 정해진 균주 현탁액을 2 ml씩 접종하여 섭씨 35℃ 인큐베이터에서 정치 배양하였다. 배양액을 107-108 cells/ml의 균주 농도를 맞추어 접종하였다. 샘플에 따라 간헐적으로 흔들여 주었다. 매일 같은 시간에 발효상태 (pH)를 확인하고 35℃, 6일간 발효하였다. 발효 후 -30℃에서 120분, -15℃에서 120분, 0℃에서 240분, 15℃에서 120분, 30℃에서 120분의 조건으로 동결건조 하였다.

## 6. 항산화 효과 측정

### 1) DPPH 라디칼 소거능 측정

엑상 발효한 와송의 항산화 효능을 비교하기 위하여 100배 희석한 발효액을 사용하여 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. 전자공여능 (electron donating ability)은 DPPH 자유라디칼 소거법으로 측정되었다. DPPH의 용액은 보라색 (deep violet)이며, 시료 중에 있는 항산화 물질과 결합하여 중화 (환원)가 되면 용액은 투명하게 변한다. 이러한 원리를 이용하여 DPPH는 시료 중에 포함된 항산화 (라디칼 소거능) 물질의 양을 측정하는데 사용된다. 일정농도의 시료 100  $\mu$ l과 DPPH용액 (dissolved in ethanol)을 100  $\mu$ l를 넣고 혼합한 후, 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 사용하여 540 nm에서 측정된 후, 전자공여능을 계산하여 산출하였다.

### 2) ABTS 라디칼 소거능 측정

7 mM ABTS와 2.45 mM Potassium persulfate를 증류

수에 녹인 다음 12시간동안 차광하여 보관한다. 이 반응액을 415 nm에서 ethanol을 이용하여 흡광도  $0.70 \pm 0.02$ 로 보정한다. 그 후, ABTS 95  $\mu$ l에 시료 5  $\mu$ l을 첨가하여 15분 반응 후, 415 nm에서 흡광도를 측정한다.

## 7. 성분분석

와송 및 엑상 발효 와송 추출액의 1 ml에 함유된 성분을 분석하기 위하여 Waters사의 ESI 소스의 질량분석기가 결합된 UPLC를 사용하여 분석하였다. 성분의 분리를 위하여 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1  $\times$  150.0 mm, 1.7 mm) 칼럼을 사용하였으며, 이동상은 0.1% formic acid가 함유된 물과 아세트나이트릴을 사용하여 기울기 용매 조건으로 흘려주었다. 칼럼은 40℃를 유지하였으며, 유속은 분당 0.18 ml/min 및 주입량은 3.0 ml로 하였다. 또한 정량분석을 위하여 ACQUITY TQD MS를 사용하여 양이온과 음이온 모드에서 검출하였다. MS 검출을 위해 capillary voltage (3.3 kV), extract voltage (3 V), interface temperature (120℃), RF lens (0.3 V), desolvation temperature (300℃), desolvation gas (600 L/h), cone gas (50 L/h) 및 collision gas (0.14 ml/min) 등에 대한 조건을 설정하여 multiple reaction monitoring (MRM) 모드를 적용하여 정량을 실시하였다. 와송 및 엑상 발효와송 추출액의 1 ml에 함유된 성분을 분석하여 함량을 표로 나타내었다. 발효 와송은 quercetin과 Kaempferol의 함량을 분석하여 나타내었으며 tr은 검출은 되지만 정량값이 의미가 없는 것을 의미한다.

## 8. LPS에 의한 급성 간 손상 개선 효능 평가

### 1) LPS에 의한 급성 간 손상 유발

ICR mouse (6주령, 수컷)를 아무런 처치를 하지 않은 정상군, LPS를 처치한 대조군, 와송 투여군 및 *in vitro* 실험을 통해 선별한 발효 와송 2종을 각 200 mg/kg의 용량으로 1일 1회 8일간 경구 투여한 투여군 총 4 그룹으로 분류하였으며, 각 군에 6마리씩 배정하였다. 8일 동안 시료를 각 용량에 맞게 경구 투여 하였으며, 실험 9일째, LPS 20 mg/kg를 복강주사 하고 24시간 절식 후, 흡입 마취하여 심장에서 혈액을 채취하였고 원심분리기를 이용해 4,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 그 후, saline (0.9% NaCl, pH 7.4) 관류하여 장기를 채취해 장기무게를 잰 후, 분석 전까지 -80℃에서 보관하였다.

### 2) 혈청의 AST 및 ALT 측정

분리한 혈청 중 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) 활성도는 Reitman-Frankel법에 의해 제조된 시약 키트를 사용하여 505 nm에서 UV spectrophotometer로 비색 정량하여 측정하였고, 혈청 liter당 international unit (IU/L)으로 나타내었다.

### 3) 활성 산소종 (ROS : Reactive oxygen species) 측정

혈청과 조직 내의 ROS를 측정하기 위하여 간 조직을 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 이용

하여 분쇄하였다. 그 후 혈액과 조직 샘플에 25 mM DCF-DA를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 0분부터 매 10분씩 emission wavelength of 530 nm와 excitation wavelength of 485 nm를 이용하여 30분간 측정된 산출 값을 계산하였다.

#### 4) Western Blot Analysis

간의 세포질단백질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리하여 세포질 단백질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵 단백질을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 헹구고 100  $\mu$ l의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가해 재부유 시킨 뒤 10분마다 vortex를 3번 하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 핵 단백질을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80°C에서 각각 냉동 보관하였다. 간 조직의 세포질단백질의 iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ -actin 및 핵 단백질의 AP-1, NF- $\kappa$ B p65, Histone 단백질을 발현을 측정하기 위해 10 mg의 단백질을 8-15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBST로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBST로 1:3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBST로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced

chemiluminescence (ECL) 용액에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)프로그램을 사용하여 정량하였다.

#### 5) 조직학적 분석

실험 종료 후, 간 조직을 적출한 다음, 10% 중성 포르말린에 18시간 이상 고정시킨 다음, 탈수를 거쳐 파라핀 포매후 4 mm의 절편을 제작하였다. 이후 Hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 실시하고, 광학 현미경 하에서 관찰하였다.

