

## Immune-enhancing and Anti-inflammatory Effects of HK Shiitake Mushroom Mycelium (HKSMM) using Balb/c Mice

Hun Hwan Kim<sup>1†</sup>, Sang Eun Ha<sup>1†</sup>, Min Young Park<sup>1</sup>, Se Hyo Jeong<sup>1</sup>, Bhosale Pritam Bhagwan<sup>1</sup>, Abusaliya Abuyaseer<sup>1</sup>, Jeong Ok Kim<sup>2</sup>, Yeong Lae Ha<sup>2</sup> and Gon Sup Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Life Science and College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

<sup>2</sup>Antianging Institute, HK biotech., Co., Ltd., Jinju 52840, Korea

Received March 17, 2022 /Revised May 30, 2022 /Accepted June 10, 2022

In this study, we confirmed the effect of HK shiitake mushroom mycelium (HKSMM) on immune enhancement in Balb/c mice. Experimental animals were divided into five groups: negative control (NC), positive control (PC; 1,000 mg/100 g; AHCC), T1 (500 mg/100 g; HKSMM), T2 (1,000 mg/100 g; HKSMM), and T3 (2,000 mg/100 g; HKSMM), and dissection was performed at four and six weeks. COX-2 and iNOS concentrations were significantly lower in the six-week experimental group than in the control group, and the NO results were also similar. Results of the confirmation of the factors related to the NF- $\kappa$ B (p-p65 and p-I $\kappa$ B $\alpha$ ) and MAPK (pERK, pJNK, and p38) signaling pathways revealed that the HKSMM-fed experimental group significantly decreased compared with the control group. A comparative analysis of the number and size of white pulp in the spleen tissue showed that those of the experimental group were significantly higher than those of the control group in a concentration-dependent manner. These results suggest that HKSMM has both immune-enhancing and anti-inflammatory effects in Balb/c mice, indicating that it can be used as a health functional food ingredient.

**Key words :** Anti-inflammation,  $\beta$ -glucan, HK shiitake mushroom mycelium, immune enhancement, immune-enhancing

### 서 론

염증 반응은 인체가 외부인자들의 침입에 대항하기 위한 면역세포들의 상호작용으로 진행되는 방어기전 중 하나인 면역시스템이지만[12], 장기간 유지되어 만성염증으로 진행되면 다양한 질병이 되기도 한다[3]. 염증반응을 조절하는 대표적인 인자인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 산화질소(NO)의 생성을 촉진시키고, cyclooxygenase-2 (COX-2)는 arachidonic acid로부터 prostaglandin E2의 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다[14]. 또, 염증 반응은 다양한 신호전달 경로를 통해 발현하게 되는데 MAPKs 및 NF- $\kappa$ B 등이 있다[2]. 염증 및 면역반응을 조절하기 위해 임상에서는 합성약물 및 면역강화제를 사용하고 있으나, 이와 같은 화학적인 치료제는 보통, 탈모, 구토

및 소화 장애와 같은 다양한 부작용을 유발할 수 있다[8]. 이 때문에 생체친화적이고 부작용이 적은 천연물을 소재로 활용하여 질병을 예방하고 치료하기 위한 연구가 꾸준히 진행되고 있으며, 이미 치료에 이용되고 있는 약물의 약 50%는 천연소재를 활용한 것으로 경제적 가치 또한 높게 평가되고 있다[1].

곰팡이의 일종인 버섯은 무기질, 비타민을 비롯하여 단백질, 탄수화물 및 지방을 고루 함유하고 있어 오랜 시간 동안 식품소재로 이용되고 있다. 버섯은 균사(mycelium)와 자실체(fruiting body)로 크게 나뉘는데 자실체 외에 균사체에도 다양한 생리활성 물질이 존재하고 있다. 또한, 자실체의 생산에 비해 균사체는 소비되는 인력, 시간, 비용 등이 적고 액체배양을 통한 안정적인 생산이 가능하다. 또한 균사체의 조성 및 배양조건에 따라 다양한 대사산물을 얻을 수 있어 연구적인 가치 또한 높은 것으로 보고되었다[17]. 표고버섯 균사체가 보유한 다양한 생리활성은 표고버섯균사체에 함유되어 있는  $\beta$ -glucan, gluco-protein 및 polysaccharide로 인한 것으로 알려져 있다[5]. 그 중  $\beta$ -glucan은 표고버섯균사체의 가장 대표적인 지표 물질로써 면역증진 기능, 항산화 및 항염증 등과 같은 다양한 생리활성을 가진 것으로 보고되었다[15].

본 연구에서는 자체 개발한 표고버섯균사체인 HK shi-

<sup>†</sup>Authors contributed equally.

