

# 자양대보탕(滋養大補湯)의 발효 전·후 항염증, 항암, 항산화 효과 비교 연구

김주영<sup>1</sup>, 홍은서<sup>2</sup>, 박용기<sup>2\*</sup>, 정효원<sup>2\*</sup>

1 : 자양한방병원, 2 : 동국대학교 한의과대학

## Comparison of Jayangdaebo-tang before and after fermentation on antioxidant, anti-inflammatory and anticancer effects

Juyoung Kim<sup>1</sup>, Eunseo Hong<sup>2</sup>, Hyo Won Jung<sup>2\*</sup>, Yong-Ki Park<sup>2\*</sup>

1 : Jayang Hospital of Korean Medicine, Shinsongro 154, Yeonsu-gu, Inchoen 22001, Korea

2 : College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongdaero 123, Gyeongju 38066, Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : In this study, it was investigated the anti-inflammatory, anticancer, and antioxidant effects of Jayangdaebo-tang (JDT) consisting of twelve herbs before and after fermentation.

**Methods** : JDT extract was fermented using the *Lactopantibacillus plantanum* (JDT-L), *Bacillus subtilis* (JDT-B), and *L. plantanum* plus *B. subtilis* (JDT-L+B). The effects of each extract were measured in LPS-stimulated RAW264.7 cells, MCF-7 breast cancer and A549 lung cancer cells, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated HepG2 cells.

**Results** : The extracts of JDT-L, JDT-B and JDT-L+B at 1 mg/ml decreased significantly the levels of nitric oxide (NO) in LPS-treated RAW264.7 cells and also inhibited the expression of iNOS and COX-2, and the phosphorylation of ERK and NF- $\kappa$ B. The JDT-L+B extract decreased significantly the expression of apoptotic proteins, Bax, cleaved caspase-3, and PARP in MCF-7 and A549 cancer cells. The JDT-L, JDT-B and JDT-L+B extracts increased significantly the cell viability in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated HepG2 cells and the JDT-L+B extract decreased significantly the expression of SOD, catalase, HO-1, and NRF-2. Among fermented JDT extracts, JDT-L+B was the best effective on response of macrophage inflammation, cancer cell apoptosis, and liver cell damage.

**Conclusions** : Our results were suggested that the fermentation can be used as a useful way to enhance the biological activity of JDT.

**Key words** : Jayangdaebo-tang, fermentation, anti-inflammation, anticancer, antioxidation

## I. 서 론

발효(fermentation)는 유기물이 다양한 미생물의 작용에 의한 분해 및 변화하는 현상으로 넓은 의미에서 미생물에 의해 유용한 물질이 생산되는 것을 말한다. 한약재도 배양된 식용 미생물을 이용해서 순수 발효시킴으로써 그 유효성분을 분해 추출하는 발효 한약으로 제조할 수 있으며, 발효 후 저분자

구조로 분해되어 생리활성물질의 체내 흡수율과 생체 이용률을 높임으로써 약효를 더욱 강화시키고 농약이나 중금속 등의 독성을 감소시킨다는 장점이 알려져 있다<sup>1)</sup>. 한의학에서 발효는 '의방유취(醫方類聚)'에 발효기법 중 '술빛을 양(釀)법'을 통해 소개되고 있으며 현재 발효삼(醱酵蔘), 발효천마, 발효초오 및 발효 상황버섯, 녹용, 우슬, 천마, 울금 등 다양한 한약 제조에 발효기술이 적용되고 있다<sup>2-4)</sup>.

\*Corresponding author : Yong-Ki Park, Department of Herbol, College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongdaero 123, Gyeongju 38066, Korea,

· Tel : +82-54-770-2661

· Fax : +82-54-770-2647

· E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

Hyo Won Jung, Department of Herbol, College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongdaero 123, Gyeongju 38066, Korea,

· Tel : +82-54-770-2367

· Fax : +82-54-770-2647

· E-mail : tenzing2@hanmail.net

· Received : 21 July 2023

· Revised : 07 September 2023

· Accepted : 25 September 2023

십전대보탕(十全大補湯)은 보기약(補氣藥)인 사군자탕(四君子湯)과 보혈약(補血藥)인 사물탕(四物湯)의 합방에 보기약(補氣藥)인 황기와 보양약(補陽藥)인 육계가 추가된 보기혈제(補氣血劑)의 대표 처방이며, 병후 체력저하, 피로 권태, 식욕 부진, 도한(盜汗), 손발 차가움, 빈혈 증상을 개선시키고, 면역력 증진을 통한 만성 허약성 질환 치료에 널리 활용되고 있다<sup>5-7</sup>. 십전대보탕에 대한 현대 약리연구는 주로 간, 위, 신장, 신경계통에서의 기능증진 효과와 면역 활성화에 대한 보고<sup>8</sup>가 이루어져 있으며, 임상연구로 암환자에서의 생존 기간 증가, 항암제 부작용 감소<sup>9</sup>, 알츠하이머 치매 개선 및 빈혈 치료 등의 효능이 보고된 바 있다<sup>2</sup>. 최근 십전대보탕의 발효 연구도 이루어지고 있는데 발효 후 성분 변화, 산화 스트레스에 대한 뇌 신경 보호 활성 및 항산화 활성 증가<sup>6,10</sup>, 대식세포에서의 염증 억제<sup>11</sup> 효과 등이 보고되고 있다.

본 연구에서는 십전대보탕을 기본으로 항염증, 항산화, 항암 효과를 높이기 위한 황금(黃芩), 건강(乾薑), 저령(豬苓), 맥문동(麥門冬), 생지황(生地黃)을 추가로 구성한 자양대보탕(滋養大補湯)의 효능을 확인하고자 수행하였으며, 특히 최근 한약

제조에 활용하고 있는 발효기법을 적용하여 자양대보탕의 발효 전후의 항염, 항산화, 항암 활성 변화를 비교함으로써 자양대보탕 발효추출물의 임상적 활용 가능성을 확인하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 자양대보탕 처방 구성 및 추출물 제조

본 연구에 사용된 자양대보탕(Jayangdaebo-tang, JDT) 처방의 구성 약재는 (주)광명당제약(Ulsan, Korea)에서 구입하였으며, 표 1과 같이 무게를 측정된 후 총 건조중량의 10배 증류수(2.36 L)를 가하여 180분 동안 열수 추출하는 전탕 추출법으로 제조하였다. 각 추출물은 3M 종이 여과지를 통과시켜 여과한 후 121°C, 1.5 기압에서 15분간 가압 멸균하고, 상온까지 냉각시킨 후 발효에 사용하였다.

Table 1. Preparation of JDT with herbs

Herbal part <sup>12)</sup>	Herbal name	Scientific name	Weight (g)
Astragalus Root	Astragali Radix	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	16
Ginseng	Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	16
Atractylodes Rhizome White	Atractylodis Rhizoma Alba	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidzumi	16
Poria	Poria Sclerotium	<i>Poria cocos</i> Wolf	16
Polyporus Sclerotium	Polyporus	<i>Polyporus umbellatus</i> Fries	16
Citrus Unshiu Peel	Citri Unshius Pericarpium	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	16
Prepared Rehmannia Root	Rehmanniae Radix Preparata	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz ex Steudel	16
Fresh Rehmania root	Rehmanniae Radix Recens	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz ex Steudel	16
Angelica Gigas Root	Angelicae Gigantis Radix	<i>Angelica gigas</i> Nakai	16
Cnidium Rhizome	Cnidii Rhizoma	<i>Cnidium officinale</i> Makino	16
Peony Root	Paeoniae Radix	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	16
Liriope Tuber	Liriopsis seu Ophiopogonis Tuber	<i>Liriope platyphylla</i> Wang et Tang	16
Scutellaria Root	Scutellariae Radix	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	8
Dried Ginger	Zingiberis Rhizoma	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	8
Jujube	Zizyphi Fructus	<i>Zizyphus jujuba</i> M. var. <i>inermis</i> Rehder	8
Licorice	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	<i>Glycyrrhiza glabra</i> Linné	8

### 2. 자양대보탕 발효추출물 제조

자양대보탕 추출물의 발효에 사용된 균주는 모두 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC: kribb.re.kr)로부터 유산균(KCTC 3108; *Lactoplantibacillus plantanum* subsp. *plantanum*) 및 고초균(KCTC 2217; *Bacillus subtilis*)을 분양 받아 사용하였다. 유산균은 MRS 배지(Difco, Detroit,

MI, USA), 고초균은 NA (Nutrient agar) 배지에 각각 계대 배양한 뒤 초기 균의 수를  $1 \times 10^6$  CFU/ml로 조절하여 사용하였다. 발효는 1M NaOH로 원방 추출물의 pH를 8.0으로 조정된 후 유산균 및 고초균을 추출물 용량 대비 1%(v/v) 비율로 접종하고 37°C의 항온배양기에서 48시간 동안 배양하여 발효 한약을 제조하였다(표 2). 각 추출물을 3겹 거어즈 및 와