### 9. 통계처리

실험결과는 평균과 표준편차 (mean  $\pm$  SD)로 표기하였으며, SPSS 22.0 for Windows program을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test로 유의수준  $p$ -value < 0.05에서 검정하였다.

## III. 결 과

### 1. 항산화 효과 측정 결과

OHF0과 OHF3이 각각 97.54  $\pm$  0.18%, 94.96  $\pm$  0.21%로 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈고, OHF1이 40.68  $\pm$  1.24%로 두 번째로 높은 활성이 나타났다. ABTS 라디칼 소거능은 OHF3이 83.12  $\pm$  2.59%의 ABTS 라디칼 소거능을 나타내어 가장 높은 항산화 활성을 보였고, OHF0은 79.50  $\pm$  2.43%로 두 번째로 높은 활성이 나타났다 (Table 2).

Table 2. DPPH and ABTS radical scavenging activities of *Orostachydis Herba* and fermented *Orostachydis Herba*

	OHF0	OHF1	OHF2	OHF3	OHF4
DPPH radical scavenging activity	97.54 $\pm$ 0.18	40.68 $\pm$ 1.24 <sup>***</sup>	26.43 $\pm$ 1.05 <sup>***</sup>	94.96 $\pm$ 0.21	29.12 $\pm$ 1.62 <sup>***</sup>
ABTS radical scavenging activity	79.50 $\pm$ 2.43	40.20 $\pm$ 0.18 <sup>***</sup>	33.83 $\pm$ 1.76	83.12 $\pm$ 2.59 <sup>***</sup>	43.12 $\pm$ 0.69 <sup>***</sup>

OH : *Orostachydis Herba*, OHF0 : None-fermented *Orostachydis Herba*. OHF1 : Dried *Orostachydis Herba* Fermented by *Lactobacillus hilgardii*, OHF2 : Dried *Orostachydis Herba* Fermented by *Leuconostoc mesenteroides*, OHF3 : Dried *Orostachydis Herba* Fermented by *Pediococcus acidilactici*, OHF4 : Dried *Orostachydis Herba* Fermented by *Saccharomyces cerevisiae*. Significance was compared to OHF0 (<sup>\*\*\*</sup>  $p$  < 0.001).

### 2. 성분분석

와송 및 발효와송의 rutin, isoquercitrin, kaempferol-3-O-rutinoside, quercitrin, quercetin, kaempferol의 성

분을 분석한 결과, OHF0 에서 quercetin의 함량이 5.39로 나타났고, kaempferol의 함량이 9.94로 나타났다 (Table 3) (Fig. 1, 2).

Table 3. Composition of *Orostachydis Herba* and Fermented *Orostachydis Herba*.

	Rutin	Isoquercitrin	Kaempferol-3-O-rutinoside	Quercitrin	Quercetin	Kaempferol
OHF0	No peak	No peak	No peak	No peak	5.38723	9.94246
OHF1	No peak	No peak	No peak	No peak	No peak	No peak
OHF2	No peak	No peak	No peak	No peak	No peak	No peak
OHF3	No peak	No peak	No peak	No peak	No peak	No peak
OHF4	No peak	No peak	No peak	No peak	No peak	No peak

OHF0 : None-fermented *Orostachydis Herba*. OHF1 : Dried *Orostachydis Herba* Fermented by *Lactobacillus hilgardii*, OHF2 : Dried *Orostachydis Herba* Fermented by *Leuconostoc mesenteroides*, OHF3 : Dried *Orostachydis Herba* Fermented by *Pediococcus acidilactici*, OHF4 : Dried *Orostachydis Herba* Fermented by *Saccharomyces cerevisiae*.

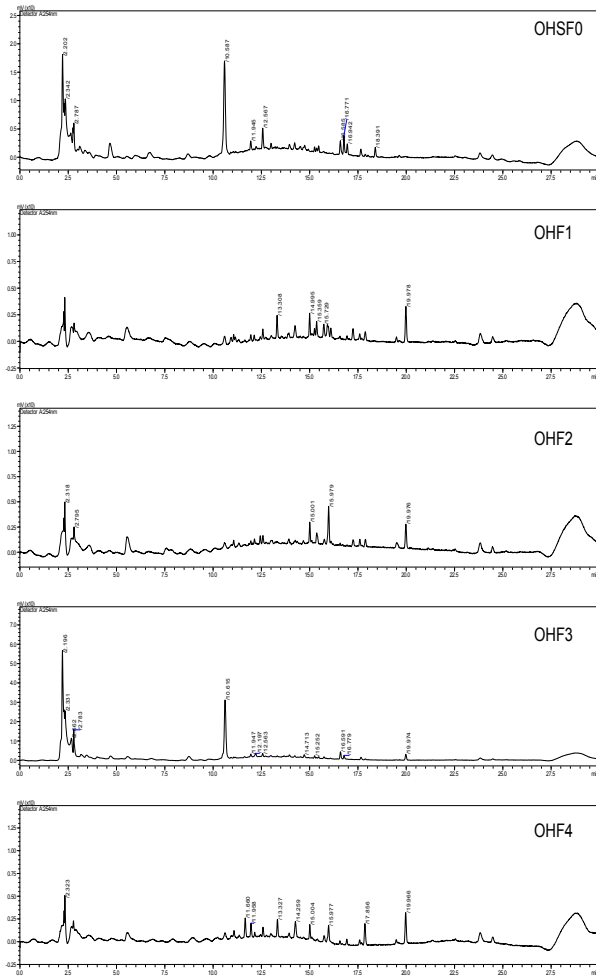


Fig. 1. Composition of Orostachydis Herba and Fermented Orostachydis Herba by UPLC analysis  
 OHF0 : None-fermented Orostachydis Herba, OHF1 : Dried Orostachydis Herba Fermented by *Lactobacillus hilgardii*,  
 OHF2 : Dried Orostachydis Herba Fermented by *Leuconostoc mesenteroides*, OHF3 : Dried Orostachydis Herba Fermented by *Pediococcus acidilactici*, OHF4 : Dried Orostachydis Herba Fermented by *Saccharomyces cerevisiae*.