\*Corresponding author

Tel : +82-55-772-2346, Fax : +82-55-772-2345

E-mail : gonskim@gnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

itake mycelium (HKSM)을 Balb/c 마우스에 4주 및 6주간 급여하여, 면역활성을 담당하는 비장세포의 변화를 확인하고, 혈액을 채취하여 염증 조절 인자의 발현 유도 및 억제 조절 기능을 확인하였다. 상기 연구결과는 HKSM의 면역 증진효과 및 염증 억제효과에 대한 기초자료를 제공함으로써 천연 생리활성 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### HK 표고버섯 균사체(HKSM)의 제조

HK 표고버섯 균사체(HKSM)은 고체 배양 분말과 액체배양 분말을 2:1 (w/w)로 혼합하여 제조하였다. 고체배양 분말은 보리를 수세하여 이물질을 제거하고 24 시간 수돗물에 침지한 후 거름망에서 4시간 방치하였다. 그 후 121°C에서 2시간 멸균한 후 미리 배양한 표고버섯 종균을 접종하였다. 25°C의 배양기에서 10일간 배양한 후 50°C에서 열풍건조를 시켜 100 mesh로 분말화 하였다. 액체배양 분말은 탈지 대두분(2.5 g/l), 황백당, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.025 g/l), MgSO<sub>4</sub> (0.025 g/l)을 물과 혼합한 후 거품제거제를 통해 거품을 제거하였다. 그 후 121°C에서 2시간 멸균한 뒤 표고버섯균사체 종균을 접종하였다. 25°C 배양기에서 10일간 배양 후 베타-글루칸을 추출하기 위해 121°C에서 1시간 추출한 후 탈지대두분을 추출물에 대해 10% (w/v) 혼합한 다음 열풍 건조하였다. 건조된 액체배양물은 100 mesh로 분말화 하였다.

#### 실험동물

Balb/c 마우스 50 마리로 구성은 Table 1과 같다. 일반사료 급여군 negative control (NC) 10마리, 표고버섯균사체 기성품 AHCC 급여군 positive control (PC) 10마리, HKSM 급여군 T1 (500 mg/100 g), T2 (1,000 mg/100 g) 및 T3 (2,000 mg/100 g)로 구성하였다. 농도에 맞게 제조된 사료와 미세여과기 및 자외선 유수살균장치를 통과한 물을 자유급이 하였다. 실험동물의 혈청은 4주차 및 6주차에 혈액을 채취하여 얼음에서 20 min 방치 후 원심분리를 통

Table 1. Information on experimental animals and treatments with diet

| Group | Number of animals | Dose (mg/100 g) |
|-------|-------------------|-----------------|
| NC    | 10                | 0               |
| PC    | 10                | 1,000 (AHCC)    |
| T1    | 10                | 500 (HKSM)      |
| T2    | 10                | 1,000 (HKSM)    |
| T3    | 10                | 2,000 (HKSM)    |

NC; Negative control, PC; Positive control (AHCC)  
 AHCC; reference product  
 HKSM; shiitake mushroom mycelium

해 분리하였고, 비장은 6주차에 채취하였다. 동물사육실은 항온항습한 환경에서 12시간 주기의 조명으로 설정하여 사육하였다. 동물실험은 KIT 경남환경독성본부 IACUC의 승인을 받아 진행되었다(승인번호: 2108-0004).

#### Griess Assay를 통한 NO (nitric oxide) 측정

NO의 함량은 제조사의 프로토콜에 따라 Promega Griess Reagent system (Promega Corporation, Madison, USA)을 사용하여 분석하였다. 96 well plate에 Balb/c 마우스에서 채취한 혈청 100 µl와 sulfanilamide solution 50 µl을 분주한 후 차광상태의 실온에서 10분간 반응하였다. 그 후 NED solution 50 µl를 추가로 분주한 후 차광상태의 실온에서 10분간 반응하였다. 반응이 끝난 plate는 540 nm에서 흡광도를 통해 아질산염농도를 측정하였다.

#### Western Blot 분석에 의한 단백질 발현 측정

단백질 농도는 Pierce bicinichoninic acid 단백질 분석 키트(Thermo Fisher Scientific, Inc.)의 프로토콜에 따라 측정하고 모든 시료를 같은 농도로 제조하였다. 동량의 단백질 샘플(10 µg)을 SDS-PAGE를 통해 분리하고 TE Semi-Dry Transfer Unit (GE Healthcare Life Sciences)를 이용하여 PVDF membrane으로 옮겼다. 그런 다음 실온에서 1시간 30분 동안 5% 소 혈청 알부민(BSA, Thermo Fisher Scientific, Inc.)으로 blocking 하였다. Blocking이 끝난 membrane은 4°C에서 하루밤 동안 1차 항체(iNOS (cat. no. 13120S); 1:1,000, COX-2 (cat. no. 12282S); 1:1,000, β-Actin (cat. no. 4970S); 1:5,000, p-p65 (cat. no. 3033S); 1:1,000, p65 (cat. no. 8242S); 1:1,000, p-IKB (cat. no. 2859S); 1:1,000, IKB (cat. no. 4812S); 1:1,000, p-ERK (cat. no. 4370S); 1:1,000, p-JNK (cat. no. 4671S); 1:1,000, p38 (cat. no. 8690S); 1:1,000)와 함께 반응시켰다. 1차 항체는 Cell Signaling Technology, Inc. (Massachusetts, USA)에서 구입하였다. 반응이 끝난 membrane을 1X TBST로 15분 동안 5회 세척하고 2차 항체(anti-rabbit (cat. no. A120-101P, Bethyl Laboratory, Inc.)와 함께 실온에서 3시간 동안 반응하였다. 한번 더 1X TBST로 세척한 후 Chemiluminescence kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA)로 발현정도를 시각화 하였다. 이미지는 Chemi-Doc 시스템(Version 6.0, Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA)에 의해 확인하였다. Total form과 β-actin은 로딩 대조군으로 사용되었다. Image J1.50i 소프트웨어(National Institutes of Health)를 사용하여 3회 수행한 Western blot 이미지를 정량화 하였다.

