

## 추출 용매에 따른 *Lactobacillus plantarum* 발효 우슬의 항염증 효과 증진

조은솔 · 우영민 · 김옥주 · 조민영\* · 안미영\*\* · 이재화\*\*\* · 하종명\*\*\* · 김안드레\*\*\*,†

신라대학교 자연과학연구소, \*신라대학교 일반대학원 바이오과학과, \*\*신라대학교 제약공학과  
(2018년 10월 22일 접수, 2018년 11월 21일 심사, 2018년 12월 18일 채택)

### Enhancement of Anti-inflammatory Activity of *Lactobacillus plantarum* Fermented by *Achyranthes japonica* on Extraction Solvents

Eun Sol Jo, Young Min Woo, Ok Ju Kim, Min Young Jo\*, Mee Young Ahn\*\*, Jae-Hwa Lee\*\*\*, Jong-Myung Ha\*\*\*, and Andre Kim\*\*\*,†

Natural Science Institute, Silla University, Busan 46958, Korea

\*Department of Bioscience, Graduate School of Silla University, Busan 46958, Korea

\*\*Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 46958, Korea

(Received October 22, 2018; Revised November 21, 2018; Accepted December 18, 2018)

#### 초 록

본 연구에서는 우슬(*Achyranthes japonica*, AJ)과 *Lactobacillus plantarum*으로 발효한 우슬(AJ-LP)을 5가지 용매(물, 에탄올, 헥산, 아세트산에틸, 부탄올)로 추출하여 RAW264.7 세포에서 항염증 활성에 미치는 영향을 확인하였다. lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 RAW264.7 세포에서 nitric oxide (NO) 및 cytokine 생성을 측정하였으며 western blot으로 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 nitric oxide synthase (iNOS)의 발현 정도를 관찰하였다. 세포 독성은 CCK assay를 통해 확인하였으며 독성을 가지지 않는 농도인 100 µg/mL로 실험을 진행하였다. NO 생성 저해 활성 결과 AJ-LP를 에탄올(E)로 추출한 시료가 LPS만 처리한 control군에 비해 약 74%로 저해율이 가장 높았으며 염증관련 cytokine인 Interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )의 결과에서도 약 57, 70, 74%의 저해율로 우수한 효능을 보였다. COX-2와 iNOS 발현결과 AJ군에서 대조군(20-hydroxyecdysone)의 저해율이 가장 높은 것으로 나타났다. AJ-LP군에서 COX-2 발현량은 헥산(H)으로 추출한 시료가 대조군에 비해 약 16%로 감소하였고 iNOS 발현량은 부탄올(B)으로 추출한 시료가 약 7%로 감소하였다. 이상의 결과들에서 우슬보다 *L. plantarum*으로 발효한 우슬이 천연물 소재로서의 활용 가능성이 높음을 시사하였다.

#### Abstract

In this study, we used extracts obtained from five different solvents (water, ethanol, hexane, ethyl acetate, butanol) of *Achyranthes japonica* (AJ) and also AJ fermented with *Lactobacillus plantarum* (LP) to confirm effects on the anti-inflammatory activity in RAW264.7 cells. Experiments of measuring nitric oxide (NO) and cytokine production were performed in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells, and the expression of both cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) was observed by a western blot method. The cytotoxicity of RAW264.7 was confirmed by the cell counting kit (CCK) assay at a concentration of 100 µg/mL, which has no toxicity. As a result of the inhibition of NO production, the inhibition rate of AJ-LP extracted with ethanol samples was about 74% higher than that of using the control group. Interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), which are inflammatory cytokines, also showed an excellent efficacy with inhibition rates of about 57, 70, and 74%, respectively. Comparing to the results of COX-2 and iNOS expression in the AJ group, the inhibition rate of 20-hydroxyecdysone was the highest than others. On the other hand, the COX-2 expression level of AJ-LP group decreased about 16% compared to that of the control group, and the iNOS expression level was also decreased about 7%. These results suggest that the extract of AJ fermented from *L. plantarum* can be used as an anti-inflammatory natural material.

**Keywords:** RAW264.7, Anti-inflammatory, Nitric oxide, *Achyranthes japonica*, *Lactobacillus plantarum*

## 1. 서 론

염증반응은 내독소, 세균 감염 등의 외부 자극에 대해 생체 조직을 복구 및 재생시키려는 방어반응 기작이다[1]. 그러나 염증반응이 과도하게 일어나면 생체 내 활성산소가 증가하게 되고 산화적 스트레스에 노출이 되어 세포 손상이 일어남으로써 만성 염증성 질환, 신경계 질

† Corresponding Author: Silla University,  
Department of Pharmaceutical Engineering, Busan 46958, Korea  
Tel: +82-51-999-7620 e-mail: adrk@silla.ac.kr

환, 당뇨, 심혈관계 질환, DNA 손상 및 암을 유발할 뿐만 아니라 퇴행성 질환을 유발하는 특정 세포의 유전자 발현이 증가된다[2,3]. 면역조절작용에서 대식세포는 1차적으로 바이러스, 세균, 노화세포, 암세포 등을 제거하는 탐식작용을 하고 생리활성물질과 cytokine을 분비하여 2차적으로 면역반응을 활성화시킨다[4]. 대식세포에서 생성된 염증매개물질이 박테리아 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 면역자극물질에 노출될 경우 RAW264.7 macrophage에서 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 같은 염증매개체들인 cytokine을 분비하고 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 활성화되어 nitric oxide (NO)를 생성한다[5-7].