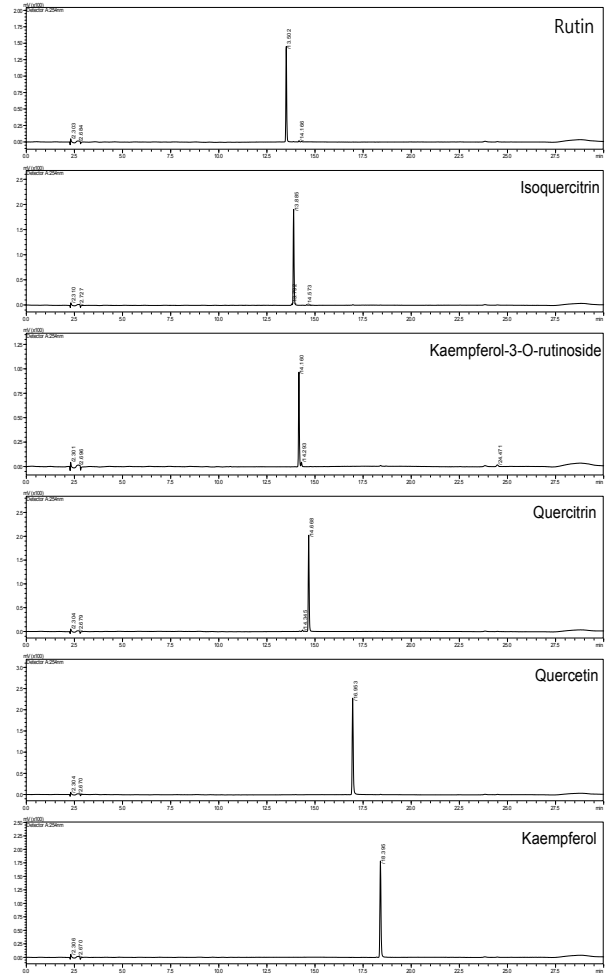


Fig. 2. UPLC profiles of standard compounds  
 OHF0 : None-fermented Orostachydis Herba, OHF1 : Dried Orostachydis Herba Fermented by *Lactobacillus hilgardii*,  
 OHF2 : Dried Orostachydis Herba Fermented by *Leuconostoc mesenteroides*, OHF3 : Dried Orostachydis Herba Fermented by *Pediococcus acidilactici*, OHF4 : Dried Orostachydis Herba Fermented by *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3. LPS에 의한 급성 간 손상 개선효능평가

#### 1) 체중 변화를 및 식이효율

적용기간을 제외한 식이 투여 기간 8일 동안 측정된 체중 변화 및 식이효율은 Table 4의 내용과 유의적인 변화가 없는 것으로 나타났다 (Table 4).

실험동물의 체중에 대한 간 조직의 무게 비에서 정상군

( $56.06 \pm 2.10$  mg/g ( $p < 0.001$ ))에 비하여 대조군 ( $79.57 \pm 2.80$  mg/g)은 유의성 있게 증가 하였고, OHF0 투여군 ( $78.09 \pm 1.83$  mg/g), OHF2 투여군 ( $75.60 \pm 1.63$ mg/g)으로 감소하는 경향은 있었으나, 유의성은 없었다. OHF3 투여군 ( $67.55 \pm 1.12$  mg/g ( $p < 0.05$ ))으로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 3).

Table 4. Initial and final body weight, body weight change, and body weight reduction ratio in ICR mice.

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	body weight gain (g)	FER(%)
Nor	33,02 ± 0.54	35,56 ± 0.77	2.54 ± 0.33	0.16 ± 0.02
Veh	32,52 ± 0.37	34,50 ± 0.41	1.99 ± 0.14	0.14 ± 0.01
OHF0	32,62 ± 0.38	34,53 ± 0.51	1.92 ± 0.28	0.12 ± 0.02
OHF2	32,18 ± 0.50	33,83 ± 0.68	1.65 ± 0.28	0.10 ± 0.02
OHF3	32,08 ± 0.50	33,65 ± 0.46	1.57 ± 0.20	0.10 ± 0.01

Nor; normal mice, Veh; LPS treated mice, OHF0; OHF0 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, OHF2; OHF2 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, OHF3; OHF3 200 mg/kg body weight-treated LPS mice. The mice divided 4 groups were administered orally with distilled water, OHF0, OHF2, OHF3 for 8 days, and checked body weight daily.

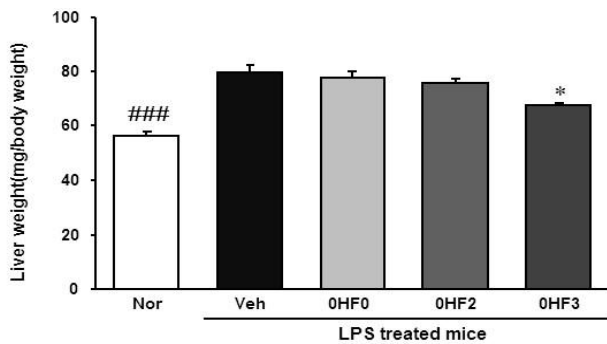


Fig. 3 Liver weight of LPS treated mice. Nor; normal mice, Veh; LPS treated mice, OHF0; OHF0 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, OHF2; OHF2 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, OHF3; OHF3 200 mg/kg body weight-treated LPS mice. All data are expressed mean $\pm$ SEM, n=6 mice per group.

