

# Dextran Sulfate Sodium으로 유발된 대장염 모델에서 백목이버섯(*Tremella fuciformis*) 균사체 유래 다당류의 항염증효과

유 선 희<sup>\*,\*\*</sup> · †강 순 아<sup>\*\*\*,\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>호서대학교 벤처대학원 융합공학과 박사과정 학생, <sup>\*\*</sup>호서대학교 보건산업연구소 연구원,  
<sup>\*\*\*</sup>호서대학교 벤처대학원 융합공학과 교수, <sup>\*\*\*\*</sup>호서대학교 보건산업연구소 소장

## Anti-Inflammatory Effects of Polysaccharides Isolated from *Tremella fuciformis* Mycelium on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Model

Sun Hee Yoo<sup>\*\*\*</sup> and †Soon Ah Kang<sup>\*\*\*,\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Ph.D. Student, Dept. of Convergence Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

<sup>\*\*</sup>Researcher, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

<sup>\*\*\*</sup>Professor, Dept. of Convergence Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

<sup>\*\*\*\*</sup>Director, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

### Abstract

This study observed the anti-inflammatory effect of the polysaccharide derived from the mycelium of *Tremella fuciformis* in mice with colitis induced with dextran sulfate sodium (DSS). The experimental groups were normal, DSS, DSS-TFL50, DSS-TFH100, and sulfasalazine. Body weights, colon lengths, and organ weights were measured, and the plasma level of pro-inflammatory cytokine and mRNA and protein expression in colon tissue were analyzed. Body weight loss, a symptom of DSS-induced colitis, was suppressed by DSS-TF and the speed of weight recovery proceeded rapidly. In addition, DSS-TF showed a significant inhibitory effect on the decrease of colon length typically caused by colon damage. TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  cytokine levels in plasma were reduced in DSS-TF and positive control groups. TNF- $\alpha$ , COX-2 and IL-1 $\beta$  mRNA expression in colon tissue were inhibited in DSS-TF and positive control, and it was significantly different from that of the DSS group. The protein expression of inflammation-related genes (IL-6, TNF- $\alpha$  and COX-2) in the colon tissue was significantly increased by DSS compared to that of the normal group, but by DSS-TFL50, DSS-TFH100 and sulfasalazine decreased. In conclusion, the polysaccharide derived from the mycelium of *Tremella fuciformis* showed the anti-inflammatory effect on DSS-induced colitis in mice.

Key words: anti-inflammatory effect, polysaccharides, *Tremella fuciformis*, DSS-induced colitis

### 서 론

식생활 형태의 다양성 및 의학 발달에 의한 평균수명이 연장되고, 문명의 발달에 의한 운동부족 현상이 가속화하면서 생활습관병 혹은 만성 퇴행성 질환이 증가하게 되었다. 특히, 염증반응은 필수적인 선천면역 생체방어 기능이지만, 다양한 생활습관병 질환의 요인으로 작용하고 있다. 최근 고령화 현상, 환경오염, 황사, 미세먼지 등 다양한 유해환경

의 증가에 따라 염증 발생 위험도가 증가하면서 효과적인 염증반응 제어 소재의 요구도가 높아지고 있다. 식물 유래의 프리바이오틱스 소재를 제외한 유용한 다당체는 유산균, 버섯, 효모가 생산한다고 연구되어 있으며(Turnbaugh 등 2006; Liu 등 2018) 특히, 면역증강 소재로써 다양한 다당류(exopolysaccharide)를 생산하여 건강기능성식품, 의약품, 화장품, 바이러스 감염 예방제 등 다양한 바이오제품 개발에 소재로 활용될 것으로 전망하고 있다.

† Corresponding author: Soon Ah Kang, Professor, Dept. of Convergence Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea. Tel: +82-2-2059-2353, Fax: +82-2-2059-1405, E-mail: sakang@hoseo.edu

천연 약용자원 중 버섯은 향과 맛이 풍부하고, 다양한 영양성분과 생체조절물질을 함유하고 있어서 식용 및 의약용으로 널리 이용되고 있다(Kim & Kim 1997; Oh 등 2006). 특히, 버섯의 다양한 생리활성 효과 즉, 항암, 면역 활성화, 콜레스테롤 감소, 항혈전효과, 항고혈압 등에 관한 연구가 보고되는데 약리학적 물질은 버섯 균사체 혹은 자실체 유래 다당류로 밝혀졌다(Oh 등 2006). 표고버섯의 자실체 유래 lentinan 다당류의 Sarcoma 180 종양세포에 대한 강한 항암 효과(Chihara 등 1970), 영지버섯 균사체 유래 다당체의 항암작용 및 면역능 증가효과(Kim & Kim 1997; Kim SW 1998a; Kim SW 1998b), 노루궁뎅이(*Hericium erinaceus*) 자실체에서 추출한 조다당류의 면역증진 및 항암효과(Choi 등 2010), 상지배양 상황버섯 균사체 유래 다당류의 면역증가 효과(Park & Hong 2017) 등 많은 연구가 진행되고 있었다.

백목이 혹은 흰목이(*Tremella fuciformis* Berk.)는 한국, 중국, 일본, 인도 등 전 세계에 분포되어있으며 봄에서 가을에 걸쳐서 고사목이나 활엽수의 마른 가지 또는 줄기 위에 서식하는 담자균류이며 하얀색의 수국꽃모양으로 자란다(Cheng 등 2003). 백목이는 중국에서는 귀한 식용버섯으로 면역 활성화, 항암, 항노화, 기관지염, 변비, 항고혈압, 항동맥경화 등 다양한 효능을 가진 버섯으로 알려져 많이 복용하고 있다(Park & Lee 1999; Oh 등 2006; Liu 등 2018). 그러나, 자연산 버섯은 수급의 어려움이 있어서 원목을 활용하여 인공재배를 많이 하고 있는데 자실체를 이용한 인공재배는 수년간의 시간이 소요되므로 대중화를 위하여 균사체를 이용한 버섯의 기능성 연구가 다양하게 진행되고 있다(Park & Hong 2017; Ge 등 2020).

