

생물전환을 통한 음나무발효물의 LPS에 대한 경쟁적 억제제 효과 및 내독소혈증 억제 효과

†김성필^{*,**} · 이화영^{***} · 인수아^{***} · 성은영^{****} · 김진만^{*} · 남석현^{*****}

^{*}(주)에스티알바이오텍 중앙연구소 책임연구원, ^{**}아주대학교 기초과학연구소 연구원,
^{***}(주)에스티알바이오텍 중앙연구소 선임연구원, ^{****}(주)에스티알바이오텍 중앙연구소 연구원,
^{*****}아주대학교 생명과학과 교수

The Inhibitory Effect of Fermented *Kalopanax pictus* by Bioconversion on Endotoxemia and the Competitive Inhibitor Activity on LPS

†Sung Phil Kim^{*,**}, Wha Young Lee^{***}, Su A In^{***}, Eun Young Seong^{****},
Jean Man Kim^{*} and Seok Hyun Nam^{*****}

^{*}Senior Researcher, R&D Center, STR Biotech. Co. Ltd., Chuncheon 24232, Korea

^{**}Researcher, Research Institute of Basic Science, Ajou University, Suwon 16499, Korea

^{***}Junior Researcher, R&D Center, STR Biotech. Co. Ltd., Chuncheon 24232, Korea

^{****}Researcher, R&D Center, STR Biotech. Co. Ltd., Chuncheon 24232, Korea

^{*****}Professor, Dept. of Biological Science, Ajou University, Suwon 16499, Korea

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of fermented *Kalopanax pictus* (KP-F) on macrophage activation and its effect as a competitive inhibitor of LPS and inhibitory effect on endotoxemia. The results showed that KP-F could activate macrophage in a dose-dependent manner, and KP-F was confirmed to act as a ligand for TLR4. Also, it was found that KP-F did not exhibit the same biotoxicity as LPS in intraperitoneal injection, and that it could suppress the neutrophil migration induced by LPS administration. In normal mice, the body weight, tissue weight, and amount of nitrite and pro-inflammatory cytokines in serum showed no significant changes with KP-F diet for 2 weeks, confirming that administration of KP-F in normal mice did not lead to over activation of immune response and biotoxicity. In the mouse model of endotoxemia induced by LPS and D-galactosamine(D-GalN) in sub-lethal dose, the diet of KP-F effectively inhibited the amount of nitrite and cytokines in the blood, and thus was found to be able to relieve the hepatic and kidney injury. In addition, in the endotoxemia mouse model induced by LPS and D-GalN of lethal dose, the survival rate was increased by KP-F diet in a dose-dependent manner.

Key words: *Kalopanax pictus*, fermented, endotoxemia, liver injury, kidney injury

서 론

Lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성 세균의 외막을 구성하는 물질로, 동물의 생체 내에서 독소 쇼크(toxic shock)를 일으키는 물질로 알려져 있다(Caroff 등 2002). 동물의 체내로 들

어온 LPS는 LPS-binding protein(LBP)과 결합할 수 있으며, LPS-LBP 결합체 혹은 LPS 단독으로 CD14에 결합하게 된다. CD14와 복합체를 형성한 LPS는 Toll-like receptor 4(TLR4)와 상호작용하여 세포 내로 신호를 전달하며, 그 결과 다양한 cytokine 및 염증매개물질들이 합성된다(Triantafidou &

† Corresponding author: Sung Phil Kim, Senior Researcher, R&D Center, STR Biotech. Co. Ltd., Chuncheon 24232, Republic of Korea. Tel: +82-33-258-6353, Fax: +82-33-258-6332, E-mail: spkim@strbiotech.co.kr

Triantafyllou 2005). LPS에 의한 세포의 활성화는 염증반응의 적절한 조절을 불가능하게 하며, 결국 조직손상과 만성염증에 의한 노화 및 노화 관련 질병들을 유발할 수 있다. 또한, 세포 내 만성적인 염증반응으로 인한 산화-환원 조절 반응의 실패로, 비만, 대사질환, 암, 동맥경화 등 다양한 합병증이 발생할 가능성이 있다(Chung 등 2009). 내독소혈증(endotoxemia) 역시 LPS에 의해 유발되는 질병이며, 저혈압, 조직관류 저하, 다발성 장기부전 등을 특징으로 하고, LPS에 의해 활성화되어 과분비되는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukins(ILs) 등이 간 기능 부전 및 간세포 괴사를 유발하는 것으로 알려져 있다(Howe LM 2000; Moulin 등 2001; Motobu 등 2006). 현재 내독소혈증의 치료를 위해, polymyxin B와 같은 LPS 중화제 및 비스테로이드성 항염증제, 당질코르티코이드, phosphodiesterase 저해제 등이 사용되고 있으나, 대부분 대식세포의 활성을 억제하여 증상을 완화시키는 정도이며, 다양한 약물을 통한 집중 치료에도 불구하고 여전히 사망률이 높은 질환이기 때문에 새로운 약물 혹은 새로운 치료법의 개발이 필요하다(Werners AH 2017).

