

Anti-inflammatory Efficacy of HK Shiitake Mushroom Mycelium in LPS-treated RAW 264.7 Cells Through Down-regulation of NF- κ B Activation

Chae Yeong Song¹, Tae Woo Oh², Hoon Hwan Kim³, Yu Bin Lee¹, Jeong Ok Kim¹, Gon Sup Kim³ and Yeong Lae Ha^{1*}

¹HK Biotech. Co., Ltd., Jinju 52840, Korea

²Korea Institute of Oriental Medicine, Daegu 41062, Korea

³College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52727, Korea

Received March 7, 2022 /Revised June 8, 2022 /Accepted July 11, 2022

HK shiitake mushroom mycelium (HKSMM), containing 14% β -glucan, is a health functional food ingredient individually approved by the Korea Ministry of Food and Drug Safety for liver health. The anti-inflammatory effect of a 50% aqueous ethanol extract of HKSMM (designated HKSMM50) was studied in RAW 264.7 macrophage cells treated with lipopolysaccharide (LPS). An active hexose correlated compound (AHCC) was used as a positive control. LPS-activated RAW 264.7 cells were treated with HKSMM50 and AHCC (0, 20, 100, 500 μ g/ml) and cultured for 24 hr. Inflammation-related elements in the supernatant were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) proteins in the cells was analyzed by Western blotting. The HKSMM50 lowered iNOS and COX-2 protein expressions, and nuclear factor-kappa B (NF- κ B), nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) contents in a concentration-dependent manner as compared to LPS treatment. Similarly, the HKSMM50 lowered the content of pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-4 (IL-4) and interleukin-6 (IL-6) contents and increased the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The efficacy of the AHCC treatment was similar to that of the HKSMM50 treatments. These results indicate that HKSMM50 showed an anti-inflammatory effect in LPS-treated RAW 264.7 cells by down-regulation of NF- κ B signaling and suggest that HKSMM could be used as a health functional food ingredient to help improve immune function.

Key words : COX-2, HK shiitake mushroom mycelium, iNOS, NF- κ B, RAW 264.7 cells

서 론

염증(inflammation)은 외부 병원균으로부터 몸을 보호하는 선천성 면역반응(innate immunity reaction)으로 대식세포(macrophage)가 주로 관여한다[22, 26]. Gram negative bacteria cell wall의 lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포 표면에 발현하는 toll-like receptor 4 (TLR4)에 결합하여 inflammatory mediators인 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)와 pro-inflammatory cytokines인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)

등을 생성하여 염증반응을 유발한다[22, 23, 25].

Inflammatory mediators 및 cytokines의 과잉생산은 관절염, 천식, 다발성 경화증, 염증성 장질환 및 동맥경화증 등을 일으킨다[5, 20]. 과도한 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 단백질 발현은 뇌암, 유방암, 폐암, 전립선암, 췌장암과 같은 많은 악성종양과 관련이 있다[11, 25]. 또한 과도한 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현은 세포 손상, 부종, 신생혈관 형성 및 전이 같은 종양 생성과 깊은 관련이 있다[22, 25]. 따라서 이들 inflammatory mediators 및 cytokines의 생성을 억제할 수 있는 생리활성 물질에 대한 관심이 높아지고 있다.

Aspirin 및 non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) 같은 분자량이 작은 항염증물질은 COX-2 활성을 비가역적으로 저해하여 PGE₂의 생성을 낮춘다[8]. 또한 indomethacin 및 dexamethasone과 같은 inflammatory drugs도 NO와 PGE₂ 합성을 억제하지만[29], 부작용이 따른다. 따라서 부작용 없이 안전하게 염증반응을 억제하는 천연물 소재

*Corresponding author

Tel : +82-55-762-9307, Fax : +82-55-762-9407

E-mail : bestintheworld1080@gmail.com

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.

를 개발이 요구된다.

표고버섯을 비롯한 다양한 식용 버섯은 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 항염증작용이 있음이 밝혀졌는데, 이들 버섯에서 항염증작용을 갖는 물질은 주로 다당체 인 β -glucan 이다[2, 6, 9, 30, 36, 37]. 표고버섯에는 β -glucan인 lentinan (LNT; 1→3/1→6 결합)이 다량 함유되어있다[1, 4, 7]. 또한 표고버섯균사체로부터 제조한 active hexose correlated compound (AHCC)에는 74%가 β -glucan이고, 약 20%가 분자량이 5,000정도 되는 acetyl된 α -1,4-glucans으로 구성되어 있어. 병원균 침입과 암 발생에 대한 면역조절제로 사용되고 있다[38].

HK표고버섯균사체(HK Shiitake mushroom mycelium: HKSM)는 β -glucan이 14% 함유된 식품의약품안전처의 개별 인정 형 간 건강기능식품이다[28]. HKSM은 CCL₄로 간 독성을 유발한 rats와 ethanol로 간 독성을 유발한 rats에서 glutamate-oxalate transaminase (GOT), glutamate-pyruvate transaminase (GPT), 및 lactic dehydrogenase (LDH)를 감소시켰고 항산화효소[superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)]활성을 증가시켜 간 기능 보호 효과가 우수한 것으로 확인되었다[12, 14]. 또한 한국인의 장기간 알코올 섭취자의 간 기능 개선에 도움이 될 수 있음이 확인되었다[16]. 따라서 β -glucan이 14% 함유되어 있는 HKSM을 면역기능 증진 건강기능식품으로 활용하기 위한 면역효과 연구를 수행하였다.

본 연구에서는 HKSM의 면역증진에 따른 항염증효과를 구명하기 위하여 HKSM의 50% ethanol 수용액 추출물(HKSM50)을 LPS로 활성화한 RAW 264.7 세포에 처리하여 nuclear factor-kappa B (NF- κ B), COX-2 및 iNOS와 염증 관련 cytokines을 측정하였다. AHCC를 positive control로 사용하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

HKSM은 (주)HK바이오텍(경남 진주시), AHCC는 KCFKOREA (서울)로부터 제공받았다. RAW 264.7 cells은 ATCC (Koram Biotech Corp, 서울)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco사(MA, USA)에서 구입하였다. Sulfanilamide, phosphoric acid, N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED), sodium nitrate와 LPS는 Sigma-Aldrich사(MO, USA)에서 구입하였다. Cell counting kit-8 (CCK-8) (Enzo Life Sciences, MN, USA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) assay kits (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4, NF- κ B, SOD, CAT)는 Abcam사(Cambridge, UK)로부터 구입하였다. RIPA buffer (Thermo Scientific, MA, USA), Western blotting de-

tecting reagents (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK), Pierce bicinchoninic acid protein assay kit와 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, MA, USA). Primary antibody rabbit anti-iNOS, COX-2 goat polyclonal, β -actin mouse polyclonal, anti-goat IgG horseradish HRP conjugate secondary antibody는 Santa Cruz사(CA, USA)로부터 구입하였다. Enhanced chemiluminescence kit (ECL)는 Bio-Rad사(CA, USA)로 구입하여 사용하였다. 그 외 사용된 시약은 reagent grade 이상이였다.