흰목이버섯의 재배방법은 공생균을 활용하는 일부 국내 농가에서 재배를 하지만 특수한 재배공정기술이 필요하므로 낮은 생산량과 재배기술의 불안정으로, 안정적인 대량생산 기술을 필요로 하는 균사의 최적의 배양조건에 관한 연구가 미생물공학분야에서 연구되어지고 있다(Lee 등 2019). 유용성분 추출과정에서 자실체에서는 끓는 물에서 장시간 추출을 요하는데 반하여 균사체는 다량의 단백다당체 성분(excopolysaccharide)을 얻을 수 있어서 버섯 균사체 생산방법에 관한 연구가 활발하게 진행되면서 Lee 등(2012)은 상황버섯 균사체 대량생산공정을 확립하여 추출물의 면역활성 증진효과에 대하여 발표하였다. 또한 흰목이버섯 다당류의 *in vitro* 실험으로 항산화(Zhang 등 2014; Ge 등 2020) 및 항암활성(Bin C 2010) 효과가 있으나 백목이버섯 균사체 유래 다당류의 대장염 동물모델에서 항염증효과에 대한 연구는 거의 없다. 따라서 본 연구는 Dextran Sulfate Sodium (DSS)로 유도한 대장염 동물모델에서 백목이버섯 균사체 유래 다당류를 섭취시킨 후 마우스의 항염증효과를 보고자

하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 준비 및 군 구성

동물 실험에 사용된 마우스는 20±2 g 체중의 6주령 C57BL/6로 오리엔트바이오(Orient Bio, Seong-nam, Korea)에서 분양받아 실험하였다. 사료는 AIN-93G를 공급하였으며, 온도는 23±2°C, 상대습도 55±5%, 12시간 주기로 light-dark cycle이 유지되는 조건(micro ventilation cage system)하에서 사육하였다. 분양 후 1주일 동안 적응 기간을 부여한 후, 체중을 측정하여 각 군을 정상군(Normal), DSS로 대장염을 유도한 대조군(DSS), DSS로 대장염을 유도하고 *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류를 50 mg/kg의 농도로 경구 투여하여 섭취한 실험군(Low dose, DSS-TFL 50), DSS로 대장염을 유도하고 *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류를 100 mg/kg의 농도로 경구 투여하여 섭취한 실험군(High dose, DSS-TFH 100), DSS로 대장염을 유도하고 Sulfasalazine를 500 mg/kg의 농도로 경구 투여하여 섭취한 실험군(positive control)으로 분류하였다.

실험에 사용된 *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당체는 500 L 유가식 배양을 통해 생산하였다. 유가식 배양은 변형 MCM 배지(glucose 20 g/L, CSL 10 g/L MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.46 g/L)를 사용하였으며, 30 L 변형된 MCM 배지가 포함된 50 L 교반형 배양기(KoBioTech Co., Incheon, Korea)에서 24시간 전 배양 하였다. 이후 500 L 교반형 배양기(KoBioTech Co., Incheon, Korea)에서 96시간 배양 하였다. 최종 정제농축액을 50 kg 동결건조기 (IlshinBioBase Co., Dongducheon, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 96시간 동결건조 후 다당체를 회수한 시료는 한국생명공학연구원에서 제공하여 본 연구에 사용하였다. 본 동물실험을 수행하기 전 차의과대학교 동물실험윤리위원회(승인번호: IACUC 200098)에서 승인을 받아 진행하였다.

### 2. 대장염 유도 및 시료 투여

대장염 유도는 증류수에 dextran sulfate sodium(DSS: M.W. 36,000~50,000, Reagent grade, MP Biomedicals, LLC, Illkirch, France)을 2%로 희석하여, 7일 동안 자유 음용수로 섭취하게 하여 대장염을 유도하였다(Park EJ 2014). 정상군은 PBS만 공급하였다. 시료인 *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류를 저농도(50 mg/kg b.w.), 고농도(100 mg/kg b.w.), positive control인 sulfasalazine(Drug, 500 mg/kg b.w.)을 PBS에 희석하여 경구 투여로 섭취시켰다. 실험은 총 4주간 진행되었으며 실험 시작 4주 후 부검하였다.

### 3. 실험동물의 체중, 대장길이 및 장기무게측정

실험동물을 입수 시, 순화기간 중 주 1 회 및 군 분리 후 2일에 한 번씩 개체별로 체중을 측정하였다. 특히 실험기간 중 체중측정은 매회 측정 시 오차범위를 최소화하기 위하여 오전 10시 전후로 동일한 시간대를 정하여 동일한 저울로 측정하였다. DSS로 유발한 대장염 동물모델의 병변 즉 설사 혹은 혈변을 관찰하였다. 실험 종료 후 각 군의 동물을 희생하여 항문으로부터 대장이 끝나는 지점까지 적출하여 무게와 길이를 측정하였다. 대장의 길이를 자로 재어 측정하여 대장 길이가 짧을수록 대장염이 유발된 것으로 보았다. 대장, 신장, 정소, 간과 비장의 무게를 측정하였다. 채취한 혈액을 원심분리(3,950×g, 15 min)한 후, 혈청을 채취하고 각각 -70℃에 보관하여 분석에 이용하였다.

### 4. 마우스 혈청 내 사이토카인 함량 측정

마우스 희생 후 안와정맥에서 혈액을 채취하고, 이를 3,950×g로 원심분리를 10분간 하였다. 원심분리된 혈액의 상층액 즉 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다. 채취된 혈청은 TNF- $\alpha$ , IL-6와 IL-1 $\beta$ 의 함량을 확인하고자 하였으며, 효소면역측정법 ELISA kits(BioLegend, San Diego, CA, USA)를 이용하였다(Lui FF 2015). 본 실험은 제조사에서 제공된 실험방법에 따라 수행하였다. TMB substrate solution 이 함유된 기질액 100  $\mu$ L 일정량을 접종하여 20분 동안 실온에서 방치한 후 100  $\mu$ L stop solution을 처리하여 반응을 종결시켰고, Optical density는 Wallac Victor3 1420 Multilabel Counter(Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA)로 450 nm에서 측정하였다.

### 5. RT-qPCR을 이용한 조직 내 mRNA 발현 측정

각 군 마우스의 대장조직 1 cm를 취해 trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 세포로부터 RNA를 분리하였고, 0.1% diethyl-pyrocabonate(DEPC)에 용해시켰다. 용해된 총 RNA는 NanoDrop ND-1000(NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA)를 사용하여 정량하였고, superscript II reverse transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 Thermal Cycler BioRad CFX-96 Real Time System(BioRad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 유전자 발현을 분석하였다(Jeong JK 2012).