트만 거름종이(Whatman paper filter No.1)에 여과한 후 회전식 감압농축기(rotary evaporator)를 이용하여 농축하였으며, 동결건조기로 건조시켰다. 각 동결건조 약물은 1× PBS에 일정

농도로 녹인 후 실린지 필터(0.45 μm syringe filter, Minisart NML, Sartorius AG, Germany)를 통과시켜 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

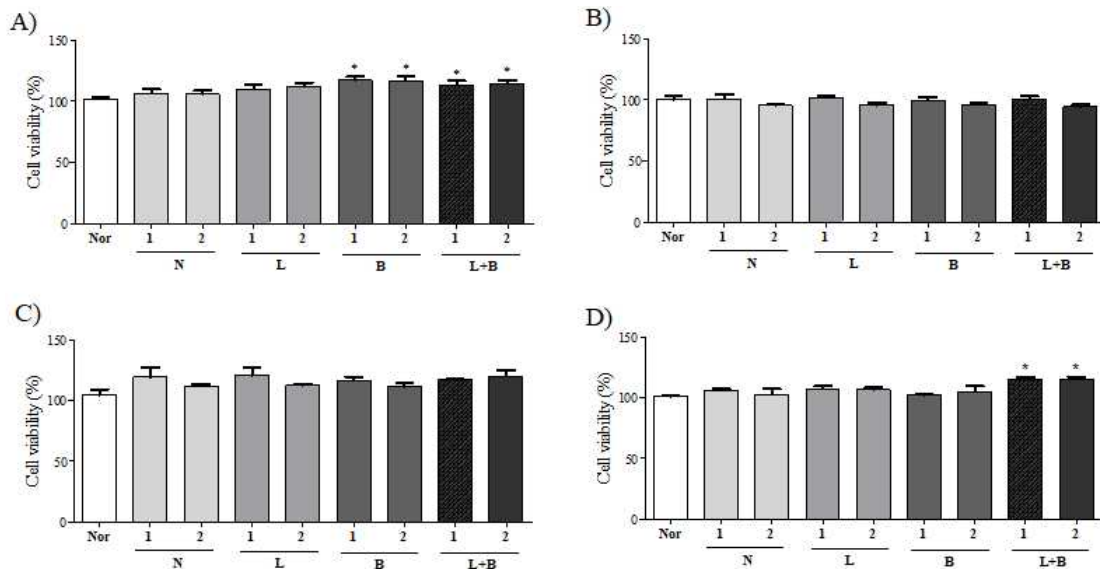
Table 2. The yield of each extract of JDT

Extract type	Weight (g)	Water volume (L)	Yield (g)	Yield (%)
Non ferment extract (JDT-N)	59	0.5	19.19	32.53
<i>Lactobacillus</i> ferment extract (JDT-L)	59	0.5	18.92	32.07
Bacillus ferment extract (JDT-B)	59	0.5	20.78	35.22
<i>Lactobacillus</i> and Bacillus ferment extract (JDT-L+B)	59	0.5	20.11	34.08

### 3. 세포배양 및 약물처리

RAW 264.7 세포(mouse macrophage cell line, TIB-71), HepG2 세포(human liver cell line, HB-8065), MCF-7 세포(human breast cancer cell line, HTB-22) 및 A549 세포(human lung cancer cell, CRM-CCL-185)는 ATCC사 (VA, USA)로부터 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, GibcoBRL, Carlsbad, CA, USA)를 배양액으로 하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 배양하였다. 또한, 추출물의 적정 처리 농도를 결정하기 위해 효능 평가 전 MTT assay(EZ-CyTox colorimetric cell viability assay kit, DoGenBio, Seoul, Korea)를 실시하였으며, 각 세포의 생존도에 영향을 주지 않는 동일한 농도를

선정, 처리하였다(Supplementary Figure 1). 검증모델 제작을 위하여 RAW 264.7 세포(2.5×10<sup>5</sup> cells/ml)를 60 mm 배양접시에 분주하여 24시간 배양한 후, 발효 전 추출물(N), 유산균 발효 추출물(L), 고초균 발효 추출물(B) 및 유산균/고초균 혼합 추출물(L+B)을 1 mg/ml 농도로 전처리하여 1시간 배양하고, LPS(1 μg/ml)를 24시간 처리하였다. 산화 스트레스 손상모델 제작을 위하여 HepG2 세포(5×10<sup>5</sup> cells/ml)를 60 mm 배양접시에 분주하여 24시간 배양한 후, 각 약물을 1시간 전처리한 후 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 200 μM/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. MCF-7과 A549 암세포(2.5×10<sup>5</sup> cells/ml)는 60 mm 배양접시에 분주하여 24시간 배양한 후, 정상조건에서 각 약물을 24시간 처리하였다.



Supplementary Figure 1. Effect of JDT extracts on the cell viability in each cell RAW264.7 (A), HepG2 (B), MCF-7 (C), and A549 (D) cells were treated with each extract (1 mg/ml) for 24 hr. The cell viability was determined in the cells by MTT assay, respectively. Data was shown as mean±SD of independent experiments (n=3). \*p<0.05 vs. Nor. Nor, normal group; N, non-fermented extract-treated group; L, fermented extract by *L. plantanum*; B, fermented extract by *B. subtilis*; and L+B, fermented extract by two germs.

#### 4. Nitric oxide (NO) 생성 측정

각 추출물과 LPS가 처리된 RAW264.7 세포로부터 배양액을 수거한 후 EZ-Nitric Oxide Assay Kit(DG-NO500, DoGen Bio)를 이용하여 NO를 측정하였다. 즉, 96-well plate에 100  $\mu$ l씩 넣고, Griess reagent(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1%  $\alpha$ -naphthyl amide in H<sub>2</sub>O)를 100  $\mu$ l씩 넣어 혼합하였다. 이를 실온에서 5분 간 반응시킨 후 흡광도 측정기(microplate reader)에서 540 nm의 흡광도로 발색 정도를 측정하였다. 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)의 표준 정량곡선을 이용하여 계산하였다.

#### 5. Western blot을 통한 단백질 발현 분석

각 세포를 수거한 후 Lysis buffer[50 mM HEPES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin]를 100  $\mu$ l씩 넣어 4°C에서 30분간 반응시킴으로써 세포막 용해를 유도하였다. 이를 14000 rpm에서 20분간 원심 분리함으로써 단백질이 함유된 상층액을 수거하고, Bradford's Protein Assay 용액을 이용하여 총 단백질의 양을 계산하였다.

Western blot을 위해서 각 세포로부터 분리된 단백질 중 30  $\mu$ g을 5× loading buffer와 잘 섞은 후 95°C에서 5분간 끓여 단백질 변성을 유도하고, 이를 SDS-PAGE에 사용하였다. 단백질 전기영동 후 겔 상의 밴드들을 nitrocellulose membrane으로 transfer하고, Ponceau S Solution으로 염색한 후 size marker 대비 각 타겟 단백질의 크기에 따라 적정하게 membrane을 절단하였다. 각 membrane을 5% skim milk 용액에서 1시간 블로킹하여 비특이 반응을 제거한 후 각각 iNOS(Cat No. 13120S, Cell Signaling), COX-2(Cat No. 12282S, Cell Signaling), ERK(Cat No. 9102S, Cell Signaling), p-ERK(Cat No. 9101S, Cell Signaling), NF- $\kappa$ B(Cat No. 4764S, Cell Signaling), p-NF- $\kappa$ B(Cat No. 3033S, Cell Signaling), Bax(Cat No. sc-493, Santa Cruz), Bcl-2(Cat No. sc-7382, Santa Cruz), cleaved caspase-3(Cat No. ASP-175, Cell Signaling), cytochrome c(Cat No. 4272S, Cell Signaling), PARP(Cat No. 9542S, Cell Signaling), SOD(Cat No. 13141S, Cell Signaling), catalase(Cat No. 14097S, Cell Signaling), HO-1(Cat No. 70081S, Cell Signaling), NRF-2(Cat No. 12721S, Cell Signaling) 등에 대한 1차 항체들 또는 대조 단백질로서  $\beta$ -actin의 1차 항체와 4°C에서 24시간 반응시켰다. 이를 1× TBS-T 완충액으로 15분씩 3번 세척한 후 horseradish peroxidase가 감작(conjugation) 되어 있는 mouse 또는 rabbit의 2차 항체와 실온에서 2시간 반응시켰다. 이를 다시 1× TBS-T 완충액으로 15분간 3회 세척한 후 ECL solution (BioRad)을 사용하여 발색시키고, 자동화학영상분석기(RAS image system)를 이용하여 밴드의 발현 정도를 관찰하였다. 각 타겟 단백질의 발현 정도는 컴퓨터상의 이미지를  $\beta$ -actin의 발현 정도와 비교하여 상대 값을 계산하였으며 최소 3회 이상 반복실험 결과를 이용하여 histogram으로 제시하였다.

