

LPS 유도 RAW264.7세포에서 발효 옷 추출물을 함유한 장류의 항염증 효과

임현지¹ · 김현영² · 이정미³ · 김현주^{1,*}

¹세계김치연구소, ²순창장류연구소, ³순창장류주식회사

The anti-inflammatory influence of fermented soy products containing a fermented *Rhus verniciflua* extract on lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW 264.7 cells

Hyun Ji Lim¹, Hyoun-Young Kim², Jeong-Mi Lee³, and Hyun Ju Kim^{1,*}

¹Industrial Technology Research Group, World Institute of Kimchi

²Institute of Sunchang Fermented Soybean Products

³Sunchangjuangryu Corp.

Abstract *Rhus verniciflua* (RV) Stokes is a herbal medicine that helps improve blood circulation by stimulating digestion, removing extravasated blood, and raising body temperature. The purpose of this research was to study the anti-inflammatory effect of fermented soy products (FSP) containing a fermented RV (FRV) extract on lipopolysaccharides (LPS)-treated RAW 264.7 cells. Treatment with FRV extracts (1, 10, 100 µg/mL) downregulated nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines as compared to the LPS-treated group. Besides, the RV extract treatment suppressed the expression of genes related to pro-inflammatory cytokines, matrixins, inflammation, and apoptosis, while increasing the expression of genes involved in the antioxidant system. Furthermore, RVS extract upregulated antioxidant enzymes, such as glutathione, Cu,Zn-SOD, and catalase without changes in the Nrf2-Keap1 pathway. FSP (doenjang, ganjang) containing FRV extracts (0.1, 1, or 10 µg/mL) significantly decreased the NO and IL-6 levels in an FSP after 8 weeks of fermentation, but not the expression of genes involved in the inflammation and antioxidant system. These result indicate that an FRV extract and FSPs have a potential application in inflammatory conditions.

Keywords: *Rhus Verniciflua* Stokes, fermented soy products, RAW 264.7 cells, inflammation

서 론

옷은 옷나무과(Anacardiaceae)의 낙엽교목으로 학명은 *Rhus verniciflua* Stokes이며 원산지는 중국에서 히말라야에 걸친 지역 뿐 아니라 한반도 각처에서 자라거나 재배되어 전 세계적으로도 약 600여종이 존재하고 있는 것으로 알려져 있으며 우리나라에는 참옷나무를 포함한 6종의 옷나무가 분포하고 있다(KFS 2008; Kim 등, 2002). 약리효과는 옷나무 껍질 바로 안쪽에서 나오는 옷 진액성분에서 우루시올이나 플라보노이드 등의 각종 약성 물질이 추출되며 옷의 가장 중요한 성분인 우루시올은 응담성분들 중의 하나인 우르신산에 알코올기가 덧붙여진 유사한 구조를 갖는다(Janeway 등, 2005). 한방에서 옷은 혈액순환 촉진, 위장질환, 심장질환, 부인과 질환(Namba, 1980) 등에 효과가 있으나 우루시올을 함유하고 있어 수포, 가려움, 발진 등을 동반한 접촉성피부염을 유발하기 때문에 그 사용에 주의를 기울여 왔다(Jung, 1998). 옷에 함유된 폴리페놀 및 플라보노이드 성분은 산화방지(Kim,

2003; Lee 등, 2002), 항돌연변이(Park 등, 2004), 항염증(Lee 등, 2009; Lee 등, 2010) 및 항당뇨(Lee, 2012), 항비만(Kim 등, 2010), 항혈전(Jeon 등, 2006), 항아토피(Kim, 2013), 숙취해소(Jeong, 2018) 등이 있는 것으로 보고되어 있다. 최근 옷이 고부가가치 산업으로 인식되면서 식의약소재로 이용하려는 시도가 증가되고 있다(KFS, 2008). 식품의약품안전처에서는 2004년 알레르기(allergy) 유발 성분인 우루시올이 제거된 옷 추출물로 옷담 및 옷오리에 식용으로 사용할 수 있도록 규제를 완화하였다(KFDA, 2010). 2013년에는 아까시재목버섯(장수버섯, *Fomitella fraxinea*)을 이용하여 우루시올 성분을 제거한 옷나무 추출물로 장류, 발효 식초, 탁주, 약주, 청주 및 과일주에 한하여 발효공정 전에만 사용할 수 있도록 옷의 기준과 규격이 개정되었다(KFDA, 2012). 현재 온오프라인에서 무독화 옷 추출물을 이용한 다양한 형태의 제품들이 판매되고 있다.

장류는 예로부터 조미를 목적으로 널리 애용되어진 대두 발효 식품으로, 육류 자원이 풍부하지 못한 우리 민족에게 곡류 단백질에서 부족 되기 쉬운 필수 아미노산과 필수 지방산 등의 영양 성분을 공급해주는 중요한 기능을 가지고 있는 전통식품이다(Lee, 2016; Park과 Jung, 2005). 대두를 발효한 간장은 다양한 맛 성분과 함께 산화방지, 항암 효능을 가지는 펩타이드 및 아이소플라본등과 같은 폴리페놀 화합물, 간 해독작용이 있는 메싸이오닌 및 콜레스테롤을 용해하여 동맥경화 예방과 고혈압 개선에 도움을 주는 레시틴과 같은 기능성 물질들이 함유되어 있어 음식의

*Corresponding author: Hyun Ju Kim, Industrial Technology Research Group, World Institute of Kimchi, Gwangju 61755, Korea
Tel: +82-62-610-1725

Fax: +82-62-610-1850

E-mail: hjkim@wikim.re.kr

Received June 5, 2018; revised September 19, 2018;

accepted November 14, 2018

조미료뿐만 아니라 기능성 소재로서의 활용 가능성도 보고되고 있다(Kwon 등, 2006). 최근에는 간장의 기능성과 관련하여 시판 간장에서 추출한 다당류의 항염증 효과, 항균 및 항암활성, 장관 면역 등과 관련한 연구가 진행된 바 있다(Lee 등, 2004; Matsui 등, 2010). 이러한 다양한 기능성에도 불구하고, 대표적인 전통 슬로우 푸드인 장류의 섭취를 제한하는 이유 중 하나는 제조 시 첨가되는 높은 식염의 함량 때문이다. 소금의 과다 섭취는 고혈압과 같은 심혈관계 질환에 대한 위험을 증가시키는 인자로 지적되고 있다. 한편으로, 저염화에 따른 보존성의 유지를 위해서 기능성이 있는 자연 소재들을 발굴하여 부재료로 활용함으로써 전통식품의 저염화 및 기능성 강화를 모색하는 연구들이 진행되고 있다(Lee, 2016). 이처럼 전통 장류식품의 기능성을 강화하기 위한 연구들이 진행되어 왔으나 아직까지 옷을 첨가한 장류의 생리활성 규명에 관한 연구는 수행된 바 없다.

따라서, 본 연구에서는 옷의 산업적 활용성 및 농산업체의 부가가치 증대를 위한 다양한 옷 가공품 개발의 일환으로 아까시 제묵버섯에 의해 우루시올 성분이 제거된 무독화 옷(Choi 등, 2007) 추출물을 첨가한 장류의 생리활성을 분석하였다. 옷 추출물과 옷 함유 농도와 발효시기를 다르게 한 된장과 간장을 조제하여 세포실험을 진행하였다. RAW 264.7세포에 옷 추출물, 옷 추출물 0, 5, 10% 첨가 된장 추출물 및 간장 추출물을 처리하여 세포 생존률과 LPS 유도 NO생성 억제력을 확인하였고, 염증 관련 인자인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 사이토카인 및 PGE₂ 생성량, 그리고 염증, 산화스트레스 및 산화방지시스템 관련 유전자 발현 정도를 확인하였다.

재료 및 방법

추출물 제조

본 실험에 사용한 옷 추출물, 옷 첨가 된장 및 간장은 순창군 장류사업소(Sunchang, Korea)로부터 제공받아 실험에 사용하였다. Choi 등(2007)의 방법을 따라 제조된 장수버섯균사체를 접종하고 21°C에서 30일간 배양한 후 50°C에서 열풍 건조시켜 발효 옷을 제조하였다. 옷 추출물은 전제 된장 및 간장 대비 0, 5, 10% 첨가하여 0주, 4주, 8주 발효·숙성시킨 후 실험 재료로 사용하였다. 옷 첨가 된장은 시료 무게의 10배에 해당하는 증류수를 첨가하여 24시간 실온에서 교반하여 추출하였다. 여과지로 여과한 후 추출액은 -70°C에서 냉동 건조하여 세포실험에 사용하였다. 옷 첨가 간장은 시료 무게의 10배에 해당하는 100% 에탄올을 첨가하여 24시간 실온에서 교반하여 추출하였다. 추출액을 -20°C에서 하루 방치한 후 간장에 포함된 소금이 석출되면 상층액만 거름종이(Whatman No. 2, Kent, UK)로 여과하여 여과액을 얻었다. 소금을 제거한 여과액을 회전 증발기(N-1000S, EYELA, Tokyo, Japan)에 넣고 45°C에서 에탄올을 완전히 증발시킨 후, -70°C에서 냉동 건조하여 세포실험에 사용하였다.