Catalase peroxidase, SOD (superoxide dismutase)와 같은 항산화 효소 또는 vitamin C, tocopherol, flavonoid 등의 항산화제는 생체 내에서 자유기(free radical), 활성산소 및 과산화물을 억제하는 활성을 가진다[8]. 유산균은 산화적 스트레스에 의한 손상으로부터 스스로를 보호하기 위하여 항산화 물질을 생산하며 효소적, 비효소적 기작을 통해 생체 내 활성산소 축적 억제, 여러 가지 활성산소의 소거 및 방어작용을 한다[9]. 또한 *Lactobacillus plantarum*은 지질 과산화를 저해하며 반응성이 높은 활성산소종에 대한 저항력이 강해 염증 개선에 효과가 있다고 알려져 있다[10].

우슬(*Achyranthes japonica*)은 한방에서 쇠무릎의 뿌리를 지칭하는 비름과 다년초 식물이며 한국, 중국, 일본 등의 아시아 지역에 광범위하게 분포되어 있다[11]. 우슬의 생리활성 성분으로는 oleanolic acid계 saponin, steroid계  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, rubrosterone과 그 밖의 inokosterone, ecdysone, 20-hydroxyecdysone 등이 보고되어 있다[12]. 또한 우슬은 이뇨, 진통, 소종, 통경, 정혈의 치료에 사용되며 항염증, 간 보호, 항산화, 항암 작용 등의 생리 활성이 보고되어 있다[13]. 최근 우슬의 *in vitro* 연구에서는 우슬의 항 아토피 효과[14], 과골세포와 조골세포 분화 효과[15], 우슬의 지표성분 함량 기준 설정[16], 골다공증 유발물질인 카드뮴의 독성 방어[17], 허혈성 뇌 손상에 대한 보호[18] 등이 보고되어 있으며, 우슬을 물, 에탄올, 메탄올 등의 다양한 용매로 추출 및 분획하여 항균, 항산화, 항당뇨 연구가 보고되어 있다[19-21].

본 연구에서는 유산균의 일종인 *L. plantarum*으로 발효시킨 우슬과, 발효 과정을 거치지 않은 우슬을 물(W), 에탄올(E), 헥산(H), 아세트산에틸(EA), 부탄올(B)의 5가지 용매로 추출한 후 LPS로 염증을 유도한 RAW264.7 대식세포에서 염증 주요 매개물질인 NO 생성 억제 효과 및 COX-2와 iNOS의 발현에 미치는 영향을 연구하여 항염증 활성을 알아보고자 한다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험 재료

본 실험에 사용된 우슬(*Achyranthes japonica*, AJ)은 (주)제이앤디에서 파우더 형태로 구입하였다. 우슬(AJ)은 우슬 무게의 5배에 해당하는 멸균수를 첨가하고, *L. plantarum*로 발효한 우슬(AJ-LP)은 우슬 무게의 5배에 해당하는 멸균수 및 우슬 무게의 1%에 해당하는 *L. plantarum*을 첨가한 후 37 °C shaking incubator에서 3일 동안 배양하였다. 이후 AJ와 AJ-LP에 우슬 무게의 5배에 해당하는 물(W), 에탄올(E), 헥산(H), 아세트산에틸(EA), 부탄올(B) 용매를 각각 따로 추가하여 37 °C shaking incubator에서 1일 동안 추출하였다. 추출액을 3,000 rpm으로 10 min 동안 원심분리하여 Whatman No. 2 filter paper (Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과한 후 감압 농축(Eyela

Rotary Evaporator N-1000, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)하여 동결건조 후 시료로 사용하였다. 대조군으로는 우슬의 지표성분으로 알려져 있는 20-hydroxyecdysone ((20-H), Sigma, USA)을 사용하였다.

### 2.2. 세포배양

본 실험에서 사용된 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국 세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM)을 사용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>로 유지된 배양기에서 배양하였다.

### 2.3. Cell viability

시료 농도에 따른 세포독성을 확인하기 위해 RAW264.7 세포의 CCK assay를 실시하였다. RAW264.7 세포를 6 × 10<sup>3</sup> cells/well의 농도로 96-well plate에 분주한 후 24 h 동안 배양하여 부착시켰다. 이후 각 시료 및 대조군을 농도별(0, 62.5, 125.0, 250.0, 500.0  $\mu$ g/mL)로 처리한 후 24 h 동안 배양하였다. CCK solution을 10% (v/v) 비율로 넣고 2 h 동안 반응 후 microplate reader (Multiskan, Thermo Scientific, Korea)를 사용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 세포만 배양한 흡광도 값을 기준으로 비교하였다.

### 2.4. Nitric oxide 생성 저해 효과

AJ와 AJ-LP를 용매별로 추출한 시료의 NO 생성량을 측정하기 위해 NO assay를 시행하였다. RAW264.7 세포를 6-well plate에 2 × 10<sup>6</sup> cells/well로 분주 후 24 h 동안 배양하여 부착시켰다. 100  $\mu$ g/mL 농도로 시료 및 대조군을 처리하고 1 h 후 LPS 1  $\mu$ g/mL를 처리하여 24 h 동안 반응시켰다. 반응을 마친 상등액과 griess reagent (Sigma, USA)를 1 : 1로 섞어 15 min 동안 실온에서 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포로부터 생성된 NO의 양은 NaNO<sub>2</sub> 표준액의 농도를 기준으로 계산하였다.

