

## HK Shiitake Mushroom Mycelium Exhibits Immune Functions in ConA-Treated Human Jurkat Cells Through NFAT Activation

Tae Woo Oh<sup>2</sup>, Yun Gu Moon<sup>3</sup>, Hun Hwan Kim<sup>4</sup>, Gon Sup Kim<sup>4</sup>, Jeong Ok Kim<sup>1</sup> and Yeong Lae Ha<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>HK Biotech. Co., Ltd., Jinju 52840, Korea

<sup>2</sup>Korea Institute of Oriental Medicine, Daegu 41062, Korea

<sup>3</sup>Korea Institute of Toxicology, Jinju 52840, Korea

<sup>4</sup>College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea.

Received March 7, 2022 /Revised September 21, 2022 /Accepted September 23, 2022

HK shiitake mushroom mycelium (HKSMM), containing 14%  $\beta$ -glucan, is a health functional food ingredient approved individually for liver health by the Ministry of Food and Drug Safety. The immune-enhancing efficacy of a 50% aqueous ethanol extract of HKSMM (designated HKSMM50) was studied in Jurkat cells activated with concanavalin A (ConA). Active hexose correlated compound (AHCC) was used as a positive control. ConA-activated Jurkat cells were treated with HKSMM50 (0, 25, 50, 100  $\mu$ g/ml) or AHCC (100  $\mu$ g/ml), and cultured for 3 and 6 hours. The nuclear factor of activated T cells (NFAT) protein content in the cytosol and the nucleus was measured by Western blotting. Interleukin-2 (IL-2), interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), and cyclooxygenase-2 (COX-2) were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. HKSMM50 lowered NFAT content in the cytosol, but elevated NFAT content in the nucleus. The IL-2 and IFN- $\gamma$  productions were elevated. Meanwhile, both COX-2 activity and apoptosis were suppressed. The efficacy of the AHCC treatment showed similar to those of HKSMM50 treatments. These results indicate that the HKSMM50 exhibited immune-enhancing effects in ConA-treated Jurkat cells by activation of NFAT protein, and suggest that HKSMM could be used as a health functional food ingredient to improve immune functions in humans.

**Key words :** HK shiitake mushroom mycelium, IFN- $\gamma$ , IL-2, Jurkat cells, NFAT

### 서 론

표고버섯 자실체와 균사체에는 다양한 nutraceuticals와 pharmaceuticals를 함유하고 있어 건강기능성 식품 및 대체 의약품으로 사용되고 있다[4, 10, 33, 36]. 이들은 anti-tumor, immunomodulatory, cardiovascular, hypolipidemic, hepatoprotective, heaglutinating, antioxidant 효과와 antimicrobial, antiviral, antibacterial 및 antifungal 효과도 있음이 보고되었다[4, 6, 10, 36]. 표고버섯이나 표고버섯균사체에 함유된 생리활성물질 중  $\beta$ -glucan인 lentiann ( $\beta$ -1,6:  $\beta$ -1,3-glucan; LNT)과 단백질다당체(protein-bound polysaccharides, PBP)가 면역활성에 중요한 역할을 한다[4, 6, 10, 33]. LNT는 immunopotentiator로서, immunomodulatory, antitumor,

anti-inflammatory, antibacterial, antivirus 등의 역할을 한다 [9, 28, 31, 39].

HK표고버섯균사체(HK shiitake mushroom mycelium: HKSMM)는 표고버섯균사체를 보리배지에 고체배양한 다음, 열풍건조, 분말화한 것과 표고버섯균사체를 탈지대 두분을 주원료로 하는 액체배지에서 배양한 다음, 건조, 분말화한 것을 혼합(2:1, w/w)한 것으로  $\beta$ -glucan이 14% 함유되어 있는 한국식품의약품안전처의 개별인정 형 간 건강 건강기능 식품원료로 인정되었다[30]. HKSMM은 CCl<sub>4</sub> 및 ethanol로 간 독성을 유발한 rat에서 glutamate-oxalate transaminase (GOT), glutamate-pyruvate transaminase (GPT), lactic dehydrogenase (LDH) 활성을 감소시켰고, 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD)와 catalase 활성을 증가시켜 간 기능 보호 효과가 확인되었다[13, 17]. 또한, 장기간 알코올을 섭취하는 한국인의 간 기능 개선에 도움이 될 수 있음이 밝혀졌다[22]. 최근 HKSMM은 Balb/c female mouse에서 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) 활성을 억제하여 항염증 효과가 있음이 보고되었고[21], HKSMM의 50% 수용성 ethanol 추출물(HKSMM50)은 RAW 264.7 murine macrophage 세포에서도 NF- $\kappa$ B 활성을

#### \*Corresponding author

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

E-mail : [bestintheworld1080@gmail.com](mailto: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.

down-regulation하는 항염증 효과도 보고되었다[37].

Jurkat cells는 immortalized T cell lymphocyte로 버섯 유래  $\beta$ -glucan 및 다양한 생리활성 물질의 면역활성 연구에 사용되고 있다[2, 16, 18, 26, 27, 34, 43, 44, 46, 47]. Mitogen 인 concanavalin A (ConA)가 Jurkat cells의 T-cell receptor (TCR)에 결합하여 활성화되면 transcription factors인 nuclear factor of activated T cells (NFAT), NF- $\kappa$ B 및 activator protein 1 (AP-1; c-Fos와 c-Jun의 복합체)이 활성화되어 interleukin 2 (IL-2), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) 등의 immunoregulatory cytokines을 생성한다[7, 18, 46]. 따라서 Jurkat cells에서 IL-2 및 IFN- $\gamma$ 의 증가는 면역활성의 지표로 활용되고 있다. 그러나, Jurkat cells에서 표고버섯이나 표고버섯균사체의 면역증강 효과에 관한 연구는 문헌에서 찾아보기 쉽지 않다. 따라서 Jurkat cells에서  $\beta$ -glucan을 14% 함유한 HKSMM의 면역기능 증진 효과를 연구할 필요가 있다.