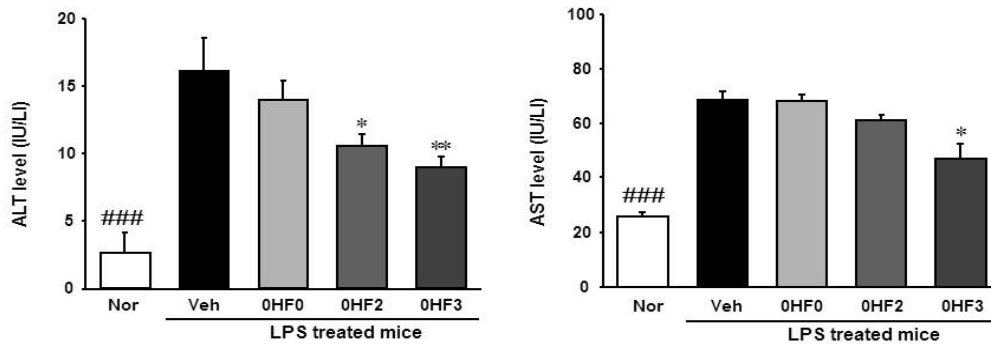


Fig. 4. Evaluation of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in LPS-treated mice. Nor; normal mice, Veh; LPS treated mice, OHF0; OHF0 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, OHF2; OHF2 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, OHF3; OHF3 200 mg/kg body weight-treated LPS mice. All data are expressed mean $\pm$ SEM, n=6 mice per group. Normal group significance was compared to vehicle treated LPS group (###  $p < 0.001$ ). Sample group significance was compared to vehicle treated LPS group (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

### 3) 산화적 스트레스 측정 결과

산화적 스트레스 바이오 마커인 ROS를 혈청 및 조직에서 분석한 결과, 혈청에서는 정상군 (23.69  $\pm$  3.20 fluorescence/min/ml ( $p < 0.01$ ))에 비하여 대조군 (31.78  $\pm$  2.07 fluorescence/min/ml)은 높게 나타났고, OHF0 투여군 (24.13  $\pm$  0.50 fluorescence/min/ml ( $p < 0.05$ )), OHF2 투여군 (23.42  $\pm$  3.73 fluorescence/min/ml), OHF3 투여군 (26.24  $\pm$  3.90 fluorescence/min/ml)은 대조군보다 감소하

였으나, 비슷한 경향을 보였다.

조직에서 또한 정상군 (32.23  $\pm$  2.03 fluorescence/min/mg protein) 보다 대조군 (47.25  $\pm$  4.39 fluorescence/min/mg protein)은 뚜렷이 증가하였고, OHF0 투여군 (34.49  $\pm$  2.32 fluorescence/min/mg protein ( $p < 0.05$ )), OHF2 투여군 (25.83  $\pm$  1.71 fluorescence/min/mg protein), OHF3 투여군 (25.02  $\pm$  0.87 fluorescence/min/mg protein)은 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 5).

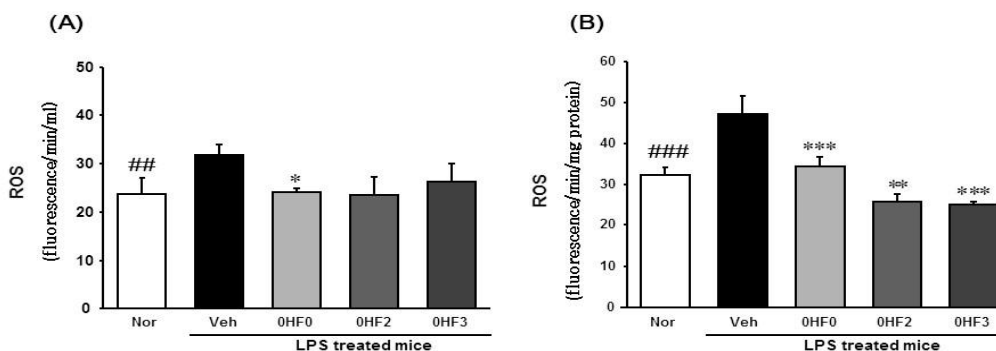


Fig. 5 Oxidative stress biomarker ROS in serum and liver tissues. (A) ROS in serum, (B) ROS in liver tissues. Nor; normal mice, Veh; LPS treated mice, OHF0; OHF0 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, OHF2; OHF2 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, OHF3; OHF3 200 mg/kg body weight-treated LPS mice. All data are expressed mean $\pm$ SEM, n=6 mice per group. Normal group significance was compared to vehicle treated LPS group (###  $p < 0.001$ ). Sample group significance was compared to vehicle treated LPS group (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

4) 간 조직의 염증성 사이토 카인 및 매개인자 측정 결과 간 조직에서 western blot을 실시하여 염증성 매개인자인 AP-1과 NF- $\kappa$ B p65를 측정하였다. 그 결과 AP-1의 발현은 정상군 ( $1.00 \pm 0.11$  ( $p < 0.001$ ))에 비하여 대조군 ( $1.68 \pm 0.15$ )은 유의성 있게 증가하였고, OHF0 투여군 ( $1.36 \pm 0.19$ ), OHF2 ( $1.16 \pm 0.23$  ( $p < 0.05$ )) 및 OHF3 ( $1.08 \pm 0.11$  ( $p < 0.05$ ))에서 유의성 있게 적은 발현을 보였다 (Fig. 7).

NF- $\kappa$ B p65의 발현은 대조군 ( $1.87 \pm 0.09$ )은 정상군 ( $1.00 \pm 0.14$  ( $p < 0.001$ ))에 비해 유의성 있게 증가하였고, OHF0 투여군 ( $1.48 \pm 0.16$ ), OHF2 ( $1.56 \pm 0.25$ )에서는 대조군에서 비하여 적게 발현하는 경향은 있었으나 유의성은 없었다. OHF3 ( $1.48 \pm 0.11$  ( $p < 0.05$ ))은 대조군에 비하여 유의하게 적은 수치로 발현하였다 (Fig. 6).

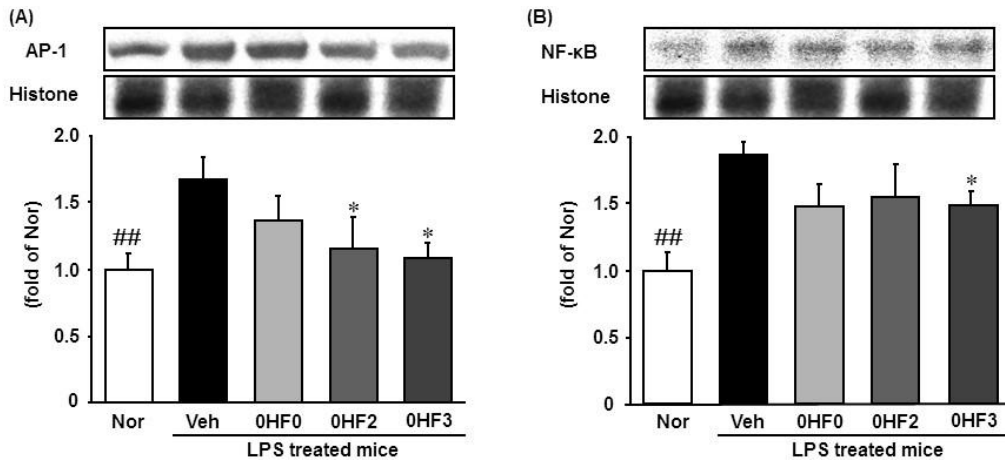


Fig. 6 Expression of inflammation-related proteins in liver.