#### H&E staining을 통한 비장의 백색수질 측정

10% 중성 포르말린에 고정된 비장 조직은 조직 처리기(Excelsior ES; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 탈수, 조직 정리 및 파라핀 침투를 수행하였

다. 그런 다음 조직 샘플을 조직 고정 시스템(Histostar, Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 파라핀 블록에 고정하였다. 파라핀 블록을 마이크로톰(microtome)을 이용하여 4 μm으로 절단한 후 슬라이드를 제작하기 위해 autostainer (Coverstainer; Aglient, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 hematoxylin&eosin (H&E) 염색을 수행하였다. H&E 염색된 슬라이드는 슬라이드 스캐너(Panoramic SCAN, 3D Histotech, Budapest, Hungary)를 사용하여 이미지를 스캔하였다. 이후, Caseviewer 소프트웨어(3D Histotech, Budapest, Hungary)를 이용하여 백색수질 수 및 직경을 측정하였다.

**통계처리**

실험의 분석결과는 3중 측정하여 mean ± SD로 표시하였다. 통계분석은 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)과 일원 요인 분산 분석(ANOVA)를 사용하여 수행하였다. 통계적 유의성은 일원분산 분석 후 Duncan's multiple range와 Student's test로 p<0.05 수준에서 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**HKSMM의 NO (Nitric oxide)생성 억제 효과**

HKSMM의 급이가 Balb/c 마우스에서 NO 생성 억제에 미치는 영향을 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. Balb/c 마우스에서의 nitric oxide (NO)는 4주차에 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만, 6주차의 NO 생성억제는 HKSMM을 2,000 mg/100 g 급이한 T3군이 가장 NO 생성을 억제한 PC군과 유사한 결과였다. T2군 또한 NC군에

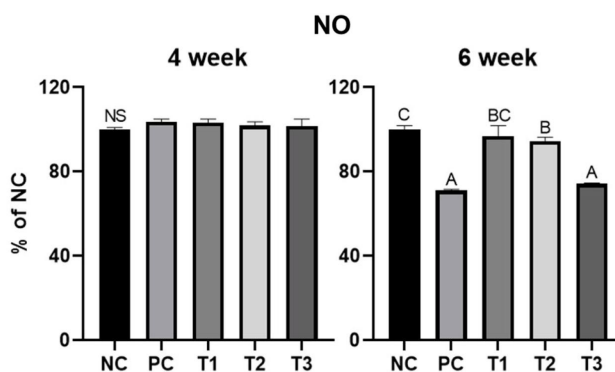


Fig. 1. Comparison of NO expression in balb/c mouse serum according to HKSMM feeding. NC; Negative control, PC; Positive control, T1; HKSMM 500 mg/100 g, T2; HKSMM 1,000 mg/100 g, T3; HKSMM 2,000 mg/100 g. 4 week; Necropsy day 29, 6 week; Necropsy day 43. All values are mean ± SD (n=3) <sup>A-C</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range tests. NS; not significant.

비해 유의적으로 NO의 생성을 억제하였으며, T1군은 NC군에 비해 유의적인 결과는 보이지 않았다. 감염 부위의 부종과 발적을 감소시키기 위해선 대식세포의 염증 반응을 조절하는 NO 생성을 억제하면 된다는 보고가 있다 [13]. 또한, NO는 염증을 유발하는 초기단계를 조절하는 것으로 알려져 있는데[9], 본 연구결과에서 HKSMM을 6주간 급이한 실험군에서 유의적으로 NO가 감소하였다. 따라서, HKSMM의 급이는 balb/c 마우스에서 염증 초기 단계를 유발하는 NO를 감소시켜, 감염부위의 부종과 발적을 감소시킬 수 있음을 시사한다.

**HKSMM의 iNOS 및 COX-2 발현 억제 효과**

HKSMM의 급이가 Balb/c 마우스에서 iNOS 및 COX-2 발현 억제에 미치는 영향을 확인한 결과는 Fig. 2과 같다. iNOS는 4주차에 PC군이 NC군에 비해 유의적으로 낮았으나, 실험군 T1, T2 및 T3군은 높은 경향이였다. 하지만, 6주차에서는 실험군 T1, T2 및 T3군이 농도 의존적으로 유의차를 보이며 NC군에 비해 iNOS 발현이 감소하였다. COX-2의 경우 4주차 T1군이 NC군에 비해 유의적으로 낮은 결과였지만, 다른 실험군에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만, 6주차에서는 T3군이 유의적으로 낮은 COX-2 발현을 보였다. 염증 유발 인자인 NO와 PGE<sub>2</sub>는 iNOS와 COX-2의 대사산물에 의해 발현한다는 보고가 있다[6]. iNOS의 NO 생성은 염증작용 등을 포함한 다양한 병리학적 작용을 보여 인체에 유해작용을 하는 것으로 보고되어 있는데, 특히 염증 및 자가면역 질환에서 인체 기관의 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다[4]. COX-2는 아라키돈산 대사를 통한 PGE<sub>2</sub>의 생산에서 중요한 역할을 하며, COX-2의 발현 증가는 염증성 사이토카인의 발현을 유도한다[16]. 본 연구에서는 HKSMM을 balb/c 마우스에 급이하여 iNOS와 COX-2의 발현을 확인한 결과 6주차에 발현이 유의적으로 감소하였다. 이는, HKSMM의 섭취는 염증성 인자인 iNOS와 COX-2의 발현을 억제함을 확인하였고, 동시에 항염증 효과가 있음을 시사한다.