본 연구에서는 HKSMM의 면역증진 효과를 규명하기 위하여 HKSMM의 50% ethanol 수용액 추출물(HKSMM 50)을 ConA로 활성화한 Jurkat cells에 처리하여 면역증진 효과(IL-2와 IFN- $\gamma$  생성 증진)를 연구하였다. 현재 면역증강 물질로 사용되고 있는 active hexose correlated compound (AHCC)를 positive control로 사용하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

HKSMM은 (주)HK바이오텍(Jinju, Korea), AHCC는 KCFKOREA (Seoul, Korea)로부터 구입하였다. Jurkat cells은 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), bovine serum albumin (BSA), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640은 Gibco사(Waltham, MA, USA) 및 concanavalin A (ConA)와 dimethylsulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide] assay kit는 Enzo Life Sciences (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. Cell proliferation을 위한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) BrdU assay kit, propidium iodide (PI), Western blotting detecting reagents, pierce bicinchoninic acid protein assay kit, NFAT primary antibody (anti-NFAT antibody),  $\beta$ -actin mouse polyclonal antibody 및 anti-goat IgG conjugated horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. Human IL-2 ELISA kit (Invitrogen Co. Seoul, Korea), human IFN- $\gamma$  ELISA kit (Bioscience Co., Seongnam, Korea) 및 human cyclooxygenase-2 (COX-2) ELISA kit (Invitrogen사)를 사용하였다. NE-PER nuclear/

cytoplasmic extraction reagent kit, lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% deoxycholate; 1 mM EDTA; 1 mM methyl sulfoxide fluoride; 1  $\mu$ g/ml aprotinin), Tris-buffered saline (TBS; 0.1 M Tris/0.15 M NaCl buffer solution, 0.05% Tween-20)는 Thermo Fisher Scientific 사 (Seoul, Korea) 및 enhanced chemiluminescence kit (ECL)는 Bio-Rad사(Hercules, CA, USA)로부터 구입하였다. 그 외 사용된 시약은 reagent grade 이상이었다.

### HKSMM 시료의 50% ethanol 수용액 추출물(HKSMM 50) 제조

HKSMM (100 g)을 50% ethanol 수용액 1 l에 첨가하고 충분히 혼합한 후 over night 방치하였다. 혼합기로 균질화하고 원심분리(7,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30 min)하여 얻은 상등액의 ethanol을 진공농축(50 $^{\circ}$ C)하여 제거하고 동결건조하여 HKSMM50 시료 갈색분말(45.4 g)을 얻었다[37].

### 세포배양

Jurkat cells은 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml)을 함유한 RPMI 1640 배지에서 배양(5% CO<sub>2</sub> incubator, 37 $^{\circ}$ C)하였다. Cells은 75 cm<sup>2</sup> Falcon flask (Glendale, AZ, USA)에서 충분히 증식한 후 3일 간격으로 incubator (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 계대배양하였다.

### Cell viability 측정

배양된 Jurkat cells ( $2 \times 10^3$  cells/100  $\mu$ l)을 96 well plate의 well에 분주하여 24시간 배양(37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)하고, HKSMM 50 및 AHCC 시료 용액(0, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1,000  $\mu$ g/ml) 100  $\mu$ l를 처리한 후 다시 24시간 배양하고 배양물을 제거하였다. 여기에 MTT 시약(RPMI 1640 medium으로 5배 희석) 100  $\mu$ l 분주하고 1시간 반응시켰다(37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>). 상등액을 제거한 후 DMSO 100  $\mu$ l를 첨가하여 살아있는 세포에 의해 생성된 formazan을 용해하여 ELSA microreader (SpectraMax i3, Molecular devices: San Jose, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Cell proliferation 측정

BrdU assay에 의한 cell proliferation은 제조사(Santa Cruz 사)의 방법에 준하여 분석하였다. 즉, 배양된 세포( $2 \times 10^3$  cells/90  $\mu$ l)를 96 well plate의 well에 분주하고 24시간 배양(37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)하였다. 여기에 HKSMM50 시료 용액(0, 250, 500, 1,000  $\mu$ g/ml) 100  $\mu$ l 및 AHCC 시료 용액(1,000  $\mu$ g/ml) 100  $\mu$ l 처리하고 3시간 또는 6시간 배양(37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)하였다. 또한 24시간 배양된 cells에 ConA 용액(500  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l 처리 1시간 후에 HKSMM50 시료 용액(0, 500, 1,000, 2,000  $\mu$ g/ml) 및 AHCC 시료 용액(2,000  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l를 처리하고 3시간 또는 6시간 배양하였다. 이들 시료처

리 배양물에 BrdU 용액 10  $\mu$ l 처리하여 3시간 배양(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)하였다. 원심분리(300 g, 10 min)하여 상등액을 제거한 후, 1시간 건조(60°C)하고, FixDent 시약 200  $\mu$ l를 첨가하고 실온에서 고정하였다. 고정액을 제거하고 anti-BrdU-POD working solution 100  $\mu$ l 첨가하고 실온에서 반응(90 min)시켰다. 세척 후 substrate solution 100  $\mu$ l 첨가하여 반응 시킨 후 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 종결 시키고 ELISA microreader (SpectraMax i3, Molecular devices)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 cell proliferation을 측정하였다.