세포 배양

실험에 사용된 마우스 큰포식세포 RAW 264.7은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포는 습윤한 5% CO₂, 37°C 배양기(SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였으며 배양액은 5% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 1% antibiotic-antibiotic을 함유한 DMEM 배지를 사용하였다. FBS와 antibiotic-antibiotic는 Gibco (Rockville, MD, USA), 배지는 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 배지는 2-3일마다 교환하였으며 세포가 80% 이상 자랐을 때 인산완충식염수(phosphate buffered saline,

PBS, Gibco, Rockville, MD, USA)로 세척한 후 cell scraper를 사용하여 계대배양 하였다.

세포 독성 평가

RAW 264.7세포를 24 well plate에 5×10⁴ cell/well의 농도로 분주하고 5% CO₂ 배양기에 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 옷 추출물, 된장 및 간장 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 반응시킨 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액을 5 mg/mL 농도로 제조하여 각각 40 μ L 처리한 후 8시간 이상 배양하였다. 배양 후 다이메틸 설펜사이드(DMSO, Sigma-Aldrich) 600 μ L 첨가하여 포마잔(formazan)을 완전히 용해한 후, 흡광도 측정기를 사용하여 540 nm의 파장에서 그 흡광도를 측정하여 생존율은 백분율로 계산하였다.

산화질소(Nitric oxide, NO) 측정

RAW 264.7세포를 24 well plate에 5×10⁴ cell/well의 농도로 분주하고 5% CO₂ 배양기에 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 옷 추출물, 된장 및 간장 추출물을 농도별로 처리하여 4시간 배양 후, 지방질다당류(lipopolysaccharides, LPS, 1 μ g/mL)를 처리하여 48시간 자극시킨 후 배양 상층액을 취하여 (Sigma-Aldrich)를 사용하여 96-well plate에 처리하고, 상온에서 15분간 반응한 후 540 nm 파장으로 측정하였다.

염증성 사이토카인 측정

사이토카인을 측정하기 위하여 RAW 264.7세포를 24 well plate에 5×10⁴ cell/well의 농도로 분주하고 배양기에 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 옷 추출물, 된장 및 간장 추출물을 농도별로 처리하여 4시간 배양 후, LPS (1 μ g/mL)을 처리하여 18시간 배양하였다. 18시간 경과 후 배양 상층액을 e-tube에 취하여 12,000 rpm, 10분 원심분리하여 실험용 시료로 사용하였다. TNF- α , IL-1 β , IL-6 염증성 사이토카인은 ELISA kit (eBioscience Co., San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 실험 시작 하루 전 coating buffer에 1차 항체를 250:1 비율로 희석하여 100 μ L씩 분주하고 4°C에서 overnight하였다. 다음 날, 30분간 안정화 후 PBS로 washing 3번 반복한 뒤 block buffer를 200 μ L씩 분주하여 1시간 30분 동안 상온에 보관하였다. 0.05% PBST washing 3번 반복 후 표준용액과 시료를 100 L씩 분주하고 2시간 동안 상온에 보관하였다. 0.05% PBST washing 5번 반복 후 2차 항체와 발색 효소를 block buffer와 희석하여 100 μ L씩 분주하고 1시간 30분 동안 상온에 보관하였다. 0.05% PBST washing 6번 반복 후 TMB 기질액을 100 μ L씩 분주하고 30분 이내로 450-480 nm 흡광도로 측정하였다.

프로스타글란딘(Prostaglandin) E₂ (PGE₂) 측정

RAW 264.7세포를 24 well plate에 5×10⁴ cell/well의 농도로 분주하고 배양기에 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 옷 추출물, 된장 및 간장 추출물을 농도별로 처리하여 4시간 배양 후, LPS (1 μ g/mL)을 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 경과 후 배양 상층액을 e-tube에 취하여 12,000 rpm, 10분 원심분리하여 실험을 위한 시료로 사용하였다. PGE₂ ELISA kit (Cambridge Bioscience, Cambridge, MA, USA) 시약들을 실험조건에 맞게 희석하여 준비하고, standard와 시료를 100 μ L, 분석 완충용액 50 μ L, conjugate 50 μ L, 항체 50 μ L씩 분주하였다. 2시간 후, washing buffer로 4번 세척 후 conjugate 5 μ L, pNpp 기질 용액 200 μ L씩

넣어주고 45분 후 405-480 nm 흡광도를 측정하였다.

유전자 발현 분석

RAW 264.7세포를 6 cm dish에 5×10 cell/well의 농도로 분주하고 배양기에 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 옷 추출물, 된장 및 간장 추출물을 농도별로 처리하여 1시간 배양 후, LPS (1 µg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 상층액을 제거한 뒤 PBS로 2회 세척한 후 PBS 1 mL 넣어 scrapper로 취하여 e-tube에 옮긴 뒤 4,000 rpm, 5분 원심분리 하여 샘플을 -70°C 보관하여 유전자 분석에 사용하였다. Total RNA를 분리하여 100 ng/5 µL가 되도록 RNA 양을 정량하였다. 냉동고에서 reporter codeset과 probeset을 꺼내서 얼음위에서 녹인 후, 몇 차례 invert해서 섞어주고, spin down하였다. 70 µL의 hybridization buffer를 reporter codeset tube에 넣어 master mix을 만든 뒤, capture probe는 해당 tube에 섞지 않고 8 µL를 각각의 well에 분주하였다. 5 µL의 RNA를 각각의 well에 분주하였다. Capture probe는 invert 한 후 각각의 well에 2 µL씩 분주하였다. 반응이 시작되기 전에 thermocycler을 65°C에 반응 부피를 15 µL되게 예열하였다. nCounter pre-station에 hybridization 과정이 완료된 샘플을 로딩하여 세척 및

immobilization 과정을 수행했다. Prep station에서 위의 과정이 완료된 카트리지를 digital analyzer에 올린 후 counting 한 후 nSolver software를 이용하여 발현 정도를 분석하였다. 타겟 유전자에 대한 정보는 Table 1과 같다.

통계처리

실험의 결과는 평균과 표준편차(mean±SD)로 나타내었고, 실험 결과의 통계적 유의성은 Graph Pad Prism version 5.0 program (Graph Pad Software, Inc, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 one-way ANOVA test로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Tukey post hoc test로 $p < 0.05$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

세포 독성

RAW 264.7세포에서 옷 추출물, 된장, 간장 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 살펴보았다. 옷 추출물(*Rhus vernichiflua* Stokes: RV)을 각각의 농도(1-100 µg/mL)로 처리한 결과 RAW 264.7세포의 세포생존율에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되

Table 1. Gene list for gene expression

Gene name	Accession	Position	Target Sequence	HUGO Gene	NSID
catalase	NM_009804.2	0.00000445	AGCTGACACAGITCG	Cat	NM_009804.2:480
IL-8	NM_011339.2	0.00160373	AGAGAATATTTCCCTT	Cxcl15	NM_011339.2:419
c-fos	NM_010234.2	0.16075721	AGCTGGTGCATTACA	Fos	NM_010234.2:1330
GAPDH	NM_008084.2	0.00024606	GGCACAGTCAAGGCC	Gapdh	NM_008084.2:215
GCLC	NM_010295.2	0.00100296	TATGGCTTTGAGTGCT	Gclc	NM_010295.2:1102
GCLM	NM_008129.3	0.00002194	CAAAAGACCTTGAAT	Gclm	NM_008129.3:535
GST	NM_029555.2	0.28811502	CCTTACAGAGTAAATCT	Gstk1	NM_029555.2:773
HO-1	NM_010442.2	0.71419144	CTGGGGAGGGCCTGG	Hmox1	NM_010442.2:610
IFN-	NM_008337.1	0.00620483	CTAGCTCTGAGACAA	Ifng	NM_008337.1:95
IL-10	NM_010548.1	0.00074371	GGGCCCTTTGCTATGG	Il10	NM_010548.1:985
IL-1α	NM_010554.4	0.20210315	ACCTCTGAAACGTCA	Il1a	NM_010554.4:225
IL-1β	NM_008361.3	0.00406476	GTTGATTCAAGGGGA	Il1b	NM_008361.3:1120
IL-6	NM_031168.1	0.84861737	CTCTCTGCAAGAGACT	Il6	NM_031168.1:40
p-JAK1	NM_146145.2	0.001378	CATAGCAAAGGACTG	Jak1	NM_146145.2:4080
p-JAK2	NM_008413.2	0.06212429	GATCCAAGACTATCA	Jak2	NM_008413.2:1049
c-Jun	NM_010591.2	0.02679975	CGCGACCAGAACGAT	Jun	NM_010591.2:2212
Keap1	NM_016679.4	0.78703451	TCTATTGTCTCTGCTT	Keap1	NM_016679.4:4140
MMP-2	NM_008610.2	0.05872361	AGTTAACCAGCCTTCT	Mmp2	NM_008610.2:2376
MMP-6	NM_001033339.3	0.0075304	TGTGCGTCAAGTCTTG	Mmp25	NM_001033339.3:2865
MMP-3	NM_010809.1	0.01059891	TCTTTGTGAAAGGAA	Mmp3	NM_010809.1:1575
MMP-9	NM_013599.2	0.26554418	CCTTACAGAGTCTTT	Mmp9	NM_013599.2:1570
NADPH-p47 ^{phox}	NM_001286037.1	0.00309115	ACCATCCGCAACGCA	Ncf1	NM_001286037.1:970
Nrf2	NR_132727.1	0.03957387	AGCAGGCTATCTCCTA	Nfe2l2	NR_132727.1:144
IκB-α	NM_010907.2	0.3221218	CTGCAGGCCACCAAC	Nfkbia	NM_010907.2:646
iNOS	NM_010927.3	0.00186702	CCCCCTCTCCACCC	Nos2	NM_010927.3:3715
NQO1	NM_008706.5	0.00376324	TTTCAGTCCCATTGC	Nqo1	NM_008706.5:430
COX-2	NM_011198.3	0.19937752	CCATCAGTTTTTCAAG	Ptgs2	NM_011198.3:675
Cu/zn-SOD	NM_011434.1	0.1584187	TGTGTCATTGAAGAT	Sod1	NM_011434.1:406
Mn-SOD	NM_013671.3	0.39976406	ATAGCTTTGCTCCTGC	Sod2	NM_013671.3:1495
FeSOD	NM_011435.3	0.00572138	TCCAACCGTGCCATCC	Sod3	NM_011435.3:633
p-STAT1	NM_009283.3	0.00082771	ACGCTGGGAACAGAA	Stat1	NM_009283.3:1590
STAT5α	NM_011488.2	0.12951882	CATGTCAGTGAAG	Stat5a	NM_011488.2:1545
STAT5β	NM_011489.3	0.00129845	TGAGGGTGTACCTGG	Stat5b	NM_011489.3:4855
TLR-4	NM_021297.2	0.01220774	AACGGCAACTTGAC	Tlr4	NM_021297.2:2510