### 6. Western blot을 이용한 조직 내 단백질 발현 측정

각 군 마우스의 대장조직 1cm를 취해 1 mL radio-immunoprecipitation assay(RIPA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) buffer을 이용하여 균질화하고 4℃에서 5분 동안 17,100×g

로 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질은 Bradford assay 방법을 이용하여 단백질의 농도를 정량하였다(Bradford MM 1976). 추출된 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하고 polyvinylidene fluoride(PVDF, Bio-Rad) membrane으로 이동시킨 후, PBS-T를 함유한 5% skim milk로 비 특이적인 단백질을 blocking하였다. TNF- $\alpha$ , IL-6, COX-2 및  $\alpha$ -TUBULIN(Santa Cruz, Dallas, TX, USA) 1차 항체를 사용하였고, 각각에 맞는 2차 항체를 사용한 후 LAS-4000(Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)을 이용하여 확인하였다.

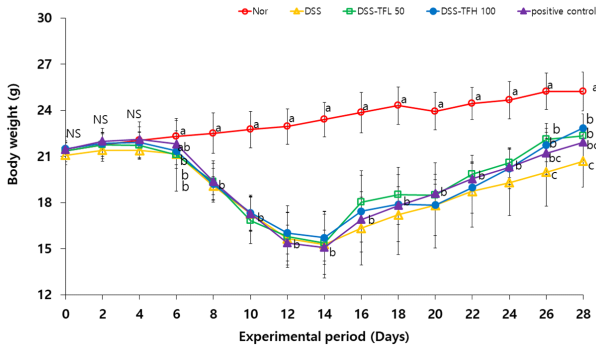
### 7. 통계 처리

RT-qPCR 데이터는 평균±표준오차(standard error, SE)로 나타내었고, 이를 제외한 모든 실험의 데이터는 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타냈다. One-way analysis of variance(ANOVA) 방법을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 각 군(n=10)간의 유의성을 검증하였다.  $p < 0.05$  이하일 때 유의성이 있다고 간주하였다. SPSS 18 statistical software package(SPSS Inc., Westlands, Hong Kong)를 이용하여 모든 실험을 통계분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 체중의 변화

실험을 시작할 시점의 마우스 군간의 체중은 비슷한 체중의 범위(21.3±0.5 g)에서 유의적으로 차이를 보이지 않았고, DSS를 처리하고 첫 주 동안 마우스의 체중은 크게 변하지 않았다. 그러나 DSS를 처리하고 7일째부터 체중은 급격히 감소하였는데 저농도(DSS-TFL 50)와 고농도 *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류(DSS-TFH 100)를 먹인 군은 다른 군에 비해 체중 감소 속도가 느렸다. 14일째부터 실험종료일까지 저농도와 고농도 *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류를 먹인 군을 다른 군과 비교하면 DDS군에 비해 고농도의 *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류(DSS-TFH 100)를 먹인 군이 체중 회복 속도가 빨랐으며, 이는 sulfasalazine (positive control)과 비슷한 결과를 보였다(Fig. 1). 실험 종료일에 마우스의 체중을 관찰한 결과 normal군은 25.2±1.2 g으로 가장 높은 수치를 나타내었고, DSS군은 20.6±1.6 g으로 normal군과 비교하여 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 그러나 DSS-TFL 50군은 22.3±1.0 g, DSS-TFH 100군은 22.8±0.9 g으로 DSS군보다 유의하게 회복한 것을 볼 수 있었고 positive control군은 21.9±1.1 g으로 DSS군보다 유의하지는 않았지만 회복하는 것을 볼 수 있었다. DSS로 대장염을 유도한 마우스에게 죽염과 *Lactobacillus plantarum*을



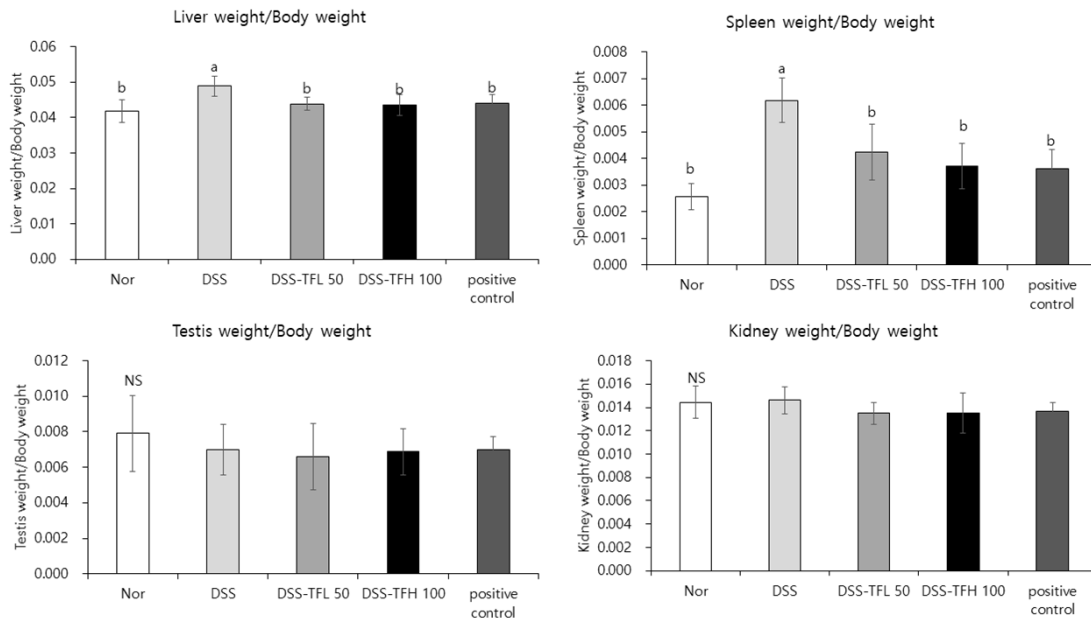
**Fig. 1. Effects of *Tremella fuciformis* on the change of body weight in C57BL/6 mice with DSS-induced colitis.** Nor: Normal diet, DSS: DSS+Normal diet, DSS-TFL 50: DSS+50 mg/kg b.w. *Tremella fuciformis*, DSS-TFH 100: DSS+*Tremella fuciformis* 100 mg/kg b.w., positive control: DSS+500 mg/kg b.w. Sulfasalazine. <sup>a-c</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range tests. <sup>NS</sup>Not significantly different.

접종한 메주로 만든 고추장을 섭취한 결과 DSS에 의하여 체중의 급격한 감소를 고추장의 섭취에 의하여 회복하는 것을 보였다(Park 등 2017a). 또한 감초 추출물의 항염증효과(Lee & Rhee 2010), 김치로부터 분리한 *Lactobacillus paracasei*

LS2 투여에 의하여 DSS에 의한 대장염에 의한 체중 손실을 감소시키는 결과(Park 등 2017b)를 보임으로써 본 연구와 흡사한 양상을 보였다.