### Biomarkers 및 NFAT protein 측정

배양된 Jurkat cells을 24 well plate의 well에  $1 \times 10^5$  cells/900  $\mu$ l를 분주하여 24시간 배양(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)하고, ConA (1,000  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l 처리 1시간 후에 HKSMM50 및 AHCC 시료 용액(0, 500, 1,000, 2,000  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l 처리하고 3시간 또는 6시간 배양하였다. 배양물을 원심분리(10,000 rpm, 5 min)한 후 상등액은 IL-2, IFN- $\gamma$  및 COX-2 측정에 사용하였고(ELIZSA kit 사용), 3시간 배양하여 얻은 침전물 cells은 NFAT protein 측정에 사용하였다.

Cells의 NFAT protein은 Jara 등[18]의 방법에 준하여 분석하였다. NE-PER nuclear/cytoplasmic extraction reagent kit를 사용하여 nuclear와 cytosol을 분리하고 lysis buffer로 lysis 시키고 원심분리(12,000 rpm, 20 min)하여 protein을 분리 및 정량(Pierce bicinchoninic acid protein assay kit)하였다. Protein (30  $\mu$ g)을 8~15% SDS-PAGE로 분리하고, NC membrane으로 transfer하여 5% BSA로 실온에서 1시간 blocking하였다. Membrane에 NFAT primary antibody (anti-NFAT1 antibody)를 처리하고 4°C에서 over night 반응시킨 후 TBS로 3회 세척하였다. 다시 anti-IgG conjugated HRP 항체를 처리하고 1시간 실온에서 반응 시키고 TBS로 3회 세척하였다. ECL을 처리하고 ChemiDoc TM touch imaging system (BioRad, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

### Apoptosis 측정

Jurkat cell apoptosis는 세포의 DNA를 PI로 염색한 후 flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences: San Jose, CA, USA)를 이용하여 형광을 측정하였다. Jurkat cells 배양 및 시료(ConA 처리 포함) 처리는 상기 Biomarker 측정과 동일한 방법으로 처리하여 3시간 및 6시간 배양(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)하였다. 원심분리하여 회수한 세포는 phosphate-buffered saline (PBS)으로 2회 세척하고 세포( $1 \times 10^6$  cells)의 DNA는 PI용액 600  $\mu$ l로 20분 반응시키고 flow cytometry로 분석하였다. 유세포분석에서 얻은 data 분석은 CellQuest Software (Becton Dickinson, San Jose: CA, USA)을 이용하여 분석하였다.

### $\beta$ -Glucan, total flavonoids 및 total isoflavonoids 함량 분석

HKSMM50 시료의  $\beta$ -glucan, total flavonoids 및 total isoflavonoids 함량은 건강기능식품 기준 및 규격의 3-25 베타글루칸, 3-48 총플라보노이드, 3-53 대두이소플라본 분석법에 준하여 분석하였다[29]. 그 결과 HKSMM50 시료에  $\beta$ -Glucan은 15.4%, total flavonoids은 1.98 mg/g 및 total isoflavonoids는 1.42 mg/g 함유되어 있었다.

### 통계처리

Data는 3반복 결과를 mean  $\pm$  SD (표준편차)로 표시하였다. Data 분석은 ANOVA를 통하여 분석하고 Duncan's multiple range test 또는 Student's t-test로 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### HKSMM50의 Jurkat cells에 대한 cytotoxicity

HKSMM50 시료의 Jurkat cell에 대한 cytotoxicity는 MTT assay로 측정하였다[40]. MTT assay는 살아 있는 세포의 대사 능력을 측정하는 방법이다. 세포의 대사 활동에 의해 tetrazolium salt로부터 formazan dye를 형성하는 능력을 측정하는 원리로, salt 자체가 cytotoxicity를 가지고 있어 장기간 처리시 세포에 영향을 받을 수 있는 단점이 있지만, 시료의 cytotoxicity측정에 많이 활용된다. 따라서 본 연구에서도 HKSMM50의 Jurkat cells에 대한 cytotoxicity를 MTT assay로 측정하였다.

Jurkat cells에 HKSMM50 및 AHCC 시료(0~100  $\mu$ g/ml)를 처리하고 24시간 배양한 후 MTT assay로 cytotoxicity를 측정하였다(Fig. 1). HKSMM50 시료의 처리 최고 농도인 100  $\mu$ g/ml 처리에서도 cytotoxicity는 없었다(Fig. 1, Left panel). Positive control인 AHCC 처리 최고 농도인 100  $\mu$ g/ml에서도 cytotoxicity는 나타나지 않았다(Fig. 1, Right panel). 따라서, 이들 결과는 Jurkat cells 실험에 HKSMM50과 AHCC를 100  $\mu$ g/ml 농도까지 사용할 수 있음을 의미한다.