#### 6. 세포 생존도 측정

HepG2 세포에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 세포독성 발생에 따른 각 추출물의 보호 효과를 확인하기 위해서 세포 생존도(cell viability) 평가를 수행하였다. 먼저 HepG2 세포(5×10<sup>5</sup> cells/ml)를 96 well plate에 well 당 100  $\mu$ l씩 분주하여 배양한 후 각 추출물(1 mg/ml)을 처리하여 1시간 배양하였다. 여기에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200  $\mu$ M/ml)를 처리하여 24시간 배양한 후 세포 생존도 측정 시약(EZ-CyTox)을 이용하여 측정하였다. 세포 생존도의 정량화는 정상 세포의 세포 생존도를 100%로 하여 각 추출물 처리군의 생존도를 상대 평가하였다. 적정 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리 농도를 정하기 위해 추출물 처리 전 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 100  $\mu$ M/ml과 200  $\mu$ M/ml을 처리하여 24시간 배양한 후 세포 생존도를 측정하였으며, 각각 72.84±5.708%와 54.52±0.6106%로 효능 실험을 위한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 농도는 200  $\mu$ M/ml로 하였다.

#### 7. 통계학적 검정

모든 실험결과는 최소 3회 반복실험에 대한 평균과 표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 통계학적 유의성은 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램(GraphPad Software, CA, USA)을 이용하여 one-way ANOVA(Tukey's test)를 이용하여 검정하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성 있는 것으로 판정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 대식세포에서의 NO 생성 및 iNOS/COX-2 발현 증가에 대한 억제 효과

자양대보탕 추출물(JDT)의 발효 전후 염증 억제 효과를 비교하기 위해 LPS로 자극한 RAW264.7 대식세포에 발효 전 추출물(N), 유산균 발효추출물(L), 고초균 발효추출물(B) 및 유산균과 고초균 혼합추출물(L+B)을 처리한 후 염증 물질인 NO와 iNOS 및 COX-2의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과 LPS를 처리한 세포군(LPS)에서는 아무것도 처리하지 않은 정상 세포군(Nor)과 비교하여 NO의 생성이 유의적으로 ( $p<0.01$ ) 증가하였으며, 비발효추출물(N,  $p<0.01$ ), 유산균 발효추출물(L,  $p<0.01$ ), 고초균 발효추출물(B,  $p<0.01$ ) 및 유산균과 고초균 혼합추출물(L+B,  $p<0.01$ )을 처리한 세포군에서는 모두 LPS 처리군에 비해 유의적인 NO 생성의 감소를 나타내었다. 특히 유산균과 고초균 혼합추출물 처리군에서 LPS-유도 NO 생성 증가에 가장 효과적인 억제 효과를 나타내었다(그림 1A). 또한, NO 생성 효소 단백질인 iNOS ( $p<0.01$ )와 염증 물질인 prostaglandin E<sub>2</sub> 생성 효소 단백질인 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현( $p<0.001$ )에서도 정상군보다 LPS 처리군에서 유의적인 증가를 나타내었고, 이는 각 추출물 처리에 의해 iNOS(그림 1B)와 COX-2(그림 1C)의 발현 모두 감소하는 것으로 나타났다. 이를 통해 대식세포에서 LPS 자극에 의한 NO 생성이나 iNOS와 COX-2 발현의 증가는

발효 후 억제 효과가 더 우수하며, 발효추출물 중 유산균과

고초균 혼합추출물에서 가장 효과적인 것을 확인하였다.

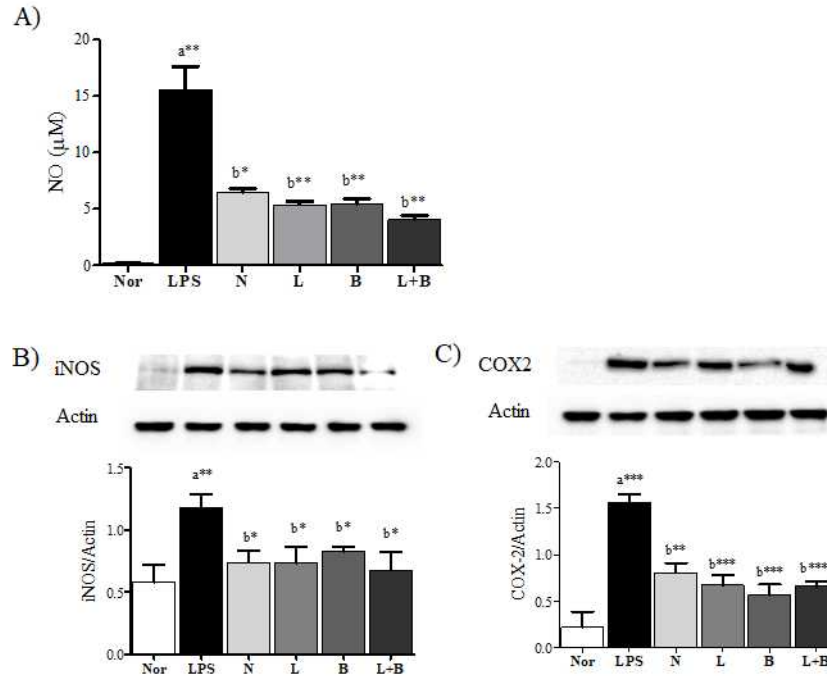


Figure 1. Effect of JDT extracts on the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW264.7 cells RAW264.7 cells were treated with each extract (1 mg/ml) for 1 hr and then stimulated with LPS (1 µg/ml) for 24 hr. The concentration of NO was measured in culture media by Griess reagent system. The expression of iNOS and COX2 was determined in the cells by Western blot, respectively. Data was shown as mean ± SD of independent experiments (n = 3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, and \*\*\*p < 0.001 vs. nor (a) or LPS (b). Nor, normal group; LPS, LPS-stimulated group; N, non-fermented extract-treated group; L, fermented extract by *L. plantanum*; B, fermented extract by *B. subtilis*; and L+B, fermented extract by two germs.

## 2. 대식세포에서의 ERK와 NF-κB의 인산화 발현 증가에 대한 억제 효과

자양대보탕 추출물의 발효 전후 염증 억제 효과를 좀 더 확인해보기 위해 LPS로 자극한 RAW264.7 대식세포에 발효 전후 추출물을 처리하여 염증 신호전달분자인 ERK와 NF-κB의 인산화 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, LPS 처리 후 ERK ( $p < 0.01$ )와 NF-κB ( $p < 0.001$ )의 인산화가 정상군(Nor)에 비하여 유의적으로 증가하였으며, 이는 각 추출물의 처리 후 감소하였다(그림 2A). ERK의 인산화 발현(p-ERK) 증가는 비발효추출물 보다 유산균 발효추출물(L,  $p < 0.01$ ), 고초균 발효추출물(B,  $p < 0.001$ ) 및 유산균과 고초균 혼합추출물(L+B,  $p < 0.001$ ) 처리군 모두에서 LPS 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 특히 유산균과 고초균 혼합추출물에서 가장 효과적으로 ERK의 인산화 발현이 억제되었다. 또한, LPS 처리에 의한 NF-κB의 인산화 발현 증가에서도 발효 전 추출물(N,  $p < 0.001$ ), 유산균 발효추출물(L,  $p < 0.01$ ), 고초균 발효추출물(B,  $p < 0.01$ ) 및 유산균과 고초균 혼합추출물(L+B,  $p < 0.01$ )에서 모두 대조군 대비 유의적으로 감소하였으며, 유산균과 고초균 혼합추출물 처리에서 가장 효과적으로 억제되었다(그림 2B). 이를 통해 자양대보탕 추출물은 발효 후 염증 반응 억제에 더 효과적인 것을 확인하였다.

## 3. 암세포에서의 세포사멸 유도 효과

자양대보탕 추출물의 발효 전후 항암효과를 확인하기 위해 MCF-7 유방암 세포와 A549 폐암 세포에 발효 전후 추출물을 처리하여 세포사멸 유도분자(Bax, Cytochrome c, Caspase-3, PARP, ERK)와 세포생존 유도분자(Bcl-2)의 발현 변화를 확인하였다. 먼저 MCF-7 유방암 세포에서 정상군(Nor)에 비하여 발효 전 추출물(N), 유산균 발효추출물(L), 고초균 발효추출물(B) 및 유산균과 고초균 혼합추출물(L+B) 처리군에서 모두 Bax(그림 3A), Cytochrome c(그림 3B), cleaved Caspase-3(그림 3C), PARP(그림 3D) 발현 및 ERK의 인산화 발현(그림 3F)이 유의적으로 증가하였으며, Bcl-2의 발현(그림 3E)이 유의적으로 감소되었다. 특히, 발효 전 추출물에 비해 발효추출물에서 세포사멸 단백질들의 발현 증가에 더 효과적이었으며, 유산균과 고초균 혼합 발효추출물에서 가장 효과적인 것으로 나타났다.