**HKSMM가 NF-κB 신호전달경로의 조절에 미치는 영향**

NF-κB는 염증 인자의 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, HKSMM의 급이가 Balb/c 마우스에서 NF-κB 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot을 통해 관련 인자를 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. Balb/c 마우스에 HKSMM을 4주 및 6주간 급이한 후 혈청을 채취하여 p-p65를 측정한 결과, 4주차에는 T1, T2 및 T3군이 NC 및 PC군에 비해 유의적으로 낮은 발현을 보였으나, 6주차에는 T1군이 유의차를 보이지 않았다. p-IKB의 경우 4주차와 6주차 모두 실험군 T1, T2 및 T3군이 NC 및 PC군에 비해 유의적으로 낮은 발현을 보였으나, 4주차의 PC군은 NC군과 유의차가 없는 발현을 보였다.

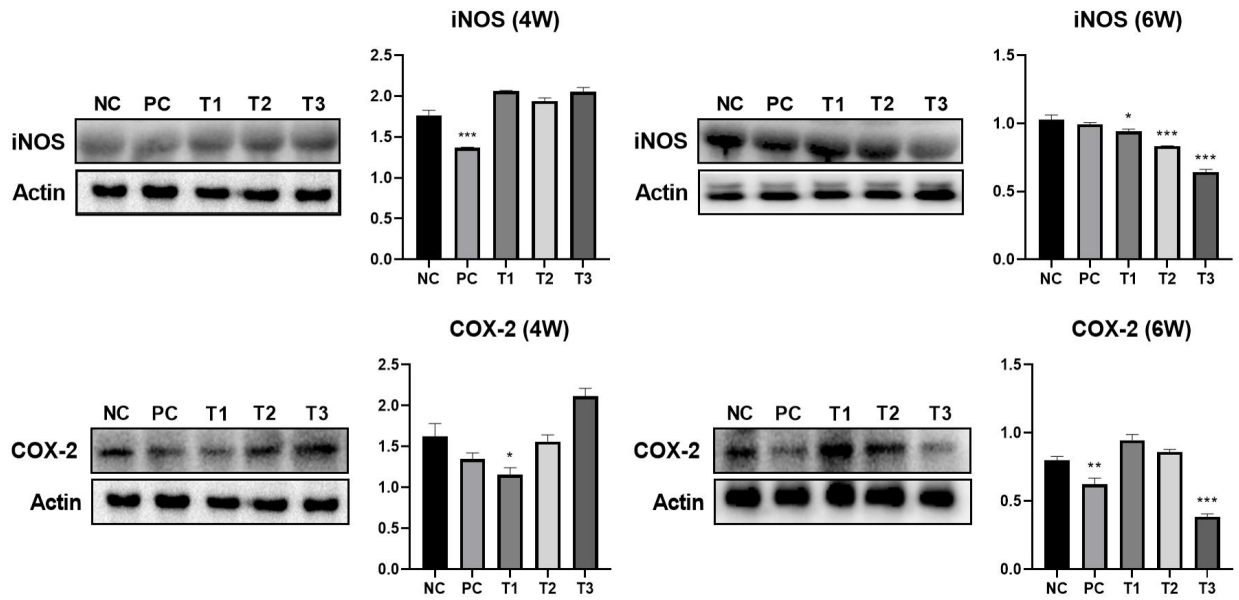


Fig. 2. Comparison on protein expression of iNOS and COX-2 in balb/c mouse serum according to HKSMM feeding. NC; Negative control, PC; Positive control, T1; HKSMM 500 mg/100 g, T2; HKSMM 1,000 mg/100 g, T3; HKSMM 2,000 mg/100 g. 4 week; Necropsy day 29, 6 week; Necropsy day 43. All values are mean  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0.05 vs NC, \*\* $p$ <0.01 vs NC, \*\*\* $p$ <0.001 vs NC.