### 2.5. Cytokine 측정

시료가 LPS의 자극에 의해 생성되는 IL-6, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 생성량에 미치는 효과를 측정하기 위해 NO 측정과 같은 방법으로 세포를 배양한 후, 각 well에서 상등액을 회수하였다. ELISA kit (R&D System, Minneapolis, USA)를 사용하여 제시된 방법에 따라 처리한 다음 흡광도 450 nm에서 ELISA reader로 측정하였다.

### 2.6. Western blot

NO측정과 같은 방법으로 세포를 배양한 후 PBS로 세척하고 0.5 M EDTA와 protease inhibitor cocktail (P3100, genDEPOT, USA)이 들어 있는 RIPA buffer로 세포를 용해시켜 4 °C, 14,000 rpm에서 15 min 동안 원심분리하였다. 그 후 상등액은 Bradford protein assay (Sigma, USA)를 이용해 단백질질을 정량하였다. 35  $\mu$ g의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하고 PVDF membrane으로 transfer하였다. 5% BSA (sigma, USA)가 함유된 TBS buffer를 사용하여 1 h 동안 blocking 후 같은 시약으로 1차 항체(COX-2, iNOS)를 1 : 1,000으로 희석하여 4 °C에서 overnight 하였다. 그 후 0.1% Tween 20이 들어간 TBS buffer (TBST)로 6회 세척하고 2차 항체는 5% skim milk (vollo, Korea)가 함유된 TBS buffer를 사용하여 1 : 5,000의 비율로 희석 후 실온에서 1 h 동안 반응시켰다. 추가로 6회 세척한 후 enhanced chemiluminescence (ECL,

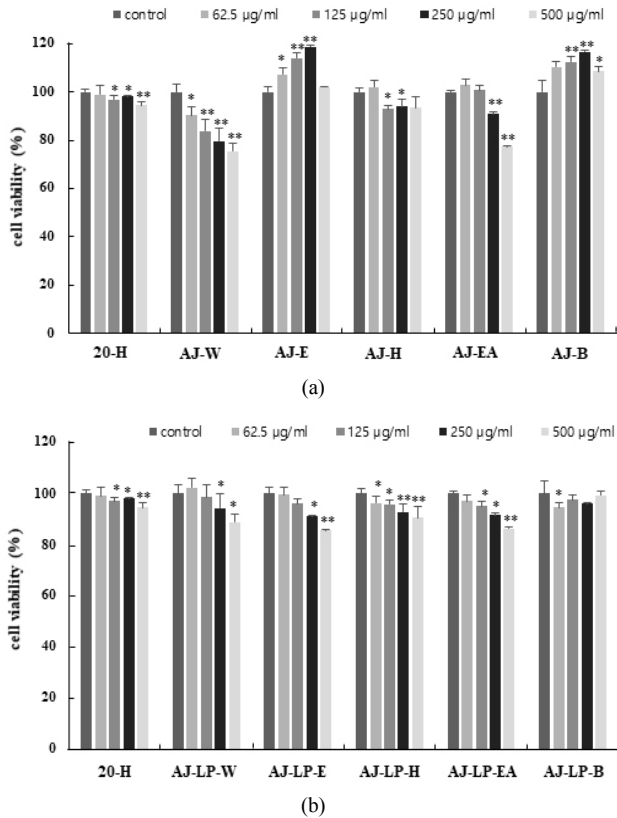


Figure 1. Effect of various extracts from *Achyranthes japonica* on RAW264.7 cells viability. RAW264.7 cells were treated with various concentrations of extract solutions (a) and *L. plantarum* fermented extract solutions (b) for 24 h and cell viability was determined using the CCK assay. Data were expressed as percentage of control (20-H; 20-hydroxyecdysone, AJ; *Achyranthes japonica*, LP; *Lactobacillus plantarum*, w; water, E; ethanol, H; hexane, EA; ethyl acetate, B; butanol)(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

Dongin, Korea)을 처리하고 CHE-BI (Neoscience, Korea)로 가시화 및 정량하였다.

## 2.7. 통계학적 검증

실험 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었으며 유의성 차이를 검증하기 위해 SPSS 20 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하여 one-way ANOVA 분석 후  $P < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple test를 실시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. Cell viability

RAW264.7 세포에서 각 시료의 세포독성 여부를 알아보기 위해 CCK assay를 통하여 세포 생존율을 확인하였다(Figure 1). AJ와 AJ-LP를 각각의 용매로 추출한 시료 및 대조군(20-H)을 농도별(0, 62.5, 125.0, 250.0, 500.0 µg/mL)로 처리한 결과 대조군에서는 모든 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였다. AJ에서는 125 µg/mL 이하의 농도에서 80% 이상의 생존율을(Figure 1(a)), AJ-LP에서는 250 µg/mL 이하의 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였다(Figure 1(b)). 따라서