한편 A549 폐암 세포에서는 정상군(Nor)에 비하여 발효 전 추출물(N1), 유산균 발효추출물(L), 고초균 발효추출물(B) 및 유산균과 고초균 혼합 발효추출물(L+B) 모두 Bax(그림 4A), Cytochrome c(그림 4B), cleaved Caspase-3(그림 4C), PARP(그림 4D)의 발현이 유의적으로 증가되었으며, Bcl-2(그림 4E)의 발현은 감소되었고, ERK의 인산화 발현(그림 4F)이 증가하였다. 유방암 세포에서와 유사하게 여러 추출물 중 특히 유산균과 고초균 혼합 발효추출물에서 세포사멸 유도 효과가 가장 큰 것으로 나타났다.

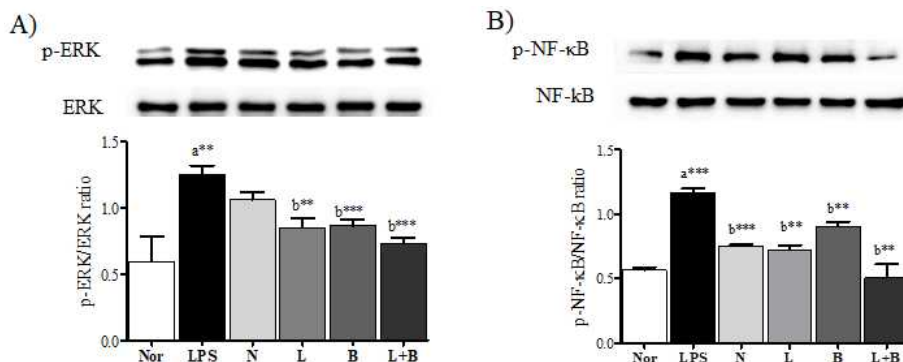


Figure 2. Effect of JDT extracts on the phosphorylation of ERK and NF-κ B in LPS-stimulated RAW264.7 cells. HepG2 cells were treated with each extract (1 mg/ml) for 1 hr and then stimulated with LPS (1 μg/ml) for 24 hr. The expression of total and phospho-forms of ERK and NF-κ B was determined in the cells by Western blot, respectively. Data was shown as mean±SD of independent experiments (n=3). \*p<0.05, \*\*p<0.01, and \*\*\*p<0.001 vs. Nor (a) or LPS (b). Nor, normal group; LPS, LPS-stimulated group; N, non-fermented extract-treated group; L, fermented extract by *L. plantanum*; B, fermented extract by *B. subtilis*; and L+B, fermented extract by two germs.

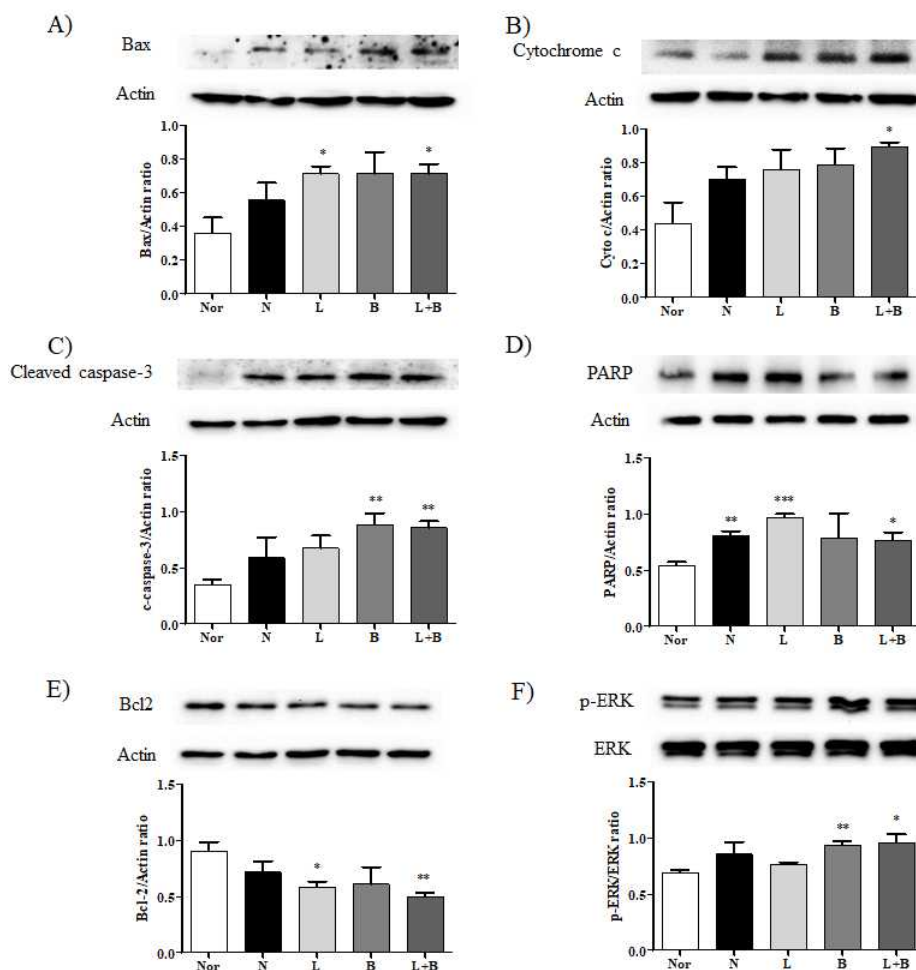


Figure 3. Effect of JDT extracts on the expression of apoptosis regulators in MCF-7 cells. MCF-7 cells were treated with each extract (1 mg/ml) for 24 hr. The expression of Bax, Cytochrome c, cleaved Caspase-3, PARP, Bcl-2, and p-ERK was determined in the cells by Western blot, respectively. Data was shown as mean±SD of independent experiments (n=3). \*p<0.05, \*\*p<0.01, and \*\*\*p<0.001 vs. Nor. Nor, normal group; N, non-fermented extract-treated group; L, fermented extract by *L. plantanum*; B, fermented extract by *B. subtilis*; and L+B, fermented extract by two germs.