음나무(*Kalopanax pictus*)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 낙엽성 수목으로 예로부터 수피(stem bark)는 해풍피라 하여 류마티스관절염, 신경통, 당뇨 및 통증 완화에 널리 사용되어 왔다(Bang 등 2010). 연구 결과에 따르면 음나무 추출물은 항산화 활성 및 항염증 활성을 가지며, 이를 통해 류마티스 관절염 및 당뇨, 위염 등에 대한 효과적인 억제 활성을 갖는 것으로 보고되어 있다(Choi 등 2002; Sohn 등 2015). 또한, 음나무에는 liriiodendrin, kalopanaxsaponin(A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K), syringin, erythrakine 등 다양한 생리활성 성분이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다(Rahman 등 2018). 이 중, kalopanaxsaponin A는 JNK와 NF- κ B를 억제하여 항염증 활성을 나타낸다는 보고가 있으며(Jeong 등 2013), kalopanaxsaponin B는 IRAK1 kinase를 억제하여 LPS에 의해 유도된 염증 반응을 억제하고(Joh 등 2012), TNBS에 의해 유도된 대장염증을 억제시킬 수 있다는 보고가 있다(Jeong 등 2012). 따라서 본 연구에서는 표고버섯 균사를 이용하여 음나무발효물을 제조하고, 제조된 음나무발효물이 갖는 생리활성을 평가하고자 하였다. 이전 연구 결과에 따르면 흑미강발효물은 Th1 면역반응을 활성화시켜서 *Salmonella typhimurium*에 의한 감염증을 효과적으로 억제함과 동시에 LPS에 의해 유도된 내독소혈증을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다(Kim 등 2013; Kim 등 2014). 따라서 동일한 발효 과정을 통하여 제조된 음나무발효물이 갖는 면역반응 활성화 효과에 대해 확인하였으며, 또한 LPS에 의해 유도되는 내독소혈증을 억제할 수 있는지 확인하여 생체안전성 및 건강기능성 식품으로서의 가능성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 및 시약

본 실험에 사용된 음나무는 영창물산(Jecheon, Korea)에서 구입하였다. 동물세포배양에 사용된 배지 및 fetal bovine serum(FBS), 염류용액은 모두 ThermoFisher Scientific(Waltham, MA)에서 구입하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), LPS 및 기타 화학시약은 모두 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO) 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 시료의 제조

표고버섯 균사는 자실체로부터 분리하여 PDA 배지에서 배양하였으며, 균사체의 유전자는 Korean Center of Microorganisms(Seoul, Korea)에서 검정하였다. PDA 배지에서 배양한 균사는 50 mL 액체배지(2% glucose, 0.5% yeast extract, 0.5% soy peptone, 0.2% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄, 0.002% FeSO₄, 미강 10%, w/v)에 접종하여 28°C에서 5일간 120 rpm으로 진탕 배양하였고, 배양이 끝난 균사는 이후 발효를 위한 종균으로 사용하였다. 발효공정은 Lee 등(2017)의 방법을 일부 변형하여 수행하였다. 100 g/L의 분쇄한 음나무 수피의 powder를 이용하여 액체배지를 제조한 뒤, 40 U의 amylase를 처리하여 60°C에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤, pH를 7.0으로 조정하고, 고온 처리하여 살균하였다. 멸균이 끝난 배지는 5L 발효조에서 10%의 종균을 첨가하여 28°C에서 150 rpm으로 7일간 생물전환 발효공정을 거친 후 50°C에서 60분간 cellulase를 처리하여 생물전환 효소처리공정을 수행하였다. 효소처리 공정이 끝난 시료는 90°C에서 1시간동안 열수 추출하여 최종적으로 음나무발효물을 수득하였으며, 동결건조 후 사용하였다.

3. 세포배양 및 nitric oxide(NO), cytokine 생산 유도 활성 측정

마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 분양받아 사용하였으며, 10% FBS 및 100 U/mL의 penicillin과 100 mg/mL의 streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 계대 배양하였다. NO 생산 유도 활성 측정은 Murakami 등(1999)의 방법에 따라 측정하였다. 96 well plate에 1×10⁶ cells/mL로 세포를 분주하여 24시간 배양한 뒤, 농도별 시료와 TAK242를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 상층액 100 μ L를 취하여 동량의 Griess reagent(1% N-(1-naphthyl)ethylene diamine과 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid)를 첨가한 뒤, ELISA microplate reader(molecular devices, San Jose, CA)를 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 세포독성의 측정은 Yoon

등(2013)의 방법을 일부 변형하여 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 확인하였다. 96 well plate에 5×10^4 cells/mL로 세포를 분주하여 배양한 뒤, 농도별 시료를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 끝나면 배양액에 1 mg/mL의 MTT 시약을 50 μ L 처리하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 4시간 배양하여 formazan crystal의 생성을 유도하였다. 이후 상등액을 제거하고 100 μ L의 DMSO를 첨가하여 세포 내 formazan을 충분히 용출시킨 후 570nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 계산하였다.

4. 실험동물

6주령의 pathogen-free female Balb/c 마우스는 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 12시간의 명암주기와 20~22°C의 온도, 50±10%의 습도조건에서 사육하였으며, 고형사료(5L79) 및 식수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 모든 동물실험 방법은 (재)춘천바이오산업진흥원 동물실험윤리위원회의 가이드라인에 의하여 수행되었다(승인번호 2018-011).