HKSM 시료의 ethanol 수용액 추출물 제조

HKSM (100 g)을 ethanol 수용액(0, 30, 50, 70, 95%) 1.0 l에 첨가하고 충분히 혼합한 다음 하룻밤 방치하였다. 혼합기로 균질화하고 원심분리(7,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30 min)하여 얻은 상등액의 ethanol을 진공농축하여 제거하였다(50 $^{\circ}$ C). Ethanol을 제거한 HKSM 농축물은 동결건조하여 분말화하였다. HKSM의 50% 수용성 ethanol 추출물(HKSM50)을 RAW 264.7 세포 처리 시료로 사용하였다 (Fig. 1).

세포배양

RAW 264.7 세포는 10% FBS와 penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml)이 함유된 RPMI 1640 배지에서 배양(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator)하였다. RPMI 1640 배지에서 배양된 RAW 264.7 세포 1 \times 10⁵ cells/200 μ l을 96 well plate의 well에 분주 후 다시 24시간 배양하고 배양액을 제거하였다. 여기에 LPS 1 μ g/100 μ l을 분주한 다음 1시간 후에, HKSM50 시료를 함유한 RPMI 1640 배지 일정량을 분

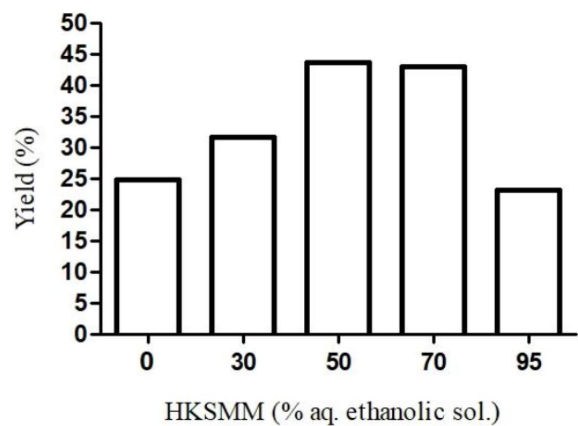


Fig. 1. Yields of freeze-dried aqueous ethanolic solutions of HKSM sample. HKSM sample (100 g) was extracted with various aqueous ethanolic solutions (1.0 l) by hand-shaking for 10 min, followed by storing at room temperature for over-night. After being centrifugation (7,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C), the supernatant was freeze-dried to get powder samples.

주하고 24시간 배양하였다. AHCC도 HKSM50 시료와 동일한 방법으로 처리하고 배양하였다. Griess assay를 위한 시료 농도는 0, 40 µg/100 µl였고, CCK-8 assay를 위한 시료 농도는 0, 8, 40, 200, 1,000 µg/90 µl였고, biochemical markers를 위한 시료 농도는 0, 4, 20, 100 µg/100 µl였다.

RAW 264.7 세포 처리용 HKSM50 수용성 ethanol 추출물 선정(Griess assay)

RAW 264.7 세포에 LPS와 시료를 처리하고 24시간 배양한 배양액 100 µl를 96 well plate의 well에 분주하였다. 여기에 sulfamilamide solution (1% sulfanilamide/5% phosphoric acid) 50 µl를 분주하고 10분 후 NED solution (0.1% 수용액) 50 µl 분주하여 10분간 반응시켜(상온, 암실), ELSA microreader (SpectraMax i3, Molecular devices, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액 (NaNO₂ 용액)도 시료와 동일한 방법으로 처리하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

시료의 세포독성 측정(CCK-8 assay)

LPS와 시료가 처리된 RAW 264.7 세포를 24시간 배양한 well에 CCK-8 용액 10 µl 첨가하고 2시간 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Biochemical markers 및 SOD 및 CAT 활성 측정

LPS와 시료가 처리된 RAW 264.7 세포를 24시간 배양한 배양액은 biochemical marker assay (ELISA kit 사용)에 사용하였다. 각 biochemical marker assay는 ELISA kit 제조사의 분석방법에 준하여 분석하였다.

Western blotting

COX-2 및 iNOS protein 발현은 Raha 등[33]의 방법에 준하여 Western blotting으로 분석하였다. RAW 264.7 세포는 60 mm plate의 well에 5×10⁵ cells을 seeding하였다. LPS와 시료(HKSM50 및 AHCC)를 처리하고 24시간 배양하였다. 이들 세포를 RIPA buffer로 lysis한 후 원심분리 (14,000 rpm, 30 min, 4°C)하였다. 배양액의 protein 함량은 Pierce bicinchoninic acid protein assay kit로 분석하였다. Protein (10 µg)을 10% SDS-PAGE로 분리한 후 PVDF membrane (Immunobilon-P, 0.45 mm)으로 transfer하였다. 분리된 protein band는 iNOS, COX-2, 및 actin 항체와 반응시켰다. Membrane을 ECL kit와 Western blotting detecting reagent로 처리하고 나타난 밴드는 ImageJ software (<http://imagej.nih.gov>)로 정량화 하였다.

β-Glucan, total flavonoid 및 total isoflavonoid 함량 분석

HKSM50 시료의 β-glucan, total flavonoid 및 total iso-

flavonoid 함량은 건강기능식품 기준 및 규격의 3-25 β-glucan, 3-48 total flavonoid, 및 3-53 대두 isoflavonoid 분석법에 준하여 분석하였다[27].

통계처리

Data는 3반복 결과를 mean ± SD (표준편차)로 표시하였다. Data 분석은 ANOVA를 통하여 분석하고 Duncan's multiple range test 또는 Student's t-test로 유의성 검증을 하였다.

결 과

RAW 264.7 세포에 처리할 HKSM50의 수용성 ethanol 추출물 선정

Fig. 1은 HKSM50 시료 100 g이 수용성 ethanol 용액 1.0 l에 용해되는 물질을 추출하고 동결건조 한 결과를 나타내고 있다. HKSM50의 수용성 ethanol 용액에 용해되는 물질은 증류수(0% ethanol)에 24.9%, 50% ethanol에 43.6%, 70% ethanol 용액에 43.0% 그리고 95% ethanol 용액에 23.1%였다. HKSM50 수용성 ethanol 추출물의 동결건조물 색깔은 증류수 추출물은 황갈색이었고, 나머지 수용성 ethanol 추출물은 갈색이었다.