Inflammation-related proteins AP-1 (A), NF- $\kappa$ B p65 (B). Nor; normal mice, Veh; LPS treated mice, OHF0; OHF0 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, OHF2; OHF2 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, OHF3; OHF3 200 mg/kg body weight-treated LPS mice. All data are expressed mean  $\pm$  SEM, n=6 mice per group. Normal group significance was compared to vehicle treated LPS group ( $^{##}p < 0.01$ ) Sample group significance was compared to vehicle treated LPS group ( $^{*}p < 0.05$ )

또한 COX-2, iNOS와 TNF- $\alpha$ 의 발현을 확인한 결과, 대조군에서의 COX-2 ( $1.85 \pm 0.30$ )는 정상군 ( $1.00 \pm 0.03$  ( $p < 0.01$ ))에 비하여 크게 증가하였고, OHF0 투여군 ( $1.66 \pm 0.22$ )에서는 대조군에서 비하여 적은 발현을 보이는 경향은 있었으나 유의성은 없었다. OHF2 ( $1.17 \pm 0.13$  ( $p < 0.05$ )) 및 OHF3 ( $0.94 \pm 0.13$  ( $p < 0.01$ ))은 대조군에 비하여 유의성 있게 적은 발현을 보였다 (Fig. 7(B)). iNOS의 발현은 정상군 ( $1.00 \pm 0.08$  ( $p < 0.01$ ))에 비하여 대조군 ( $1.68 \pm 0.24$ )은 유의성 있게 증가하였고, OHF0 투여군 ( $1.17 \pm 0.12$

( $p < 0.05$ ) 및 OHF2 투여군 ( $1.10 \pm 0.10$  ( $p < 0.01$ )) 및 OHF3 투여군 ( $1.03 \pm 0.09$  ( $p < 0.01$ ))에서 유의성 있게 적은 발현을 보였다 (Fig. 7(B)).

또한 TNF- $\alpha$ 의 발현은 정상군 ( $1.00 \pm 0.08$  ( $p < 0.01$ ))에 비하여 대조군 ( $1.46 \pm 0.16$ )은 유의성 있게 증가하였고, OHF0 투여군 ( $1.20 \pm 0.12$ ), OHF2 투여군 ( $1.16 \pm 0.08$ )은 적은 발현을 보이는 경향이 있었고, OHF3 투여군 ( $1.05 \pm 0.08$  ( $p < 0.05$ ))에서 유의성 있게 적은 발현을 보였다 (Fig. 7(C)).

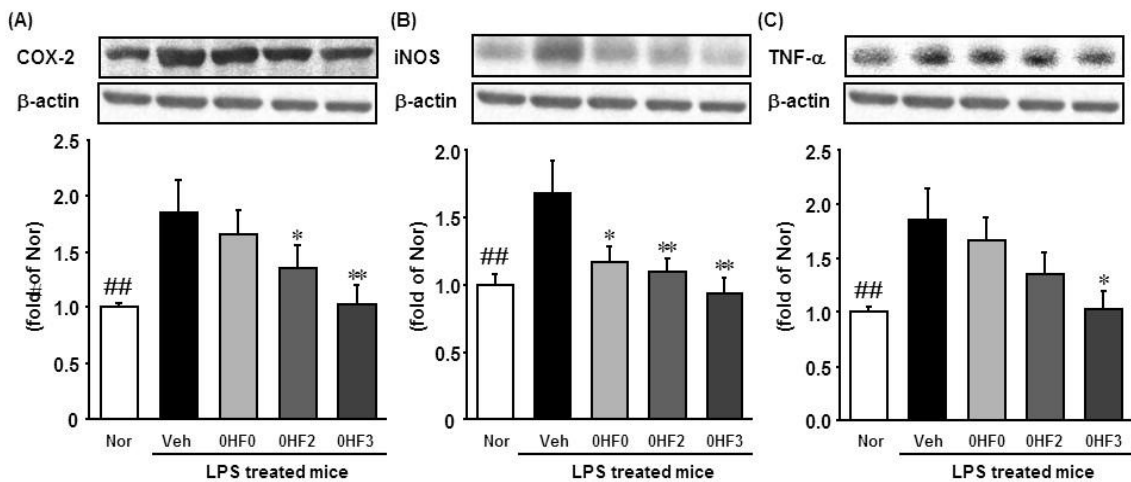


Fig. 7 Expression of inflammation-related proteins in liver.

Inflammation-related proteins COX-2 ; (A), iNOS ;(B), TNF- $\alpha$  ;(C). Nor; normal mice, Veh; LPS treated mice, OHF0; OHF0 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, OHF2; OHF2 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, OHF3; OHF3 200 mg/kg body weight-treated LPS mice. All data are expressed mean  $\pm$  SEM, n=6 mice per group. Normal group significance was compared to vehicle treated LPS group ( $^{##}p < 0.01$ ) Sample group significance was compared to vehicle treated LPS group ( $^{*}p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$ ).

### 5) 조직학적 분석

부검 후, 적출한 간 조직을 H&E염색을 한 다음, 광학 현미경 하에서 관찰한 결과, 정상군 (A)에 비하여 대조군 (B)에서는 혈관주위의 염증 정도가 증가하였으며, 핵의 모습이 현저하게

줄어든 모습을 관찰할 수 있으며, OHF0 투여군 (C)와 OHF2 투여군 (D) 및 OHF3 투여군 (E)에서는 혈관주위의 염증 정도가 줄어든 모습과 핵의 유무가 뚜렷이 구분되는 모습을 관찰할 수 있었다 (Fig. 8).