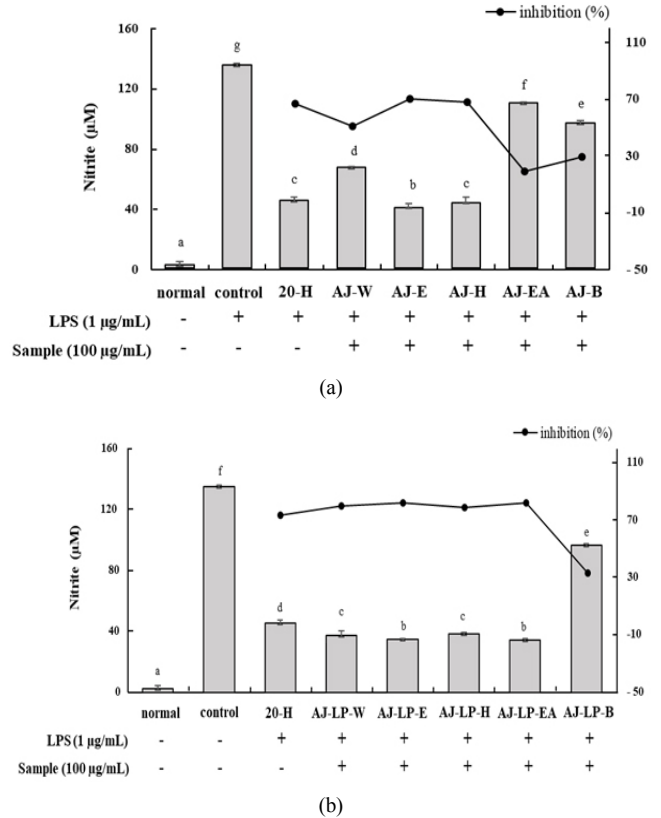
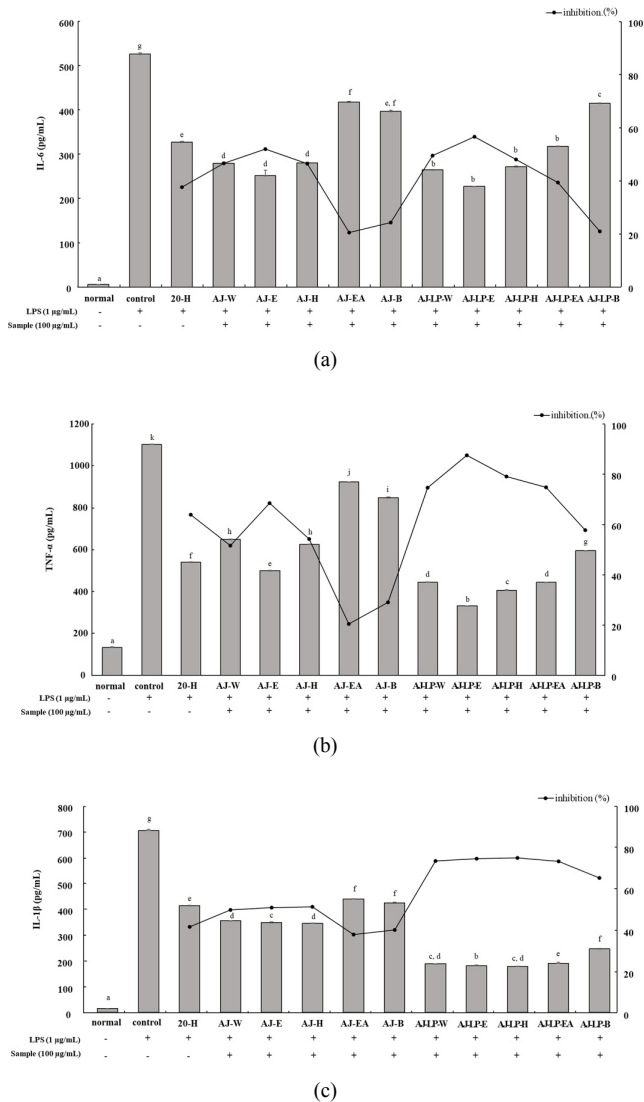


Figure 2. Effect of various extracts from *Achyranthes japonica* on LPS-induced nitrite production in RAW264.7 cells. The cells were pretreated with 100 µg/mL of extract solutions (a) and *L. plantarum* fermented extract solutions (b) and LPS (1 µg/mL) for 24 h. The amount of nitrite in supernatant was measured using Griess reagent (20-H; 20-hydroxyecdysone, AJ; *Achyranthes japonica*, LP; *Lactobacillus plantarum*, w; water, E; ethanol, H; hexane, EA; ethyl acetate, B; butanol)(\* $p < 0.05$ ).

모든 시료가 RAW264.7 세포에서 독성을 가지지 않는 것을 확인하였으며 시료의 농도를 100 µg/mL로 하여 각 실험을 수행하였다.