RAW 264.7 세포에 처리할 HKSM50 수용성 ethanol 추출물을 선정하기 위하여 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에 HKSM50 수용성 ethanol 추출물 200 µg/ml을 처리하여 생성된 NO를 Griess assay로 측정하였다(Fig. 2). LPS 처리에 비해 모든 HKSM50 수용성 ethanol 추출물은 NO를 유의성

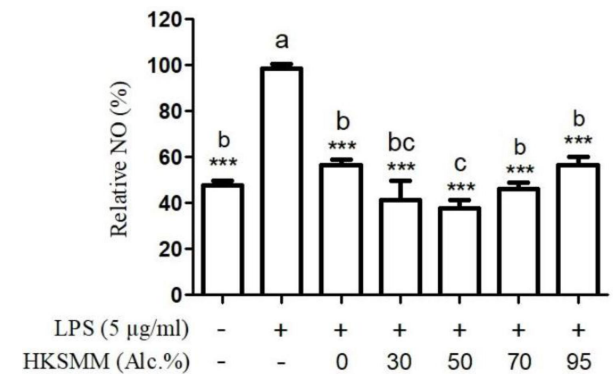


Fig. 2. Relative NO production of various ethanolic solutions of HKSM50 samples (0, 30, 50, 70, 95%) in the LPS-treated RAW 264.7 cells when analyzed by Griess assay. LPS-activated RAW 264.7 cells were treated with 200 µg/ml ethanolic extracts of HKSM50 samples, followed by 24 hr incubation (5%, CO₂, 37°C). Star markers represent significant differences by t-test against LPS treatment (*, p<0.05; **, p<0.01, and ***, p<0.001). Means with different letters represent significances at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

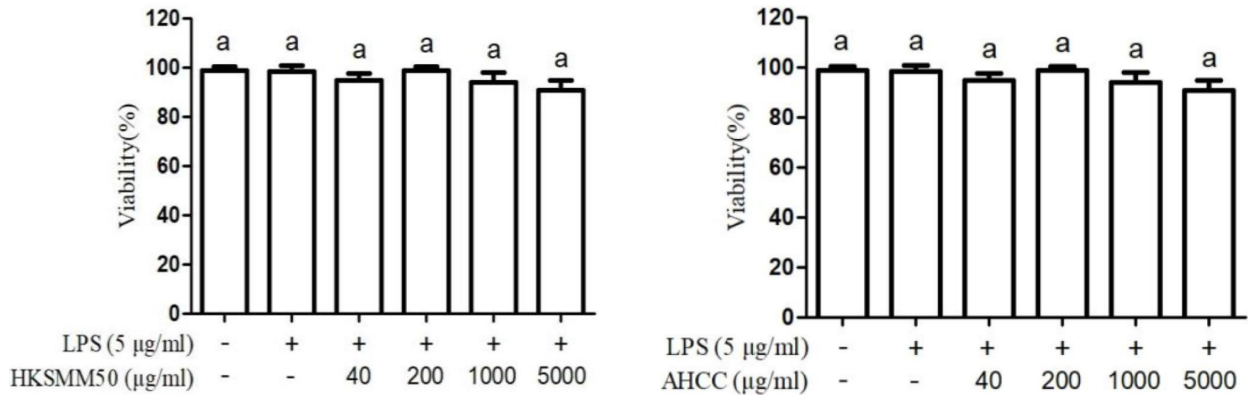


Fig. 3. Cell viability of LPS-treated RAW 264.7 cells by HKSM50 and AHCC samples. LPS-treated RAW 264.7 cells were incubated for 24 hr (5% CO₂, 37°C) with various amount of HKSM50 or AHCC sample. Cell proliferation was analyzed with CCK-8 assay. Means with different letters represent significances at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

있게 감소시켰지만($p < 0.001$), 50% ethanol 추출물이 가장 많은 NO를 감소시켰다. 따라서 RAW 264.7 세포에 처리할 HKSM50 수용성 ethanol 추출물은 50% 수용성 ethanol 추출물(HKSM50)이 가장 적당하였다. HKSM50에는 β-glucan 15.4%, total flavonoid 1.98 mg/g 및 total isoflavonoid 1.42 mg/g 함유되어 있었다.

HKSM50 시료의 cell viability

LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에 HKSM50 시료를 최대 5,000 μg/ml 처리하고 24시간 배양한 후 CCK-8 방법으로 세포 viability를 측정하였다(Fig. 3). LPS 처리에 비해 HKSM50 시료 5,000 μg/ml에서도 세포 생육에 크게 영향을 미치지 않았다. Positive control인 AHCC도 5,000 μg/ml 농도에서 세포 생육에 크게 영향을 미치지 않았다. 이 결과는 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포 실험에 HKSM50을 최대 5,000 μg/ml 처리할 수 있음을 의미한다.

HKSM50의 NF-κB의 활성 억제

RAW 264.7 세포의 염증반응에서 가장 중요한 인자는 NF-κB이다. LPS로 활성화한 RAW 264.7 세포에 HKSM50 시료(0, 20, 100, 500 μg/ml)를 처리하고 24시간 배양한 후 배양액의 NF-κB 함량을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다(Fig. 4). Positive control인 AHCC는 100 μg/ml을 처리하였다.

LPS 처리에 비해 HKSM50 처리는 농도 의존적으로 유의성 있게 NF-κB 함량을 감소시켰다($p < 0.01 \sim p < 0.001$). HKSM50 시료의 500 μg/ml 처리는 Control 수준으로 NF-κB의 함량을 감소시켰다. AHCC 시료 100 μg/ml도 HKSM50 시료 100 μg/ml과 유사한 결과를 나타내었다. 이 결과는 HKSM50 시료가 LPS로 활성화한 RAW 264.7 세포에서 NF-κB 활성을 down regulation함을 의미한다.

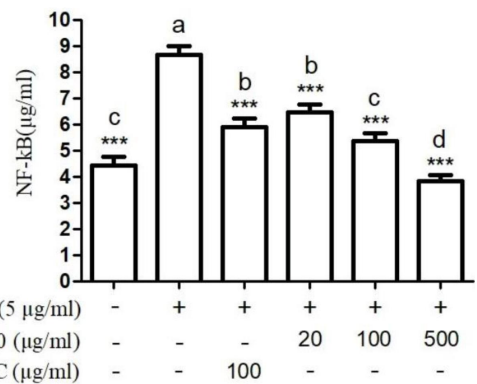


Fig. 4. Suppression of NF-κB production in LPS-treated RAW 264.7 cells by HKSM50. LPS-treated RAW 264.7 cells were incubated for 24 hr (5% CO₂, 37°C) with various concentrations of HKSM50. Supernatants were used for NF-κB concentration assay, using its ELISA kit. Star marks represent significant differences by t-test against LPS treatment (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, and ***, $p < 0.001$). Means with different letters represent significances at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. AHCC is a positive control.

HKSM50 시료의 염증 mediator인 NO 및 PGE₂ 함량 감소

LPS로 활성화한 RAW 264.7 세포에 HKSM50 시료(0, 20, 100, 500 μg/ml)를 처리하고 24시간 배양한 후 배양액의 NO와 PGE₂의 함량을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다(Fig. 5). Positive control로 AHCC 100 μg/ml를 처리하였다. LPS 처리에 비해 HKSM50 시료 처리는 NO와 PGE₂의 함량을 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰다($p < 0.01 \sim p < 0.001$). HKSM50 시료 500 μg/ml 처리는 NO와 PGE₂ 함량을 Control 수준으로 감소시켰다. AHCC 100 μg/ml도 동일한 농도의 HKSM50 시료 효과와 유사하였다.