HKSMM50 시료에 함유되어 있는 성분 중 가장 함량이 높은  $\beta$ -glucan은 T cell에 대한 세포독성이 아주 낮다고 보고되었다[34, 43]. 따라서,  $\beta$ -Glucan, total flavonoids와 total isoflavonoids를 포함한 HKSMM50 시료 100  $\mu$ g/ml까지는 Jurkat cells에 독성이 없음을 의미한다

### Jurkat cell proliferation에 대한 HKSMM50의 영향

Jurkat cells의 proliferation은 BrdU assay로 측정하였다[1]. BrdU assay는 새로이 합성된 DNA 양을 측정하는 방법으로 새로이 합성된 DNA-Br를 BrdU specific antibody를 이용하여 colorimetric으로 측정하는 방법이다. HKSMM50 시료의 Jurkat cell proliferation을 측정하기 위하여 ConA로

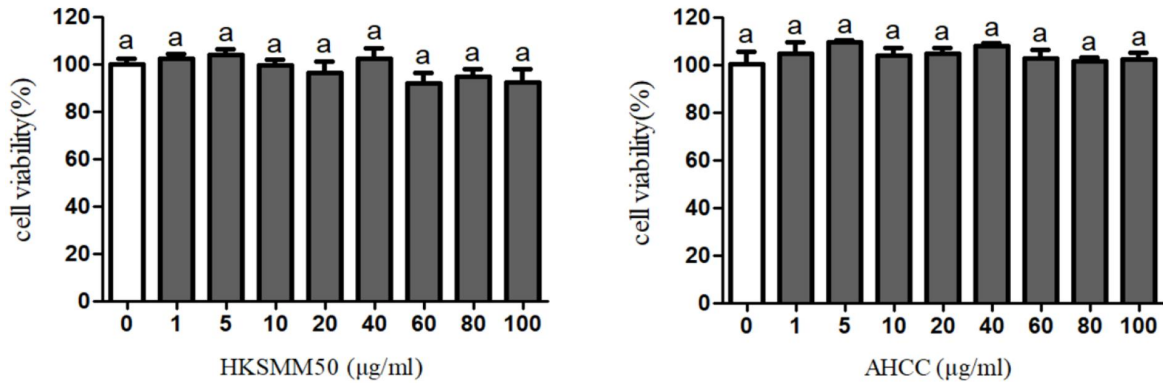


Fig. 1. Viability of Jurkat cells treated with various concentrations of HKSMM50 (Left panel) and AHCC (Right panel) samples. The cells were incubated for 24 hr in an incubator (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) with samples. No significant difference was seen between all treatments by Duncan’s multiple range test.

활성화되지 않은 Jurkat cells과 활성화된 Jurkat cells에 HKSMM50 시료(0, 25, 50 및 100 µg/ml)를 처리하고 다시 3시간 및 6시간 배양한 후 proliferation을 BrdU assay kit로 측정하였다. Positive control인 AHCC의 농도는 100 µg/ml를 사용하였다.

Fig. 2는 ConA를 처리하지 않은 Jurkat cell proliferation을 나타내고 있다. 3시간 처리에서(Fig. 2, Left panel), HKSMM50 시료 처리에 의한 proliferation은 Control 처리에 비해 유의성 있게 증가되었다( $p < 0.05$ ). 6시간 처리에서의 cell proliferation (Fig. 2, Right panel)은 Control보다 증가하였지만( $p < 0.05$ ), 그 효과는 3시간 처리보다 낮았다. AHCC와 HKSMM50 시료의 동일한 농도에서의 cell proliferation은 차이가 없었으나, 6시간 처리에서 AHCC가 HKSMM50보다 높았다( $p < 0.05$ ). 이와 같은 결과는 HKSMM50 시료 처리(25~100 µg/ml; 3시간 및 6시간)가 Jurkat cells의 proliferation을 유도함을 의미한다.

Fig. 3은 ConA로 활성화 시킨 Jurkat cells의 proliferation을 나타내고 있다. 3시간(Fig. 3, Left panel) 및 6시간(Fig.

3, Right panel) 처리에서, ConA 처리에 의한 cell proliferation은 Control 보다 높았다( $p < 0.01$ ). ConA 처리에 비해 HKSMM50 시료 처리에 의한 cell proliferation은 처리 농도 간에는 큰 차이가 없었으나 100 µg/ml 처리에서 만 유의성이 있었다( $p < 0.01$ ). AHCC (100 µg/ml)에 의한 cell proliferation은 동일한 농도의 HKSMM50 시료의 proliferation보다 낮았다( $p < 0.05$ ). 이 결과는 HKSMM50 시료 처리(100 µg/ml; 3시간 및 6시간)는 ConA로 활성화한 Jurkat cell의 proliferation을 증가시켰음을 의미한다.

### Jurkat cells의 NFAT protein 활성화에 대한 HKSMM50의 영향

ConA가 Jurkat cells의 TCR에 결합하면 NFAT, NF-κB와 AP-1이 활성화되어 IL-2 및 IFN-γ mRNA 등의 발현을 유도한다[7, 18, 46]. 따라서 IL-2 및 IFN-γ 등의 생성은 면역 증진의 지표로 활용되고 있다. 따라서 Jurkat cells에서 NFAT protein의 cytosol과 nuclear 분포를 측정하기 위하여 ConA로 활성화한 Jurkat cells에 HKSMM50 시료(0, 25, 50