### 3.2. Nitric oxide 생성저해 효과

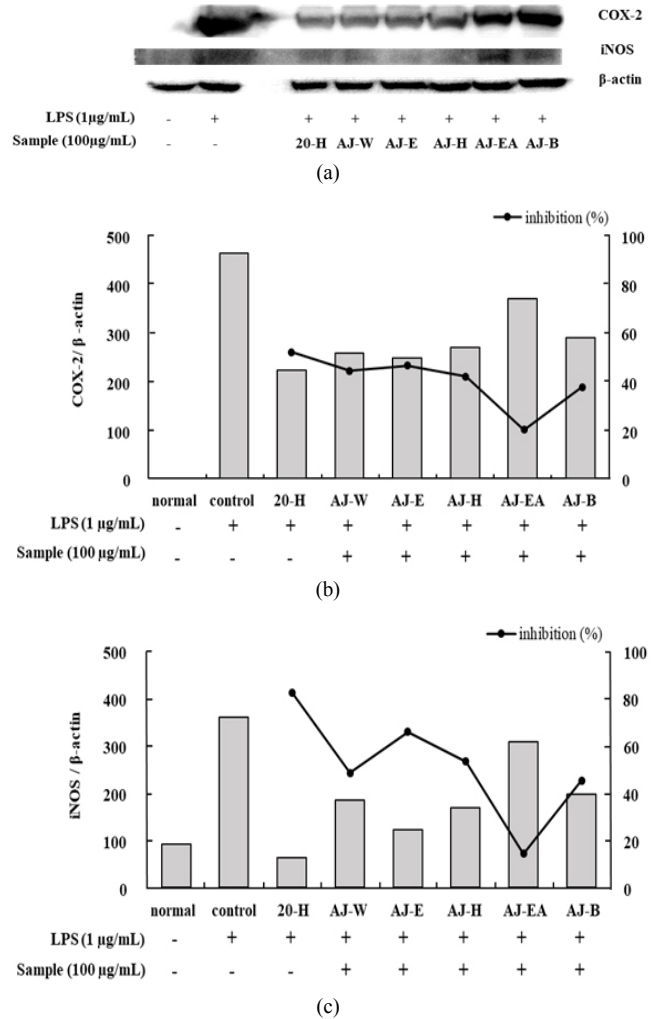
염증반응이 활성화되면 L-arginine에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 NO가 합성되며 과도한 NO 생성은 염증의 심화와 그로 인한 조직의 손상을 초래한다[23]. 따라서 AJ와 AJ-LP의 추출용매별 NO 생성 저해능을 알아보기 위해 RAW264.7 세포를 LPS로 자극시킨 후, 시료 및 대조군을 100 µg/mL 농도로 첨가하여 NO 억제 활성을 분석하였다(Figure 2). LPS만 처리한 control군이 normal군에 비해 NO 생성량이 많은 것으로 보아 염증이 유도된 것을 확인하였다. 대조군은 control군에 비해 66%의 NO 생성 저해율을 나타내었고, AJ를 E, H, W, B, EA로 추출한 시료가 control군에 비해 각각 69.9, 67.6, 50.3, 28.5, 18.6%의 NO 생성 저해율을 나타냈다(Figure 2(a)). AJ-LP를 EA, E, W, H, B로 추출한 시료는 control군에 비해 각각 74.6, 74.2, 72.2, 71.6, 28.4%의 NO 생성 저해율을 나타냈다(Figure 2(b)). 따라서 AJ를 E와 H로 추출한 시료와 AJ-LP를 W, E, H, EA로 추출한 시료는 대조군보다 NO 억제 효능이 뛰어남을 알 수 있었다.



**Figure 3.** Effect of various extracts from *Achyranthes japonica* on production of pro-inflammatory cytokine in LPS-induced RAW264.7 cells. IL-6 (a), TNF- $\alpha$  (b), IL-1 $\beta$  (c) was detected at 450 nm by ELISA method (20-H; 20-hydroxyecdysone, AJ; *Achyranthes japonica*, LP; *Lactobacillus plantarum*, w; water, E; ethanol, H; hexane, EA; ethyl acetate, B; butanol)( $p < 0.05$ ).

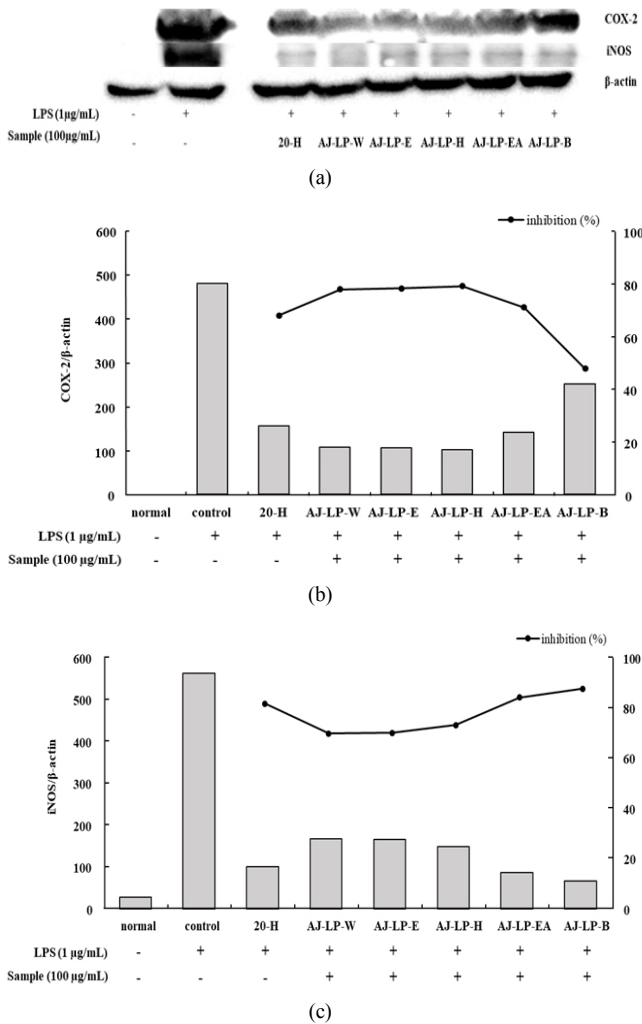
**3.3. Cytokine 측정**

시료가 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 생성되는 pro-inflammatory cytokine (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ELISA 방법으로 측정했다(Figure 3). IL-6의 결과에서 control군이 527.3 pg/mL, 대조군은 328.4 pg/mL로 나타났다. AJ를 H, W, E로 추출한 시료가 각각 281.6, 280.9, 252.5 pg/mL, AJ-LP에서는 EA, H, W, E로 추출한 시료가 각각 318.9, 272.8, 265.6, 228.2 pg/mL의 농도로 대조군에 비해 IL-6 생성량이 낮았다. 특히 AJ-LP-E가 control군에 비해 56.7%, 대조군에 비해 30.5%로 가장 높은 IL-6 저해율을 나타냈다(Figure 3(a)). TNF- $\alpha$ 의 결과에서 control군은 1103.7 pg/mL, 대조군은 540.3 pg/mL로 대조군이 control군에 비해 51.0%의 저해율을 나타냈다. AJ를 E로 추출한 시료와 AJ-LP를 E, H,