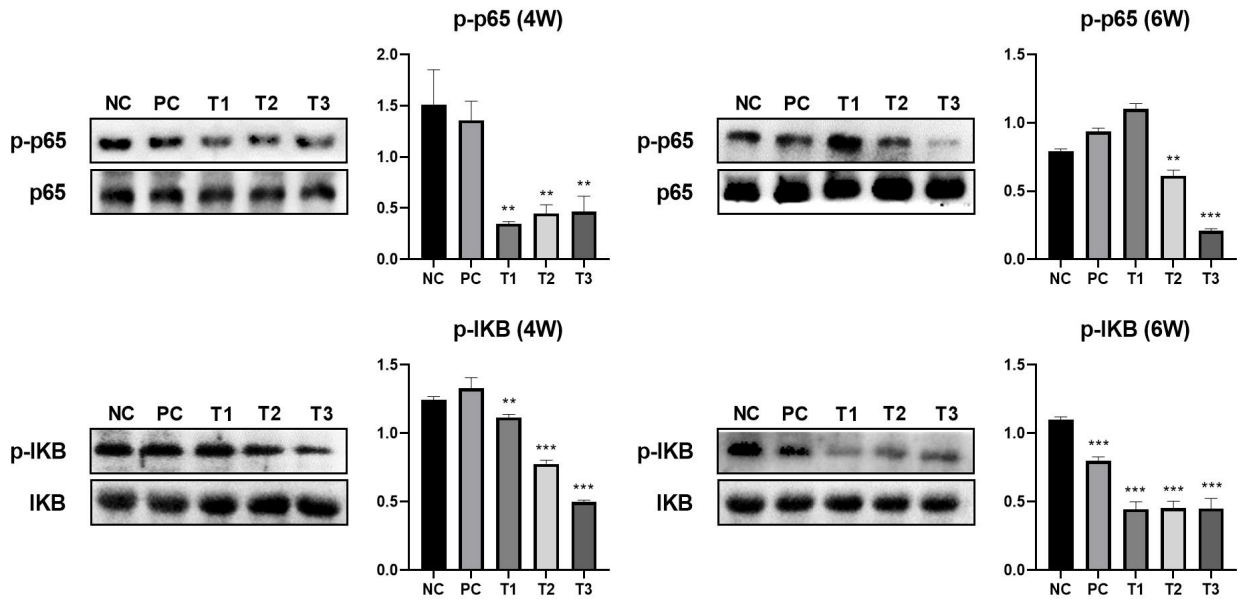


Fig. 3. Comparison on protein expression of p-65, p-p65, IκBα and p- IκBα in balb/c mouse serum according to HKSMM feeding. NC; Negative control, PC; Positive control, T1; HKSMM 500 mg/100 g, T2; HKSMM 1,000 mg/100 g, T3; HKSMM 2,000 mg/100 g. 4 week; Necropsy day 29, 6 week; Necropsy day 43. All values are mean  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0.05 vs NC, \*\* $p$ <0.01 vs NC, \*\*\* $p$ <0.001 vs NC.

NF-κB는 미세아교세포에서 염증 매개체 생산에 기여하는 대표적인 신호 전달 과정이다[20]. IκB kinase 후속 단백질의 분해에 의해 활성화 되는 p65 및 IκBα는 TNFα, IL-1β 및 IL-6 등과 같은 염증성 사이토카인의 반응을 유도한다[7]. 항염증 효과를 가진 대표적인 성분인 플라보노

이드를 처리하였을 때, p-65 및 IκBα가 농도의존적으로 발현이 감소함을 확인하였다[10]. 이는 HKSMM의 급이가 Balb/c 마우스에서 NF-κB의 발현을 억제 조절하였기에 면역 및 항염증 기능을 증가시킴을 시사한다.

**HKSM가 MAPKs 신호전달경로의 조절에 미치는 영향**

MAPK (JNK, ERK 및 p38) 신호 전달경로는 NF-κB 신호 전달경로를 조절하여 염증 발현 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, HKSM의 급이가 Balb/c 마우스에서 MAPKs 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot을 통해 관련 인자를 확인한 결과는 Fig. 4와 같다. 세린, 트레오닌 및 티로신 키나아제인 MAPK는 염증조절 외에도 세포 증식 및 분화에 중요한 역할을 하고 JNK, ERK 및 p38로 알려져 있다. HKSM을 balb/c 마우스에 4주 및 6주간 급이하였을 때, 4주차에 pERK는 PC군이 NC군에 비해 유의차가 있었으나 수치상 큰 차이는 나지 않았다. 하지만, 실험군 T1, T2 및 T3군은 농도의존적으로 감소하였다. 6주차에는 PC군 또한 NC군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 실험군 T3군이 가장 낮은 발현을 보였다. pJNK는 4주차에 PC군 및 실험군(T1, T2 및 T3)이 NC군에 비해 유의적으로 낮았으며, T3군이 가장 낮은 수치였다. 6주차에서는 PC군과 NC군 사이에 유의차가 없었으나, 실험군 T1, T2 및 T3군은 NC 및 PC군에 비해 유의적으로 발현이 감소하였다. p38은 pERK 및 pJNK의

결과와는 다르게 4주차에 NC 및 PC군보다 실험군 T1, T2 및 T3군이 높은 발현을 보였다. 하지만 6주차에 실험군 T2 및 T3군이 NC 및 PC군보다 유의적으로 낮은 발현을 보였다. Mitogen-activated protein kinases (MAPK)는 염증과정 및 반응을 조절하는 경로로써 지속적으로 연구되어 왔다. 특히, 세포에서 염증을 생성하는데 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 과하게 발현하면 염증의 생성을 가속화하는 것으로 보고되었다[22]. 그 중에서도 류마티스 관절염의 발병기전에서 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다[19]. 또한, 스트레스로 인해 활성화된 MAPK 신호 전달 경로는 염증을 유발하고, 이는 하위 염증 유발인자를 차례로 활성화시켜 사이토카인 생성을 유도한다[21]. 따라서, HKSM을 balb/c 마우스에 급이하였을 때, MAPK 관련 단백질들이 하향 조절된 것은 HKSM의 급이가 염증성 인자들을 억제하여 항염증 효과를 보인 것으로 시사된다.