5. 호중구 유도능 측정

마우스에서의 호중구 유도능 측정은 Cecilio 등(1997)의 방법을 일부 변형하여 수행하였다. 6주령의 Balb/c 마우스에 200 ng의 LPS, 200 ng의 KP-F, 200 ng의 LPS와 KP-F를 복강주사하였다. 6시간 뒤 마우스를 희생하고, 복강 내로 10% FCS가 포함된 RPMI1640 배지 3 mL를 주입하여 복강 내 세포를 회수하였다. 400×g에서 5분간 원심분리하여 세포를 세척한 후, 총 세포수를 혈구계수기를 이용하여 측정하였으며, May-Grunwald-Giemsa 염색을 이용하여 호중구의 수를 확인하였다. 200개의 세포를 확인하여 호중구의 비율을 구하였으며, 무작위적으로 선택한 6개의 영역에서 관찰하여 평균치를 구하였다.

6. 장기 무게, nitrite 및 염증성 cytokine 측정

6주령의 암컷 Balb/c 마우스에 2주간 KP-F를 10, 40, 160 mg/kg의 일일투여량으로 식이투여하였다. 이후 마우스를 희생하여 체중 및 심장, 폐, 위, 간, 비장의 무게를 측정하였으며, 심장에서 채혈 후 2,000×g에서 30분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 내 nitrite의 양은 Nitric Oxide Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였고, 혈청 내 cytokine의 양은 각각의 ELISA assay kit(R&D systems, Minneapolis, MN)를 이용하여 측정하였다.

7. 간 손상 및 신장 손상 측정

6주령의 암컷 Balb/c 마우스에 2주간 KP-F를 10, 40, 160

mg/kg의 일일 투여량으로 식이 투여하고, 5 μ g/kg의 LPS와 700 mg/kg의 D-galactosamine을 복강주사하여 내독소혈증을 유도하였다. 4시간 후 마우스를 희생하여 간 조직을 적출하고 무게를 측정하였으며, 심장에서 채혈하고 2,000×g에서 30분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 내 간 손상의 지표로 GOT/GPT 효소 활성을 측정하였으며, GOT/GPT colorimetric assay kit(Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 신장 손상의 지표로 신장조직 내 Myeloperoxidase activity와 혈청 내 creatinine, BUN의 양을 측정하였으며, 각각의 assay kit를 abcam(Cambridge, UK)에서 구입하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다.

8. 마우스 생존율 확인

6주령의 암컷 Balb/c 마우스에 KP-F를 2주간 식이투여하였다. 이후 20 μ g/kg의 LPS와 700 mg/kg의 D-galactosamine을 복강주사하여 내독소혈증에 의한 마우스의 사망을 유도하였고, 총 60시간 동안 마우스의 생존율을 확인하였다.

9. 통계 분석

3회 이상 반복실험에서 얻어진 data는 Statistical Analysis System software package(SAS)의 ANOVA procedure test 분석 방법에 따라 분산분석을 실시하였고, 각 처리군별 유의성은 5% 수준에서 Duncan 분석방법에 따라 사후검정하였다.

결과 및 고찰

1. KP-F의 대식세포 활성화 효과 검증

마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포주를 지시세포로 사용하여 KP-F가 갖는 대식세포 활성화 효과를 검증하였다. KP-F를 0.01 μ g/mL에서 10 μ g/mL까지 농도별로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 NO 생성 유도 활성이 증가하는 경향을 보였으며, 대조군으로 사용한 LPS와 유사한 수준으로 대식세포를 활성화 시키는 것으로 확인되었다. 또한, TLR4의 특이적 억제제인 TAK242를 함께 처리한 결과, KP-F에 의한 NO 생성이 대부분 억제되는 것으로 확인되었다(Fig. 1). TAK242는 TLR4의 세포 내부 도메인 중 747번 시스테인에 결합하여 특이적으로 TLR4 신호전달을 억제하는 것으로 알려져 있다(Matsunaga 등 2011). 따라서 KP-F의 대식세포 활성화 경로는 TLR4를 경유하는 신호전달 경로이며, KP-F는 TLR4의 agonist로 작용한다고 볼 수 있다.

2. 호중구 유도능 측정을 통한 생체 내 안전성 확인

LPS와 같은 내독소는 복강 내 주사 시 호중구의 이동 및 활성화를 유도하여 급성 염증반응을 유발한다(Cecilio 등 1997;