HKSM50 시료에 의한 NO와 PGE₂의 함량 감소를 검

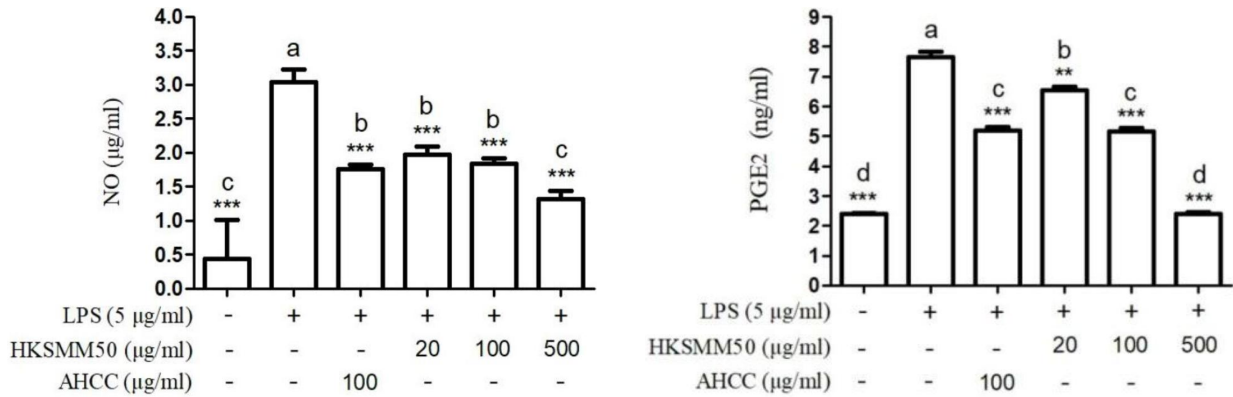


Fig. 5. Suppression of NO and PGE₂ productions in LPS-treated RAW264.7 cells by HKSM50 samples. LPS-treated RAW264.7 cells were incubated for 24 hr (5% CO₂, 37°C) with various concentrations of HKSM50 samples. Supernatants were used for NO and PGE₂ assays, using their corresponding ELISA kits. Star marks represent significant differences by t-test against LPS treatment (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, and ***, $p < 0.001$). Means with different letters represent significances at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. AHCC is a positive control.

증하기 위하여 LPS로 활성화한 RAW 264.7 세포에 HKSM50 시료(0, 20, 100, 500 µg/ml)를 처리하고 24시간 배양한 후 세포에 함유된 iNOS와 COX-2 protein 발현을 Western blotting으로 분석하였다(Fig. 6). Positive control인 AHCC 시료도 HKSM50 시료와 동일한 농도(0, 20, 100, 500 µg/ml)를 처리하였다. LPS 처리에 비해 HKSM50 처리는 iNOS와 COX-2 protein의 발현을 유의성 있게 감소시켰다($p < 0.001$). iNOS와 COX-2 protein의 발현은 HKSM50 시료 농도 의존적으로 유의성 있게 감소되었다($p <$

0.001). HKSM50 시료는 AHCC 시료보다 iNOS 및 COX-2 protein 발현을 더 강하게 억제하였다.

이들 결과는 HKSM50은 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2 protein 발현을 억제하여 NO와 PGE₂ 함량을 감소시켰음을 의미한다.

HKSM50 시료의 pro-inflammatory cytokines 감소

LPS로 활성화한 RAW 264.7 세포에 HKSM50 시료(0, 20, 100, 500 µg/ml)를 처리하고 24시간 배양한 후 배양액

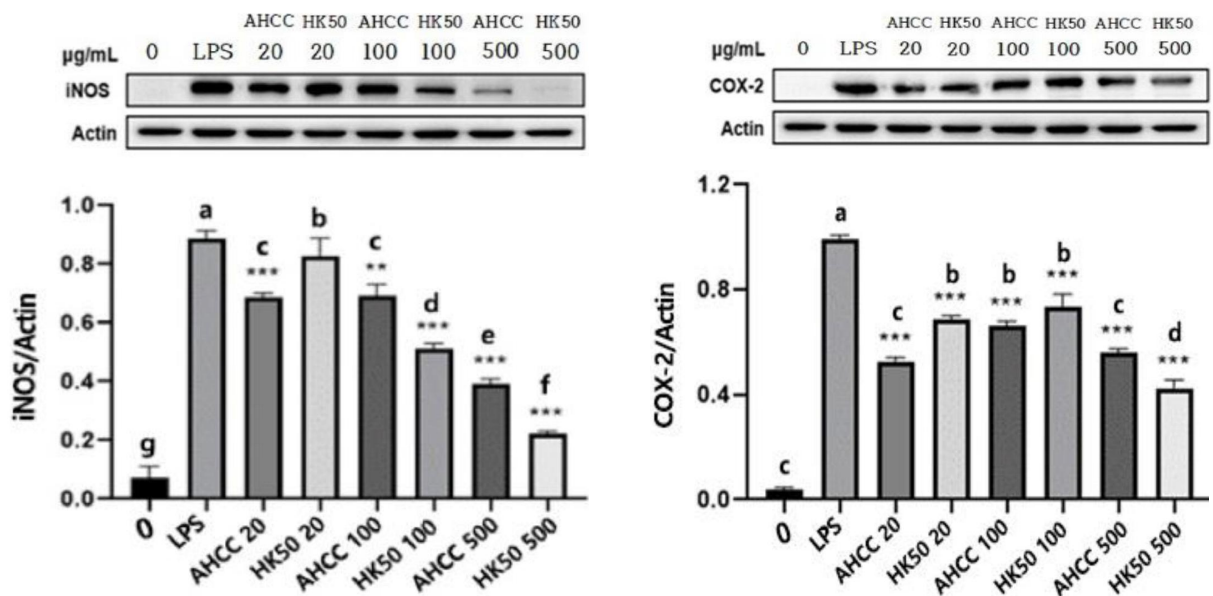


Fig. 6. Suppression of iNOS and COX-2 protein expressions in LPS-treated RAW264.7 cells by HKSM50 samples. LPS-treated RAW264.7 cells were incubated for 24 hr (5% CO₂, 37°C) with various concentrations of HKSM50 and AHCC samples. The iNOS and COX-2 protein expressions were measured in lysates of the cells by Western blotting. Star marks represent significant differences by t-test against LPS treatment (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, and ***, $p < 0.001$). Means with different letters represent significances at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

의 IL-1 β , TNF- α , IL-4 및 IL-6의 함량을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다(Fig. 7). Positive control로 AHCC 100 μ g/ml을 처리하였다.

LPS 처리에 비해 HKSMM50 시료 처리는 IL-1 β , TNF- α , IL-4 및 IL-6의 함량을 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰다($p < 0.05$ - $p < 0.001$). HKSMM50 시료 500 μ g/ml 처리는 Control 수준으로 TNF- α 와 IL-6의 함량을 감소시켰다. AHCC 100 μ g/ml 처리도 HKSMM50 시료 100 μ g/ml 처리 효과와 유사하였다. 이 결과는 HKSMM50 시료가 LPS로 활성화한 RAW 264.7 세포에서 IL-1 β , TNF- α , IL-4 및 IL-6의 함량을 감소시켰음을 의미한다.