**HKSM가 비장의 조직학적 변화에 미치는 영향**

HKSM 급이가 Balb/c 마우스 비장의 조직학적 변화

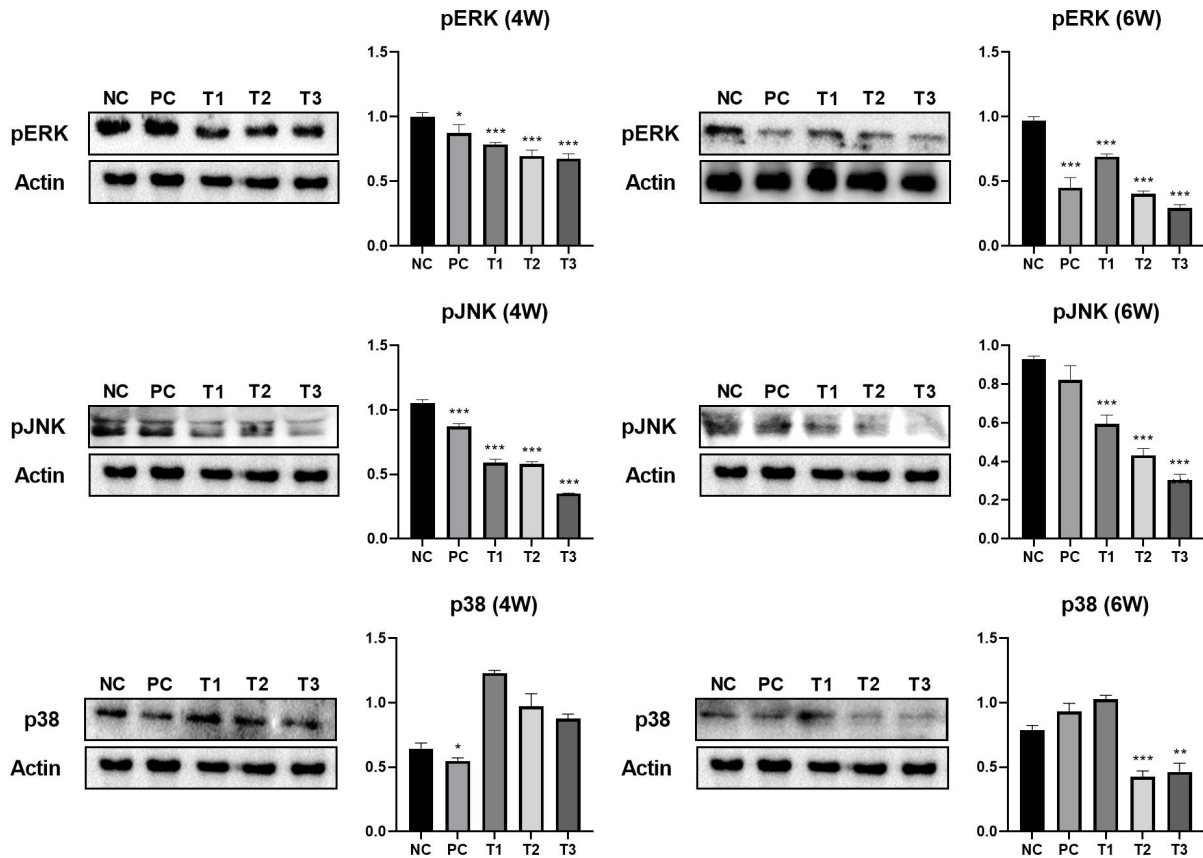


Fig. 4. Comparison on protein expression of p-ERK, p-JNK and p38 in balb/c mouse serum according to HKSM feeding. NC; Negative control, PC; Positive control, T1; HKSM 500 mg/100 g, T2; HKSM 1,000 mg/100 g, T3; HKSM 2,000 mg/100 g. 4 week; Necropsy day 29, 6 week; Necropsy day 43. All values are mean ± SD (n=3). \**p*<0.05 vs NC, \*\**p*<0.01 vs NC, \*\*\**p*<0.001 vs NC.

에 미치는 영향을 확인하기 위하여 H&E stain을 통해 확인한 결과는 Fig. 5, 이를 수치화한 결과는 Table 2와 같다. White pulp는 항원 특이적 면역 반응을 지원하는 림프구가 풍부한 것으로 알려져 있다[18]. 따라서, 비장 조직내의 백색수질(white pulp) 변화는 면역 반응을 주관하는 조직의 변화로 간주될 수 있다. 비장조직의 white pulp 개수는 NC군(8.90)이 T1군(8.90)과 유의차를 보이지 않았지만, PC (10.90), T2 (10.60) 및 T3 (13.10)군이 유의적으로 높았으며, 특히 T3군이 가장 많은 결과였다. White pulp의 크기는 NC군 (220.73)에 비해 PC (331.15) 및 실험군(242.21~398.94)이 유의적으로 증가하였으며, PC군과 T2군은 유사한 크기였다. T3군은 white pulp의 개수와 크기 모두 가장 유의적으로 증가하였다. 비장은 가장 큰 이차 림프 기관 (Secondary lymphoid organ)으로써, 적혈구 조절 및 회전을 조절을 한다. 또한, 비장의 white pulp는 혈액 필터 역할과 T 및 B세포를 혈액 매개 병원체에 대해 진행되는 면역반응을 매개하는 기능을 가지고 있다[11]. 바이러스 감염으로 인해 white pulp가 손상되면 심각한 면역결핍을 유발한