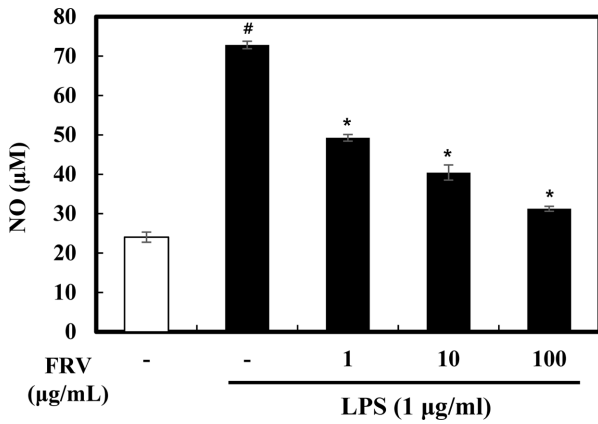


Fig. 1. Effects of the fermented-*Rhus verniciflua* (FRV) extract on NO levels in LPS-induced RAW 264.7 cells. FRV was pre-treated at the concentration of 1, 10, 100 µg/mL. After 4 h, the RAW 264.7 cells were treated with 1 µg/mL LPS for 48 h. Total NO levels were evaluated by Griess reagent assay. Data values were expressed as mean±SD. Significant difference was analyzed with ANOVA Tukey post hoc test ([#]*p*<0.05 versus control and ^{*}*p*<0.05 versus LPS alone).

었다(data not shown). 웃 첨가 농도 0, 5, 10% 된장 및 간장의 발효 0주, 4주, 8주 추출물은 각각의 농도(0.1-10 µg/mL)로 처리한 결과 세포 생존율에 영향을 미치지 않아 실험 농도로 설정하였다(data not shown). 웃 첨가 된장 및 간장 100 µg/mL 처리 시 세포생존율이 94% 수준으로 감소되어 실제 실험에 사용한 농도

는 0.1-10 µg/mL로 정하였다.

NO 생성 억제 효능

NO는 활성 산소종의 하나이며, 일반적으로 종양을 제거하는 면역반응에 관여하지만 과량 존재할 경우 인체에 염증반응을 조절하여 다양한 병리적인 반응을 유도한다. NO 저해에 대한 웃 추출물, 웃 첨가 된장 및 간장추출물의 효과를 알아보기 위해 RAW 264.7세포에 농도별 추출물을 4시간 동안 처리한 후 LPS (1 µg/mL)를 48시간 동안 처리하여 NO 생성량을 측정하였다. 웃 추출물을 각각의 농도(1-100 µg/mL)로 처리한 결과, RAW 264.7 세포에서 LPS 처리로 증가된 NO 생성을 농도 의존적으로 저해하였다(Fig. 1). 된장 추출물은 0.1-10 µg/mL로 처리한 결과 LPS에 의해 증가된 NO 생성을 모든 농도에서 저해하였다. 발효하지 않은 된장(발효 0주 된장)에서 웃 첨가 농도에 따른 NO 생성억제 효과는 나타나지 않았지만, 발효 8주 된장에서는 웃 첨가 농도가 증가할수록 NO 생성은 억제되는 것으로 나타났다. 특히 웃 추출물이 10% 함유된 발효 8주차 된장에서 NO 생성 억제 효능이 가장 뛰어났다(Fig. 2). 발효 4주차 된장 추출물의 NO 생성 정도를 살펴본 결과 웃 첨가농도 5%와 10%인 경우 0.1 µg/mL 농도에서 NO 생성 억제효과가 나타났다(data not shown). 간장 추출물 또한 농도별 0.1-10 µg/mL로 처리한 결과 LPS에 의해 증가되는 NO 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 발효하지 않은 간장(발효 0주 간장)에서 웃 첨가 농도에 따른 NO 생성억제 효과는 나타나지 않았지만, 발효 8주 간장에서는 웃 첨가 농도가 증가할수록 NO 생성은 억제되는 것으로 나타났다. 특히 웃 10% 첨가 간장의 경우 발효하지 않은 간장(발효 0주

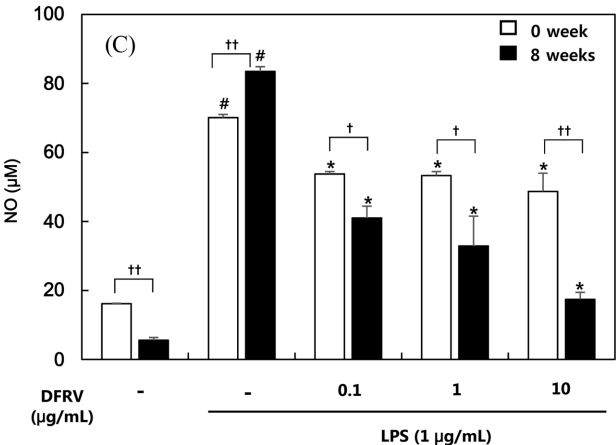
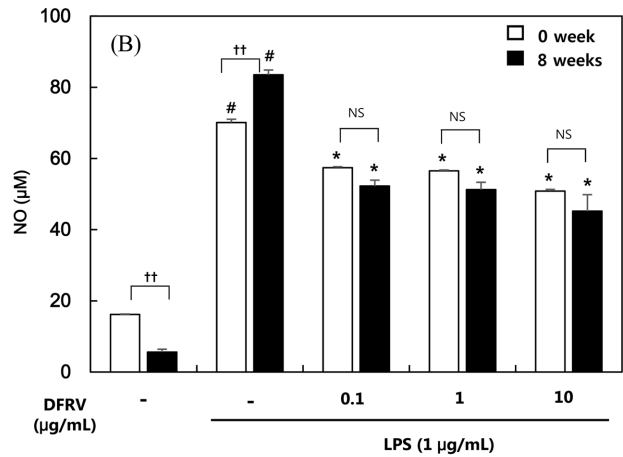
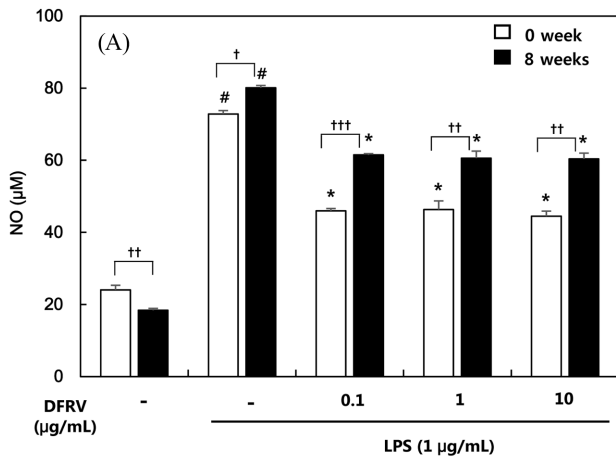