**2. 장기무게의 변화**

실험동물을 실험 4주 후에 희생시키고 신장, 고환, 간 및 비장을 제거한 후, 그 중량을 비교한 결과는 조직 중량/체중의 비율로 나타내었다(Fig. 2). 신장과 고환의 무게는 실험군 간에 유의적인 차이가 없었으므로 대장염 모델 유도에 의한 장기 이상은 문제가 없음을 나타낸다. 그러나 간과 비장에서 독성으로 인해 염증과 부종이 생겨 조직 크기가 다소 커졌다. 마우스의 간의 무게를 체중 당 관찰한 결과 DSS군은  $0.049 \pm 0.002$  g, normal군은  $0.041 \pm 0.003$ 으로 DSS군에서 간의 체중 당 무게가 증가함을 볼 수 있었다( $p < 0.05$ ). 그러나 DSS-TFL 50군은  $0.044 \pm 0.001$  g, DSS-TFH 100군은  $0.043 \pm 0.002$  g, positive control군은  $0.044 \pm 0.002$  g으로 DSS군보다 유의하게 회복한 것을 확인할 수 있었다( $p < 0.05$ ). 결론적으로 DSS군은 Nor군보다 간 및 비장 무게가 유의하게 높았으며 DSS-TFL 50, DSS-TFH 100 및 positive control 그룹의 무게는 정상과 비슷해졌다( $p < 0.05$ ). 따라서 *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류와 sulfasalazine 섭취군은 DSS군에 비해 독성과 염증 수준이 완화되었다고 할 수 있다.



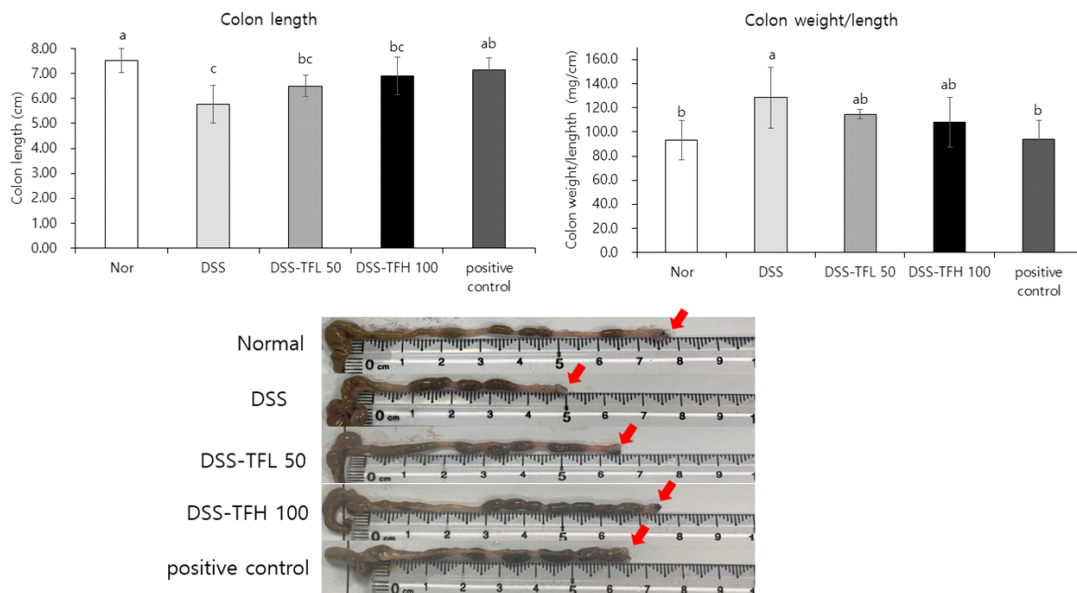
**Fig. 2. Effects of *Tremella fuciformis* on the tissue weight per body weight in C57BL/6 mice with DSS-induced colitis.** Nor: Normal diet, DSS: DSS+Normal diet, DSS-TFL 50: DSS+50 mg/kg b.w. *Tremella fuciformis*, DSS-TFH 100: DSS+*Tremella fuciformis* 100 mg/kg b.w., positive control: DSS+500 mg/kg b.w. Sulfasalazine. <sup>a,b</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range tests. <sup>NS</sup>Not significantly different.

### 3. 대장길이 및 대장무게/길이 비율

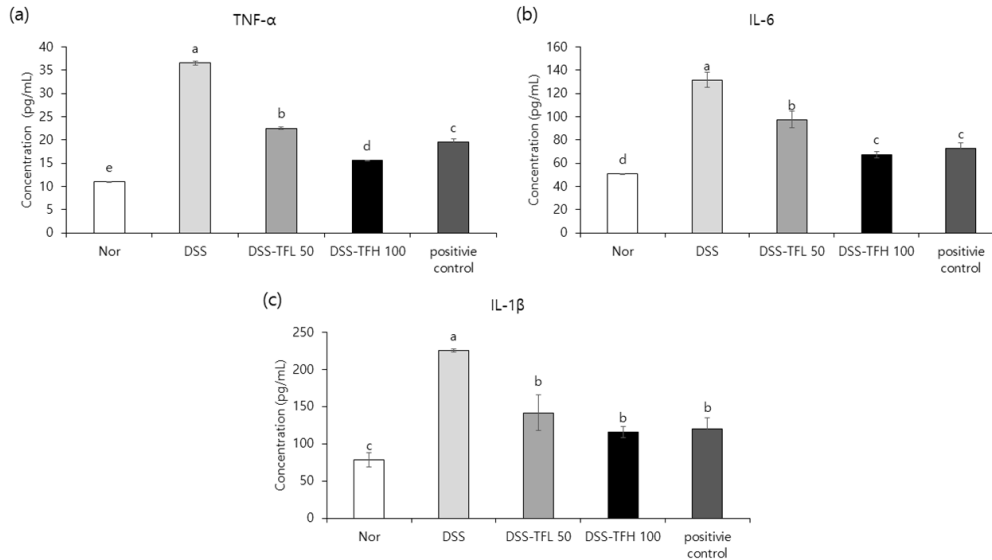
DSS에 의해 대장의 손상은 체중 감소, 대장의 출혈 및 팽창, 대장 길이 감소를 유발하며 혈변 및 마우스의 설사를 유발할 수 있다. DSS로 염증을 유도한 DSS군( $5.78 \pm 0.75$  cm)은 normal군( $7.53 \pm 0.48$  cm)에 비하여 대장 길이가 통계적으로 유의적으로 짧아져서( $p < 0.05$ ) DSS로 대장염이 유도된 것을 확인하였다. 하지만 저용량군(DSS-TFL 50,  $6.50 \pm 0.44$  cm)과 고용량군(DSS-TFH 100,  $6.90 \pm 0.74$  cm)의 *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류를 섭취한 군은 DSS군에 비해 대장의 길이가 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 이는 *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류가 DSS로 인한 대장의 손상을 효과적으로 완화시켜 대장의 길이가 줄어드는 것을 방지하였다고 사료된다(Fig. 3). Park 등(2017a)의 연구에 의하면 고추장을 투여한 군은 고추장에 첨가된 *Bacillus subtilis*와 *Lactobacillus plantarum*에 의해 대장의 길이 감소를 억제하여 장에서 영양소의 섭취율을 증가시키고, 장점막세포의 증식을 촉진하여 DSS군에 비해 체중이 증가하였다고 보고하였다. Lee JH(2010) 연구에 의하면 Lactic acid bacteria에 의하여 DSS로 유도된 대장염 마우스의 부종, 점막세포 파괴 감소, 대장길이 감소억제 현상을 관찰하였다. 백강잠(*Bombycis corpus*)의 대장염 억제효과(Lee GH 2018), 청일 품종 뽕나무추출물의 궤양성대장염 유발로 인한 대장길이 감소에 유의한 회복효과를 나타냈다(Lee KT 2011).