HKSMM50 시료의 항산화효소 SOD 및 CAT 활성 증가

Fig. 8에서는 LPS로 활성화한 RAW 264.7 세포에 HKSMM50 시료(0, 20, 100, 500 μ g/ml)를 처리하고 24시간 배양한 후 배양액의 SOD와 CAT의 활성을 나타내고 있다. LPS 처리는 SOD 효소 활성을 Control 처리에 비해 유의성 있게 감소시켰다($p < 0.001$). 그러나 HKSMM50 처리는 SOD 활성은 Control 수준으로 증가시켰다. AHCC

처리 역시 유사한 결과를 보였다. CAT 효소 활성에서도 LPS 처리는 Control 수준으로 감소시켰지만($p < 0.001$), HKSMM50 처리는 농도 의존적으로 CAT 활성을 Control 수준으로 증가시켰다. AHCC 처리 결과도 동일한 HKSMM50 처리 농도와 유사하였다.

이 결과는 HKSMM50 시료는 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 SOD와 CAT의 활성을 증가시켜 항산화 효과가 있음을 의미한다.

고 찰

NF- κ B 신호전달을 통해 과도하게 생성된 NO와 PGE₂를 매개로 하는 염증반응은 다양한 질병과 관련이 있다. 따라서 본 연구에서는 HKSMM50 [β -glucan 15.4%, total flavonoid 1.98 mg/g 및 total isoflavonoid 1.42 mg/g 함유]의 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 항염증 효과를 연구하였다. HKSMM50은 NF- κ B의 활성을 낮추었고 (Fig. 4), iNOS 및 COX-2 protein 발현을 억제하여(Fig. 6), NO와 PGE₂의 함량을 감소시켰다(Fig. 5). 또한 pro-inflammatory

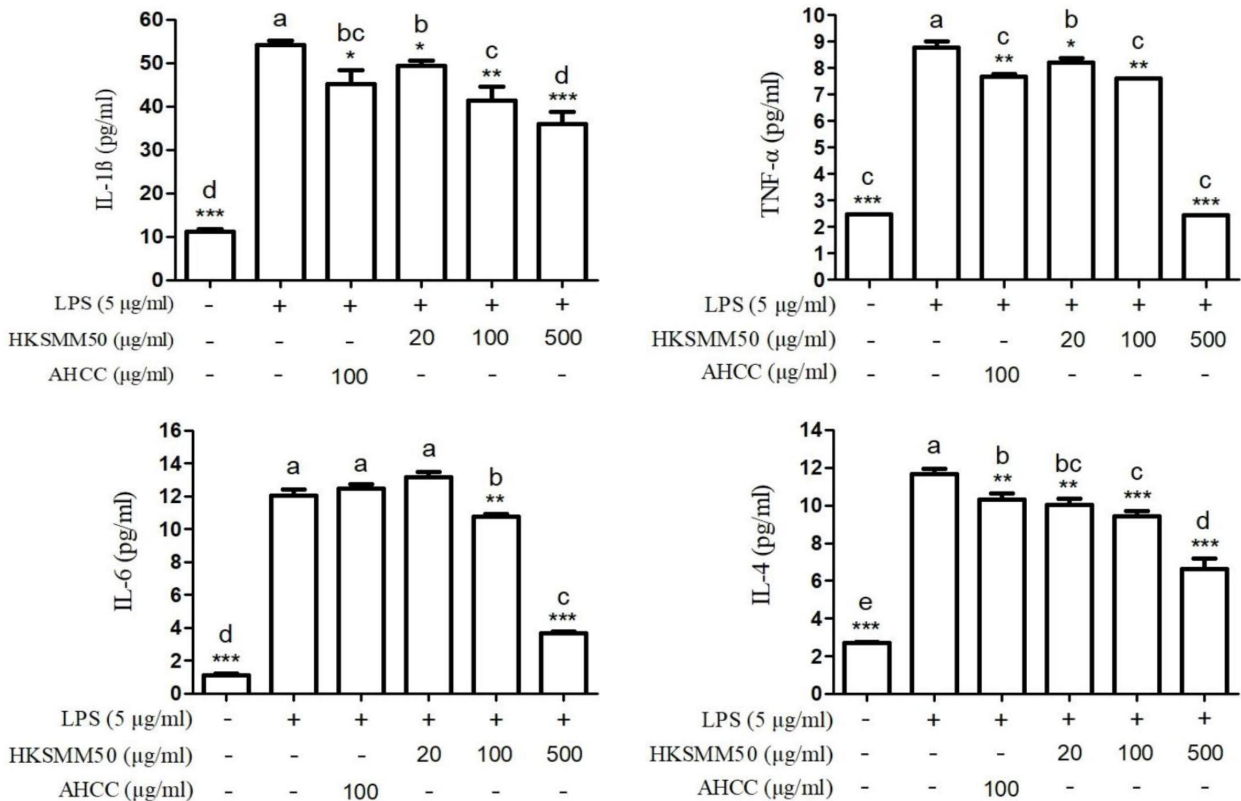


Fig. 7. Suppression of some pro-inflammatory cytokines in LPS-treated RAW 264.7 cells by HKSMM50 samples. LPS-treated RAW264.7 cells were incubated for 24 hr (5% CO₂, 37°C) with various concentrations of HKSMM50 samples. Supernatants were used for IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-4 assays, using their corresponding ELISA kits. Star marks represent significant differences by t-test against LPS treatment (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, and ***, $p < 0.001$). Means with different letters represent significances at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. AHCC was a positive control.

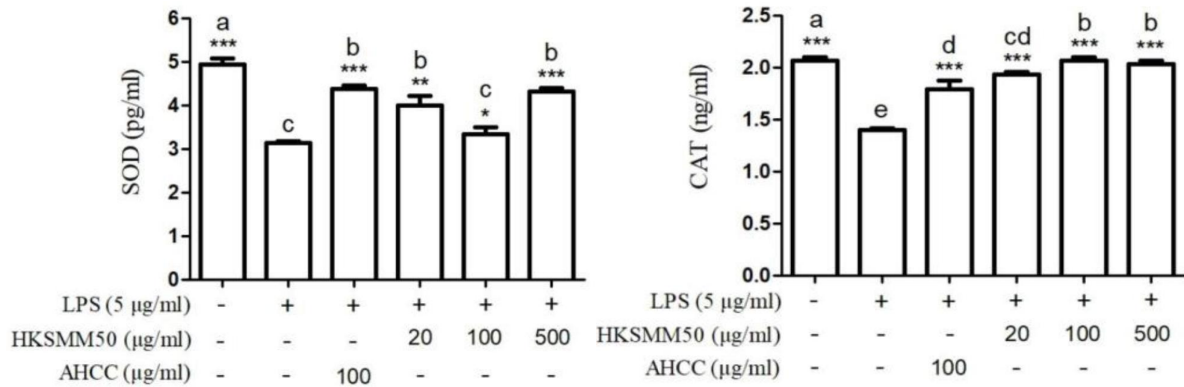


Fig. 8. Enhancements of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in LPS-treated RAW 264.7 cells by HKSMM50 samples. LPS-treated RAW264.7 cells were incubated for 24 hr (5% CO₂, 37°C) with various concentrations of HKSMM50 samples. Supernatants were used for SOD and CAT activity assays, using their corresponding ELISA kits. Star marks represent significant differences by t-test against LPS treatment (*, *p*<0.05; **, *p*<0.01, and ***, *p*<0.001). Means with different letters represent significances at *p*<0.05 by Duncan’s multiple range test. AHCC was a positive control.