Fig. 2. Effects of the doenjang (soybean paste) containing fermented-*Rhus verniciflua* (FRV) extract (DFRV) on NO levels in LPS-induced RAW 264.7 cells. DFRV was pre-treated at the concentration of 0.1, 1, 10 µg/mL. After 4 h, the RAW 264.7 cells were treated with 1 µg/mL LPS for 48 h. Total NO levels were evaluated by Griess reagent assay. Data values were expressed as mean±SD. Significant difference was analyzed with ANOVA Tukey post hoc test ([#]*p*<0.05 versus control and ^{*}*p*<0.05 versus LPS alone) and Student's two tails t-test with a significant level of [†]*p*<0.05, ^{††}*p*<0.01 and ^{†††}*p*<0.001 between two groups. NS means no significance. A: Doenjang extract containing 0% FRV, B: Doenjang extract containing 5% FRV, C: Doenjang extract containing 10% FRV

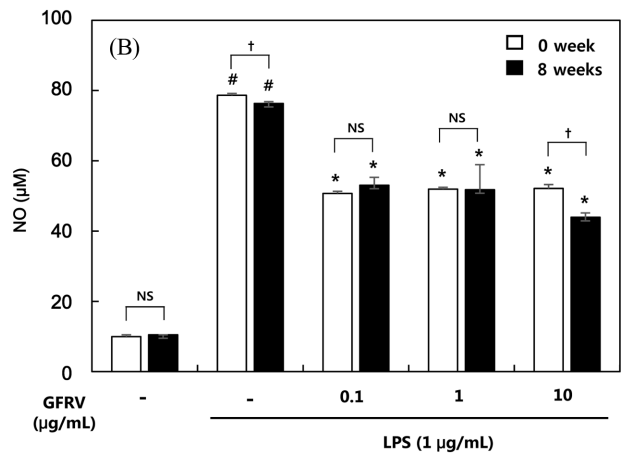
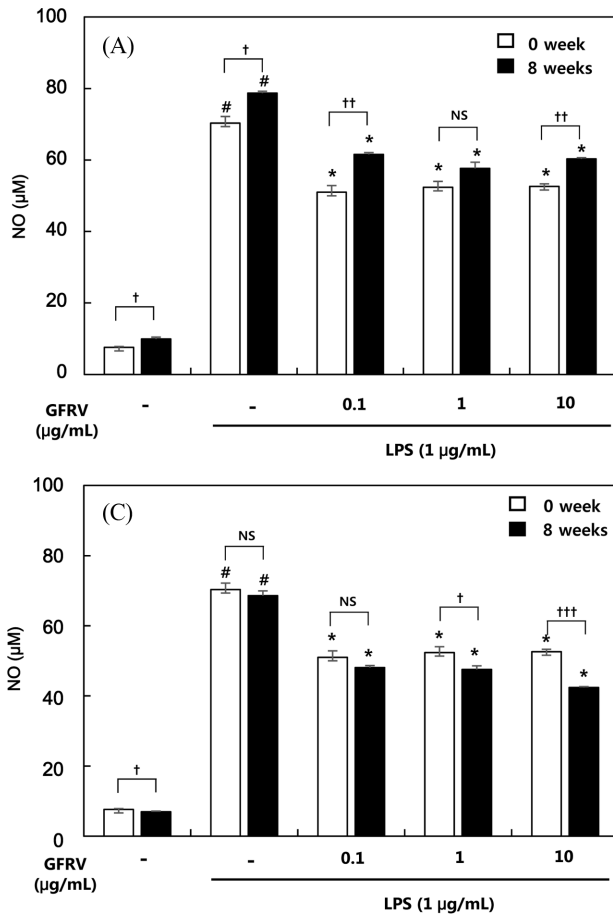


Fig. 3. Effects of the ganjang (soy sauce) containing fermented-*Rhus verniciflua* (FRV) extract (GFRV) on NO levels in LPS-induced RAW 264.7 cells. GFRV was treated at the concentration of 0.1, 1, 10 µg/mL. After 4 h, the RAW 264.7 cells were treated with 1 µg/mL LPS for 48 h. Total NO level were evaluated by Griess reagent assay. Data values were expressed as mean±SD. Significant difference was analyzed with ANOVA Tukey post hoc test ([#]*p*<0.05 versus control and **p*<0.05 versus LPS alone) and Student's two tails t-test with a significant level of †*p*<0.05, ††*p*<0.01 and †††*p*<0.001 between two groups. NS means no significance. A: Ganjang extract containing 0% FRV, B: Ganjang extract containing 5% FRV, C: Ganjang extract containing 10% FRV

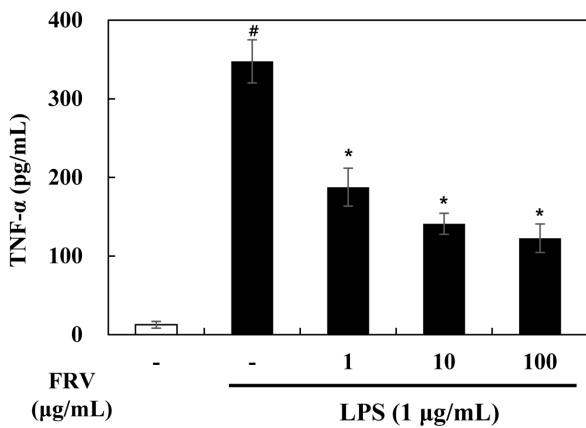
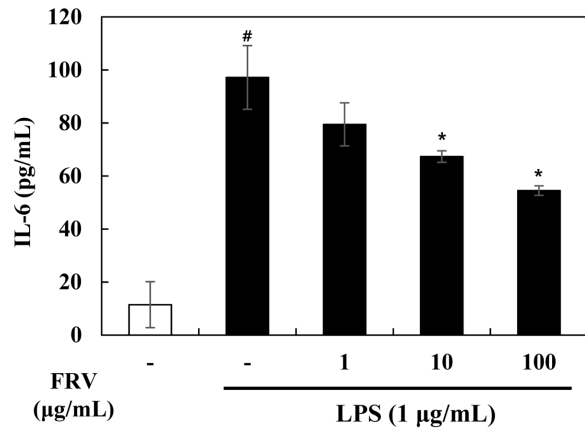
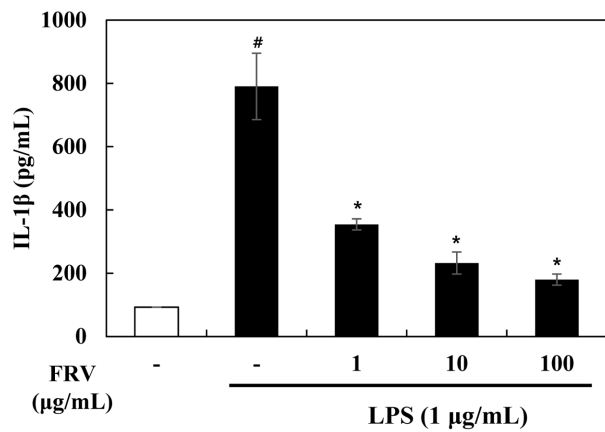


Fig. 4. Effects of the fermented-*Rhus verniciflua* (FRV) extract on inflammatory cytokine levels in LPS-induced RAW 264.7 cells. FRV was treated at the concentration of 1, 10, 100 µg/mL. After 4 h, the RAW 264.7 cells were treated with 1 µg/mL LPS for 18 h. Data values were expressed as mean±SD. Significant difference was analyzed with ANOVA Tukey post hoc test ([#]*p*<0.05 versus control and **p*<0.05 versus LPS alone).

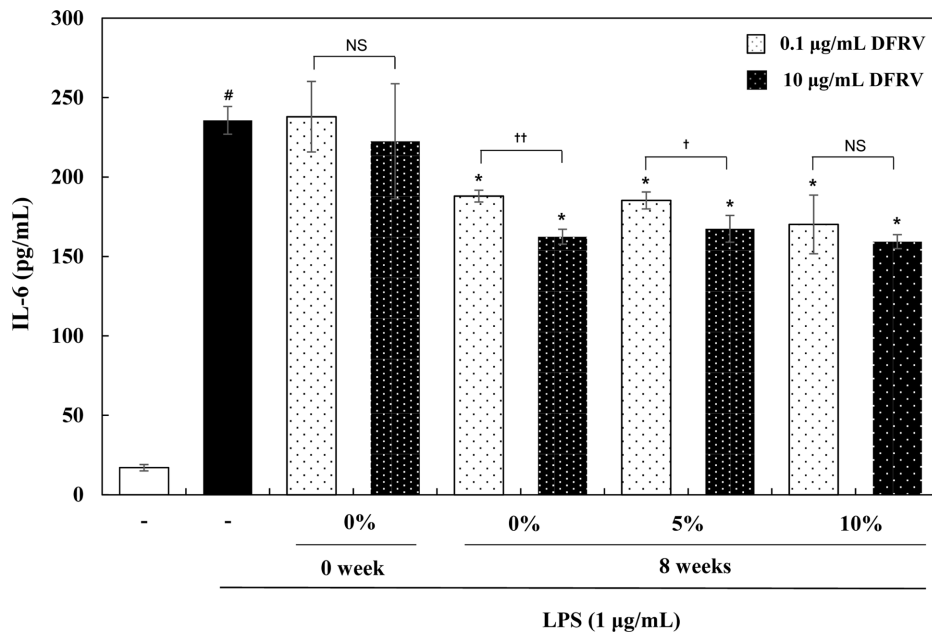


Fig. 5. Effects of the doenjang (soybean paste) containing fermented-*Rhus verniciflua* (FRV) extract (DFRV) on IL-6 levels in LPS-induced RAW 264.7 cells. DFRV was treated at the concentration of 0.1, 10 µg/mL. After 4 h, the RAW 264.7 cells were treated with 1 µg/mL LPS for 18 h. Data values were expressed as mean±SD. Significant difference was analyzed with ANOVA Tukey post hoc test ([#] $p < 0.05$ versus control and $*p < 0.05$ versus LPS alone) and Student's two tails t-test with a significant level of [†] $p < 0.05$ and ^{††} $p < 0.01$ between two groups. NS means no significance.