### 4. 마우스 혈청 내 사이토카인 함량 변화

염증성 사이토카인을 크게 증가시킬 수 있는 DSS 투여로 유도된 대장염 모델에서 세포의 pro-inflammatory 인자인 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 양의 변화를 분석한 결과는 Fig. 4에 나타났다. *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류를 투여한 마우스의 혈청 pro-inflammatory 인자의 양이 감소하였다. *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류는 DSS 용액을 처리한 후 마우스에서 염증을 억제하고, 신체에서 염증 인자의 발현 및 축적을 완화시켰으므로, 염증 완화의 효과를 줄 수 있을 것이라고 생각된다(Fig. 4). 혈청에서 TNF- $\alpha$  농도는 DSS군은  $36.6 \pm 0.4$  pg/mL, normal군은  $11.0 \pm 0.1$  pg/mL로 DSS군에서 유의하게 높게 나타났다( $p < 0.05$ ). 그러나 DSS-TFL 50군은  $22.5 \pm 0.2$  pg/mL, DSS-TFH 100군은  $15.6 \pm 0.1$  pg/mL, positive control군은  $19.5 \pm 0.6$  pg/mL로 DSS군보다 유의하게 낮은 값을 나타내어( $p < 0.05$ ) 백목이버섯 균사체유래 다당류 투여에 의하여염증반응을 억제하는 것으로 나타났다. 혈청에서 IL-6 농도는 DSS군은  $131.5 \pm 6.6$  pg/mL, normal 군은  $51.0 \pm 0.1$  pg/mL로 DSS군에서 유의하게 높았고( $p < 0.05$ ), DSS-TFL 50군은  $97.5 \pm 7.2$  pg/mL, DSS-TFH 100군은  $67.5 \pm 2.7$  pg/mL, positive control 군은  $72.5 \pm 4.8$  pg/mL로 DSS군보다 유의하게 낮은 값을 나타내어( $p < 0.05$ ) TNF- $\alpha$  농도와 비슷한 결과를 보였다. Park 등(2017a)의 연구에서 종균과 죽염을 접종한 메주로 담은 고추장이



**Fig. 3.** Effects of *Tremella fuciformis* on the colon length, colon weight/length ratio in C57BL/6 mice with DSS-induced colitis. Nor: Normal diet, DSS: DSS+Normal diet, DSS-TFL 50: DSS+50 mg/kg b.w. *Tremella fuciformis*, DSS-TFH 100: DSS+ *Tremella fuciformis* 100 mg/kg b.w., positive control: DSS+500 mg/kg b.w. Suflasalazine. <sup>a-c</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range tests.



**Fig. 4.** Effects of *Tremella fuciformis* on serum cytokine levels of TNF- $\alpha$  (a), IL-6 (b) and IL-1 $\beta$  (c) in C57BL/6 mice with DSS-induced colitis. Nor: Normal diet, DSS: DSS+Normal diet, DSS-TFL 50: DSS+50 mg/kg b.w. *Tremella fuciformis*, DSS-TFH 100: DSS+ *Tremella fuciformis* 100 mg/kg b.w., positive control: DSS+500 mg/kg b.w. Sulfasalazine. <sup>a-d</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range tests.