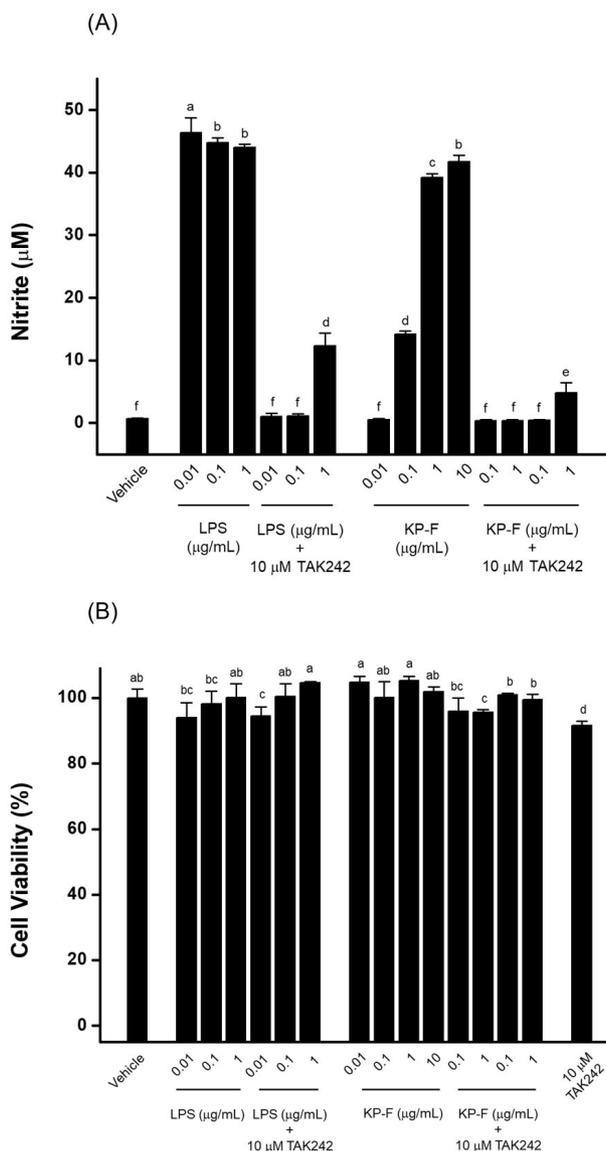


Fig. 1. Effect of KP-F on production of nitric oxide in macrophage (A) and cell cytotoxicity (B). Data are expressed as the mean±S.D. of triplicate experiments. Bars sharing a common letter are not significantly different at $p < 0.05$.

Miyazaki 등 2004). KP-F 역시 TLR4에 결합하여 대식세포를 활성화시키는 기전을 가지고 있기 때문에, 생체 내에서 내독소와 같은 작용을 하는지 확인할 필요가 있다. 따라서 KP-F를 복강 내로 주사한 뒤 세포의 침윤 및 침윤 세포 내 호중구의 비율을 측정하여 KP-F의 생체 안전성을 평가하는 한편, LPS와 KP-F를 함께 투여하여 KP-F가 LPS에 의한 급성 염증 반응을 억제할 수 있는지 확인하였다. 200 ng의 대장균 유래 LPS를 복강 투여하였을 때, 복강 내 세포 중 90.3%의 세포가 호중구인 것으로 확인되었으나, 동일 농도의 KP-F를 복강주사할 경우, 복강 내로 침윤된 세포 중 호중구의 비율은 16.8%

로 LPS와 같은 호중구의 유도는 일으키지 않는 것으로 확인되었다. 또한, 200 ng의 LPS와 200 ng의 KP-F를 동시에 투여하여 급성염증반응을 유발할 경우, LPS에 의한 호중구의 유도가 48.3%로 감소하는 것으로 확인되었다(Fig. 2). Fig. 1에서 LPS와 KP-F 모두 동일한 TLR4를 경유하여 대식세포의 활성화를 유도하는 것으로 볼 때, KP-F가 먼저 TLR4에 결합한 세포는 LPS에 의한 활성화를 일으키지 못하는 것으로 판단된다. TLR2 또는 TLR4에 특정 ligand가 결합하면, 동일한 수용체에는 agonist가 결합하지 못하는 endotoxin tolerance가 나타날 수 있다는 보고(Dobrovolskaia 등 2003)를 참고할 때, KP-F의 투여가 LPS에 대한 endotoxin tolerance를 일으킨 것으로 판단되며, 따라서 KP-F는 LPS에 대한 경쟁적 억제제로 작용한다고 사료된다.

3. 정상 마우스에 KP-F 투여 시 생체 안전성 평가

10 mg/kg, 40 mg/kg, 160 mg/kg의 KP-F를 정상 마우스에 2주간 식이한 후, 마우스를 희생하여 KP-F가 갖는 생체 독성을 평가하였다. 마우스의 체중과 장기 무게를 측정한 결과, 최대 투여량인 160 mg/kg 투여 마우스에서 심장과 간 무게의 소폭 증가가 일어난 것을 제외하고, 특별한 무게의 변화는 관찰되지 않았다(Table 1). 또한, 혈액 내 염증지표로 nitrite의 양과 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 양을 측정한 결과, 160 mg/kg 투여군에서 8.64% 정도의 nitrite 증가가 일어났으나, cytokine의 양은 모두 유의미한 변화가 관찰되지 않았다(Table 2). 따라서, KP-F의 투여는 정상 생체 내에서 특별한 독성을 유발하지 않으며, 과도한 면역반응을 유발하지 않는 것으로 확인되었다.

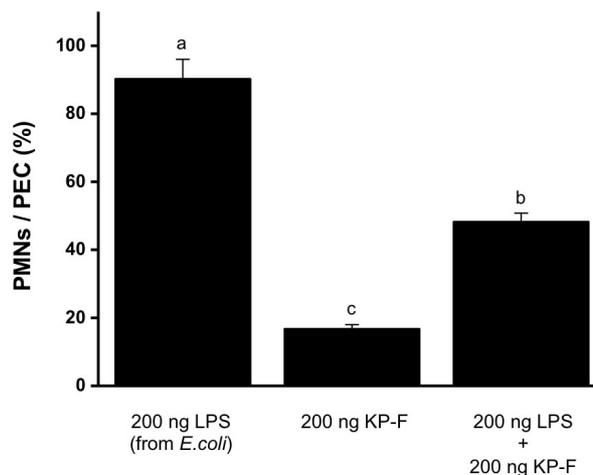


Fig. 2. Effect of KP-F on neutrophil migration induced by LPS treatment. Data are expressed as the mean±S.D. of 10 mice experiments. Bars sharing a common letter are not significantly different at $p < 0.05$.