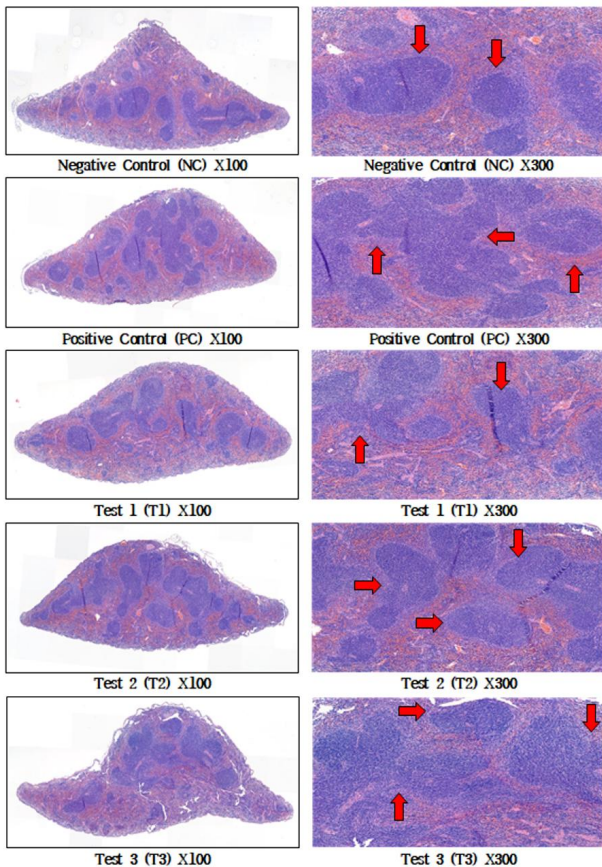


Fig. 5. Histological comparison of balb/c mouse splenocytes according to HKSMM feeding. NC; Negative control, PC; Positive control, T1; HKSMM 500 mg/100 g, T2; HKSMM 1,000 mg/100 g, T3; HKSMM 2,000 mg/100 g. Necropsy day 43.

Table 2. Comparison of the number and size of white pulp in balb/c mouse serum according to HKSMM feeding

| Group | The number of the white pulp | Diameter of the white pulp (um) |
|-------|------------------------------|---------------------------------|
| NC    | 8.90±2.13 <sup>A</sup>       | 220.73±7.92 <sup>A</sup>        |
| PC    | 10.90±1.6 <sup>B</sup>       | 331.15±16.84 <sup>C</sup>       |
| T1    | 8.90±1.1 <sup>A</sup>        | 242.21±10.65 <sup>B</sup>       |
| T2    | 10.60±1.7 <sup>AB</sup>      | 337.00±18.74 <sup>C</sup>       |
| T3    | 13.10±2.8 <sup>C</sup>       | 398.94±37.52 <sup>D</sup>       |

NC; Negative control, PC; Positive control (AHCC)

AHCC; reference product

HKSMM; shiitake mushroom mycelium

All values are mean ± SD (n=3).

<sup>A-D</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range tests.

다고 보고되어져 있다. 따라서, HKSMM을 급여한 balb/c 마우스의 비장조직에서 white pulp 크기 및 개수가 증가한 결과는 면역 기능이 증가한 것을 시사한다.

### 감사의 글

이 논문은 2021년 경상남도 미래선도기술산업화지원 사업에 의해 수행되었다.

### The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

### References

- Desai, S. J., Prickril, B. and Rasooly, A. 2018. Mechanisms of phytonutrient modulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inflammation related to cancer. *Nutr. Cancer* **70**, 350-375.
- Doyle, S. L. and O'Neill, L. A. 2006. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1102-1113.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S. and Girardin, S. E. 2007. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin. Exp. Immunol.* **147**, 227-235.
- Geller, D. A. and Billiar, T. R. 1998. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev.* **17**, 7-23.
- Hazama, S., Watanabe, S., Ohashi, M., Yagi, M., Suzuki, M., Matsuda, K., Yamamoto, T., Suga, Y., Suga, T., Nakazawa, S. and Oka, M. 2009. Efficacy of orally administered superfine dispersed lentinan (beta-1,3-glucan) for the