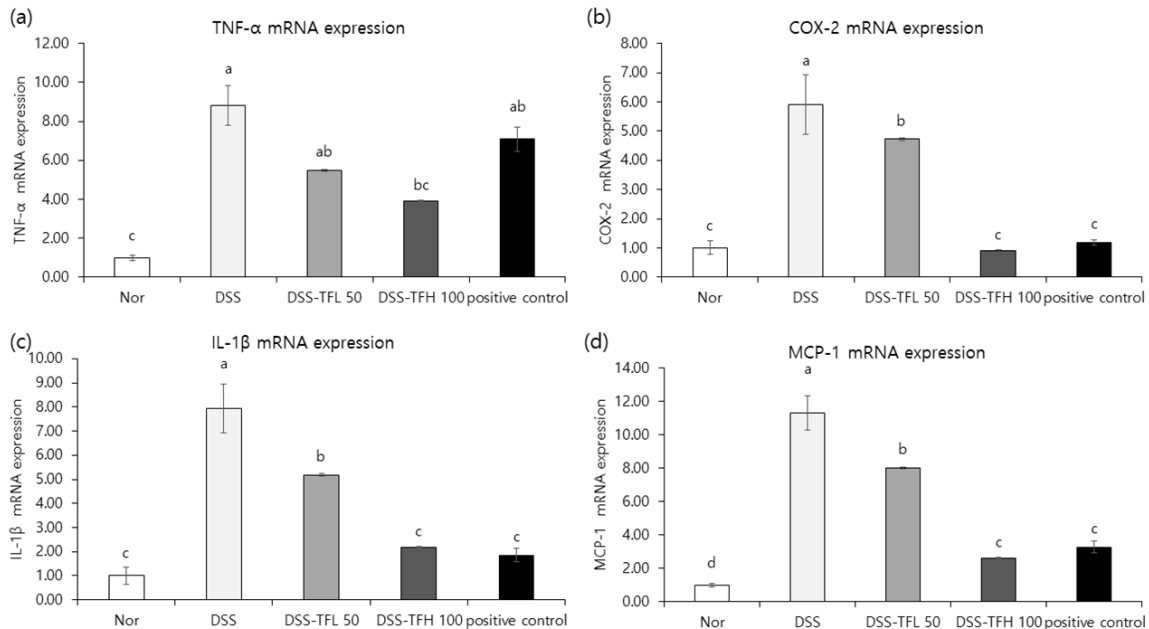
유의적으로 낮은 IL-6 값을 보이면서 항염증효과를 보였다 ( $p < 0.05$ ). 또한, DSS로 궤양성 대장염을 유발시킨 ICR 마우스에서 식방풍 잎(*Peucedanum japonicum* Thunberg Leaf) 추출물에 의한 궤양성 대장염에 미치는 효과에서 체중감소 완화효과, 대장조직 개선효과, 혈중내 염증성 사이토카인 감소, 대장조직 내 염증성 사이토카인 mRNA 발현 억제효과를 보였다(Jung 등 2014). DSS 유도 궤양성 염증성대장질환에서 뽕잎 추출물의 염증반응들을 억제시켰고 lipopolysaccharide와 마우스의 복강대식세포로부터 nitrite IL-8 생성을 억제하였다(Kim YJ 2012). 흰목이 자실체 추출 다당류는 Sarcoma 180 복수암 유도 쥐에서 수명연장효과 및 B림파구의 alkaline phosphatase 활성을 증가시키면서 백혈구수도 증가시키면서 면역을 활성화시키면서 항암효과를 보였다(Oh 등 2006). 백목이버섯 균사체 유래 다당류의 동물실험으로 면역효과에 관한 유사 연구는 없었으나 다양한 종류의 버섯 추출물로 세포실험에서 면역활성이 있었음을 보였다. 이러한 결과들은 앞으로 궤양성대장염 개선 또는 치료제로서의 활용가능성을 제시한다.

##### 5. RT-qPCR을 이용한 대장 조직 내 mRNA 발현 측정

대장조직의 전염증성 사이토카인의 mRNA 발현 결과는 Fig. 5에 보여주듯이 DSS는 마우스 대장에 염증을 일으키며, TNF- $\alpha$ , COX-2 및 IL-1 $\beta$ 와 같은 염증 유발 인자들은 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 대식세포 매개 염증반응이

시작되면서 TNF- $\alpha$ 는 장 상피세포를 자극하면서 IL-8 혹은 MCP-1과 같은 chemokine의 분비를 유도하게 되는데, MCP-1은 염증반응을 증폭시키므로 염증성 대장 조직에서 발현이 현저히 증가하는 대장염의 특징적인 지표이다(Kaser & Tilg 2008; Cader & Kaser 2013). 본 연구에서 DSS군의 MCP-1mRNA 발현 수준은 정상군의 MCP-1보다 11배 유의하게 높았고( $p < 0.05$ ), DSS-TFL 50, DSS-TFH 100 및 sulfasalazine 처리군은 DSS군에 비하여 유의하게 낮은 MCP-1의 발현량을 관찰 할 수 있었다. 또한 TNF- $\alpha$ , COX-2 및 IL-1 $\beta$  염증 유발 인자들의 발현 수준은 DSS군에 비하여 DSS-TFL 50, DSS-TFH 100 및 sulfasalazine 처리군은 유의하게 낮은 발현 양을 관찰 할 수 있었다( $p < 0.05$ ). 이 결과는 *Tremella fuciformis* 균사체유래 다당류가 대장 조직의 염증을 완화시킬 수 있음을 확인하였다(Fig. 5).

염증성장질환 모델에서 쇠뜨기(*Equisetum Arvense*)의 수용성 추출물은 MCP-1 chemokine 분비를 유의하게 억제하였고 대식세포활성의 지표인 염증성 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 cytokine의 생성을 유의하게 감소시켰다(Lee SM 2019). 영지버섯 균사체 유래 다당류의 반응질소 대사산물의 생성이 증가하는 기전은 calcium channel blocking 과 c-AMP의 증가시에 증가시킴을 확인하였다(Kim SW 1998b). 노루궁뎅이 자실체 유래 조다당류 추출물이 B 림파구 alkaline phosphatase 활성을 증가시키면서 백혈구 수를 증가시키며 면역을 증강시키는 효과가 있음이 보고되었다(Choi 등 2010). 또한, 상



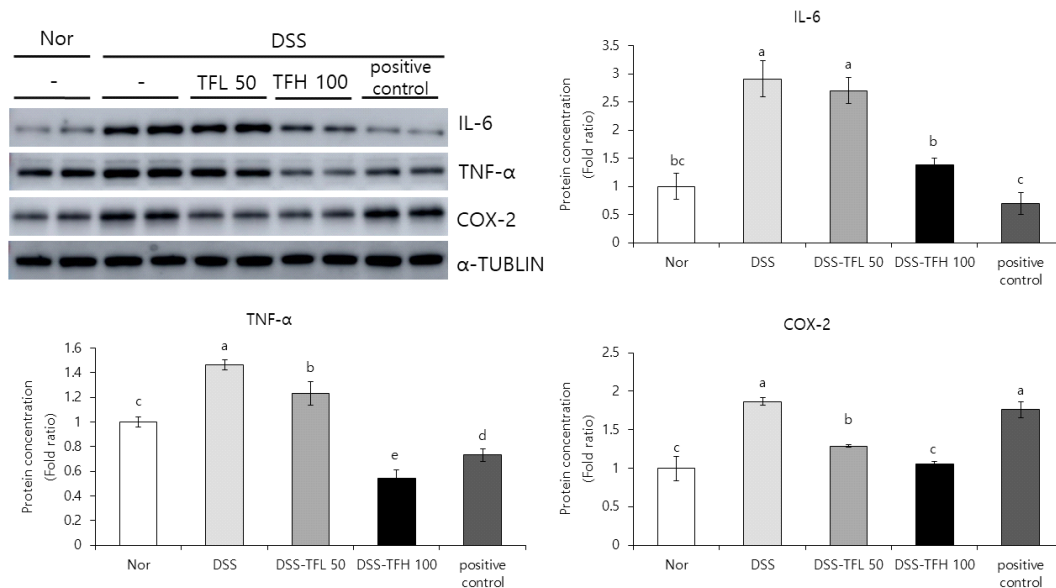
**Fig. 5. Effects of *Tremella fuciformis* on mRNA expression levels of TNF- $\alpha$  (a), COX-2 (b), IL-1 $\beta$ (c) and MCP-1(d) in C57BL/6 mice with DSS-induced colitis.** Nor: Normal diet, DSS: DSS+Normal diet, DSS-TFL 50: DSS+50 mg/kg b.w. *Tremella fuciformis*, DSS-TFH 100: DSS+ *Tremella fuciformis* 100 mg/kg b.w., positive control: DSS+500 mg/kg b.w. Sulfasalazine. <sup>a-d</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range tests.