Table 1. Body weight and organ weight changes by KP-F administration in normal mice

Sample	Body weight (g)	Organ weight (g/20g body weight)				
		Heart	Lung	Stomach	Liver	Spleen
Vehicle	31.7±1.4 ^a	0.18±0.01 ^b	0.25±0.02 ^a	0.23±0.02 ^a	1.03±0.09 ^b	0.17±0.01 ^b
10 mg/kg	31.9±1.5 ^a	0.17±0.01 ^b	0.25±0.01 ^a	0.25±0.02 ^a	1.03±0.11 ^{ab}	0.21±0.03 ^a
KP-F 40 mg/kg	30.8±2.1 ^a	0.19±0.01 ^{ab}	0.26±0.02 ^a	0.23±0.01 ^a	1.01±0.08 ^b	0.18±0.02 ^{ab}
160 mg/kg	31.3±3.0 ^a	0.20±0.02 ^a	0.25±0.01 ^a	0.24±0.02 ^a	1.05±0.12 ^a	0.16±0.02 ^b

Data are expressed as the mean±S.D. of 10 mice experiments. Values sharing a common letter are not significantly different at $p<0.05$ through one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

Table 2. Nitrite and cytokines production by KP-F administration in normal mice

Sample	Nitrite (μ M)	Cytokines (pg/mL)		
		TNF- α	IL-1 β	IL-6
Vehicle	0.81±0.07 ^b	35.7±1.6 ^a	9.2±0.7 ^a	7.8±0.4 ^a
10 mg/kg	0.85±0.04 ^{ab}	36.1±1.7 ^a	9.5±0.4 ^a	8.0±0.5 ^a
KP-F 40 mg/kg	0.84±0.06 ^{ab}	35.9±2.8 ^a	9.4±0.8 ^a	8.2±0.6 ^a
160 mg/kg	0.88±0.09 ^a	36.3±2.9 ^a	9.6±0.5 ^a	7.9±0.5 ^a

Data are expressed as the mean±S.D. of 10 mice experiments. Values sharing a common letter are not significantly different at $p<0.05$ through one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

4. 아치사량의 LPS와 D-GalN으로 유발된 내독소혈증에서 KP-F의 억제 효과

10 mg/kg, 40 mg/kg, 160 mg/kg의 KP-F를 2주간 식이투여한 뒤, 아치사량인 5 μ g/kg의 LPS와 700 mg/kg의 D-GalN을 복강주사하여 내독소혈증을 유발하였다. 4시간 뒤 마우스를 희생하여 혈중 염증지표로서 nitrite의 양과 cytokine을 확인한 결과, LPS와 D-GalN에 의해 유도된 전신염증반응이 KP-F의 투여로 인해 농도 의존적으로 감소되는 것으로 확인되었

다(Table 3). 특히, 조직 손상을 유발하는 대표적 cytokine인 TNF- α 의 경우, KP-F 투여 시 대조군 대비 최대 72.2% 감소하는 것으로 확인되어 전신염증반응에 의한 장기 손상을 보호할 수 있을 것이라 판단하였다. Josephs 등(2000)은 LPS와 D-GalN에 의해 유도되는 TNF- α 는 간 손상을 유발할 수 있다고 보고하였으며, Takahashi 등(2012)은 LPS의 투여에 의해 신장 손상이 유발됨을 보고하였다. 따라서 내독소혈증 유발 시 손상되는 대표적 장기인 간과 신장의 손상 정도를 확인하였다. 마우스의 간 무게를 측정된 결과, 전신염증반응 유발 시 14.8% 증가한 간 무게가 KP-F 투여 시 최대 43.8%까지 감소하였으며, 혈중 GOT와 GPT의 양 역시 감소하는 것으로 확인되어 KP-F의 투여로 인해 간 손상이 억제되는 것으로 확인되었다(Table 4). 또한, 신장조직에서의 myeloperoxidase activity와 혈중 creatinine, BUN을 측정하여 신장 손상을 확인한 결과, 내독소혈증에 의해 유도된 신장 손상 역시 KP-F의 투여에 의해 농도 의존적으로 감소하는 결과를 보였다(Table 5). 이러한 결과는 TLR2/4를 통해 대식세포의 활성화를 유도하는 물질인 β -1,4-mannobiose가 endotoxin tolerance에 의해 LPS에 의한 내독소혈증을 억제할 수 있다는 보고(Kovacs-Nolan 등 2013)와 부합하며, KP-F 역시 endotoxin tolerance의 유도를 통해 LPS와 같은 endotoxin에 의한 전신성 염증반응을 억제

Table 3. Effect of KP-F on nitrite and cytokines production in endotoxemia mice induced by LPS/D-GalN