- treatment of advanced colorectal cancer. *Anticancer Res.* **29**, 2611-2617.
6. Herencia, F., Ferrandiz, M. L., Ubeda, A., Guillen, I., Dominguez, J. N., Charris, J. E., Lobo, G. M. and Alcaraz, M. J. 1999. Novel anti-inflammatory chalcone derivatives inhibit the induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in mouse peritoneal macrophages. *FEBS Lett.* **453**, 129-134.
  7. Hong, G. E., Kim, J. A., Nagappan, A., Yumnam, S., Lee, H. J., Kim, E. H., Lee, W. S., Shin, S. C., Park, H. S. and Kim, G. S. 2013. Flavonoids identified from Korean *Scutellaria baicalensis georgi* inhibit inflammatory signaling by suppressing activation of NF- $\kappa$ B and MAPK in RAW 264.7 cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**, 912031.
  8. Hu, Z., Ott, P. A. and Wu, C. J. 2018. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 168-182.
  9. Kang, J., Zhang, Y., Cao, X., Fan, J., Li, G., Wang, Q., Diao, Y., Zhao, Z., Luo, L. and Yin, Z. 2012. Lycorine inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 up-regulation in RAW264.7 cells through suppressing P38 and STATs activation and increases the survival rate of mice after LPS challenge. *Int. Immunopharmacol.* **12**, 249-256.
  10. Kim, J. A., Ha, S. E., Kim, S. M., Vetrivel, P., Kim, G. S. and Kim, E. H. 2019. Anti-inflammatory activities of sinensetin on LPS-stimulated L6 skeletal muscle cells. *J. Biomed. Transl. Res.* **20**, 1-7.
  11. Mebius, R. E. and Kraal, G. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 606-616.
  12. Okoli, C. O. and Akah, P. A. 2004. Mechanisms of the anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Culcasia scandens* P. Beauv (Araceae). *Pharmacol. Biochem. Behav.* **79**, 473-481.
  13. Park, S. B., Park, G. H., Kim, H. N., Son, H. J., Song, H. M., Kim, H. S., Jeong, H. J. and Jeong, J. B. 2018. Anti-inflammatory effect of the extracts from the branch of *Taxillus yadoriki* being parasitic in *Neolitsea sericea* in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Biomed. Pharmacother.* **104**, 1-7.
  14. Rankin, J. A. 2004. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin. Issues* **15**, 3-17.
  15. Ross, G. D., Vetvicka, V., Yan, J., Xia, Y. and Vetvickova, J. 1999. Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacology* **42**, 61-74.
  16. Sklyarov, A. Y., Panasyuk, N. B. and Fomenko, I. S. 2011. Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis. *J. Physiol. Pharmacol.* **62**, 65-73.
  17. Song, T. Y. and Yen, G. C. 2002. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *J. Agric. Food. Chem.* **50**, 3322-3327.
  18. Steiniger, B., Bette, M. and Schwarzbach, H. 2011. The open microcirculation in human spleens: a three-dimensional approach. *J. Histochem. Cytochem.* **59**, 639-648.
  19. Thalhamer, T., McGrath, M. A. and Harnett, M. M. 2008. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* **47**, 409-414.
  20. Tilstra, J. S., Clauson, C. L., Niedernhofer, L. J. and Robbins, P. D. 2011. NF-kappaB in aging and disease. *Aging Dis.* **2**, 449-465.
  21. Wang, J., Huang, J., Wang, L., Chen, C., Yang, D., Jin, M., Bai, C. and Song, Y. 2017. Urban particulate matter triggers lung inflammation via the ROS-MAPK-NF-kappaB signaling pathway. *J. Thorac. Dis.* **9**, 4398-4412.
  22. Yang, Y., Kim, S. C., Yu, T., Yi, Y. S., Rhee, M. H., Sung, G. H., Yoo, B. C. and Cho, J. Y. 2014. Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm.* **2014**, 352371.

**초록 : Balb/c 마우스를 이용한 HK 표고버섯 균사체(HKSMM)의 면역증강 및 항염효과**

김훈환<sup>1\*</sup> · 하상은<sup>1\*</sup> · 박민영<sup>1</sup> · 정세효<sup>1</sup> · 볼살레 프리탐 바그완<sup>1</sup> · 아부살리야 아부야시르<sup>1</sup> · 김정옥<sup>2</sup> · 하영래<sup>2</sup> · 김곤섭<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>경상국립대학교 수의과대학 & 생명과학연구소, <sup>2</sup>주HK바이오텍)

본 연구는 Balb/c 마우스의 면역 강화에 대한 HK 표고버섯 균사체 (HKSMM)의 효과를 확인했다. 실험 동물은 음성 대조군(NC), 양성 대조군(PC; 1,000 mg/100 g; AHCC), T1 (500 mg/100 g; HKSMM), T2 (1,000 mg/100 g; HKSMM) 및 T3 (2,000 mg/100 g; HKSMM)로 구성하였고, 시료의 채취는 4주 및 6주에 수행하였다. COX-2 및 iNOS는 대조군보다 6주차 실험군에서 유의하게 낮았고, NO 결과도 유사한 결과였다. NF-κB 및 MAPKs 신호전달 경로와 관련된 인자를 확인한 결과, HKSMM을 섭취한 실험군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 비장 조직 내 백색수질의 수와 크기를 비교 분석한 결과, 대조군에 비해 실험군의 백색수질의 수와 크기가 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 HKSMM이 Balb/c 마우스에서 면역강화 효과를 유도함과 동시에 항염증 효과가 있음을 시사한다. 따라서 HK 표고버섯 균사체는 면역 강화 및 항염증 효과가 있어 건강기능식품 원료로 사용될 수 있다.