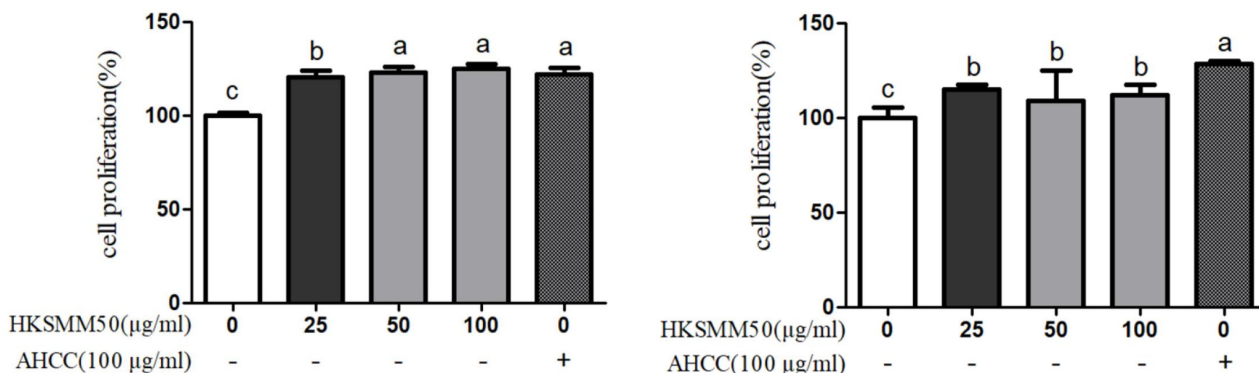


Fig. 2. Proliferations of Jurkat cells treated with HKSMM50 samples for 3 hr (Left panel) and 6 hr (Right panel) incubation. Means with different letters represent significances at  $p < 0.05$  by Duncan’s multiple range test. AHCC represents a positive control.

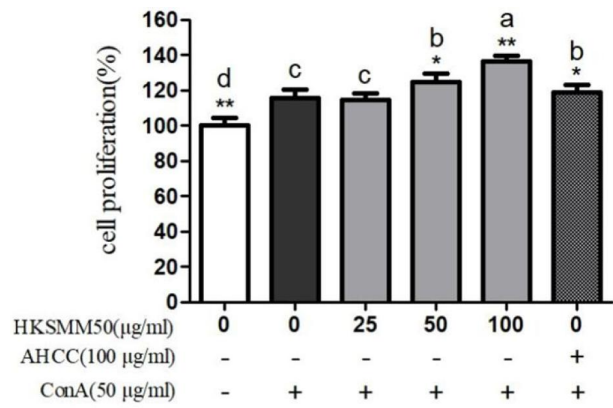
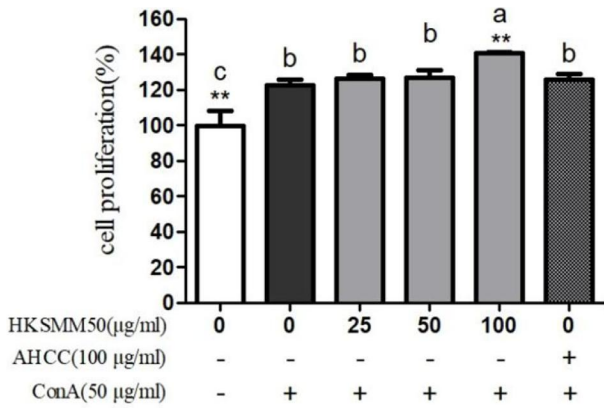


Fig. 3. Proliferation of ConA-treated Jurkat cells by HKSSM50 samples for incubations of 3 (Left panel) and 6 hr (Right panel). Means with different letters represent significances at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Means with star marks represent significant differences (\*,  $p < 0.05$ ; and \*\*,  $p < 0.01$ ) against ConA treatment by t-test. AHCC represents a positive control.

및 100 µg/ml 및 AHCC (100 µg/ml)를 처리하여 3시간 및 6시간 배양하고 세포를 회수하여 cytosol과 nuclear에 함유된 NFAT protein 함량을 Western blotting으로 측정하였다(Fig. 4, Fig. 5).

Fig. 4는 cytosolic NFAT/β-actin 비를 나타내고 있다. 이 비는 Control에서 1.7이였으나 ConA 처리로 1.3으로 감소하였다. 이것은 ConA 처리로 NFAT protein이 cytosol로부터 nuclear로 옮겨 갔음을 의미한다. HKSSM50 시료 25

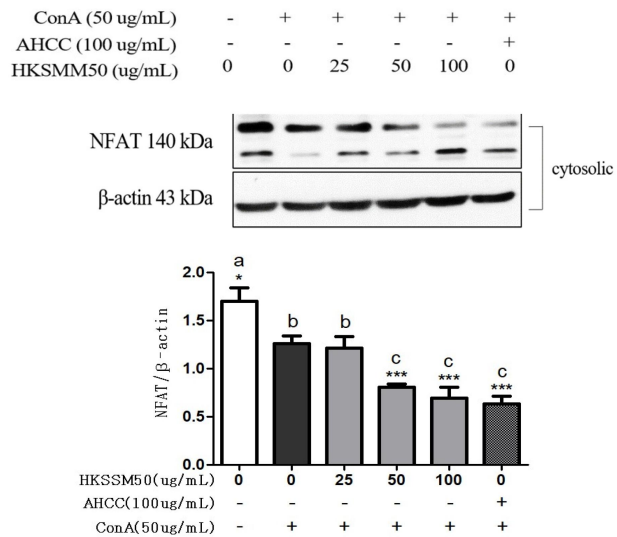


Fig. 4. Reduction of cytosolic NAFT protein content in ConA-treated Jurkat cells by HKSSM50 samples. The cells were incubated for 3 hr in an incubator (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) with samples. Means with different letters represent significances at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Means with star marks represent significant differences (\*,  $p < 0.05$ ; and \*\*,  $p < 0.01$ ) against ConA treatment by t-test. AHCC represents a positive control.