Sample	Nitrite (μ M)	Cytokines (pg/mL)		
		TNF- α	IL-1 β	IL-6
Vehicle	0.81±0.1 ^e	35.7±1.6 ^d	9.2±0.7 ^c	7.8±0.4 ^e
LPS/GalN (5 μ g/kg and 700 mg/kg)	17.6±1.3 ^a	313.5±12.7 ^a	44.6±3.8 ^a	38.7±2.1 ^a
10 mg/kg	6.7±0.3 ^b	133.9±11.5 ^b	31.8±1.7 ^b	28.3±2.6 ^b
KP-F 40 mg/kg	5.1±0.4 ^c	124.2±10.1 ^{bc}	27.7±1.4 ^c	24.2±1.5 ^c
160 mg/kg	4.6±0.1 ^d	112.8±5.4 ^c	23.6±0.9 ^d	21.3±1.7 ^d

Data are expressed as the mean±S.D. of 10 mice experiments. Values sharing a common letter are not significantly different at $p<0.05$ through one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

Table 4. Effect of KP-F on liver injury induced by LPS/D-GalN

Sample	Liver weight (g)	GOT (Karmen unit/mL)	GPT (Karmen unit/mL)
Vehicle	1.08±0.11 ^c	71.3±5.6 ^d	41.2±0.3 ^c
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	1.24±0.12 ^a	242.3±11.5 ^a	172.8±11.0 ^a
KP-F 10 mg/kg	1.17±0.12 ^{ab}	178.9±15.6 ^b	77.9±3.6 ^b
KP-F 40 mg/kg	1.15±0.08 ^b	162.3±11.7 ^{bc}	71.3±6.1 ^c
KP-F 160 mg/kg	1.12±0.10 ^{bc}	148.2±13.2 ^c	62.3±5.8 ^d

Data are expressed as the mean±S.D. of 10 mice experiments. Values sharing a common letter are not significantly different at $p<0.05$ through one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

Table 5. Effect of KP-F on kidney injury induced by LPS/D-GalN

Sample	Myeloperoxidase activity (U/g protein)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)
Vehicle	1.78±0.12 ^c	0.27±0.01 ^c	10.2±0.9 ^c
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	5.45±0.32 ^a	0.52±0.03 ^a	48.3±1.2 ^a
KP-F 10 mg/kg	3.36±0.15 ^b	0.46±0.02 ^b	38.1±1.7 ^b
KP-F 40 mg/kg	3.04±0.28 ^c	0.40±0.03 ^c	34.4±2.5 ^c
KP-F 160 mg/kg	2.77±0.14 ^d	0.35±0.01 ^d	29.6±1.3 ^d

Data are expressed as the mean±S.D. of 10 mice experiments. Values sharing a common letter are not significantly different at $p<0.05$ through one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

하는 것이라 사료된다.

5. 치사량의 LPS와 D-GalN으로 유발된 내독소혈증에서 KP-F의 사망률 개선 효과

10 mg/kg, 40 mg/kg, 160 mg/kg의 KP-F를 2주간 식이투여한 뒤, 치사량의 20 µg/kg LPS와 700 mg/kg D-GalN을 복강주사 하여 내독소혈증에 의한 마우스의 사망을 유도하였다. 이후 60시간까지 마우스의 생존율을 관찰한 결과, 대조군의 마

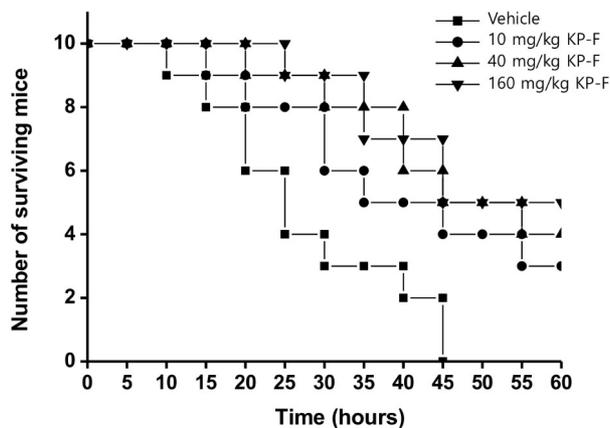


Fig. 3. Effect of KP-F on the mortality of the lethal shock in mice challenged by LPS/D-GalN. KP-F was dieted for 2 weeks prior to LPS/D-GalN challenge at 20 µg/kg and 700 mg/kg, respectively.

우스는 45시간에 모든 마우스가 사망한 반면, KP-F 투여군은 마우스의 생존율이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 3). 이러한 결과는, Ding 등(2012)이 보고한 phosvitin 유래 Pt5 peptide가 미생물 감염 패혈증 모델에서 cytokine의 발현 조절을 통해 생존율을 증가시킨다는 연구 결과와 유사하며, KP-F의 투여가 endotoxin tolerance를 유발하여 LPS에 의한 면역반응 과활성화를 억제함으로써 다발성 장기손상을 억제한 결과라고 볼 수 있다. 대부분 내독소혈증을 억제할 수 있는 물질은 항염증 활성을 가지며, 활성화된 대식세포 및 Th1 반응을 억제함에 따라 내독소혈증에 대한 억제반응을 보인다고 알려져 있다. 하지만 최근 Brinkhoff 등(2018)은 LPS에 의해 유발된 내독소혈증에서 전염증성 세포인 Th1 세포와 Th17 세포가 억제된다고 보고하였으며, 이러한 결과는 오히려 Th1 면역반응을 활성화 시킴으로써 내독소혈증을 억제할 가능성이 있음을 시사한다. 또한, 면역세포의 활성화를 유도하는 fucoidan이 LPS에 대한 저항성을 유도하여 내독소혈증에 대한 보호 효과를 가진다는 보고(Kuznetsova 등 2014)를 참고할 때, KP-F 역시 생체 내에서 LPS에 대한 저항성을 유도할 가능성이 있으며, 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다. 이상의 결과를 종합할 때 KP-F는 정상적인 면역반응을 억제하지 않으며, 내독소에 의한 과면역반응을 선택적으로 억제할 수 있을 것으로 생각되며, TLR4의 agonist이자 동시에 LPS에 대한 선택적 억제제 활성을 갖는 면역조절제로서의 개발 가능성이 있다.