cytokine인, IL-1β, TNF-α, IL-4 및 IL-6의 함량도 감소시켰다(Fig. 7). 반면에 HKSMM50는 항산화효소인 SOD와 CAT의 활성을 증가시켰다(Fig. 8). 따라서 HKSMM50는 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 핵 내의 NF-κB의 함량을 감소시켜, iNOS와 COX-2 유전자 발현 억제에 따른 NO 및 PGE₂의 생성을 감소시키고, pro-inflammatory cytokines의 생성을 억제하여 항염증효과를 나타내었다(Fig. 9).

LPS로 활성화시킨 RAW 264.7 세포는 다양한 버섯의 항염증 효과 연구에 사용되었다[10, 37]. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 표고버섯의 LNT가 NO와 TNF-α를 억제하여 항염증효과를 나타내었다[37], 표고버섯의 ethanol 추출물[10]과 표고버섯균사체의 열수추출물도 항염증 효과가 있음이 보고되었다[10]. 더불어, 다양한 버섯의 열수 추출물(동충하초, 꽃송이버섯, 영지버섯 및 잎새버섯)[13, 18, 17]과 ethanol 추출물(애린기버섯 양송이버섯, 느타리버섯, 만가닥버섯 차가버섯)[3, 21, 24, 31, 39, 41, 44]이 LPS로 활성화 된 RAW 264.7 세포에서 항염증효과가 있음이 보고되었다. 본 연구에서 50% ethanol 수용성 추출물인 HKSMM50의 항염증효과는 이들 연구결과와 유사하다.

RAW 264.7 세포의 iNOS 및 COX-2 유전자의 promoter 영역에는 NF-κB, AP-1, CCAAT-enhancer box protein (C/EBP), cAMP reaction element binding protein (CREB), interferon과 같은 전사인자 결합부위가 있다[40]. 이 중 NF-κB, AP-1은 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 iNOS 및 COX-2 유전자 발현에 필요하다[15]. 따라서 NF-κB는 핵으로 이동해서 iNOS와 COX-2의 발현을 up-regulation 시킨다[22]. Xu 등[42]은 표고버섯에서 분리한 LNT가 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells에서 MAP kinases, JNK1/2 및 ERK1/2를 활성화시켜 NF-κB (p65)의 핵으로의 이동을

억제하여 하였고, pro-inflammatory cytokines TNF-α와 NO를 억제하였다. 마찬가지로, 본 연구의 HKSMM50도 NF-κB의 활성을 억제하여 iNOS와 COX-2의 발현을 억제함으로써 NO 및 PGE₂의 생성을 감소시켜 염증반응을 억제하였다(Fig. 9). 즉, HKSMM50은 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell에서 NF-κB 활성을 down regulation하여 항염증효과를 보였다.

β-Glucan은 대식세포 표면에 존재하는 Dectin-1에 의해 주로 인식되고 TLR2에 의해서도 인식된다[2, 15, 30, 42]. Xu 등[42]은 표고버섯에서 유래한 LNT가 LPS로 자극하지 않은 RAW 264.7 세포의 Dectin-1과는 강하게, TLR2와는 약하게 결합하였으나 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 Dectin-1을 anti-Dectin-1 mAb (Dectin-1의 blocking)로 결합시킨 후에도 여전히 거의 동일하게 NO 생성을 억제하였다. 이 연구결과는 β-glucan이 Dectin-1 및 TLR2 receptor가 아닌 다른 β-glucan receptor와 결합함을 의미한다. Xu 등[43]은 LNT가 아닌 baker's yeast-derived β-glucan (BBG)도 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 Dectin-1이 아닌 TLR2와 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 불활성화를 통해 NO의 생성이 억제하였다고 보고하였다. 본 연구에서의 HKSMM50의 β-glucan은 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포의 어느 receptor와 결합하여 NF-κB의 활성을 down regulation하는지에 관해서는 더 연구를 하여야 할 것이다.

HKSMM50은 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 SOD와 CAT의 활성을 증가시켰다(Fig. 8). SOD는 체내에서 여러 생화학반응에 의해 생성되는 superoxide anion (O₂⁻)을 H₂O₂로 전환하는 항산화효소이고, CAT는 SOD나 다른 생화학반응에 의해 생성된 H₂O₂를 O₂와 H₂O로 전환하는 항산화효소이다. 따라서 이들 두 효소는 생체 내에서 reactive oxygen species (ROS)를 제거하여 oxidative

stress (OS)를 줄이는데 중요한 역할을 한다. 인체는 항산화계를 가지고 있으나 ROS를 완전히 제거하기에는 부족하다[1, 44]. 따라서 표고버섯 등에 포함되어 있는 nutraceuticals 및 pharmaceuticals를 섭취하여 ROS를 제거하고 있다[32, 34]. 표고버섯이나 표고버섯균사체에는 LNT, mannoglucan, polysaccharide protein complex, eritadenine, lentinacin, polyphenol 화합물과 같은 아주 다양한 생리활성물질을 포함하고 있다[1, 2, 4, 6, 7]. 표고버섯자실체 열수추출물, 다당체의 분자량에 따른 분획물, 다당체의 crude extract (LEP)와 표고버섯균사체 exudates (DE)의 항산화 효과는 주로 phenol 화합물에 기인한다고 보고되었다[19, 32, 34-36]. 따라서 본 연구에서 HKSMM50의 SOD 및 CAT 활성 증가효과는 폐놀성화합물(flavonoids, isoflavonoids 등) 등에 기인한다고 볼 수 있다. OS가 NF-κB 활성의 up-regulation에 관여하기 때문에[39], HKSMM50은 OS를 제거하여 NF-κB의 활성을 down regulation하여 항염증효과를 나타낸다고 볼 수 있다(Fig. 9).