µg/ml 처리에 의한 이 함량 비는 ConA 처리와 비슷하였지만 HKSSM50 시료 50 µg/ml 및 100 µg/ml 처리는 그 함량 비를 유의성 있게 감소시켰다( $p < 0.001$ ). AHCC (100 µg/ml) 처리 효과는 동일한 농도의 HKSSM50 시료 처리 효과와 유사하였다. 따라서 이 결과는 HKSSM50 시료 처리가 NFAT protein을 cytosol로부터 nuclear로 이동하였음을 의미한다.

Fig. 5는 nucleic NFAT/β-actin 비를 나타내고 있다. 이

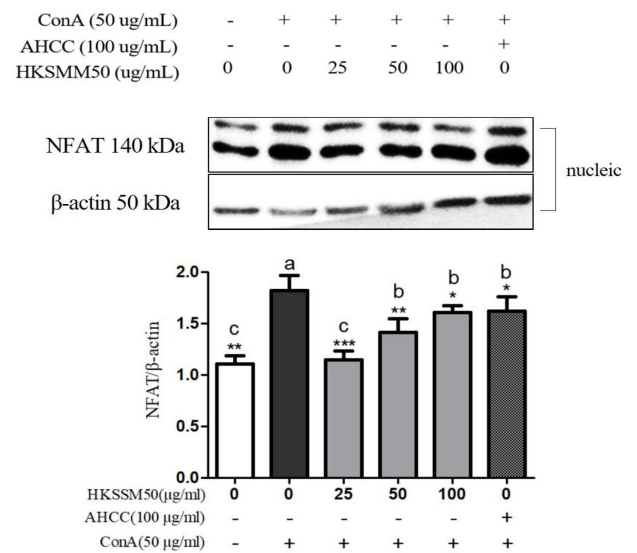


Fig. 5. Elevation of nucleic NAFT protein content in ConA-treated Jurkat cells by HKSSM50 samples. The cells were incubated for 3 hr in an incubator (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) with samples. Means with different letters represent significances at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Means with star marks represent significant differences (\*,  $p < 0.05$ ; and \*\*,  $p < 0.01$ ) against ConA treatment by t-test. AHCC represents a positive control.

비는 Control에서 1.1이었으나 ConA 처리로 1.7로 크게 증가하였는데, 이것은 ConA 처리로 NFAT protein이 cytosol로부터 nuclear로 이동하였음을 의미한다. 이 비는 HKSMM 50 시료 처리 농도 의존적으로 증가되었다( $p < 0.05$ ). 그러나 이들 비는 ConA 처리보다는 낮았지만( $p < 0.05 \sim 0.001$ ), Control 보다는 높았다( $p < 0.05$ ). AHCC (100  $\mu\text{g/ml}$ ) 처리 효과는 HKSMM50 (100  $\mu\text{g/ml}$ ) 처리 효과와 유사하였다. 이 결과는 HKSMM50 처리로 NFAT protein을 cytosol에서 nuclear로 이동되었음을 의미한다.

**Jurkat cells의 IL-2와 IFN- $\gamma$  함량 및 COX-2 활성화에 대한 HKSMM50의 영향**

ConA로 활성화한 Jurkat cells에 HKSMM50 시료 처리는 cytosol의 NFAT를 nucleus로 이동시켰음을 확인하였다 (Fig. 4, Fig. 5). 따라서 HKSMM50 시료가 Jurkat cells에서

immunostimulatory cytokine인 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 생성 증가를 확인하기 위하여 ConA로 활성화한 Jurkat cells에 HKSMM 50 시료(0, 25, 50 및 100  $\mu\text{g/ml}$ )를 처리하고 3시간 및 6시간 배양한 후의 IL-2 (Fig. 6) 및 IFN- $\gamma$  (Fig. 7) 함량과 COX-2 활성화(Fig. 8)을 측정 하였다. Positive control로서 AHCC는 100  $\mu\text{g/ml}$  처리하였다.

IL-2 함량은 3시간(Fig. 6, Left panel) 및 6시간(Fig. 6, Right panel) 배양 처리에서 ConA 및 HKSMM50 시료 처리는 Control 처리보다 증가하였다( $p < 0.05$ ). IL-2 함량을 ConA 처리와 비교하였을 때, 3시간 처리의 경우 HKSMM50 시료 100  $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도 의존적으로 IL-2 함량이 증가 하였지만( $p < 0.05 \sim 0.01$ ), 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 유의성이 없었다. 또한 HKSMM50 시료 6시간 처리서도 농도 의존적으로 IL-2 함량이 증가하였는데( $p < 0.01 \sim 0.001$ ), 그 증가 효과는 3시간 처리의 경우보다 다소 높았다. AHCC (100  $\mu\text{g/ml}$ )