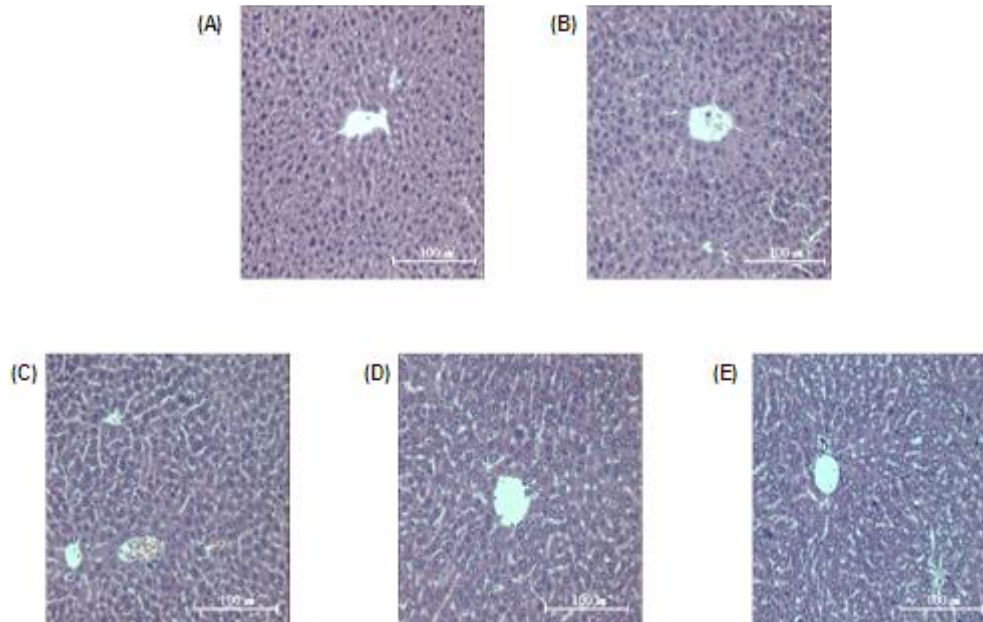


Fig 8. Effect of OHF0, OHF2, OHF3 on the histopathological change liver-tissues of LPS treated mice. Liver tissues were stained with H&E (Original magnification X 200)

(A) Normal mice, (B) Vehicle treated LPS mice, (C) OHF0 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, (D) OHF2 200 mg/kg body weight-treated LPS mice, (E) OHF3 200 mg/kg body weight-treated LPS mice.

## IV. 고 찰

미생물을 이용한 biotransformation 가능성 물질들은 새로운 건강보조식품의 소재로 각광받고 있으며, 최근에는 체내 유익균 성장을 촉진하는 probiotics 균주의 위장기능개선, 체내 콜레스테롤 흡수저해, 면역조절, 영양소의 흡수 등의 다양한 질병예방과 생리조절작용이 보고되었다<sup>16-19)</sup>. 또한, 선행연구에 따르면 와송과 발효와송은 조직의 과산화지질 농도와 혈중 지질수준에 대하여, 발효 와송이 지질개선에 더 긍정적인 영향을 나타내는 것을 확인하였다<sup>20)</sup>. 또한 발효와송의 알코올성 및 비알코올성 지방간의 개선 효능, 항균 및 항산화 활성이 보고되었다<sup>11), 12)</sup>. 이에 본 연구는 발효한 와송의 간기능 개선 효능을 비교하기 위해 간독성을 일으킨 마우스에서 항산화조절 및 염증개선 효과를 실험을 진행 하였다.

발효 균주에 따른 와송의 항산화 효능과 성분분석 실험을 위해 *Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Saccharomyces cerevisiae*의 4 종류의 균을 사용하여 각각 종류별로 액상발효 시켰다. *Lactobacillus hilgardii*는 높은 항산화 활성을 가지며<sup>21)</sup>, *Leuconostoc mesenteroides*는 김치유산균의 한 종류로 식이섬유 텍스트린을 생성하는 특징을 가지고 있다<sup>22)</sup>. *Pediococcus acidilactici*가 생성하는 박테리옌은 인체에 무독 무해하고 잔류성이 없으며, 그람양성 및 음성 미생물과 병원미생물에 항균 활성을 보이는 것으로 보아 소화기 감염의 원인이 되고 있는 세균에 대한 항균 효과를 확인 할 수 있었다<sup>23)</sup>.

*Saccharomyces cerevisiae* 즉 맥주효모는 지방간에 유효한 성분이 들어있어, 간질환에 효과적인 공급원이라 할 수 있다<sup>24-26)</sup>. 따라서 기존 와송이 가지고 있는 항산화, 항염증, 간기능 개선 등을 확인하고, 더 나은 효능을 연구하기 위하여 위의 4가지 균을 이용하여 와송을 액상발효 시켰으며, 와송 발효물의 항산화 기능을 확인 한 결과 와송과 3번 균주로 발효한 와송이 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈고, 1번 균주로 발효한 와송이 두 번째로 높은 활성을 나타냈다. 이러한 결과는 항균활성이 있는 *Pediococcus acidilactici*가 와송의 항산화효과를 더욱 증대시켜준 것으로 추측할 수 있다. 또한 발효 와송인 OHF3이 가장 높은 ABTS 라디칼 소거능을 보였고, 발효시키지 않은 와송인 OHF0은 두 번째로 높은 활성을 나타내었다. *In vitro* 실험 결과 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능의 활성 증가를 통하여 가장 뛰어난 항산화능력을 지닌 OHF3과 효능이 적게 나타난 OHF2 두 개를 선정하여 실험을 실시하였다.

본 실험에서는 와송 및 발효 와송의 간 손상 예방 효과를 확인하기 위하여, 와송 및 발효 와송을 8일간 경구 투여 한 후, LPS로 급성 간 손상을 유발하였다. 간 조직의 무게비를 보았을 때, 정상군에 비하여 LPS로 간 손상을 유발한 대조군의 무게비는 유의성 있게 증가 하여 급성 간 손상이 이루어 졌음을 나타내었고, 와송 및 발효 와송 투여군은 대조군에 비하여 감소하였을 뿐 아니라 OH3투여군은 유의성있는 감소를 나타내었다.