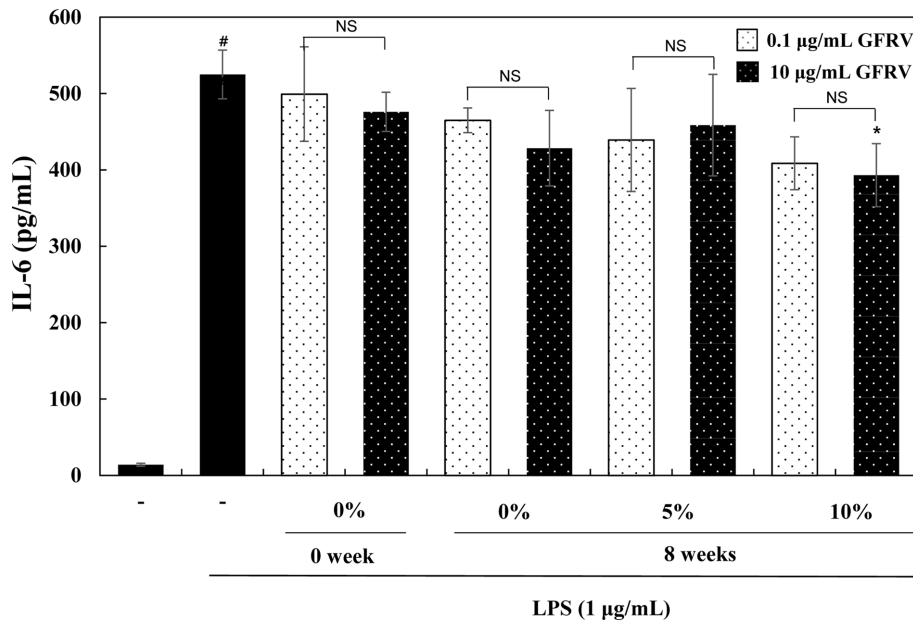


Fig. 6. Effects of the ganjang (soy sauce) containing fermented-*Rhus verniciflua* (FRV) extract (GFRV) on IL-6 levels in LPS-induced RAW 264.7 cells. GFRV was treated at the concentration of 0.1, 10 µg/mL. After 4 h, the RAW 264.7 cells were treated with 1 µg/mL LPS for 18 h. Data values were expressed as mean±SD. Significant difference was analyzed with ANOVA Tukey post hoc test ($p < 0.05$ versus control and $*p < 0.05$ versus LPS alone). NS means no significance.

간장에 비해 발효 8주 간장에서 NO 생성 억제 효능이 크게 나타났다(Fig. 3). 우루시올이 제거된 웃 추출물의 처리가 LPS 자극에 의해 증가된 ROS, NO, PGE₂ 모두 억제하였으며 이러한 효과는 웃나무의 플라보노이드인 푸스틴(fustin)이 가장 효과적이었다(Moon, 2014).

염증성 사이토카인 억제 효과

TNF-α는 급성염증반응을 주로 매개하는 사이토카인이며, 주로 활성화된 큰포식세포에 의해 분비된다. TNF-α의 중요한 역할은 면역세포의 조절이며, IL-1β과 IL-6의 분비를 자극할 뿐만 아니라 NF-κB와 AP-1과 같은 전사인자들을 활성화시키거나 세포사

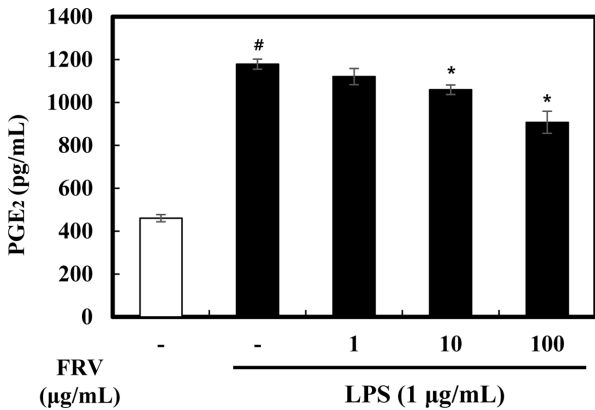


Fig. 7. Effects of the fermented-*Rhus verniciflua* (FRV) extract on PGE₂ levels in LPS-induced RAW 264.7 cells. FRV was treated at the concentration of 1, 10, 100 µg/mL. After 4 h, the RAW 264.7 cells were treated with 1 µg/mL LPS for 24 h. Data values were expressed as mean±SD. Significant difference was analyzed with ANOVA Tukey post hoc test ([#]*p*<0.05 versus control and ^{*}*p*<0.05 versus LPS alone).

멸을 유발한다(Blaser 등, 2016). IL-1β는 저농도의 경우 국소적 염증반응에 관여하고, 고농도 시 혈류로 들어가 내분비 기능을 나타내며, NF-κB와 AP-1 등의 전사인자를 활성화시키고, MAP Kinase 활성화와 연관된다고 알려져 있다(Sun 등, 2017). 옷 추출물이 RAW 264.7세포에서 LPS에 의한 IL-1β 생성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 모든 옷 추출물 처리 군(1-100 g/mL)에서 LPS에 의해 증가된 IL-1β 생성을 효과적으로 억제하였다(Fig. 4A). IL-6는 급성염증반응에 중요한 사이토카인이며, 국소적 및 전신적 범위에서 작용하고, 단핵세포, 혈관내피세포, 섬유모세포 외 여러 세포에서 IL-1β과 TNF-α의 반응에 의해 생성되며, p38 MAPK와 NF-κB 신호 전달체계의 영향을 받는다(Sun 등, 2017). 옷 추출물이 RAW 264.7세포에서 LPS에 의한 IL-6 생성에 미치

는 영향을 살펴 본 결과, 모든 옷 추출물 처리 군(1-100 g/mL)에서 LPS에 의해 증가된 IL-6 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 4B). 옷 추출물이 RAW 264.7세포에서 LPS에 의한 TNF-α 생성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 모든 옷 추출물 처리 군(1-100 g/mL)에서 LPS만 처리한 대조군에 비해 TNF-α 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 4C).

옷 첨가 된장의 경우, LPS에 의하여 IL-6 생성량은 235.67±8.73 pg/mL로 LPS를 처리하지 않은 정상대조군에 비해 약 14배 증가하였다. 발효하지 않은 된장에 비해 발효 8주차 된장에서 IL-6 생성 억제효능이 크게 나타났다. 또한 옷 첨가 농도가 많을수록 IL-6 생성 억제 효능이 증가하는 경향을 보였다. 특히 10%의 옷 추출물이 첨가된 발효 8주차 된장 10 µg/mL 군에서 IL-6 농도는 159.32±4.40 pg/mL로 가장 크게 감소하였다(Fig. 5). 옷 첨가 간장의 경우, LPS에 의하여 IL-6 생성량은 525.01±31.89 pg/mL로 LPS를 처리하지 않은 정상대조군에 비해 약 37배 증가하였다. 발효하지 않은 간장에 비해 발효 8주차 된장에서 IL-6 생성 억제 효능이 크게 나타났다. 또한 옷 첨가 농도가 많을수록 IL-6 생성 억제 효능이 증가하였다. 10%의 옷 추출물이 첨가된 발효 8주차 간장 10 µg/mL 군에서 IL-6 농도는 393.1541.26 pg/mL로 가장 효과가 좋았다(Fig. 6).