결론적으로, 14% β-glucan과 폐놀화합물을 비롯한 다양한 생리활성물질을 함유한 HKSMM50은 LPS로 활성화한

RAW 264.7 세포에서 NF-κB 활성을 down-regulation하였다. 따라서 NF-κB가 세포질에서 핵으로의 이동이 감소되어 COX-2와 iNOS의 발현 억제로 PGE₂와 NO의 합성이 감소되었다. 또한 HKSMM50은 pro-inflammatory cytokine IL-1β, TNF-α, IL-2, IL-6의 합성을 억제하였으나 SOD와 CAT 효소 활성은 증가시켰다. 결과적으로, HKSMM50은 NF-κB 활성 down-regulation에 의해 항염증작용을 보였다(Fig. 9). 따라서, HKSMM50은 인체의 면역기능을 증진시키는 소재로 활용할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2021 경상남도 항노화미래선도사업지원사업의 지원을 받아 수행되었습니다. (주)HK바이오텍 김경은 연구원의 그래프 작도에 대해 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

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

References

1. Bisen, P. S., Baghel, R. K., Sanodiya, B. S., Thakur, G. S. and Prasad, G. B. K. S. 2010. Lentinus edodes: A macrofungus with pharmacological activities. *Curr. Med. Chem.* **17**, 2419-2430.
2. Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Komura, D. L., Marcon, R., Freitas, C. S., Baggio, C. H. and Santos, A. R. S. 2008. Lentinus edodes heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Food Chem.* **111**, 531-537.
3. Chien, R. C., Yang, Y. C., Lai, E. I. and Mau, J. L. 2016. Anti-inflammatory effects of extracts from the medicinal mushrooms *Hypsizygus marmoreus* and *Pleurotus eryngii* (Agaricomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms* **18**, 477-487.
4. Crespo, H., Guillén, H., de Pablo-Maiso, L., Gómez-Arrebola, C., Rodríguez, G., Glaria, I., de Andrés, D. and Reina, R. 2017. Lentinula edodes β-glucan enriched diet induces pro- and anti-inflammatory macrophages in rabbit. *Food Nutr. Res.* **61**, 141279.
5. Du, C., Bhatia, M., Tang, S. C., Zhang, M. and Steiner, T. 2015. Mediators of inflammation: Inflammation in cancer, chronic diseases, and wound healing. *Mediators Inflamm.* **2015**, 570653.
6. Du, B., Lin, C., Bian, Z. and Xu, B. 2015. An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucan. *Transds Food Sci. Technol.* **41**, 49-59.
7. Finimundy, T. C., José, A., Dillon, P., Antônio, J., Henriques, P. and Ely, M. R. 2014. A review on general nutritional compounds and pharmacological properties of the *Lentinula edodes* mushroom. *Food Nutr. Sci.* **5**, 1095-1105.
8. Fiorucci, S., Santucci, L., Wallace, J. L., Sardina, M.,

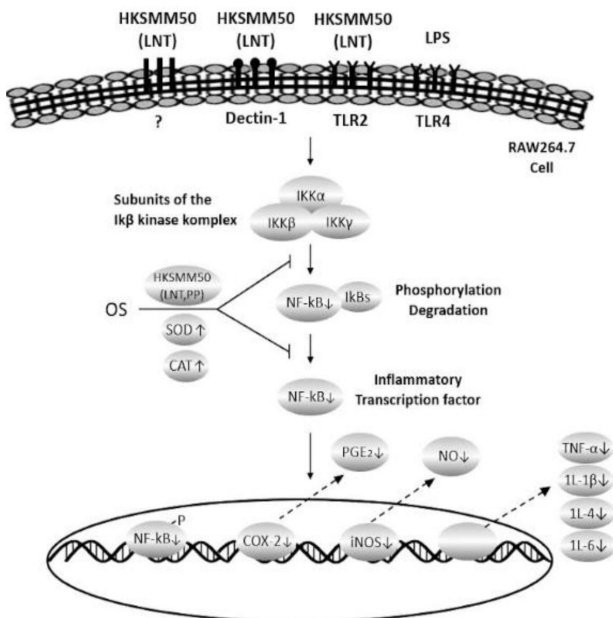


Fig. 9. A proposed mechanism by which HKSMM50 exhibited anti-inflammatory effects in LPS-treated RAW264.7 cells through down-regulation of NF-κB activation. HKSMM50 containing β-glucan (LNT) interacted with Dectin-1 and TLR2 and/or other receptor on the surface of the cells, resulting in the reduction of NF-κB translocation into nucleus from cytosol. These reactions decrease in iNOS and COX-2 protein expressions, and in pro-inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β, IL-4 and IL-6 productions. Antioxidant actions of HKSMM50 were also involved in this process through LNT and polyphenols (PP). OS represents oxidative stress.