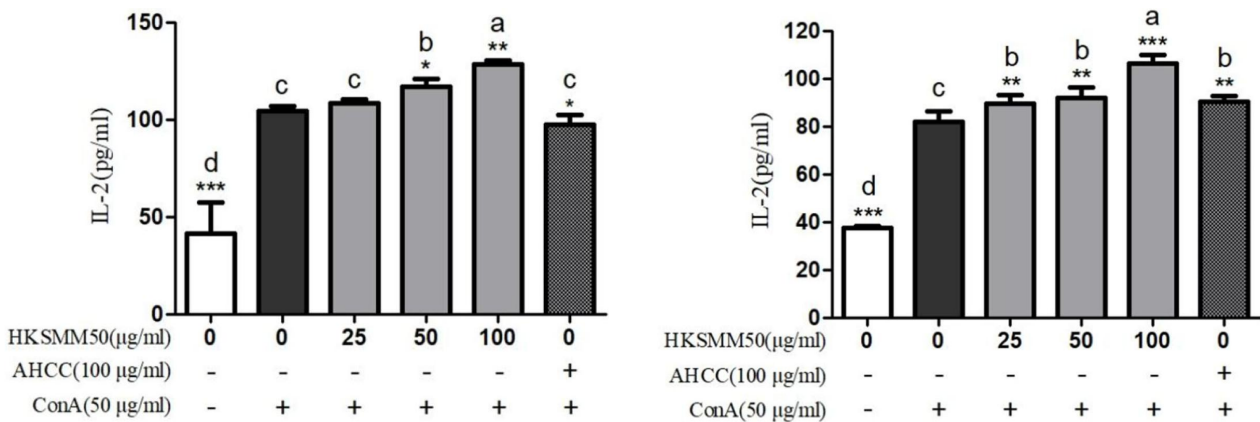


Fig. 6. IL-2 production of ConA-treated Jurkat cells by HKSMM50 sample for incubations of 3 hr (Left panel) and 6 hr (Right panel). Means with different letters represent significances at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Means with star marks represent significant differences (\*,  $p < 0.05$ ; and \*\*,  $p < 0.01$ ) against ConA treatment by t-test. AHCC represents a positive control.

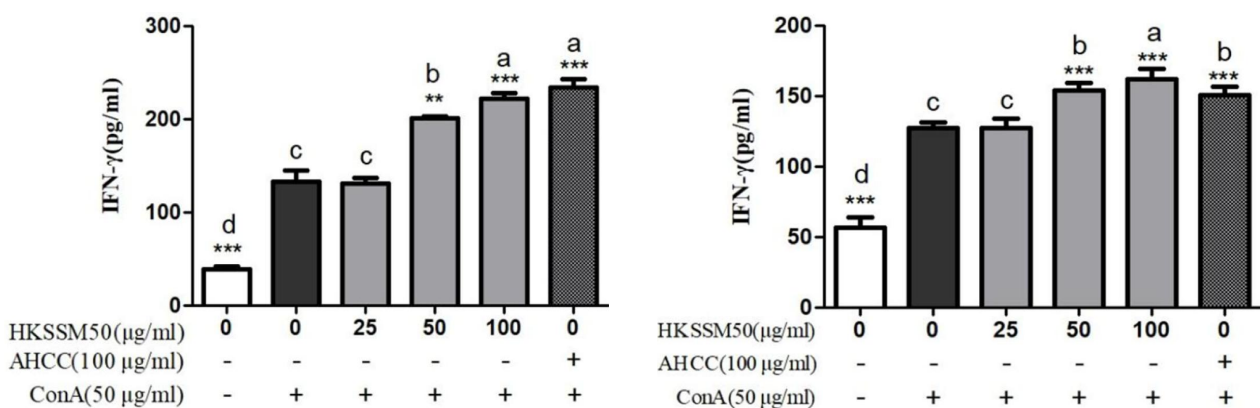


Fig. 7. IFN- $\gamma$  production of ConA-treated Jurkat cells by HKSMM50 samples for incubations of 3 hr (Left panel) and 6 hr (Right panel). Means with different letters represent significances at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Means with star marks represent significant differences (\*,  $p < 0.05$ ; and \*\*,  $p < 0.01$ ) against ConA treatment by t-test. AHCC represents a positive control.

처리의 IL-2 함량 증가 효과는 ConA 처리와 차이가 없었지만, 동일 농도의 HKSMM50 처리보다 낮았다( $p < 0.05$ ). 이 결과는 HKSMM50이 IL-2 함량을 증가시켰음을 의미한다.

Fig. 7은 IFN- $\gamma$  함량 증가를 나타내고 있다. 3시간(Fig. 7, Left panel) 및 6시간(Fig. 7, Right panel) 배양에서 ConA 및 HKSMM50 시료 처리에 의한 IFN- $\gamma$  증가는 Control에 비해 높았다( $p < 0.05$ ). IFN- $\gamma$  함량을 ConA 처리와 비교하였을 때, 3시간 처리시에 HKSMM50 시료 100  $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도 의존적으로 IFN- $\gamma$  함량이 증가하였지만 ( $p < 0.01 \sim 0.001$ ), 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 유의성이 없었다. 또한 HKSMM50 시료 6시간 처리시 농도 의존적으로 IFN- $\gamma$  함량이 증가하였는데( $p < 0.001$ ), 그 증가 효과는 3시간 처리와 비슷하였다. AHCC (100  $\mu\text{g/ml}$ ) 처리에 의한 IFN- $\gamma$  증가는 동일한 농도의 HKSMM50 처리와 크게 차이가 없었다. 이 결과는 HKSMM50 처리가 IFN- $\gamma$  함량을 증가시켰음을 의미한다.