황버섯 균사체 유래 다당류의 NO 생성량이 LPS 처리군에 비하여 유의하게 감소함을 보였고, TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 생성량이 높게 나타나면서 면역증강 효과가 있음이 보고되었다 (Park & Hong 2017). 이와 같이 다양한 버섯 균사체 혹은 자실체 추출 다당류의 면역증강 효능을 보여준 결과와 비슷한 결과를 보였으나 본 연구에서는 백목이버섯 균사체 유래 다당류의 항염증효과가 면역증강효과를 보이는 것으로 사료된다.

**6. Western blot을 이용한 대장 조직 내 단백질 발현 측정**  
대장조직 내의 염증관련 유전자의 단백질 발현을 본 결과가 DSS로 유도된 대장염 대장 조직에서의 IL-6, TNF- $\alpha$  및 COX-2의 단백질 발현이 정상군에 비하여 유의하게 높아졌으나, *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류 및 Sulfasalazine을 투여한 마우스에서, 대장조직의 IL-6, TNF- $\alpha$  및 COX-2의 단백질 발현이 통계적으로 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ) (Fig. 6). 이러한 결과는 대장 조직에서 관련 유전자들의 mRNA의 발현 현상과 비슷하게 나타나, 전사 수준 및 단백질 발현 수준이 비슷한 결과를 나타내었다. 즉, *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류의 처리는 염증을 일으킨 대장 조직에서 염증 관련 유전자들이 mRNA 및 이들의 단백질 발현을 낮추는 결과를 보여 염증 발생을 억제함을 확인할

수 있었다. DSS 유도된 대장염 모델에서 백강잠(*Bombycis corpus*)처리에 의하여 대식세포의 염증 촉진제를 억제하는 역할을 하면서 염증성 반응을 억제하며 산화적 스트레스를 완화해주는 역할을 한다고 보고하였다(Lee GH 2018). Lee JH(2010) 연구에 의하면 Lactic acid bacteria에 의하여 DSS로 유도된 대장염 마우스의 부종, 점막세포 파괴 감소, 대장 길이 감소억제 현상 및 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 COX-2 발현에 억제효과가 있음이 보고되었다. 대장염모델에서의 다양한 소재의 면역증진효과를 보는 관점에서 대장염 모델에서의 버섯의 종류, 균사체 혹은 자실체에 의하여 효능은 본 연구와 비슷한 결과를 보였다.

버섯 균사체 생산방법에 관한 연구가 활발하게 진행되면서 Lee 등(2012)은 상황버섯 균사체 대량생산공정을 확립하여 추출물의 면역활성 증진효과에 대하여 발표하였다. 그러나 백목이버섯 균사체 유래 다당류의 대장염 모델에서 항염증 효과에 대한 연구는 거의 없었다. 본 연구의 시료인 백목이버섯 균사체는 다량의 단백다당체 성분(excopolysaccharide)을 얻을 수 있어서 Dextran Sulfate Sodium(DSS)로 유도된 대장염모델에서 백목이버섯 균사체 유래 다당류를 투여 후 항염증 효과를 확인하면서 대장염 예방 및 진행과정을 억제할 수 있음을 확인하면서 면역증진 기능성식품 소재로 개발할 수 있으리라 기대해본다.



**Fig. 6.** Effects of *Tremella fuciformis* on protein expression levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , and COX-2 in C57BL/6 mice with DSS-induced colitis. Nor: Normal diet, DSS: DSS+Normal diet, DSS-TFL 50: DSS+50 mg/kg b.w. *Tremella fuciformis*, DSS-TFH 100: DSS+ *Tremella fuciformis* 100 mg/kg b.w., positive control: DSS+500 mg/kg b.w. Sulfasalazine. <sup>a-d</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range tests.

## 요약 및 결론

본 연구의 목적은 DSS로 유도된 대장염 동물모델에서 백목이버섯(*Tremella fuciformis*) 균사체 유래 다당류(DSS-TF)의 항염증효과를 관찰하고자 하였다. 실험군은 정상군, DSS군, *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류 저농도(DSS-TFL 50; 50 mg/kg), 고농도(DSS-TFH100; 100 mg/kg), sulfasalazine (positive control, 500 mg/kg)군으로 총 4주간 진행하였다. 체중, 대장 길이, 장기무게를 측정하였고 전염증성인자의 함량과 대장조직에서 mRNA 발현과 단백질발현을 분석하였다. 실험 결과는 DSS로 유도된 대장염증상인 체중감소는 DSS-TF 섭취에 의하여 억제되면서 체중회복 속도가 빠르게 진행되었다. 또한 대장 손상에 의한 대장 길이의 감소현상을 DSS-TF에 의하여 억제효과가 유의하게 나타났다. DSS 투여로 유도된 대장염 모델에서 혈청 내 전염증성인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6의 양이 증가하였으나 DSS-TFL50과 DSS-TFH100에 의하여 감소함을 확인하였다. DSS는 마우스 대장에 염증을 일으키며, TNF- $\alpha$ , COX-2 및 IL-1 $\beta$ 와 같은 염증 유발 인자들의 발현이 유의적으로 증가하였으나 DSS군에 비하여 DSS-TFL 50, DSS-TFH 100 및 Sulfasalazine 처리군은 유의하게 낮은 발현 양을 관찰하면서 *Tremella fuciformis* 균사체유래 다당류가 대장 조직의 염증을 완화시킴을 확인하였다. 대장조직 내의 염증관련 유전자의 단백질 발

현(IL-6, TNF- $\alpha$  및 COX-2)은 DSS군이 정상군에 비하여 유의하게 높아졌으나, DSS-TFL50, DSS-TFH100 및 Sulfasalazine에 의하여 유의하게 감소하였다. 즉, *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류의 처리는 염증을 일으킨 대장 조직에서 염증 관련 유전자들이 mRNA 및 이들의 단백질 발현을 낮추는 결과를 보여 염증 발생을 억제함을 확인 할 수 있었다. *Tremella fuciformis* 균사체 유래 다당류에 의하여 DSS로 유도된 대장염 마우스의 체중감소, 대장길이 감소억제 현상 및 염증 관련 유전자들의 mRNA 및 단백질 발현을 낮추는 결과를 보여 염증 발생을 억제함을 확인 할 수 있었다. 결론적으로 DSS로 유도된 대장염 모델에서 백목이버섯 균사체 유래 다당류의 항염증효과를 확인하였고 대장염 예방 및 진행과정을 억제할 수 있는 항염증 기능성식품 소재로 개발할 수 있으리라 기대해본다.