PGE₂ 생성 억제 효능

옷 추출물이 RAW 264.7세포에서 염증성 매개인자인 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 ELISA 방법을 활용하여 측정하였다. 전염증성 자극에 의해 생성되는 COX-2는 염증을 유발하는 물질인 프로스타글란딘합성을 증가시켜 염증반응에 있어 중추적인 역할을 한다고 알려져있다(Needleman, 1997). COX-2의 선택적인 억제제의 개발은 염증의 치료에 타겟 물질이 되고 있으며 PGE₂는 염증반응과 혈관확장을 일으키고, 과발현되었을 때 종양을 생성하기도 한다(Patrono, 2016). 대식세포에 LPS처리 시 PGE₂의 수준이 1178.67±23.33 pg/mL로 LPS를 처리하지 않은 정상대조군에서 460.89±16.78 pg/mL로 나타나 LPS 처리에 의해

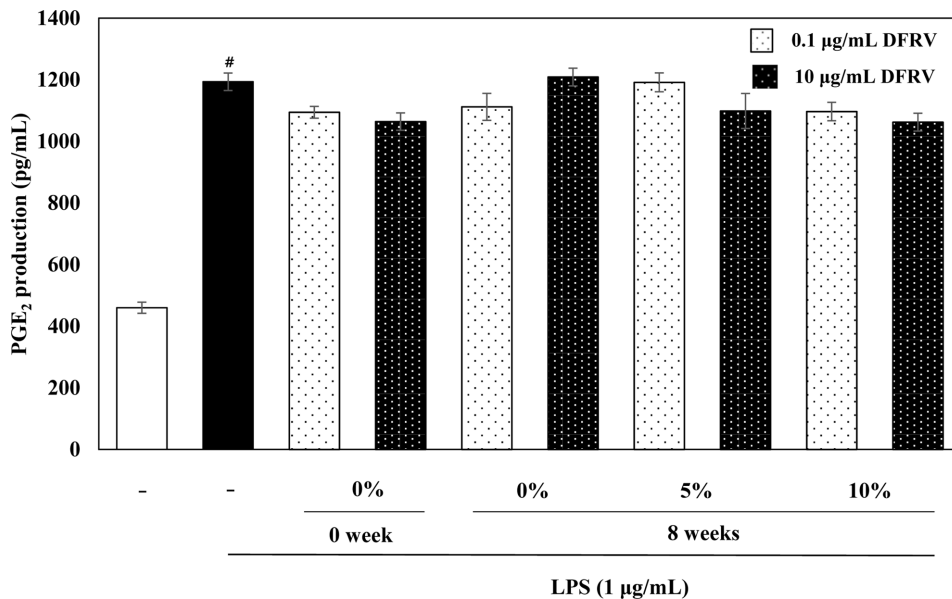


Fig. 8. Effects of the doenjang (soybean paste) containing fermented-*Rhus verniciflua* (FRV) extract (DFRV) on PGE₂ production levels in LPS-induced RAW 264.7 cells. DFRV was treated at the concentration of 0.1, 10 µg/mL. After 4 h, the RAW 264.7 cells were treated with 1 µg/mL LPS for 18 h. Data values were expressed as mean±SD. All values are not significantly different among sample treated groups ([#]*p*<0.05 versus control).

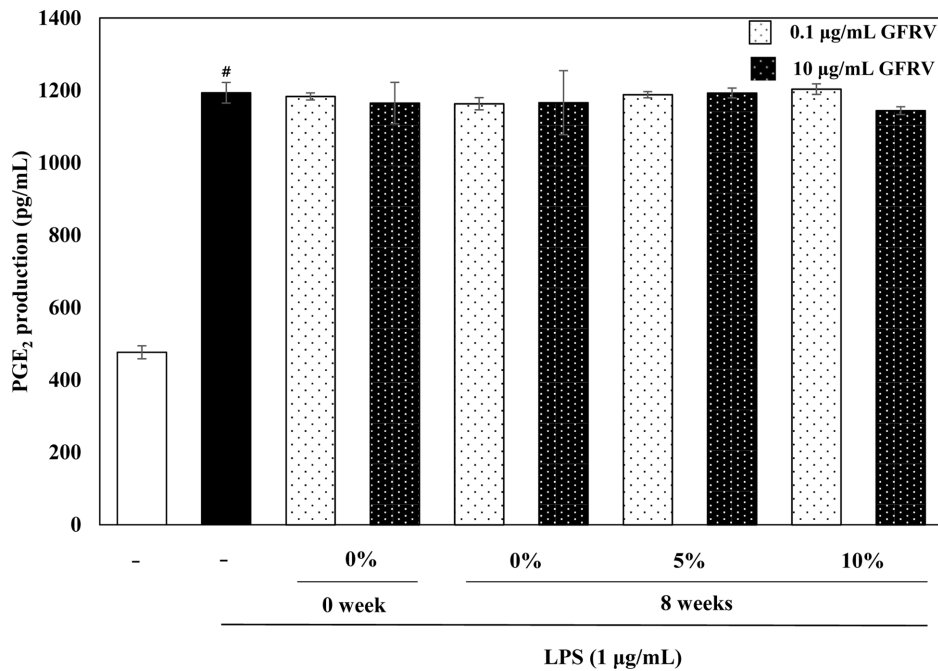


Fig. 9. Effects of the ganjang (soy sauce) containing fermented-*Rhus verniciflua* (FRV) extract (GFRV) on PGE₂ production levels in LPS-induced RAW 264.7 cells. DFRV was treated at the concentration of 0.1, 10 µg/mL. After 4 h, the RAW 264.7 cells were treated with 1 µg/mL LPS for 18 h. Data values were expressed as mean±SD. All values are not significantly different among sample treated groups ([#]*p*<0.05 versus control).

PGE₂ 생성이 약 2.6배 증가됨을 확인하였다. LPS만 처리한 대조군에 비해 모든 옷 추출물 처리군에서 PGE₂ 농도가 감소되었으며, 특히 옷 추출물 100 µg/mL군(907.56±51.68 pg/mL)에서 PGE₂ 농도가 가장 크게 감소하였다(Fig. 7). 옷 첨가 된장 및 간장 추출물의 PGE 생성 억제 효능은 관찰되지 않았다(Fig. 8, 9).

유전자 발현 분석

LPS 유도 염증성 대식세포에서 옷 추출물, 옷 첨가 된장 및 간장 추출물의 처리가 항염증, 산화스트레스 및 산화방지 시스템 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. LPS를 처리한 대조군은 정상대조군(Blank)에 비해 염증관련 유전자인 COX-2, iNOS, 염증성 사이토카인, matrix metalloproteinases (MMPs), STAT5a, p-JAK2의 발현이 유의적으로 증가하였다(*p*<0.001-0.05). 반면 산화방지 관련 유전자인 Nrf2, Keap1, GCLC, GCLM, NQO1, GST는 유의적인 변화는 없었지만 HO-1, Mn-SOD은 정상군에 비해 대조군에서 유의적으로 증가하였으며 Cu,Zn-SOD, catalase는 유의적으로 감소하는 경향을 보였다(*p*<0.05). 그러나, LPS 유도 염증상태인 큰포식세포에 옷 추출물을 1-100 µg/mL 처리하였을 때, 염증관련 유전자 발현정도는 감소하는 경향을 보였다(Table 2). 이러한 결과는 앞에서 살펴 본 NO 및 염증성 사이토카인 생성량 억제와 일치하는 결과라 할 수 있다. LPS의 외부적인 자극에 의해 사이토카인 생성이 증가되면 JAK가 활성화되고, 인산화 과정을 거쳐 STATs를 활성화시키게 된다. 활성화된 STATs는 핵 내로 이동하게 되고 이는 타겟 유전자의 발현을 조절하는 핵 내 전사인자로 작용하게 된다(Villarino 등, 2017). NO는 염증반응에서 중요한 역할을 하는 염증매개조절 인자로, NOS에 의해 L-arginine으로부터 생성되며, iNOS는 염증반응에 관여하는 대식세포에서 NO를 생성하여 염증반응을 촉진하는 역할을 한다. 또한 COX-2는 아라키돈산(arachidonic acid)를 PGE₂로 전환시키는 효소로 PG류의 다양한 염증반응 매개체들을 생성한다(Moncada, 1991). 옷

추출물의 처리가 COX-2와 iNOS의 유전자 발현에 유의적인 영향을 미치지 않았음에도 PGE₂와 NO의 생성을 감소시킨 것은 옷 추출물은 효소의 활성에 영향을 미친것으로 생각되어진다. 옷 추출물의 처리는 산화방지 관련 유전자 발현에는 변화를 일으키지 않아 옷 추출물은 LPS 유도 염증상태에서 산화방지시스템에는 영향을 미치는 않은 것으로 사료된다. 산화방지 시스템에서 핵 내 전사인자인 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)는 LPS 처리에 의해 거의 변화가 없었다. 우루시올이 제거된 옷나 무진액을 RAW 264.7세포에 처리하였을 때 세포내의 활성산소의 생성을 억제함으로써 산화방지 효과를 나타내었다(Ahmed, 2018; Jung 등, 2006).