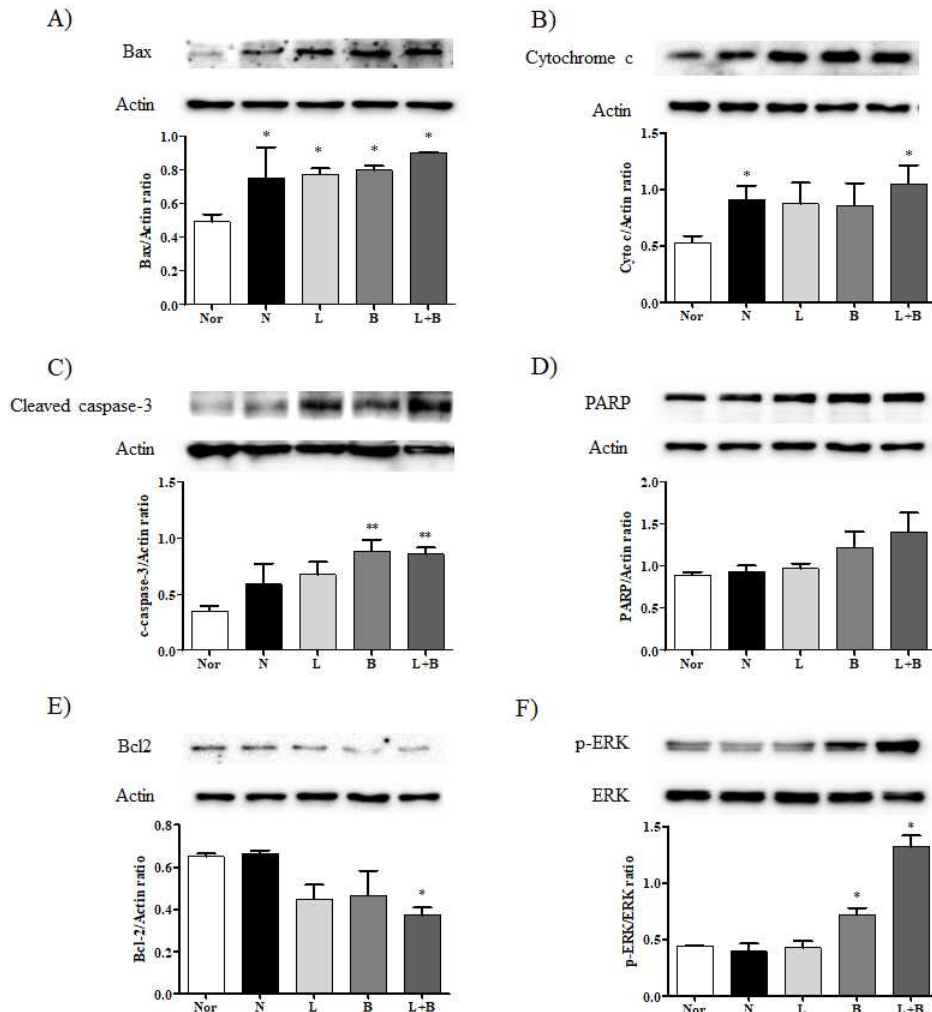


Figure 4. Effect of JDT extracts on the expression of apoptosis regulators in A549 cells. A549 cells were treated with each extract (1 mg/ml) for 24 hr. The expression of Bax, cytochrome c, cleaved caspase-3, PARP, Bcl-2, and p-ERK was determined in the cells by Western blot, respectively. Data was shown as mean±SD of independent experiments (n=3). \*p<0.05 and \*\*p<0.01 vs. nor. Nor, normal group; N1, non-fermented extract-treated group; L, fermented extract by *L. plantanum*; B, fermented extract by *B. subtilis*; and L+B, fermented extract by two germs.

#### 4. 간세포에서의 산화적 스트레스 손상에 대한 보호 효과

자양대보탕 추출물의 발효 전후 항산화 효과의 변화를 확인해보기 위해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화 스트레스 손상을 유발한 HepG2 간세포에 발효 전후 추출물을 처리하여 세포생존도 및 세포사멸 유도분자(Bax, cytochrome c, caspase-3, PARP, ERK)와 세포생존 유도분자(Bcl-2)의 발현 변화를 확인하였다. 먼저, 정상군(Nor)에 비해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 대조군에서 세포 생존도가 유의적으로(p<0.001) 감소하였으며, 비발효추출물(N, p<0.001), 유산균 발효추출물(L, p<0.001), 고초균 발효추출물(B1, p<0.01) 및 유산균과 고초균 혼합추출물(L+B, p<0.001) 처리군에서 모두 대조군에 비해 유의적인 세포 생존도의 증가를 나타내었다(그림 5). 또한, 간세포에서의 항산화 단백질들의

발현 변화를 확인한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군은 정상군(Nor)에 비해 SOD의 발현이 유의적으로(p<0.05) 증가하였으며, 이는 발효 전 추출물(N), 유산균 발효추출물(L), 고초균 발효추출물(B) 및 유산균과 고초균 혼합 발효추출물에 의해 감소되었고, 특히 혼합발효추출물 처리군에서 대조군 대비 유의적인(p<0.05) 감소를 나타내었다(그림 6A). 또한, HO-1(그림 6C)과 NRF-2(그림 6D)의 발현에서도 정상군에 비해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군에서 유의적으로(p<0.05) 증가하였고, 유산균(p<0.01), 고초균(p<0.01), 유산균과 고초균 혼합(p<0.01) 발효추출물 처리군에서 대조군 대비 유의적인 감소를 나타내었다. 따라서 자양대보탕 비발효추출물 보다 발효추출물에서 항산화 효과가 증가하고, 발효추출물 중 유산균과 고초균 혼합추출물에서 효과적인 것을 확인하였다.

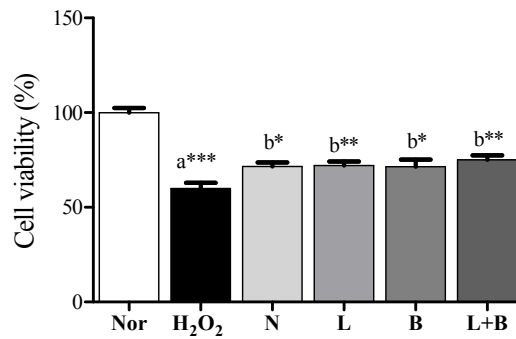


Figure 5. Effect of JDT extracts on the viability in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated HepG2 cells  
 HepG2 cells were treated with each extract (1 mg/ml) for 1 hr and then stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM/ml) for 24 hr. The cell viability was measured by MTT assay. Data was shown as mean±SD of independent experiments (n=3). \*p<0.05, \*\*p<0.01, and \*\*\*p<0.001 vs. nor (a) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b). Nor, normal group; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated group; N, non-fermented extract-treated group; L, fermented extract by *L. plantanum*; B, fermented extract by *B. subtilis*; and L+B, fermented extract by two germs.

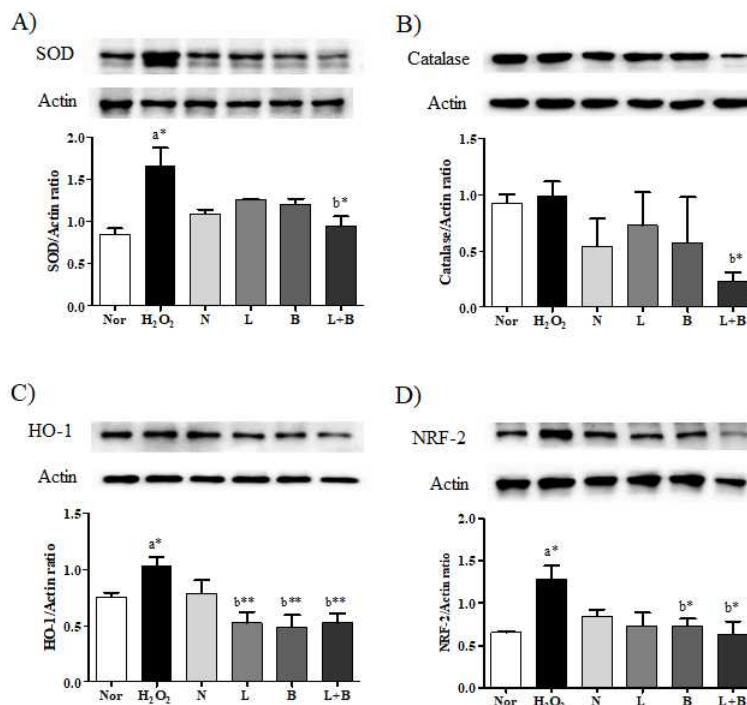


Figure 6. Effect of JDT extracts on the expression of SOD, Catalase, HO-1, and NRF-2 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated HepG2 cells  
 HepG2 cells were treated with each extract (1 mg/ml) for 1 hr and then stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM/ml) for 24 hr. The expression of SOD, Catalase, HO-1, and NRF-2 was determined in the cells by Western blot, respectively. Data was shown as mean±SD of independent experiments (n=3). \*p<0.05 and \*\*p<0.01 vs. nor (a) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b). Nor, normal group; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated group; N, non-fermented extract-treated group; L, fermented extract by *L. plantanum*; B, fermented extract by *B. subtilis*; and L+B, fermented extract by two germs.

### IV. 고찰

십전대보탕은 한의원 처방 순위 3위인 대중적 처방으로<sup>13)</sup> 보기약(補氣藥)인 사군자탕(四君子湯)에 보혈약(補血藥)인 사물탕(四物湯)에 황기와 육계가 추가된 처방이다. 본 연구의 자양대보탕은 여기에 항염증 효과를 위한 황금, 향암·향산화 효과가 있는 저령, 보양(補陽) 효능 강화를 위한 건강, 보음약(補陰藥)인 맥문동과 생지황을 추가적 구성한 처방이다. 추가 약물의 선택은 원하는 효능은 있으면서도 환자의 건강상태에

따른 복용제약에 크게 영향을 받지 않도록 안전성을 고려하였고, 부자(Aconiti Lateralis Radix Preparata)나 건칠(Lacca Rhois Exsiccata)처럼 유사한 효능이 있지만, 독성이 있는 약재들은 배제하면서 보제(補劑) 위주의 약물을 선별 추가하였다. 십전대보탕은 내장기관, 신경계통, 면역활성 등을 대상으로 항염증, 항산화, 항암 활성에 대해서도 보고된바 있다<sup>14)</sup>. 자양대보탕에 대한 효과는 본 논문을 통해 처음 보고하는 것으로, 추가된 약물 중 황금은 청열조습약(淸熱燥濕)으로 고한(苦寒)하여 조습청열(燥濕淸熱)하는 약물로 습열제증(濕熱諸證)에 사용하는데