## 감사의 글

This work was supported by the KRIBB Research Initiative Program (KGM5482113).

## References

Bin C. 2010. Optimization of extraction of *Tremella fuciformis*



- polysaccharides and its antioxidant and antitumour activities *in vitro*. *Carbohydr Polym* 81:420-424
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Cader MZ, Kaser A. 2013. Recent advances in inflammatory bowel disease: Mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut* 62:1653-1664
- Cheng HH, Hou WC, Lu ML. 2003. Interactions of lipid metabolism and intestinal physiology with *Tremella fuciformis* Berk edible mushroom in rats fed a high-cholesterol diet with or without Nebacitin. *J Agric Food Chem* 50:7438-7443
- Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka F. 1970. Antitumour polysaccharide derived chemically from natural glucan (Pachyman). *Nature* 225:943-944
- Choi YI, Lee JS, Lee UY, Lee TS. 2010. Immunostimulating and antitumor effects on mouse sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Hericium erinaceus*. *J Life Sci* 20:623-631
- Ge X, Huang W, Xu X, Lei P, Sun D, Xu H, Li S. 2020. Production, structure, and bioactivity of polysaccharide isolated from *Tremella fuciformis* XY. *Int J Biol Macromol* 148:173-181
- Jeong JK. 2012. Improvement of quality and probiotic effect of Meju and Doenjang prepared with mixed starter cultures. Ph.D. Thesis, Pusan National Univ. Busan. Korea
- Jung HK, Jung WS, Ahn BK, Kang BM, Yeo JH, Cha SW, Park CG, Cho HW. 2014. *Peucedanum japonicum* Thunberg leaf alleviates the symptoms of dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in mice. *Korean J Plant Resour* 27:421-428
- Kaser A, Tilg H. 2008. Novel therapeutic targets in the treatment of IBD. *Expert Opin Ther Targets* 12:553-563
- Kim SW, Kim ES. 1997. Studies on the immunomodulating effects of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on macrophage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26:148-153
- Kim SW. 1998a. Studies on anti-microbial and anti-cancer functions of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27:1183-1188
- Kim SW. 1998b. Nitric oxide production ability and its formation mechanisms in macrophage TIB 71 cell line by polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27:333-337
- Kim YJ. 2012. Inhibitory effect of *Mori folium* water extract on DSS-induced ulcerative colitis in murine model. Ph.D. Thesis, Wonkwang Univ. Iksan. Korea
- Lee BE, Ryu SY, Kim EH, Kim YH, Kwak KA, Song HY. 2012. Immunostimulating effect of mycelium extract of *Phellinus linteus*. *Kor J Pharmacogn* 43:157-162
- Lee EJ, Park HS, Lee CJ, Kong WS, Koo CD. 2019. Suitable conditions for mycelial culture of *Tremella fuciformis*. *Korean J Mycol* 47:1-12
- Lee GH. 2018. Study on the remediation effect of *Bombycis corpus* in DSS-induced colitis model. Master's Thesis, Konyang Univ. Nonsan. Korea
- Lee JH. 2010. Improving effect of lactic acid bacteria in DSS-induced colitic mouse model. Ph.D. Thesis, Kyung Hee Univ. Seoul. Korea
- Lee KH, Rhee KH. 2010. Anti-inflammatory effects of *Glycyrrhiza glabra* Linne extract in a dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model. *Korean J Food Nutr* 23:435-439
- Lee KT. 2011. Effects of the products of Chungil mulberry tree on ulcerative colitis. Ph.D. Thesis, Wonkwang Univ. Iksan. Korea
- Lee SM. 2019. Anti-inflammatory effect of *Equisetum arvense* on DSS-induced ulcerative colitis in a mouse model. Ph.D. Thesis, Wonkwang Univ. Iksan. Korea
- Liu YW, Liong MT, Tsai YC. 2018. New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis. *J Microbiol* 56:601-613
- Lui FF. 2015. Anti-obesity and colon cancer preventive effects of Kochujang in C57BL/6J mice. Mater's Thesis, Pusan National Univ. Busan. Korea
- Oh YH, Kim SB, Lee GW, Kim HY, Shim MJ, Rho HS, Lee HS, Lee MW, Lee UY, Lee TS. 2006. The immunomodulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis*. *Korean J Mycol* 34:105-111
- Park EJ. 2014. Increased health functionalities of ramyon that prepared with brown rice and sorghum flour added noodle and Doenjang bamboo salt soup. Mater's Thesis, Pusan National Univ. Busan. Korea
- Park ES, Heo JH, Lim YI, Joo JH, Park KY. 2017a.

- Improvement of colitis preventive effects of *Gochujang* by addition of *Lactobacillus plantarum* on C57BL/6 mice. *Korean J Food Preserv* 24:1188-1194
- Park HM, Hong JH. 2017. Immune-enhancing effects of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* mycelium on *Mori ramulus*. *J Korean Soc Food Nutr* 46:26-33
- Park JS, Joe I, Rhee PD, Jeong CS, Jeong G. 2017b. A lactic acid bacterium isolated from kimchi ameliorates intestinal inflammation in DSS-induced colitis. *J Microbiol* 55:304-310
- Park WH, Lee HD. 1999. Korean Medicinal Mushroom Encyclopedia. Gyohaksa
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031
- Zhang Z, Wang X, Zhao M, Qi H. 2014. Free-radical degradation by  $Fe^{2+}/Vc/H_2O_2$  and antioxidant activity of polysaccharide from *Tremella fuciformis*. *Carbohydr Polym* 112:578-582
- 

Received 25 January, 2021

Revised 18 February, 2021

Accepted 02 March, 2021