세포 내 발생한 과도한 산화적 스트레스를 제어할 수 있는 다양한 세포 내 메커니즘에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이중 Nrf2는 산화방지 관련 단백질의 발현 증가를 유도하여 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 핵심 전사인자 중 하나로 알려져 있다. 정상 상태에서 Nrf2는 세포질에 Keap1 단백질과 결합되어 ubiquitin proteasome system에 의해 분해된다. 세포에 유발된 산화적 스트레스는 Keap1으로부터 Nrf2를 해리시키고, 세포질에 존재하던 Nrf2가 핵으로 이동하여 표적유전자 프로모테 내 ARE에 결합하여 sestrin-2, glutamate-cysteine ligase catalytic subunits, heme oxygenase 1, NAD(P)H quinone oxidoreductase 1등을 포함한 항산화 관련 유전자의 전사를 활성화시킨다(Ahmed 등, 2017). Nrf2의 활성화 과정은 산화적 스트레스에 의한 직접적인 Nrf2/Keap1 복합체 변형을 통한 Nrf2의 유리, protein kinase C, p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase, 또는 phosphatidylinositol 3-kinase 등에 의한 Nrf2 인산화가 관여하는 것으로 보고되었다(Suzuki과 Yamamoto, 2017). 우루시올이 제거된 발효옷 물추출물은 3종류의 페놀산과 4종류의 플라보노이드가 검출되었다. 페놀산중에서는 갈산(gallic acid)이 가장 많이 함유되어 있었으며, 플라보노이드중에서는 피세틴

Table 2. Effects of the fermented-*Rhus verniciflua* (FRV) extract on gene expression in LPS-induced RAW 264.7 cells

Gene name	LPS vs. Blank	p-value	FRV ($\mu\text{g/mL}$)					
			1 μg vs. LPS	p-value	10 μg vs. LPS	p-value	100 μg vs. LPS	p-value
COX-2	183.2	0.000004	1.03	0.604933	-1.02	0.732660	-1.03	0.623087
iNOS	15.62	0.001603	1.06	0.744578	-1.19	0.469805	1.01	0.833671
IL-10	1.58	0.160757	2.05	0.137762	1.22	0.428039	1.53	0.293063
IL-1 β	1154.93	0.000246	-1.40	0.394887	-1.66	0.219163	-1.71	0.117545
IL-1 α	277.04	0.001002	-1.46	0.324608	-1.81	0.106857	-1.78	0.033844
IL-6	719.42	0.000021	-1.14	0.250333	-1.25	0.547933	-1.53	0.066627
IL-8	2.92	0.288115	1.06	0.942011	-1.51	0.675731	-2.54	0.355268
IFN-	-1.15	0.714191	1.30	0.661039	1.72	0.268989	-1.04	0.909333
TNF- α	11.17	0.006204	1.02	0.327913	-1.03	0.416418	-1.11	0.068861
I κ B- α	6.51	0.000743	-1.03	0.850143	-1.04	0.797769	-1.14	0.505916
MMP-2	4.91	0.202103	-1.46	0.606896	-1.52	0.636475	-1.20	0.804814
MMP-3	96.67	0.004064	-1.28	0.216022	-1.55	0.036322	-1.14	0.285667
MMP-6	-1.18	0.848617	1.42	0.796931	-1.01	0.995190	1.67	0.566547
MMP-9	784.08	0.001378	1.00	0.985882	-1.19	0.357524	-1.14	0.380291
p47 ^{phox}	1.36	0.062124	-1.10	0.505907	-1.17	0.200691	-1.18	0.208264
STAT5 α	5.43	0.026799	-1.16	0.379766	-1.26	0.375611	-1.26	0.261597
STAT5 β	-1.04	0.787034	-1.19	0.393335	-1.53	0.153844	-1.77	0.135750
TLR-4	-1.26	0.058723	-1.03	0.845592	-1.37	0.229361	-1.23	0.054259
c-Jun	-3.69	0.007530	1.33	0.007421	1.08	0.788493	1.10	0.667712
c-fos	-8.98	0.010598	1.28	0.264667	1.31	0.100667	-1.09	0.709189
p-JAK1	1.08	0.265544	1.01	0.909032	-1.22	0.455874	-1.08	0.401143
p-JAK2	11.78	0.003091	-1.20	0.300845	-1.55	0.132041	-1.5	0.138487
p-STAT1	4.75	0.039573	-1.28	0.527819	-1.62	0.302202	-1.43	0.326017
Nrf2	-1.09	0.322121	1.04	0.177033	-1.02	0.950281	1.02	0.909515
Keap1	-3.89	0.001867	1.04	0.682368	1.02	0.808264	-1.06	0.568454
GCLC	-1.83	0.003763	1.17	0.159332	-1.12	0.579258	-1.04	0.656432
GCLM	-1.14	0.199377	-1.06	0.807531	1.02	0.758514	1.00	0.976981
NQO1	1.35	0.158418	1.01	0.940197	-1.88	0.298422	-1.12	0.154117
GST	-1.27	0.399764	2.59	0.107727	1.22	0.749709	1.32	0.705063
HO-1	3.94	0.005721	1.16	0.406705	1.23	0.399297	1.44	0.208622
Cu,Zn-SOD	-1.67	0.000827	1.07	0.375936	-1.02	0.839336	1.04	0.290705
Fe-SOD	1.71	0.129518	-1.26	0.357253	-1.39	0.462670	-1.11	0.762774
Mn-SOD	3.01	0.001298	-1.09	0.310069	-1.31	0.078878	-1.22	0.155344
Catalase	-1.17	0.012207	1.12	0.056514	1.12	0.719257	1.13	0.511730

*House keeping gene: GAPDH

(fisetin)의 함량이 가장 높았다(Choi 등, 2012). 갈산, 푸스틴과 피세틴은 발효옷 추출물의 중요한 산화방지 물질(Kim, 2003)이며, 일부 유해 세균 및 효모에 대하여 항균활성(Kim 등, 2010)을 가지고 있을 뿐만 아니라 항암활성(Jang 등, 2005)도 있다. 이외에 옷나무 껍질에서 추출한 설프레틴(sulfretin)은 항염증(Lee 등, 2010)에 효과적이다.

옷 첨가 된장 추출물의 항염증 및 산화방지 효과를 유전자 발현으로 분석한 결과, 옷을 첨가하지 않은 된장의 경우 발효가 진행됨에 따라 염증성 사이토카인의 유전자 발현이 감소되는 경향을 보였으며, 산화방지 관련 유전자 발현에는 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다. 옷 첨가 농도에 따라, 발효 유무에 따른 유의적인 변화는 관찰되지 않았다(Table 2). 최근 기존 전통된장의 기능성을 부각시키기 위하여 전통된장에 지역 특산물이나 기능성 원료를 첨가하여, 기능성이 더욱더 증가된 전통된장의 제조에 관한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 구운 죽염 또는 검정콩을 이용하여 제조한 된장의 추출물에서 산화방지 활성이 증가되었

으며, 염증인자인 iNOS 및 COX-2의 유전자 발현을 억제하여 항염증 활성이 증가되는 것으로 보고되었다(Jeong, 2013, Park 등, 2015). 따라서, 된장 또는 간장을 담을 때 사용되는 원료에 따라 장류의 항염증 효능은 달라진다고 볼 수 있으며, 우루시올이 제거된 발효 옷 추출물을 첨가한 장류의 항염증 효능은 옷에 함유된 페놀 화합물 및 플라보노이드, 장류에 함유된 아이소플라본의 작용에 의한 것으로 사료된다.

옷 첨가 간장 추출물의 항염증 및 산화방지 효과를 유전자 발현으로 분석한 결과, 옷을 첨가하지 않은 간장의 경우 발효가 진행됨에 따라 산화방지관련 유전자 발현이 증가하는 경향을 보였으나, 염증관련 유전자 발현에는 변화가 없는 것으로 나타났다. 따라서, LPS 유도 염증성 상태에서 옷 추출물은 항염증 효과를 나타내지만 된장 및 간장에 첨가했을 경우 그 효과는 미미한 것으로 나타났다(Data not shown). 참깨 간장은 LPS 유도 염증성 상태에서 일반간장과 비교했을 때, NO 생성을 감소시키고, 전염증성 인자인 iNOS, TNF- α , COX-2, IL-1 β , IL-6 유전자 발현을

감소시켰다(Song, 2012). 간장의 강력한 산화방지력은 멜라노이드인(melanoidins), 아이소플라본(isoflavones), 푸라논(furanones), 피라논(pyranones), 페놀화합물, 대사산물 등으로 알려져 있다(Li 등, 2018)

요 약

본 연구는 LPS 처리 큰포식 세포에서 웃 추출물, 웃 첨가 된 장 및 간장 추출물의 항염증 및 산화방지 효과를 확인하였다. 염증 반응은 자극이 가해지면 히스타민, 세로토닌, 프로스타글란딘과 같은 혈관 활성물질에 의해 혈관 투과성이 증대되어 염증을 유발하고 사이토카인, 활성산소종, lysosomal enzyme 등 다양한 매개 인자가 관여한다. 자극에 의한 큰포식세포의 염증반응은 TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 pro-inflammatory cytokine의 발현이 유도되고, iNOS와 COX-2에 영향을 받는 유전자의 발현을 자극하게 되어 NO 및 PGE₂ 등의 염증 인자가 생성된다. 이에 따라 웃 추출물, 웃 첨가 된 장 및 간장 추출물의 염증 및 산화방지시스템 관련 유전자 발현을 분석하였다. 그 결과 웃 추출물은 LPS 자극에 의해 생성된 NO, 염증성 사이토카인 및 PGE₂의 생성을 유의적으로 감소시켰다. 웃 추출물은 산화방지관련 핵 내 전사인자인 Nrf2 및 관련 유전자의 발현에 영향을 미치지 않았다. 웃 첨가 된 장 및 간장 추출물은 NO 및 염증성 사이토카인의 생성을 억제하였지만, 염증 및 산화방지관련 유전자의 발현에 영향을 미치지 않았다.