폐(肺)의 열을 내려 폐열객수(肺熱咳嗽), 痰黃黏稠(담황점조) 등의 증상에 사용하며<sup>15)</sup>, 현대 약리연구에서 항바이러스, 항암, 항균, 항산화, 항염, 간 보호, 신경 보호 등 다양한 효과가 보고되었고, free flavonoids, flavonoid glycosides, phenylethanoid glycosides를 포함하여 100개 이상의 생리활성 성분들이 분석되고 있다<sup>16)</sup>. 저령은 감담(甘淡)하여 삼설(滲泄)하고 이수(利水)시키는 효능으로 수습정체(水濕停滯)로 생기는 소변불리(小便不利), 수종(水腫), 임병(淋病) 등을 치료하는데<sup>17)</sup>, 다양한 약리활성이 보고되었지만, 특히 신장병에서의 이뇨작용 조절과 항암, 면역증진, 간 보호 효과가 잘 알려져 있다<sup>18)</sup>. 건강은 온리약(溫裏藥)으로 신열(辛熱)하고, 조(燥)하여 몸 안의 이한(裏寒)을 제거함으로써 비위(脾胃) 양(陽)을 따듯하게 하고, 음한(陰寒)이 내성(內盛)하여 양기쇠미(陽氣衰微)하거나, 비위허한(脾胃虛寒)으로 토사냉통(吐瀉冷痛)이 생긴 증상을 치료하는데<sup>19)</sup>, 현대약리에서는 생강과 같이 gingerol 성분을 중심으로 향류마티스 관절염, 항암, 항당뇨, 항구토 효과가 보고되고 있다<sup>20)</sup>. 맥문동은 보음약(保陰藥)으로 고한하여 청열하고, 감한(甘寒)하여 질윤(質潤)하므로 양음생진(養陰生津)하므로 폐(肺), 위(胃), 심(心)에 작용하여 허로해혈(虛勞咳血), 건해조담(乾咳稠痰), 심번구갈(心煩口渴), 장조변비(腸燥便秘)를 치료한다<sup>21)</sup>. 또한, 청열량혈약(淸熱涼血)인 생지황(鮮地黃)은 한(寒)하고 감고(甘苦)한 성미가 감한질윤(甘寒質潤)하게 하므로 신음(腎陰)을 자(滋)하여 윤조(潤燥)시키고, 고조(苦燥)하여 심장과 간, 혈분(血分)에 들어가 청영량혈(淸營涼血)하여 사열(邪熱)을 설열(泄熱)하므로 열병상음(熱病傷陰), 설강번갈(舌絳煩渴), 발반발진(發斑發疹), 토혈(吐血), 녹혈(衄血) 등을 치료한다<sup>22)</sup>. 생지황과 맥문동은 모두 항암, 항당뇨, 항염, 뇌 신경 보호 효과가 잘 알려져 있으며<sup>23)</sup>, 특히 생지황은 최근 결핍과 이행동장애(ADHD)를 개선시키는 것이 최근 보고되면서 주목받고 있다<sup>24)</sup>. 본 연구에서는 자양대보탕을 구성하는 약재들의 본초학적 특성 및 현대 약리효능 보고를 바탕으로 발효 전후의 염증, 산화 스트레스 손상, 암 발생에서의 효능 변화를 비교함으로써 발효 자양대보탕의 임상적 활용성을 증진하고자 하였다.

발효는 식용 미생물을 이용하여 한약을 발효시킴으로써 유효성분 추출을 용이하게 하고, 체내 흡수율과 생체 이용률을 더욱 높이고, 약효를 강화시키며, 독성을 감소시킨다는 장점이 알려지면서<sup>1)</sup>, 최근 다양한 한약재 및 처방 약물에 발효한약 제조(醱酵法製, Bio-fermentation)에 활용되고 있다<sup>25-27)</sup>. 한약재 발효에 사용되는 균주로는 누룩에서 분리되는 누룩곰팡이(*Aspergillus* sp.), 홍국균(*Monascus* sp.), 거미줄곰팡이(*Rhizopus* sp.), 트리코데르마(*Trichoderma* sp.) 및 유산균인 고초균(*Bacillus* sp.), 비피도박테리움(*Bifidobacterium* sp.), 젖산간균(*Lactobacillus* sp.), 아세트박테리움(*Acetobacter* sp.), 클로스트리듐균(*Clostridium* sp.) 등 다양하게 이용되는데, 본 연구에서는 십전대보탕 발효에 사용된 젖산간균과 고초균을 자양대보탕 발효에 사용하였다<sup>11)</sup>. 발효한약의 임상적 활용은 대표적인 예로 홍국(紅麴, red yeast rice)을 들 수 있는데 육신국(六神麴) 보다 소식활혈(消食活血) 효능이 높고, 콜레스테롤 강하작용 및 혈당·혈압 강하, 항산화, 항암, 항균, 항염 등의 효능이 알려져 있다<sup>25)</sup>. 또한, 인삼, 홍삼 등을 순수 발효한 발효삼(醱酵蔘)<sup>26)</sup>, 동충하초<sup>27)</sup>, 천마<sup>28)</sup> 등에서의 발효 제조의 활용이 알려져 있다. 본 연구에서는 자양대보탕을 유산균, 고

초균, 유산균과 고초균 혼합으로 발효시키고, 발효 전 추출물과의 항염, 항산화, 항암 효능을 비교하였다.

염증반응은 정상적으로는 외부의 물리적, 화학적 자극이나 세균 감염 등에 대하여 면역세포가 이를 인지하고 다양한 염증매개물질들을 합성, 분비함으로써 손상된 조직을 회복시키거나 재생하는 기전이며, 임상적으로 발적, 발열, 종창, 통증 등의 증상을 유발하게 된다<sup>29)</sup>. 그러나 과도한 염증 발생은 각종 질환을 유발하게 되며 만성 질환으로의 변화에 기여하게 되므로 적정 수준에서의 제어가 필요하며, 각종 염증 관련 증상을 치료하기 위해 사용되는 약물은 세계적 시장 규모에서도 항암치료제 시장만큼이나 크다. 산화질소(NO, nitric oxide)는 세포 신호전달에 중요한 분자로 인체 여러 조직에서 신경전달물질로서 다양한 생물학적 과정 수행(혈관 확장 및 이완을 통한 긴장도 유지 등)에 중요한 역할을 한다<sup>30)</sup>. 대식세포에서의 염증반응은 iNOS가 발현됨으로써 NO를 합성하게 되는데 과도한 NO의 생성은 비정상적인 염증반응 증가로 질병을 유발하게 된다. 한편, 본 연구에서의 RAW264.7 세포는 마우스 대식세포로서 박테리아의 외피 단백질 성분인 LPS를 처리하면 염증반응이 잘 유도되기 때문에 약물의 항염증 효과를 측정하기 위한 보편적 세포실험모델로 활용되고 있다. 한편, NO의 감소는 발효 전 추출물이나 단독 발효추출물에서도 유의적인 효과를 나타내었는데 이는 기본 처방인 십전대보탕이 NO 생성을 억제하는 것과 연관되는 것으로 보인다<sup>31)</sup>. 한약의 유효성분은 대부분 당이 붙은 고분자 구조로 발효를 통해 저분자화됨으로써 체내 흡수율을 높일 수 있으며, 생리활성, 혈당과 지질 대사 변화를 통해 생리활성을 높게 되는데 본 연구에서도 발효추출물들에서 모두 NO 감소와 iNOS 발현 억제 효과를 확인하였다. 특히 혼합 발효추출물은 다른 추출물에 비하여 좀 더 감소되는 패턴을 나타내었는데 단독 발효보다 혼합 발효가 활성 변화에 미치는 영향에 대해서는 성분 분석 등 실험적 규명이 더 필요할 것으로 사료된다.

또한, 이는 염증 신호전달분자인 ERK MAPK와 전사인자(transcription factor)인 NF- $\kappa$ B의 인산화 발현 감소를 통해 이루어지는 것을 확인하였다. NF- $\kappa$ B는 염증반응 조절, 면역체계 조절, 세포증식과 사멸, 상피세포 분화 등에 관여하는 대표적인 전사인자로 과도한 활성화는 다양한 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines) 합성과 분비 및 iNOS, COX-2 등의 발현 유도로 NO와 prostaglandin E2 (PGE2) 분비 등을 통한 염증반응 유발에 기여하게 된다<sup>32)</sup>. ERK는 MAPK 계열 단백질로 특히 대식세포에서 LPS 자극으로 인산화되면 NF- $\kappa$ B의 핵 내로의 이동을 촉진함으로써 염증반응 유발에 필요한 신호들을 전달하게 된다. 따라서 NF- $\kappa$ B와 ERK MAPK의 인산화 발현을 통한 활성화를 억제하는 것은 염증반응 개선에 이득이 된다. ERK, JNK, p38 MAPKs는 염증신호분자들로 LPS 자극을 받은 대식세포는 빠르게 이들을 인산화시켜 NF- $\kappa$ B의 활성을 유도함으로써 NO, PGE2와 같은 염증매개물질 생성을 증가시킨다. NO는 BV2와 같은 염증세포에서 JNK의 negative regulator로 보고된 바 있으며<sup>33)</sup>, 박테리아 감염 대식세포에서 ERK는 I- $\kappa$ B의 분해를, p38은 NF- $\kappa$ B p65의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다<sup>34)</sup>. 본 연구에서는 ERK와 NF- $\kappa$ B 인산화 발현을 중심으로 발효 전후 자양대보탕의 억제 효과를 확인하였으며, 향후 JNK와 p38

MAPKs 발현에 대한 효과도 확인해 볼 필요가 있다.