**Figure 4.** Effect of various extracts from *Achyranthes japonica* on COX-2 and iNOS protein expressions in LPS-induced RAW264.7 cells. The level of COX-2 and iNOS were determined extract solutions by a western blot analysis and  $\beta$ -actin was used as house keeping gene (a). (b) shows the expression of COX-2 to  $\beta$ -actin and (c) of iNOS to  $\beta$ -actin (20-H; 20-hydroxyecdysone, AJ; *Achyranthes japonica*, w; water, E; ethanol, H; hexane, EA; ethyl acetate, B; butanol).

EA, W로 추출한 시료는 control군에 비해 각각 54.7%와 70.0, 63.2, 59.8, 59.6%로 대조군보다 높은 저해율을 보였다. 특히, AJ-LP-E는 control군에 비해 70.0%, 대조군에 비해 38.6%로 가장 높은 TNF- $\alpha$  저해 효과를 나타냈다(Figure 3(b)). IL-1 $\beta$ 의 결과에서 control군은 704.0 pg/mL, 대조군은 412.6 pg/mL로 대조군이 control군에 비해 41.4%의 IL-1 $\beta$  저해율을 나타냈다. AJ를 H, E, W로 추출한 시료와 AJ-LP를 H, E, W, EA, B로 추출한 시료가 control군에 비해 51.0, 50.6, 49.6%와 74.7, 74.3, 73.3, 73.0, 65.1%의 IL-1 $\beta$  저해율을 나타냈다(Figure 3(c)). AJ-LP를 B로 추출한 시료는 앞에서 살펴본 IL-6, TNF- $\alpha$  생성억제 효과에서 대조군보다 비교적 낮은 저해 효과를 보였지만, IL-1 $\beta$ 에서는 대조군보다 높은 저해 효과를 나타냈다. 발효하지 않은 우슬보다 유산균으로 우슬을 발효했을 때 cytokine 분비량이 더 적다는 것을 알 수 있었으며, 에탄올로 추출한 시료가 다른 추출



**Figure 5.** Effect of various extracts from *Achyranthes japonica* on COX-2 and iNOS protein expressions in LPS-induced RAW264.7 cells. The level of COX-2 and iNOS were determined *L. plantarum* fermented extract solutions by a western blot analysis and  $\beta$ -actin was used as house keeping gene (a). (b) shows the expression of COX-2 to  $\beta$ -actin and (c) of iNOS to  $\beta$ -actin (20-H; 20-hydroxyecdysone, AJ; *Achyranthes japonica*, LP; *Lactobacillus plantarum*, w; water, E; ethanol, H; hexane, EA; ethyl acetate, B; butanol).

용매를 사용하였을 때보다 IL-6, TNF- $\alpha$  뿐만 아니라 IL-1 $\beta$ 에서 control군에 비해 cytokine 분비량이 50% 이상 현저히 감소하였다.

### 3.4. Western blot

LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포에서 AJ (Figure 4)와 AJ-LP (Figure 5)의 COX-2 및 iNOS 발현 저해 효과를 알아보기 위해 western blot을 수행하였다. 세포의 발현 정도에 차이가 없는 house keeping gene으로  $\beta$ -actin을 측정하여 COX-2와 iNOS의 발현율을 비교하였다(Figure 4(a), 5(a)). 먼저 AJ의 용매별 COX-2 발현결과 control군에 비해 대조군은 52%의 저해율을 보였고, AJ의 용매별 추출 시료 중 E가 46.4%로 높은 저해 효능을 보였으며 EA가 20.0%로 가장 낮은 저해 효능을 보였었다(Figure 4(b)). AJ의 용매별 iNOS 발현결과 control