AST와 ALT는 간세포내의 미토콘드리아에 존재하며 간세



포의 파괴에 의해 혈액 내로 유출되는 효소로서 간 손상이 발생할 경우 ALT, AST는 증가되는 것으로 보고되어 있다<sup>27)</sup>. 본 실험에서도 대조군이 정상군과 비교하였을 때 유의적인 증가를 보였다. 하지만 OHF3을 투여한 군에서는 ALT와 AST 모두 대조군 보다 유의성 있는 감소를 확인하였다.

염증의 발생으로 인하여 자유라디칼이 형성되고 산화적 스트레스를 발생시키는데, 산화적 스트레스는 항산화 시스템의 불균형을 초래하여 각종 세포의 손상을 일으킨다<sup>28,29)</sup>. 따라서 산화적 스트레스의 바이오마커인 ROS의 감소는 염증개선의 주요한 역할을 한다. 본 연구에서 혈청 ROS는 정상군에 비하여 대조군이 유의하게 증가하였고, 와송과 발효 와송의 투여군에서는 대조군에 비하여 감소하는 경향만 보였다. 조직에서 ROS는 와송과 발효 와송 투여군 모두 대조군과 비교하여 유의한 감소를 보였다. 특히 OHF2와 OHF3 투여군에서는 정상 수치보다 감소하는 것을 확인할 수 있었는데, 이러한 결과로 보아 발효 와송의 간수치 및 간 무게비의 감소가 항산화 효과를 통하여 급성 간 손상을 억제하였을 것으로 예상할 수 있다.

LPS는 병원균 내독소로서 여러 종류의 염증세포와 조직을 구성하는 세포들이 생산하는 cytokine의 생산을 촉진한다<sup>30)</sup>. cytokine의 분비는 신호전달경로에서 JUN N-terminal kinase (JNK)와 같은 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)와 NF- $\kappa$ B p65 등의 전사인자에 의해 조절된다고 알려져 있다<sup>31,32)</sup>. LPS의 과도한 자극은 macrophage에서 TNF- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 및 IL-6와 같은 전 염증성 매개물질을 분비시킬 뿐만 아니라 superoxide ( $O_2^-$ ), hydrogenperoxide ( $H_2O_2$ )과 hydroxyl radicals와 같은 ROS 생성을 촉진하고 nitric oxide (NO)를 과도하게 활성화가 되어 iNOS의 증가를 통하여 염증을 유발시켜 조직의 손상을 초래한다<sup>33)</sup>.

이와 같이 산화적 스트레스의 증가는 염증성 매개인자인 AP-1과 NF- $\kappa$ B p65의 경로를 활성화 시켜 하위 단백질 및 사이토카인으로 직접적인 세포 손상을 일으키는데<sup>34)</sup>, 본 실험에서 AP-1의 발현은 정상군에 비하여 대조군이 유의성 있게 증가하였고, 발효 와송 투여군에서 유의성 있게 감소하였다. NF- $\kappa$ B p65의 발현 또한 OHF3에서 유의한 감소를 보였다. 또한 염증 매개 인자에서는, 대조군에서 COX-2와 iNOS는 정상군에 비하여 크게 증가하였고, 발효 와송 투여군에서 유의하게 감소하였다. TNF- $\alpha$ 는 OHF3에서만 유의한 감소를 보였다. 이러한 결과로 보았을 때, 대조군에서는 AP-1과 NF- $\kappa$ B p65의 발현을 통하여 COX-2, iNOS와 TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인이 증가하게 된 것으로 보이며<sup>35)</sup>, OHF3의 경구 투여가 AP-1, NF- $\kappa$ B p65 경로를 억제하여 염증을 감소시킨 것으로 사료된다. 따라서 발효 와송의 항산화 효과가 염증성 매개물질의 활성화를 저해하고, 이를 통하여 사이토카인의 발현을 억제해 항염증 효과가 있다고 판단된다.

## V. 결 론

와송과 발효와송을 LPS에 의해 유발된 급성 간 손상 모델에 경구 투여하여 항산화 및 항염증에 개선효과를 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS에 의해 유발된 급성 간손상 모델에서 *Pediococcus acidilactici*에 의한 발효 와송 투여군은 간 무게를 유의하게 감소시켰다.
2. *Pediococcus acidilactici*에 의한 발효 와송 투여군은 LPS에 의해 유발된 급성 간 손상에 의해 증가된 AST, ALT 수치를 유의하게 감소시켰다.
3. 와송 투여군과 발효 와송 투여군 모두 조직에서 증가된 ROS 수치를 유의하게 감소시켰으며, 발효 와송 투여군은 와송 투여군과 비교하여 더 뛰어난 항산화 효능을 나타냈다.
4. LPS에 의하여 유발된 급성 간손상 모델에서 *Pediococcus acidilactici*에 의한 발효 와송 투여군은 와송 투여군과 비교하여 AP-1 경로를 통하여 COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$ 를 크게 감소시켰다.

본 연구를 통하여 LPS에 의해 유발된 쥐의 급성 간세포손상에서 와송과 발효 와송 투여군 모두에서 항산화 및 항염증에 유의미한 효과를 확인할 수 있었고, 생 와송보다 발효한 와송이 더 유효한 효과를 가지는 것으로 확인 되었다. 이러한 결과로 *Pediococcus acidilactici*에 의한 발효 와송은 항산화, 항염증 치료 소재로서의 활용이 기대된다.