감사의 글

이 논문은 농식품부 2017년 지역전략식품육성사업(임실·순창 웃 가치평가사업)단의 지원을 받아 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

References

Ahmed MF. Radical scavenging activities of enzyme-treatment *rhus verniciflua* stokes via immune-redox on murine macrophage RAW 264.7 cells. MS thesis, Yonsei University, Seoul, Korea (2018)

Ahmed SM, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1863: 585-597 (2017)

Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D. TNF and ROS crosstalk in inflammation. *Trends Cell Biol.* 26: 249-261 (2016)

Choi HS, Kim MK, Park HS, Yun SE, Mun SP, Kim JS, Sapkota K, Kim S, Kim TY, Kim SJ. Biological detoxification of lacquer tree (*Rhus verniciflua* Stokes) stem bark by mushroom species. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 935-942 (2007)

Choi HS, Yeo SH, Jeong ST, Choi JH, Kang JE, Kim MK. Effect of the extracts from fermented-*Rhus verniciflua* stem bark with *Fomitella fraxinea* on the growth and enzyme activity of soybean product-fermenting microorganisms. *Kor. J. Mycol.* 40: 235-243 (2012)

Craig R, Larkin A, Mingo AM, Thuerauf DJ, Andrews C, McDonough PM, Glembotski CC. p38 MAPK and NF- κ B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system. *J. Biol. Chem.* 275: 23814-23824 (2000)

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology.* J. Life Sci. 551-588 (2005)

Jang HS, Kook SH, Son YO, Kim JG, Jeon YM, Jang YS, Choi KC, Kim J, Han SK, Lee KY, Park BK, Cho NP, Lee JC. Flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes activity inhibit cell growth and induce apoptosis in human osteosarcoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1726: 309-316 (2005)

Jeon WK, Lee JH, Kim HK, Lee AY, Lee SO, Kim YS, Ryu SY, Kim SY, Lee YJ, Ko BS. Anti-platelet effects of bioactive compounds isolated from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes. *J. Ethnopharmacol.* 106: 62-69 (2006)

Jeong ES. The effect of intake of *Rhus verniciflua* on acute alcohol-induced hangover and liver injury in Sprague Dawley rat model. MS thesis. Yonsei University, Seoul, Korea (2018)

Jeong MW, Jeong JK, Kim SJ, Park KY. Fermentation characteristics and increased functionality of deonjang prepared with Bamboo salt. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1915-1923(2013)

Jung CH, Jun CY, Lee S, Park CH, Cho K, Ko SG. *Rhus verniciflua* Stokes extract: Radical scavenging activities and protective effects on H₂O₂-induced cytotoxicity in macrophage RAW 264.7 cell lines. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1603-1607 (2006)

Jung NC. Biological activity of urushiol and flavonoids from Lac tree (*Rhus verniciflua* Stokes). Ph. D. thesis, Chonnam National University, Gwangju, Korea (1998)

KFDA. Analytical methods of Korean food code. Korea Food & Drug Administration, Cheongwon, Korea (2010)

KFDA. Notice No. 2012-204. Administrative notice of partial revision of the proposed criteria and standards for foods (2012)

KFS. 2007 the investigation of forestry management of Korea. Korea Forest Service. Daejeon, Korea (2008)

Kim JB. Identification of antioxidative component from stem bark of *Rhus verniciflua*. *Korean J. Food Nutr.* 16: 60-65 (2003)

Kim SY. Effects of fermented *Rhus verniciflua* extract on atopic dermatitis in DNCB-induced BALB/c mice. MS thesis, Kyungpook National University, Daegu, Korea (2013)

Kim JS, Kwon YS, Chun WJ, Kim TY, Sun J, Yu CY, Kim MJ. *Rhus verniciflua* Stokes flavonoid extracts have anti-oxidant, antimicrobial and α -glucosidase inhibitory effect. *Food Chem.* 120: 539-543 (2010)

Kim TH, Lee KM, Kwon KR, Choi SM. A literature study on lacquer poison. *J. Korean Pharmacopuncture Institute* 5: 159-169 (2002)

Kim SG, Rhyu DY, Kim DK, Ko DH, Kim YK, Lee YM, Jung HJ. Inhibitory effect of heartwood of *Rhus verniciflua* Stokes on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. *Korean J. Pharmacogn.* 41: 21-25 (2010)

Kwon SH, Lee KB, Im KS, Kim SO, Park KY. Weight reduction and lipid lowering effects of Korean traditional soybean fermented products. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 1194-1199 (2006)

Lee DS. Protective effects and mechanism of butein and sulfuretin derived from *Rhus verniciflua* against cytokine-induced destruction pancreatic beta cells and glucolipototoxicity. Ph.D. thesis, Wonkwang University, Iksan, Korea (2012)

Lee HC. The history of Korean jangs. *Food Sci. Ind.* 49: 62-96 (2016)

Lee JD, Huh JE, Jeon GS, Yang HR, Woo HS, Choi DY, Park DS. Flavonol-rich RVHxR from *Rhus verniciflua* Stokes and its major compound fisetin inhibits inflammation-related cytokines and angiogenic factor in rheumatoid arthritic fibroblast-like synovial cells and *in vivo* models. *Int. Immunopharmacol.* 9: 268-276 (2009)

Lee DS, Jeong GS, Li B, Park H, Kim YC. Anti-inflammatory effects of sulfuretin from *Rhus verniciflua* Stokes via the induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 10: 850-858 (2010)

Lee JC, Kim J, Lim KT, Jang YS. Identification of *Rhus verniciflua* Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and antiapoptotic properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 1570: 181-191 (2002)

Lee HJ, Lee KW, Kim KH, Kim HK, Lee HJ. Antitumor activity of peptide fraction from traditional Korean soy sauce. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 628-630 (2004)

Li H, Lin L, Feng Y, Zhao M, Li X, Zhu Q, Xiao Z. Enrichment of antioxidants from soy sauce using macroporous resin and identification of 4-ethylguaiaicol, catechol, daidzein, and 4-ethylphenol as key small molecule antioxidants in soy sauce. *Food Chem.* 240: 885-892 (2018)

Matsui T, Zhu XL, Shiraiishi K, Ueki T, Noda Y, Matsumoto K.

- Antihypertensive effect of salt-free soy sauce, a new fermented seasoning, in spontaneously hypertensive rats. *J. Food Sci.* 75: H129-H134 (2010)
- Moncada. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142 (1991)
- Moon JE. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of standardized aqueous extract of urushiol free *Rhus verniciflua* Stokes on lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage cell and Wistar rat. MS thesis, Seoul National University of Science and Technology, Seoul, Korea (2014)
- Namba T. Coloured illustrations of Wakan-Yaku. Hoikusha publishing Co., Ltd., Osaka, Japan. p. 215 (1980)
- Needleman. The discovery and function of COX-2. *J. Rheumatol. Suppl.* 49: 6-8 (1997)
- Park KY, Jung KO. Fermented soybean products as functional foods: Functional properties of doenjang (fermented soybean paste). *Asian Funct. Foods* 20: 555-596 (2005)
- Park KY, Jung GO, Lee KT, Choi JW, Choi MY, Kim GT, Jung JJ, Park HJ. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *J. Ethnopharmacol.* 90: 73-79 (2004)
- Park ES, Lee JY, Park KY. Anticancer effects of black soybean doenjang in HT-29 human colon cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 1270-1278 (2015)
- Patrono C. Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 82: 957-964 (2016)
- Song JL. Anticancer effects of fermented sesame sauce. Ph. D. thesis, Pusan National University, Busan, Korea (2012)
- Sun B, Dwivedi N, Bechtel TJ, Paulsen JL, Muth A, Bawadekar M, Li G, Thompson PR, Shelef MA, Schiffer CA, Weerapana E, Ho IC. Citrullination of NF- κ B p65 promotes its nuclear localization and TLR-induced expression of IL-1 β and TNF- α . *Sci. Immunol.* 2: 1-10 (2017)
- Suzuki T, Yamamoto M. Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress. *J. Biol. Chem.* 292: 16817-16824 (2017)
- Villarino AV, Kanno Y, O'Shea JJ. Mechanisms and consequences of JAK-STAT signaling in the immune system. *Nat. Immunol.* 18: 374-384 (2017)