군에 비해 대조군이 82.6%의 저해율로 가장 높았으며 다음으로는 E가 66.2%로 저해율이 높았다(Figure 4(c)). AJ-LP의 용매별 COX-2 발현결과 대조군은 control군에 비해 67.7%의 저해율을 나타냈으며, H, E, W, EA는 control군에 비해 78.9, 78.0, 77.7, 70.7%의 저해율로 대조군보다 높게 나타났다(Figure 5(b)). AJ-LP의 용매별 iNOS 발현은 control군에 비해 모든 군에서 70% 이상의 저해율을 나타냈고 AJ-LP-B가 88.1%로 가장 높은 iNOS 저해율을 나타냈다(Figure 5(c)). 이러한 결과로 보았을 때 AJ군에 비해 AJ-LP군이 COX-2 및 iNOS 발현을 효과적으로 저해하는 것으로 판단된다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 LPS로 염증을 유도한 RAW264.7 대식세포에서 NO 함량, cytokine의 생성량, COX-2와 iNOS의 단백질 발현량을 통하여 *L. plantarum*으로 발효한 우슬(AJ-LP)의 항염증 증진 효과를 알아보 고자 하였다. AJ와 AJ-LP를 여러 가지 용매로 추출한 시료의 세포 독성을 확인하기 위해 CCK assay를 수행하였으며 시료의 농도를 100  $\mu$ g/mL로 하여 이후 실험을 수행하였다. RAW264.7 대식세포에서 LPS만 처리한 control군의 NO 농도는 134  $\mu$ M 수준으로 증가하였으며, 대조군의 NO 농도는 45.3  $\mu$ M로 control군에 비해 66.4%의 저해율을 나타냈다. AJ를 E와 H로 추출한 시료와 AJ-LP를 W, E, H, EA로 추출한 시료가 대조군보다 높은 NO 저해율을 나타냈다. 염증 생성 전사 인자인 cytokine의 생성을 알아보기 위해 대표되는 IL-6, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 를 측정하였다. IL-6의 결과에서는 AJ를 W, E, H로 추출한 시료와 AJ-LP를 W, E, H, EA로 추출한 시료가 대조군의 저해율보다 높게 나타났으며, TNF- $\alpha$ 의 결과에서는 AJ-E와 AJ-LP의 W, E, H, EA 추출 시료가 대조군의 저해율보다 높게 나타났다. 그리고 IL-1 $\beta$ 의 결과에서는 AJ를 W, E, H로 추출한 시료와 AJ-LP를 W, E, H, EA, B로 추출한 시료가 대조군의 저해율보다 높게 나타났다. 결과적으로 AJ-LP를 E로 추출한 시료가 IL-6 및 TNF- $\alpha$  생성량이 가장 낮았으며, AJ-LP를 H로 추출한 시료는 IL-1 $\beta$  생성량이 가장 낮게 나타났다. 또한, TNF- $\alpha$ 는 IL-6의 결과와 비슷한 경향을 나타냈으며 두 결과 모두 AJ군보다 AJ-LP군에서 저해 효능이 뛰어났다. Cytokine의 pro-inflammatory agent에 의해 과발현되어 염증과 관련되는 COX-2와 iNOS의 발현량을 살펴본 결과 AJ군의 여러 용매 추출 시료가 대조군보다 높은 저해 활성을 나타내지는 않았지만, AJ-LP군에서는 W, E, H, EA가 COX-2 발현 결과에서 대조군보다 높은 저해 활성을 가졌으며 EA, B는 iNOS 발현 결과에서 대조군보다 높은 저해 활성을 나타냈다. Yang[22] 등의 결과에서는 TNF- $\alpha$ 가 iNOS 발현을 자극하여 NO 분비를 촉진하는 것으로 보고되어 있다. 본 연구결과 AJ를 여러 용매로 추출한 시료의 TNF- $\alpha$  생성량이 iNOS 발현량 및 NO 생성량 결과와 유사한 경향을 보였다. 이는 iNOS 단백질 발현 억제 효능이 NO 및 TNF- $\alpha$  생성에도 영향을 주는 것으로 판단된다. 위 결과들을 종합적으로 판단해보면 발효하지 않은 우슬보다는 유산균으로 발효한 우슬 시료가 항염증 효과가 뛰어났으며, 그중에서도 에탄올로 추출한 시료가 산화적 스트레스에 기인한 활성산소를 감소시킴으로써 LPS 자극에 의한 cytokine 및 COX-2와 iNOS 발현을 억제시켜 항염증 효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다. Lee[23] 등에서 유산균 발효로 인해 나타나는 생리효과에는 정장 효과, 항종양 효과, 면역부활 효과 등이 있으며 특히 *L. plantarum*은 세포 내에서 금속 이온과 복합체를 형성함으로써 활성산소를 소거하며 산소 내 독성에 대한 내성에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다. 따라서 본 연구결과 *L. plan-*

tarum으로 발효한 우슬의 활성산소 생성 저해 능력이 염증반응 조절과 밀접한 관련이 있다고 사료된다. Kim[24] 등에서는 발효로 인해 기능성 물질의 양이 증가하거나 흡수율이 높은 형태로 전환되는 효과를 가진다는 연구결과가 보고되어 있고, Choi[25] 등은 발효 및 에탄올 또는 열수 추출의 병행은 미생물 대사활동에 의해 천연물의 유효 성분과 생리활성물질의 양을 증가시키거나 새로운 물질의 생성을 기대할 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서 *L. plantarum* 발효로 인하여 우슬의 유효 생리활성물질이 효과적으로 추출됨으로써 항염증 효과가 증대됨을 확인하였고 이는 항염증 기능을 가지는 천연물 소재가 될 것으로 기대된다.

## 감 사

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업(116033-03-1-CG000)의 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## References