암은 유전자 변이, 세포 성장 조절 이상, 세포사멸 회피, 세포 에너지대사 조절 변화, 면역체계 이상 등에 의해 세포가 비정상적으로 과다 증식함으로써 각종 문제를 유발하게 된다. 최근 암의 치료는 암 발생을 촉진하는 기전 제어를 목표로 암 억제 유전자의 기능 회복이나 재설계(reengineering) 유도, 세포사멸(apoptosis) 기전의 활성화를 통한 증식 억제 등의 방법이 활용하고 있다<sup>35)</sup>. 세포자살 유도는 가장 오랫동안 사용되어 온 항암제 작용의 원리이며, 주로 자살 전 단백질인 bax(BCL2 associated X)와 PARP, cytochrome c, caspase-3 등의 발현 증가를 통해 이루어진다<sup>36)</sup>. Bax는 발생과정 중 신경세포 사멸, 림프계나 생식기관의 항상성 유지, 종양 발생 억제, DNA가 손상된 세포의 자살 유도 등 다양한 역할을 하며, bax의 발현은 자살저해 단백질인 Bcl-2에 의해 억제 조절될 수 있다. 일반적으로 세포사멸이 일어나면 Bcl-2의 발현이 감소하고, Bax 발현이 증가하며, 미토콘드리아에서 방출된 cytochrome c에 의해서 caspase-9 활성화 및 caspase-3 분절에 따른 cleaved caspase-3 변화, 그리고 DNA 복구 역할을 하는 PARP의 절단이 일어나게 된다. 따라서 Bax, cytochrome c, cleaved caspase-3, PARP와 같은 세포사멸 유도분자들의 발현 증가는 암세포의 세포사멸 유도에 유리하게 작용할 수 있으며, 다양한 항암제들은 이러한 분자들의 발현조절과 세포사멸 유도로 우수한 항암효과를 나타내는 것으로 알려지고 있다<sup>37)</sup>. 본 연구에서도 자양대보탕은 유방암세포와 폐암세포에서 세포사멸 유도분자들의 발현을 증가시킴으로써 항암효과를 나타내었으며, 항염증, 항산화 효과에서와 마찬가지로 비발효추출물 보다 유산균과 고초균을 활용한 발효 시 더 우수한 활성을 나타내는 것으로 나타났다. 사실 자양대보탕은 정상 면역세포를 보호하는 작용이 큰 약물로 구성되어 암세포에서의 세포사멸 유도를 통한 항암 활성은 적을 것으로 예상하였으나, 오히려 암세포의 세포사멸 유도를 증가시키는 결과가 확인되어 기존 세포사멸 유도 항암제의 다양한 부작용 문제를 고려해보았을 때 상대적 안전하게 항암 활성을 유도할 수 있을 것으로 기대되었다. 특히 자양대보탕의 항암활성을 발효를 통해 더욱 증강시킬 수 있는 것으로 보여 실제 임상에서 발효 자양대보탕의 항암치료 활용을 고려해 볼 수도 있을 것으로 기대된다.

산화 스트레스는 세포사멸을 유발하며 이에 대응하는 항산화 효소는 산화물질인 활성산소(ROS)를 적절히 제거함으로써 질병으로부터 우리 몸을 보호하게 된다. 대표적인 항산화효소로는 SOD, catalase, GSH 등이 잘 알려져 있으며<sup>38)</sup>, 이 중 SOD는 활성산소를 첫 번째로 제거하는 중요한 역할을 하는 효소로 SOD가 활성산소를 만나면 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 변환되고, 과산화수소는 catalase에 의해 다시 물로 변환, 배출되게 된다. 또한, HO-1은 heme catabolism의 속도결정단계에 작용하는 효소로 다양한 세포에서 자외선, 과산화수소, 사이토카인, 저산소 상태 등 외부의 산화 스트레스 손상 발생에 대한 세포의 방어기전 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>39)</sup>. HO-1의 발현 수준은 전사인자인 NRF-2에 의해 조절되는데, 정상 조직에서는 HO-1의 발현이 낮지만, 병태생리학적 스트레스 자극이 가해지면 NRF-2/HO-1 신호전달 활성화로 내인성 항산화 물질의 생성을 촉진함으로써 방어기전을 가동하게 된다<sup>40)</sup>. 따라서 약물의 항산화 효능 평가 시 약물에 의한

NRF-2/HO-1 발현 증가 및 이를 통한 ROS 생성 감소를 확인하게 되는데, 본 연구에서는 정상조건에서 약물에 의한 NRF2와 HO-1의 발현 변화를 확인하지는 않았으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리로 산화 스트레스 자극을 주었을 때 이들의 발현이 증가하는 것을 관찰하였다. 일반적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 자극은 Bax, caspase-3, PARP 등으로 이어지는 세포사멸 경로를 활성화함으로써 세포생존도를 감소시키게 되는데, 처리 농도나 시간 등 조건에 따라 Keap1/NRF-2, HO-1의 발현은 정상세포와 유사하거나 좀 더 증가 또는 감소하는 변화를 나타내기도 한다<sup>41-43)</sup>. 다만, 항산화 약물들은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 NRF-2와 HO-1의 발현을 증가시킨다는 연구결과들과 비교해볼 때, 본 연구에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 이들의 발현 증가와 자양대보탕 투여에 따른 발현의 감소에 대해서는 NRF-2의 핵과 세포질에서의 변화 및 HO-1 발현에 미치는 영향 등 자양대보탕의 약리기전 연구가 좀 더 필요할 것으로 사료된다.

자양대보탕의 기본 처방인 십전대보탕은 유산균 발효 후 항염증<sup>11)</sup> 및 기억력 개선 효과<sup>44)</sup>가 이미 알려져 있으며, 본 연구를 통해 비발효 자양대보탕 뿐 아니라 발효 자양대보탕에서도 항염증, 항산화, 항암 효과가 확인되었고, 발효는 생리활성을 높이는데 효과적인 것을 알 수 있었다. 따라서 자양대보탕은 유산균과 고초균을 이용한 순수 발효를 통해 다양한 생리활성능력을 증대시킴으로써 임상에서의 활용성을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 자양대보탕의 유산균과 고초균을 이용한 발효 전후의 항염증, 항암, 항산화 효능 변화를 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. RAW264.7 대식세포의 LPS-유도 염증반응에서 발효추출물들은 비발효추출물과 비교하여 iNOS의 발현을 억제시키며, NO 생성을 감소시켰고, COX-2 발현 억제 및 ERK, NF-κB의 인산화 발현을 억제시켰으며, 유산균과 고초균 혼합 발효추출물에서 가장 효과적인 것으로 나타났다.
2. MCF-7 유방암세포 및 A549 폐암세포에서 발효추출물들은 비발효추출물과 비교하여 Bax, cytochrome c, cleaved caspase-3, PARP 등 세포사멸 유도 단백질들의 발현을 증가시킴으로써 항암 활성을 나타내었으며, 유산균과 고초균 혼합 발효추출물에서 가장 효과적인 것으로 나타났다.
3. HepG2 간세포의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-유도 산화 스트레스 손상에서 발효추출물들은 비발효추출물과 비교하여 세포 생존도를 증가시키고 SOD, Catalase, NRF-2, HO-1의 발현을 감소시켰으며, 유산균과 고초균 혼합 발효추출물에서 가장 효과적인 것으로 나타났다.