요약 및 결론

본 연구에서는 음나무발효물(KP-F)의 대식세포 활성화 효과와 LPS에 대한 경쟁적 억제자로서의 활성 및 내독소혈증에 대한 억제효과를 평가하였다. 생물전환공정을 통해 KP-F를 제조하고, 마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포에 처리한 결과, KP-F는 용량 의존적으로 대식세포를 활성화시켰으며, 10 µg/mL 농도까지 세포독성을 나타내지 않았다. 또한, Toll-like receptor 4(TLR4)의 특이적 억제제인 TAK242와 함께 처리했을 때, KP-F의 대식세포 활성화 효과가 억제되는 것으로 나타남에 따라 KP-F가 TLR4의 ligand로서 작용한다는 것이 확인되었다. KP-F를 복강 내로 투여하여 생체 독성을 평가한 결과, 염증반응에 의한 호중구의 침윤을 유도하지 않는 것으로 나타났으며, LPS와 함께 투여 시 LPS 투여에 의해 유도된 호중구 침윤을 억제할 수 있음이 확인되었다. 이는 KP-F가 TLR4에 결합하여 endotoxin tolerance가 유도된 것으로 LPS와 같은 endotoxin에 대해 경쟁적 억제자로서의 활성을 갖는다는 것을 의미한다. 정상 마우스에 KP-F를 2주간 식이하였을 때, 체중 및 조직 무게, 혈청 내 nitrite의 양, 전염증성 cytokine의 양 모두 큰 차이를 보이지 않았기 때문에, KP-F의 투여는 정상 생체 내에서 생체 독성 및 과도한 면역반응을 유도하지 않는 것으로 확인되었다. 아치사량의 LPS와 D-Galactosamine(D-GalN)으로 유도된 내독소혈증 마우스 모델에서 KP-F의 식이는 혈청 내 nitrite 및 cytokine의 양을 효과적으로 억제하였으며, 간 손상 및 신장 손상 역시 감소하였다. 또한, 치사량의 LPS와 D-GalN에 의해 유도된 내독소혈증 마우스 모델에서 KP-F의 식이를 통해 용량 의존적으로 생존율이 증가하는 것으로 확인되었다. 이상의 결과를 종합할 때, KP-F는 생체 내에서 염증반응을 유발하지 않는 TLR4의 agonist로서 LPS와 같은 내독소에 의한 과면역반응을 효과적으로 제어할 수 있는 물질이라 평가된다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 중소기업청 중소기업융복합기술개발사업(S2389154)의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다.

References

- Bang SY, Park GY, Park SY, Kim JH, Lee YK, Lee SJ, Kim YH. 2010. The stem bark of *Kalopanax pictus* exhibits anti-inflammatory effect through heme oxygenase-1 induction and NF-κB suppression. *Immune Netw* 10:212-218
- Brinkhoff A, Sieberichs A, Engler H, Dolff S, Benson S, Korth J, Schedlowski M, Kribben A, Witzke O, Wilde B. 2018. Pro-inflammatory Th1 and Th17 cells are suppressed during human experimental endotoxemia whereas anti-inflammatory IL-10 producing T-cells are unaffected. *Front Immunol* 9:1133
- Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, Haefliger-Cavaillon N. 2002. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 4:915-926
- Cecilio CA, Costa EH, Ucelli P, Chaves CAA, Toffoli MC, Flores CA, Cunha FQ, Ferreira SH, Tamashiro WMSC. 1997. The neutrophil migration induced by tumour necrosis factor alpha in mice is unaffected by glucocorticoids. *Mediators Inflamm* 6:46-52
- Choi J, Huh K, Kim SH, Lee KT, Park HJ, Han YN. 2002. Antinociceptive and anti-rheumatoid effects of *Kalopanax pictus* extract and its saponin components in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 79:199-204
- Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C. 2009. Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 8:18-30
- Ding Y, Liu X, Bu L, Li H, Zhang S. 2012. Antimicrobial-immunomodulatory activities of zebrafish phosphitin-derived peptide Pt5. *Peptides* 37:309-313
- Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, Cody MJ, Michalek SM, Rice NR, Vogel SN. 2003. Induction of *in vitro* reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-κB signaling pathway components. *J Immunol* 170:508-519
- Howe LM. 2000. Novel agents in the therapy of endotoxic shock. *Expert Opin Invest Drugs* 9:1363-1372
- Jeong JJ, Jang SE, Joh EH, Han MJ, Kim DH. 2012. Kalopanaxsaponin B ameliorates TNBS-induced colitis in mice. *Biomol Ther (Seoul)* 20:457-462
- Jeong YH, Hyun JW, Kim Van Le T, Kim DH, Kim HS. 2013. Kalopanaxsaponin A exerts anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated microglia via inhibition of JNK and NF-κB/AP-1 pathways. *Biomol Ther* 21:332-337
- Joh EH, Jeong JJ, Kim DH. 2012. Kalopanaxsaponin B inhibits LPS-induced inflammation by inhibiting IRAK1 kinase. *Cell Immunol* 279:103-108
- Josephs MD, Bahjat FR, Fukuzuka K, Ksontini R, Solorzana CC,