- Romano, M., del Soldato, P. and Morelli, A. 2003. Interaction of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor with aspirin and NO-releasing aspirin in the human gastric mucosa. *PNAS* **100**, 10937-10941.
9. Garcia-Lafuente, A., Moro, C., Cillares, A., Guillamon, E., Rostagno, M. A., Arrigo, M. D. and Martinez, A. 2010. Mushrooms as a source of anti-inflammatory agents & anti-allergy agents. *Med. Chem.* **9**, 125-141.
10. Gunawardena, D., Bennett, L., Shanmugam, K., King, K., Williams, R., Zabarar, D., Head, R., Ooi, L., Gyengesi, E. and Münch, G. 2014. Anti-inflammatory effects of five commercially available mushroom species determined in lipopolysaccharide and interferon- γ activated murine macrophages. *Food Chem.* **148**, 92-96.
11. Guzik, T. J., Korbout, R. and Adamek-Guzik, T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 469-487.
12. Ha, Y. L., Kim, Y. S., Ahn, C. R., Kewon, J. M., Park, C. W., Ha, Y. K. and Kim, J. O. 2010. Mycelial culture of *Lentinus edodes* alleviates rat liver toxicity induced by carbon tetrachloride and ethanol. *J. Life Sci.* **20**, 133-141.
13. Han, H. S. 2021. Effect of water extract of *Sparasis crispa* on the expression of TNF- α , iNOS and IL-1 β genes in RAW 264.7 cells. *J. Kor. Soc. Integr. Med.* **9**, 163-171.
14. Jang, W. J., Kim, Y. S., Ha, Y. L., Park, C. W., Ha, Y. K. and Kim, O. K. 2010. Optimal level for the protection of carbon tetrachloride-induced Sprague-Dawley rat liver damage by mycelial cultures of *Lentinus edodes*. *J. Life Sci.* **20**, 782-788.
15. Jedinak, A., Dudhgaonkar, S., Wu, O. L., Simon, J. and Slival, D. 2011. Anti-inflammatory activity of edible oyster mushrooms is mediated through the inhibition of NF- κ B and AP-1 signaling. *Nutr. J.* **10**, 52. DOI: 10.1186/1475-2891-10-52.
60. Kim, J. I. 2009. Efficacy of the blood lipid improvement, antioxidant, and liver function improvement of shiitake mushroom mycelium powder in the high alcohol intake group. Inje University. Final report.
17. Kim, D. H., Park, S. R., Debnath, T., Hasnat, A., Pervin, M. and Lim, B. O. 2013. Evaluation of the antioxidant activity and anti-inflammatory effect *Hericium erinaceus* water extracts. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **21**, 112-117.
18. Kuo, M. C., Weng, C. Y., Ha, C. L. and Wu, M. J. 2006. *Ganoderma lucidum* mycelia enhance innate immunity by activating NF- κ B. *J. Ethnopharmacol.* **103**, 217-222.
19. Lee, J. W. 2014. Antioxidant and immunological activities of polysaccharide extracted from cultured mycelia of *Schizophyllum commune*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **49**, 1334-1341.
20. Libby, P., Ridker, P. M. and Maseri, A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1135-1143.
21. Lin, J. T., Liu, C. W., Chen, Y. C., Hu, C. C., Juang, L. D., Shiesh, C. C. and Yang, D. J. 2014. Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties for ethanolic extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting bodies harvested at different time. *LWT-Food Sci. Technol.* **55**, 374-382.
22. Liu, T., Zhang, L., Ju, D. and Sun, S. C. 2017. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2**, e17023.
23. Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F. and Yao, Y. M. 2014. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 520-529.
24. Ma, L., Chen, H., Dong, P. and Lu, X. 2013. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chem.* **139**, 503-508.
25. Mann, J. R., Backlund, M. G. and DuBois, R. N. 2005. Mechanisms of disease: Inflammatory mediators and cancer prevention. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2**, 202-210.
26. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A. and Locati, M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* **13**, 453-461.
27. Ministry of Food and Drug Safety. 2022. Standards and specifications of health functional foods. 3-25(237p), 3048 (361p) and 3-53(388p).
28. Ministry of Food and Drug Safety. 2010. HK shiitake mushroom mycelium. Certificate of health functional food ingredient for liver health. 2010-35.
29. Nagappan, A., Varghese, J., Pranesh, G. T., Jeyaseelan, V. and Jacob, M. 2014. Indomethacin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase in the rat kidney: possible role of this effect in the pathogenesis of indomethacin-induced renal damage. *Chem. Biol. Interact.* **25**, 77-87.
30. Park, S. O. and Kim, J. M. 2012. Functional food for immune regulation - beta-glucan. *Food Sci. Ind.* **45**, 39-47.
31. Park, Y. M., Won, J. H., Kim, Choi, W., Park, H. J. and Lee, K. T. 2005. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. *J. Ethnopharmacol.* **101**, 120-128.
32. Parola, S., Chiodaroli, L., Orlandi, V., Vannini, C. and Panno, L. 2017. *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*: functional food with antioxidant-antimicrobial activity and an important source of Vitamin D and medicinal compounds. *Funct. Foods Health Dis.* **7**, 773-794.
33. Raha, S., Lee, H. J., Hong, G. E., Venkatarama, V., Saralamma, G., Ha, Y. L., Kim, J. O., Kim, Y. S., Heo, J. D., Lee, S. J., Kim, E. H. and Kim, G. S. 2016. Vitamin D2 suppresses amyloid- β 25-35 induced microglial activation in BV2 cells by blocking the NF- κ B inflammatory signaling pathway. *Life Sci.* **161**, 37-44.
34. Robaszkiewicz, A., Bartosz, G., Lawryniewicz, M. and Soszynski, M. 2010. The role of polyphenols, beta-carotene, and lycopene in the antioxidative action of the extracts of dried, edible mushrooms. *J. Nutr. Metab.* **2010**, 173274. doi: 10.1155/2010/173274.
35. Rodrigues, M. L. 2018. The multifunctional fungal ergosterol. *ASM J.* **9**, 01755-18.
36. Sajon, S. R., Sana, S., Rana, S., Mushiur, S. M. and Nishi, X. M. 2018. Mushrooms: Natural factory of anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic and nutrition. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **7**, 464-475.

37. Seo, K. H., Park, J. Y., Noh, H. J., Lee, J. Y., Lee, E. Y., Han, J. G., Kim, J. H. and Cheong, M. S. 2018. Anti-inflammatory effects of various mushrooms in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Kor. J. Plant Res.* **31**, 478-488.
38. Takanari, J., Hirayama, Y., Homma, K., Miura, T., Nishioka, H. and Maeda, T. 2015. Effects of active hexose correlated compound on the seasonal variations of immune competence in healthy subjects. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* **20**, 28-34.
39. Taofiq, O., Calhelha, R. C., Heleno, S., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., Queiroz, M. J. R. and Ferreira, I. C. 2015. The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Food Res. Int.* **76**, 821-827.
40. Trianthi, P. and Aggarwal, A. 2006. NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Curr. Sci.* **90**, 519-531.
41. Van, Q., Nayak, B., Reimer, M., Jones, P., Fulcher, R. and Rempel, C. 2009. Anti-inflammatory effect of *Inonotus obliquus*, *Polygala senega* L., and *Viburnum trilobum* in a cell screening assay. *J. Ethnopharmacol.* **125**, 487-493.
42. Xu, X., Yasuda, M., Nakamura-Tsuruta, S., Mizuno, M. and Ashida, H. 2012. beta-Glucan from *Lentinus edodes* inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor- α production and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated murine RAW 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem.* **287**, 871-878.
43. Xu, X., Yasuda, M., Mizuno, M. and Ashida, H. 2012. β -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* **820**, 1656-1663.
44. Yoon, H. M., Jang, K. J., Han, M. S., Jeong, J. W., Kim, G. Y., Lee, J. H. and Choi, Y. H. 2013. *Ganoderma lucidum* ethanol extract inhibits the inflammatory response by suppressing the NF- κ B and toll-like receptor pathways in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Exp. Therap. Med.* **5**, 957-963.

초록 : LPS로 활성화한 RAW 264.7 세포에서 HK표고버섯균사체의 NF- κ B 활성 억제를 통한 항염증 효과

송채영¹ · 오태우² · 김훈환³ · 이유빈¹ · 김정옥¹ · 김곤섭³ · 하영래^{1*}

(¹주) HK바이오텍, ²한국한의약연구원, ³경상국립대학교 수의과대학)

HK표고버섯균사체(HK shiitake mushroom mycelium, HKSMM)는 간 건강 개별 인정 건강기능식품이다. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 HKSMM50 (HKSMM의 50% ethanol 수용액 추출물)의 항염증효과를 연구하였다. AHCC는 positive control로 사용하였다. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에 HKSMM50 및 AHCC를 처리(0, 20, 100, 500 μ g/ml)하고 24시간 배양하여 배양물의 염증 관련 인자는 ELISA kits로, 세포에 함유된 iNOS와 COX-2 protein 발현은 Western blotting으로 측정하였다. HKSMM50는 LPS 처리에 비해 농도 의존적으로 NF- κ B 함량을 낮추었고, iNOS와 COX-2 protein 발현을 억제하여 NO와 PGE₂ 함량을 낮추었다. 더불어 HKSMM50는 LPS 처리에 비해 IL-1 β , TNF- α , IL-4 및 IL-6의 함량을 낮추었으나 SOD와 CAT의 활성은 증가시켰다. AHCC도 HKSMM50 처리와 비슷한 효과를 나타내었다. 이 결과는 HKSMM50이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 신호전달을 억제하여 항염증효과를 나타내었으며, HKSMM은 면역 기능증진에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품원료로 사용할 수 있을 것이다.