1. M. J. Kim, N. Y. Bae, K. B. W. R. Kim, J. H. Park, S. H. Park, Y. J. Cho, and D. H. Ahn, Anti-inflammatory effect of *Zostera marina* ethanolic extract on LPS-induced RAW264.7 cells and mouse model, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **30**(4), 182-190 (2015).
2. H. J. Kim and W. J. Lee, Exercise and reactive oxygen species, *J. Life Sci.*, **27**(9), 1078-1085 (2017).
3. P. K. Kim, K. I. Jung, Y. J. Choi, and S. W. Gal, Anti-inflammatory effects of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaf extracts in LPS-induced RAW 264.7 cells, *J. Life Sci.*, **27**(9), 986-993 (2017).
4. M. G. Choung and E. H. Sohn, Anti-tumor activity of saponin fraction of *Platycodon grandiflorum* through immunomodulatory effects associated with NO production in RAW264.7 cells, *Korean J. Plant Res.*, **24**(5), 557-563 (2011).
5. K. H. Noh, J. H. Jang, K. H. Min, R. Chinzorig, M. O. Lee, and Y. S. Song, Suppressive effect of green tea seed coat ethyl acetate fraction on inflammation and its mechanism in RAW264.7 macrophage cell, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**(5), 625-634 (2011).
6. H. W. Kang, Antioxidant and anti-inflammatory effect of extracts from *Flammulina celutipes* (curtis) singer, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**(8), 1072-1078 (2012).
7. Y. J. Kim and D. Y. Son, Inflammatory mediator regulation of the *Zizyphus jujube* leaf fractions in the LPS-stimulated Raw264.7 mouse macrophage, *Korean J. Food Preserv.*, **21**(1), 114-120 (2014).
8. J. Y. Woo, N. S. Peak, and Y. M. Kim, Studies on antioxidative effect and lactic acid bacteria growth of persimmon leaf extracts, *Korean J. Food Nutr.*, **18**(1), 28-38 (2005).
9. H. S. Kim and J. S. Ham, Antioxidative ability of lactic acid bacteria, *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, **23**(2), 186-192 (2003).
10. S. M. Lim, Resistance to reactive oxygen species and antioxidant activities of some strains of lactic acid bacteria from the mustard leaf Kimchi, *Korean J. Microbiol.*, **46**(4), 375-382 (2010).
11. D. H. Kim, J. S. Sung, M. S. Kim, C. G. Park, and L. W. Park, Growth characteristics and adaptability of introduced *Achyranthes bidentata* blume in Korea, *Korean J. Med. Crop Sci.*, **14**(3), 158-162 (2006).
12. G. Y. Jang, H. Y. Kim, S. H. Lee, Y. Kang, I. G. Hwang, K. S. Woo, T. S. Kang, J. Lee, and H. S. Jeong, Effects of heat treatment and extraction method on antioxidant activity of several medicinal plants, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**(7), 914-920 (2012).
13. S. M. Jung, S. I. Choi, S. M. Park, and T. R. Heo, Antimicrobial effect of *Achyranthes japonica* nakai extracts against *Clostridium difficile*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **39**(5), 564-568 (2007).
14. K. O. Kim, C. S. Ku, M. J. Kim, Y. J. Park, H. W. Ryu, H. H. Song, J. H. Kim, and S. R. Oh, Phytoecdysones from the roots of *Achyranthes japonica* nakai and their anti-atopy activity, *J. Appl. Biol. Chem.*, **58**(1), 13-19 (2015).
15. J. S. Kim, S. W. Lee, Y. O. Kim, M. S. Bang, C. H. Oh, and C. T. Kim, Effects of the hot water extract mixtures from *Achyranthes bidentata* blume and *Panax ginseng* on osteoclast and osteoblast differentiation, *Korean J. Med. Crop sci.*, **23**(2), 117-124 (2015).
16. D. H. Kim, S. H. Kim, Y. S. Jang, M. C. Shin, C. V. Men, Y. K. Lee, M. H. Woo, and J. S. Kang, Establishment of content criteria of marker compounds through the monitoring of *Achyranthes radix* collected from Korea and China, *Anal. Sci. Technol.*, **25**(4), 250-256 (2012).
17. Y. R. Choi, M. J. Kang, and Y. W. Son, Protective effect of *Achyranthis radix* extract on cadmium of osteoporosis-induced agent in cultured osteoblasts, *J. Korean Soc. People Plants Environ.*, **15**(5), 319-324 (2012).
18. T. W. Oh, K. H. Park, M. Y. Lee, G. Choi, and Y. K. Park, Effects of the water extract from *Achyranthis Radix* on serum-deprivation-induced apoptosis in PC12 cells and transient cerebral middle artery occlusion-induced ischemic brains of rats, *Korean J. Herbology*, **27**(2), 77-83 (2012).
19. D. W. Lee, Y. J. Kim, Y. S. Kim, S. Y. Eom, and J. H. Kim, Study on the Anti-inflammatory effect of polysaccharide extract from *Acyranthes bidentata*, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **34**(1), 37-42 (2008).
20. Y. S. Lee, M. S. Kim, H. Y. Kwon, and H. Y. Sohn, A comparison of components and biological activities between the hot water extracts of *Achyranthes japonica* nakai and *Achyranthes bidentata* blume, *J. Life Sci.*, **24**(6), 655-663 (2014).
21. Y. S. Lee, M. S. Kim, D. J. Kim, and H. Y. Sohn, A comparison of the components and biological activities of the ethanol extracts of *Achyranthes japonica* nakai and *Achyranthes bidentata* blume, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **41**(4), 416-424 (2013).
22. H. M. Yang, S. S. Lim, Y. S. Lee, H. K. Shin, Y. S. Oh, and J. K. Kim, Comparison of the anti-inflammatory effects of the extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **39**(3), 342-347 (2007).
23. H. Lee, S. G. Yang, S. M. Park, and D. Y. Jeon, Effect of lactobacilli on reactive oxygen scavenging and immune stimulation, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **7**(4), 290-295 (1992).
24. S. I. Kim, S. M. Lee, C. Y. Lee, H. J. Son, D. Y. Hwang, H. S. Lee, and D. S. Kim, Antimicrobial activity and characteristics of *Asparagus cochinchinensis* fermented with lactic acid bacteria, *Food. Eng. Prog.*, **20**(4), 278-284 (2016).
25. W. S. Choi, H. S. Kwon, R. H. No, G. P. Choi, and H. Y. Lee, Enhancement of anti-inflammatory activities of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts using *Lactobacillus rhamnosus*, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **39**(4), 303-311 (2013).