- Edwards CK III, Tannahill CL, MacKay SLD, Copeland EM III, Moldawer LL. 2000. Lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced hepatic injury is mediated by TNF- α and not by Fas ligand. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R1196-R1201
- Kim SP, Park SO, Lee SJ, Nam SH, Friedman M. 2013. A polysaccharide isolated from the liquid culture of *Lentinus edodes* (Shiitake) mushroom mycelia containing black rice bran protects mice against a *Salmonella* lipopolysaccharide-induced endotoxemia. *J Agric Food Chem* 61:10987-10994
- Kim SP, Park SO, Lee SJ, Nam SH, Friedman M. 2014. A polysaccharide isolated from the liquid culture of *Lentinus edodes* (Shiitake) mushroom mycelia containing black rice bran protects mice against salmonellosis through upregulation of the Th1 immune reaction. *J Agric Food Chem* 62:2384-2391
- Kovacs-Nolan J, Kanatani H, Nakamura A, Ibuki M, Mine Y. 2013. β -1,4-mannobiose stimulates innate immune responses and induces TLR4-dependent activation of mouse macrophages but reduces severity of inflammation during endotoxemia in mice. *J Nutr* 143:3843-3891
- Kuznetsova TA, Besednova NN, Somova LM, Plekhova NG. 2014. Fucoidan extracted from *Fucus evanescens* prevents endotoxin-induced damage in a mouse model of endotoxemia. *Mar Drugs* 12:886-898
- Lee JH, Moon SY, Cho BY, Choi SI, Jung TD, Choi SH, Kim JD, Lee OH. 2017. Stability of ethanolic extract from fermented *Cirsium setidens* Nakai by bioconversion during different storing conditions. *Korean J Food Nutr* 30:388-394
- Matsunaga N, Tsuchimori N, Matsumoto T, Ii M. 2011. TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Mol Pharmacol* 79:34-41
- Miyazaki S, Ishikawa F, Fujikawa T, Nagata S, Yamaguchi K. 2004. Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide induces dynamic migration of Gr-1high polymorphonuclear neutrophils in the murine abdominal cavity. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:452-457
- Motobu M, Amer S, Koyama Y, Hikosaka K, Sameshima T, Yamada M, Nakamura K, Koge K, Kang CB, Hayasidani H, Hirota Y. 2006. Protective effects of sugar cane extract on endotoxic shock in mice. *Phytother Res* 20:359-363
- Moulin F, Copple BL, Ganey PE, Roth RA. 2001. Hepatic and extrahepatic factors critical for liver injury during lipopolysaccharide exposure. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G1423-G1431
- Murakami A, Gao G, Kim OK, Omura M, Yano M, ItoC, Furukawa H, Jiwajinda S, Koshimizu K, Ohigashi H. 1999. Identification of coumarins from the fruit of *Citrus hystrix* DC as inhibitors of nitric oxide generation in mouse macrophage RAW 264.7 cells. *J Agric Food Chem* 47:333-339
- Rahman MM, Kim HK, Kim SE, Kim MJ, Kim DH, Lee HS. 2018. Chondroprotective effects of a standardized extract (KBH-JP-040) from *Kalopanax pictus*, *Hericium erinaceus*, and *Astragalus membranaceus* in experimentally induced *in vitro* and *in vivo* osteoarthritis models. *Nutrients* 10:E356
- Sohn YA, Hwang SA, Lee SY, Hwang IY, Kim SW, Kim SY, Moon A, Lee YS, Kim YH, Kang KJ, Jeong CS. 2015. Protective effect of liriiodendrin isolated from *Kalopanax pictus* against gastric injury. *Biomol Ther (Seoul)* 23:53-59
- Takahashi K, Mizukami H, Kamata K, Inaba W, Kato N, Hibi C, Yagihashi S. 2012. Amelioration of acute kidney injury in lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory response syndrome by an aldose reductase inhibitor, fidarestat. *PLoS One* 7:e30134
- Triantafilou M, Triantafilou K. 2005. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res* 11:5-11
- Werners AH. 2017. Treatment of endotoxaemia and septicemia in the equine patient. *J Vet Pharmacol Ther* 40:1-15
- Yoon BR, Kim YH, Lee JS, Hong HD, Rhee YK, Cho CW, Kim YC, Lee OH. 2013. Protective effect of ferments of hot-water extract mixture from *Rhodiola sachalinensis* and red ginseng on oxidative stress-induced C2C12 myoblast. *Korean J Food Nutr* 26:485-491

Received 07 March, 2019

Revised 08 March, 2019

Accepted 17 March, 2019