## 참고문헌

1. Kim SH. Anti-cancer mechanisms in human cervical cancer cells and pre-clinical safety of the biologically active substances from *Orostachys Herba*. Inje University. 2014 : 1-134.
2. Yang SH, Kim DH, Woo HJ, Kim BW. Effects of Putative Anti-cancer Herb Drugs on Rat NK Cell Activity. J of Oriental Neuropsychiatry. 1989 ; 10(2) : 103-14.
3. Park HJ. Studies on the chemical components and antimutagenic activity of *Orostachys japonicas*. Pusan National University. 1991 : 1-113.
4. Kwon J, Han KS. Effects of *Orostachys japonicus* A. Berger on the Immune System. Korean J. Medcinal Crop Sci. 2004 ; 12(4) : 191-202.
5. Yu EA, Lee SJ, Lee SA, Kang JH, Shin SC. Total Phenol Contents and Antioxidant Activity in *Orostachys japonicus* A. Berger Grown under various Cultivation Conditions. Korean J. Medcinal Crop Sci. 2006 ; 14(4) : 234-8.
6. Choi SY, Jung MJ, Sung NJ. Studies on the Antioxidative Ability of Methanol and Water Extracts from *Orostachys japonicus* A. Berger According to Harvest Times. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2008 ; 21(2) : 157-64.

7. Lee SJ, Seo JK, Shin JH, Lee HJ, and Sung NJ. Antioxidant Activity of Wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) According to Drying Methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2008 ; 37(5) : 605-11.
8. Suk DH. Inhibitory effect of the extracts from *Orostachys japonicus* on inflammation. Inje University. 2013 : 1-65.
9. Shin MG. Anti-inflammatory effects of *Orostachydis* Herba fractions in TNF- $\alpha$  stimulated HT-29 human colon epithelial cells. Wonkwang University. 2011 : 1-40.
10. Shin JH, Lee SJ, Seo JK, Lee HJ. Effect of a Combined Extract of *Orostachys japonicus* with Medicinal Plants on the Lipid Composition of the Liver and Kidney from Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2012 ; 41(4) : 510-8.
11. Lee NS. Studies on the Antimicrobial and Antioxidative Activity of Fermented *Orostachys japonicus* A. Berger. Joongbu University. 2015 : 1-40.
12. Park KR. Improvement effect of alcoholic or non-alcoholic fatty liver by fermented orostachys malacophyllus in rats. Dong-A University. 2014 : 1-109.
13. Park HJ, Lim SC, Lee MS, Young HS. Triterpene and Steroids from *Orostachys japonicas*. *Korean J. Pharmacogn*. 1994 ; 25(1) : 20-3.
14. Jung YJ, Han DO, Choi BH, Park C, Lee HJ, Kim SH, Hahm DH. Effect of Fermented Herbal Extracts, HP-1 on Enzyme Activities and Gene Expressions Related to Alcohol Metabolism in Ethanol-loaded Rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2007 ; 21(2) : 387-91.
15. Katina K, Liukkonen KH, Kaukovirta-Noria A, Adlercreutz H, Heinonen SM, Lampi AM, Poutanen K. Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *J Cereal Sci*. 2007 ; 46(3) : 348-55.
16. Mainville I, Arcand Y, Farnworth ER. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int J Food Microbiol*. 2005 ; 99(3) : 287-96.
17. Ooi LG, Liong MT. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. *Int J Mol Sci*. 2010 ; 11(6) : 2499-522.
18. Kumar M, Nagpal R, Kumar R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A, Chakraborty C, Singh B, Marotta F, Jain S, Yadav H. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp Diabetes Res* 2012 ; 902917 : 1-14.
19. Rautava S, Kalliomäki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 ; 109(1) : 119-21.
20. Park KR, Ahn HY, Cho YS. Effect of *Orostachys malacophyllus* br Fermented Lactic Acid Bacteria on Plasma Levels of Lipid and Lipid Peroxidation in Alcohol Feeding Rats. *Journal of Life Science*. 2014 ; 24(6) : 677-85.
21. Cha JY, Kim YS, Ahn HY, Eom KE, Park BK, Jun BS. Biological Activity of Fermented Silkworm Powder. *Journal of Life Science*. 2009 ; 19(10) : 1468-77.
22. Park JM. Functional study of *Lactobacillus sakei* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Kimchi. Sungkyunkwan University. 2015 : 1-87.
23. Kim KE. Isolation and Identification of *Pediococcus acidilactici* and its Antimicrobial Activity of Bacteriocin production. Chonnam national University. 2013 : 1-26.
24. Barron EJ, Hanahan DJ. Observations on the silicic acid chromatography of the neutral lipides of rat liver, beef liver, and yeast. *J Biol Chem*. 1958 ; 231 : 493-503.
25. Stuke JE, McDonough VM, Martin CE. The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *J Biol Chem*. 1990 ; 265(33) : 20144-9.
26. Shin CS, Rho SN. Effect of Small Water Dropwort (*Oenanthe javanica* DC) and Brewer's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on the Liver Function and Serum Lipid Metabolism in Alcohol-consumed Rats. *J East Asian Soc Dietary Life*. 2006 ; 16(3) : 281-91.
27. Nyblom H, Berggren U, Balldin J, Olsson R. High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. *Alcohol Alcohol*. 2004 ; 39(4) : 336-9.
28. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000 ; 29(3) : 222-30.
29. Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. 1994 ; 65(1) : 27-33.
30. Marriott JB, Westby M, Cookson S, Guckian M, Goodbourn S, Muller G, Dalgleish AG. CC-3052: a water-soluble analog of thalidomide and potent inhibitor of activation-induced TNF- $\alpha$  production. *J Immunol*. 1998 ; 161(8) : 4236-43.
31. Barnes PJ. Nuclear factor- $\kappa$ B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997 ; 29(6) : 867-70.
32. Hwang D, Jang BC, Yu G, Boudreau M. Expression

of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways in macrophages, *Biochem Pharmacol* 1997 ; 54(1) : 87-96.

33. Shin SH, Shin YO, Lee JY, Lee AR, Kim MY, Park CH, Seo BI, Roh SS. Ethanol-heated Processed *Scutellariae Radix* Improve Inflammatory Response through an Inhibitory effect against Oxidative Stress in mice with the Lipopolysaccharide-induced Intestne of mice. *Kor. J Herbal* 2015 ; 30(4) : 81-8.
34. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001 ; 107(1) : 7-11.
35. Chen CY, Peng WH, Tsai KD, Hsu SL. Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kappaB and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sci*. 2007 ; 81(23) : 1602-14.