따라서 유산균과 고초균을 이용한 자양대보탕의 발효는 자양대보탕의 항염, 항암, 항산화 효과를 증가시킴으로써 치료 효과를 높이는데 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

## References

- Kim SH. The study of the fermented herbal's usefulness for the improvement in efficiency of the oriental medicine. Graduate School of Alternative Medicine, Kyonggi University. 2008.
- Kim YM. A Study on the Trend of Researches in Fermented Herb Medicines. Graduate School of Kyungwon University. 2009.
- Yoon SD. A study on the drinking in Dong Ui Bo Gam, Graduate School of yunghee University. 2012.
- Lee H. A study on the Brewing method in Euibangyoochui. Graduate School of Kyunghee University. 2015.
- Jeong JW. The efficacy and safety of Sipjeondaebotang for cancer patients: A systematic review and meta-analysis. Graduate School of Kyung Hee University. 2023.
- Oh S, Cheon C, Park S, Jang BH, Park JS, Jang S, Shin YC, Ko SG. The Analysis of the Recent Research Trend of Sipjeondabotang in Korea. Journal of Society of Preventive Korean Medicine 2014 ; 18(1) : 113-123
- Ministry of Food and Drug Safety. URL : [Http : //ezdrug.mfds.go.kr](http://ezdrug.mfds.go.kr)
- Jeon WY, Shin IS, Shin HK, Lee MY. Gastroprotective effect of the traditional herbal medicine, Sipjeondaebotang water extract, against ethanol-induced gastric mucosal injury. BMC Complement Altern Med. 2014; 14: 373.
- Cheon C, Park S, Park YL, Huang CW, Ko Y, Jang BH, Shin YC, Ko SG. Sipjeondaebotang in patients with cancer with anorexia: a protocol for a pilot, randomised, controlled trial. BMJ Open. 2016; 6(5): e011212.
- Yang MC, Jeong SW, Ma JY. Analysis of Constituents in Sipjundaebotangs Fermented by Lactic Acid Bacteria. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 2011; 39(4): 350-356.
- Oh YC, Cho WK, Jeong YH, Im GY, Yang MC, Ma JY. Fermentation improves anti-inflammatory effect of sipjeondaebotang on LPS-stimulated RAW 264,7 cells. Am J Chin Med. 2012; 40(4): 813-31.
- National Herbal Medicine Information. URL : <https://nifds.go.kr/nhmi/hbdc/ofcmhbdc/list.do>
- Lee JT. Research on intake of Chinese medicine by Korean. Ministry of Food and Drug Safety Report. 2006.
- Oh S, Cheon C, Park S, Jang BH, Park JS, Jang S, Shin YC, Ko SG. The Analysis of the Recent Research Trend of Sipjeondabotang in Korea. Journal of Society of Preventive Korean Medicine 2014 ; 18(1) : 113-23.
- Textbook Compilation Committee of National University of Korean Medicine, Korea. Herbology 4<sup>th</sup> ed. Seoul : Younglimsa, 2020 : 217.
- Wang ZL, Wang S, Kuang Y, Hu ZM, Qiao X, Ye M. A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*. Pharm Biol. 2018 ; 56(1): 465-484.
- Textbook Compilation Committee of National University of Korean Medicine, Korea. Herbology 4<sup>th</sup> ed. Seoul : Younglimsa, 2020 : 345.
- Zhao YY. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and quality control of *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries: a review. J Ethnopharmacol. 2013; 149(1): 35-48.
- Textbook Compilation Committee of National University of Korean Medicine, Korea. Herbology 4<sup>th</sup> ed. Seoul : Younglimsa, 2020 : 375.
- Sharma S, Shukla MK, Sharma KC, Tirath, Kumar L, Anal JMH, Upadhyay SK, Bhattacharyya S, Kumar D. Revisiting the therapeutic potential of gingerols against different pharmacological activities. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2023; 396(4): 633-47.
- Textbook Compilation Committee of National University of Korean Medicine, Korea. Herbology 4<sup>th</sup> ed. Seoul : Younglimsa, 2020 : 645.
- Textbook Compilation Committee of National University of Korean Medicine, Korea. Herbology 4<sup>th</sup> ed. Seoul : Younglimsa, 2020 : 231.
- Shang ZP, Wang F, Zhang JY, Wang ZJ, Lu JQ, Wang HY, Li N. The genus *Liriope*: Phytochemistry and pharmacology. Chin J Nat Med. 2017; 15(11): 801-15.
- Haixia Y, Meng Y, Xinmin H, Xinqiang N. The Therapeutic Effect of the Chinese Herbal Medicine, *Rehmanniae Radix Preparata*, in Attention Deficit Hyperactivity Disorder via Reversal of Structural Abnormalities in the Cortex. Evid Based Complement Alternat Med. 2018; 2018: 3052058.
- Zhu B, Qi F, Wu J, Yin G, Hua J, Zhang Q, Qin L. Red Yeast Rice: A Systematic Review of the Traditional Uses, Chemistry, Pharmacology, and

- Quality Control of an Important Chinese Folk Medicine. *Front Pharmacol*, 2019; 10: 1449.
26. Huang L, Li HJ, Wu YC. Processing technologies, phytochemistry, bioactivities and applications of black ginseng—a novel manufactured ginseng product: A comprehensive review. *Food Chem*, 2023; 407: 134714.
  27. Yan JK, Wang WQ, Wu JY. Recent advances in *Cordyceps sinensis* polysaccharides: Mycelial fermentation, isolation, structure, and bioactivities: A review. *J Funct Foods*, 2014; 6: 33–47.
  28. Wang N, Wu TX, Zhang Y, Xu XB, Tan S, Fu HW. Experimental analysis on the main contents of *Rhizoma gastrodiae* extract and inter-transformation throughout the fermentation process of *Grifola frondosa*. *Arch Pharm Res*, 2013; 36(3): 314–21.
  29. Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell*, 2015; 160(5): 816–27.
  30. Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer*, 2007; 121(11): 2357–63.
  31. Won S, Ko JH, Jeon H, Park SS, Kim SN. Co-Administration of Gagam-Sipjeondaebo-Tang and Ibuprofen Alleviates the Inflammatory Response in MPTP-Induced Parkinson's Disease Mouse Model and RAW264.7 Macrophages. *Pathogens*, 2021; 10(3): 268.
  32. Chae SW. Function and Activation of NF- $\kappa$ B in Immune System. *Korean J Otolaryngol* 2005; 48: 284–88.
  33. Park HS, Mo JS, Choi EJ. Nitric oxide inhibits an interaction between JNK1 and c-Jun through nitrosylation. *BBRC* 2006; 1(8): 281–86.
  34. Seo JH, Lim JW, Kim H. Differential Role of ERK and p38 on NF- $\kappa$ B Activation in *Helicobacter pylori*-Infected Gastric Epithelial Cells. *J Cancer Prev*, 2013; 18(4): 346–50.
  35. Naser R, Fakhoury I, El-Fouani A, Abi-Habib R, El-Sibai M. Role of the tumor microenvironment in cancer hallmarks and targeted therapy (Review). *Int J Oncol*, 2023; 62(2): 23.
  36. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*, 2014; 2014: 150845.
  37. Rezaei M, Heidari M, Peluso I, Ghorat F, Bishayee A, Kooti W. Medicinal Plants in the Prevention and Treatment of Colon Cancer. Aiello P, Sharghi M, Mansourkhani SM, Ardekan AP, Jouybari L, Daraei N, Peiro K, Mohamadian S, *Oxid Med Cell Longev*, 2019; 2019: 2075614.
  38. Husain S, Hillmann K, Hengst K, Englert H. Effects of a lifestyle intervention on the biomarkers of oxidative stress in non-communicable diseases: A systematic review. *Front Aging*, 2023; 4: 1085511.
  39. Alharbi KS, Almalki WH, Albratty M, Meraya AM, Najmi A, Vyas G, Singh SK, Dua K, Gupta G. The therapeutic role of nutraceuticals targeting the Nrf2/HO-1 signaling pathway in liver cancer. *J Food Biochem*, 2022; 46(10): e14357.
  40. Li B, Nasser MI, Masood M, Adlat S, Huang Y, Yang B, Luo C, Jiang N. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Biomed Pharmacother*, 2020; 126: 110074.
  41. Tu M, Fan X, Shi J, Jing S, Xu X, Wang Y. 2-Fluorofucose Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells via Nrf2/keap1 and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. *Life (Basel)*, 2022; 12(3): 406.
  42. Xu J, Zhang Y, Ren G, Yang R, Chen J, Xiang X, Qin H, Chen J. Inhibitory Effect of Delphinidin on Oxidative Stress Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HepG2 Cells. *Oxid Med Cell Longev*, 2020; 2020: 4694760.
  43. Chen L, Li K, Liu Q, Quiles JL, Filosa R, Kamal MA, Wang F, Kai G, Zou X, Teng H, Xiao J. Protective effects of raspberry on the oxidative damage in HepG2 cells through Keap1/Nrf2-dependent signaling pathway. *Food Chem Toxicol*, 2019; 133: 110781.
  44. Park HR, Lee H, Park H, Cho WK, Ma JY. Fermented Sipjeondaebo-tang Alleviates Memory Deficits and Loss of Hippocampal Neurogenesis in Scopolamine-induced Amnesia in Mice. *Sci Rep*, 2016; 6: 22405.