Fig. 8은 ConA로 활성화한 Jurkat cells에서 HKSMM50 시료를 3시간(Fig. 8, Left panel) 및 6시간(Fig. 8, Right panel) 처리한 후의 COX-2 효소 활성 감소를 나타낸다. 이들 두 처리에서 ConA 처리는 Control에 비해 COX-2 활성을 증가시켰다( $p < 0.05$ ). 그러나 ConA에 의해 증가된 COX-2 활성은 HKSMM50 시료 처리로 감소되었는데( $p < 0.05 \sim 0.001$ ), COX-2 효소활성 감소 효과는 3시간 처리와 6시간 처리에서 서로 비슷하였다. HKSMM50 시료 6시간 처리시 농도(25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) 의존적으로 COX-2의 활성이 감소되었지만( $p < 0.05 \sim 0.001$ ), 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 그 감소 효과가 다소 낮았고( $p < 0.05$ ), 50  $\mu\text{g/ml}$ 과 100  $\mu\text{g/ml}$  처리 농도 간에는 차이가 없었다. AHCC (100  $\mu\text{g/ml}$ ) 처리에 의한 COX-2 활성도 동일한 농도의 HKSMM50 시료 처리와 유사한 결과였다. 이 결과는 HKSMM50 처리가 COX-2

활성을 감소시켰음을 의미한다.

### Jurkat cell apoptosis에 대한 HKSMM50의 영향

세포의 apoptosis를 측정하는 방법은 apoptosis-specific caspases 활성, cell viability와 DNA laddering, 세포 모양의 변화, cell-cycle arrest 측정 등 다양한 방법이 있지만 본 연구에서는 cell-cycle arrest 방법으로 Jurkat cells의 apoptosis를 측정하였다. Jurkat cells에 대한 HKSMM50의 apoptosis 유도 효과를 검토하기 위하여 ConA로 활성화된 Jurkat cells에 HKSMM50 시료(25~100  $\mu\text{g/ml}$ )를 3시간과 6시간 처리한 후, PI로 염색한 DNA를 flow cytometry로 apoptosis DNA (sub, G1 phase DNA)를 분석하였다(Fig. 9, Table 1).

3시간 처리(Fig. 9, Top panel; Table 1)에서, ConA는 Jurkat 세포의 apoptotic DNA가 Control 처리의 7.9%에서 33.5%로 크게 증가하였다. 그러나 ConA에 의해 증가된 apoptotic DNA는 HKSMM50 시료 50  $\mu\text{g/ml}$ 와 100  $\mu\text{g/ml}$  처리로 각각 22.3% 및 23.9%로 감소되었다. AHCC (100  $\mu\text{g/ml}$ ) 처리에 의한 apoptotic DNA는 39.8%로 동일 농도의 HKSMM50 처리 23.9%보다 높았다. 마찬가지로, 6시간 처리(Fig. 9, Bottom panel; Table 1)에서 Jurkat cells의 apoptotic DNA가 Control 처리(7.3%)보다 ConA 처리(74.4%)로 크게 증가하였다. ConA에 의해 증가된 apoptotic DNA는 HKSMM50 시료 50  $\mu\text{g/ml}$ 와 100  $\mu\text{g/ml}$  처리로 각각 50.8% 및 47.8%로 감소되었다. AHCC (100  $\mu\text{g/ml}$ ) 처리의 apoptosis 억제 효과(59.0%)는 동일 농도의 HKSMM50 처리 47.8%보다 높았다.

이와 같은 결과는 6시간 이내의 ConA처리는 Jurkat cells의 apoptosis를 유도하였고, HKSMM50 시료 처리는 ConA에 의해 유도된 apoptosis를 억제하여, Jurkat cell을 보호하는 효과가 있음을 의미한다.

종합적인 결과로서, Con-A로 활성화된 Jurkat cells에

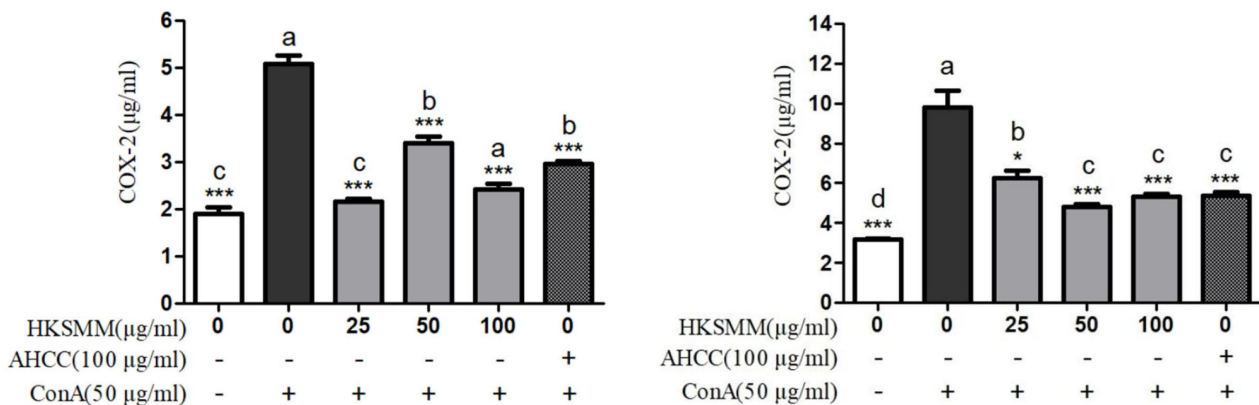


Fig. 8. COX-2 activity of ConA-treated Jurkat cells by HKSMM50 samples for incubations of 3 hr (Left panel) and 6 hr (Right panel). Means with different letters represent significances at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Means with star marks represent significant differences (\*,  $p < 0.05$ ; and \*\*,  $p < 0.01$ ) against ConA treatment by t-test. AHCC represents a positive control.

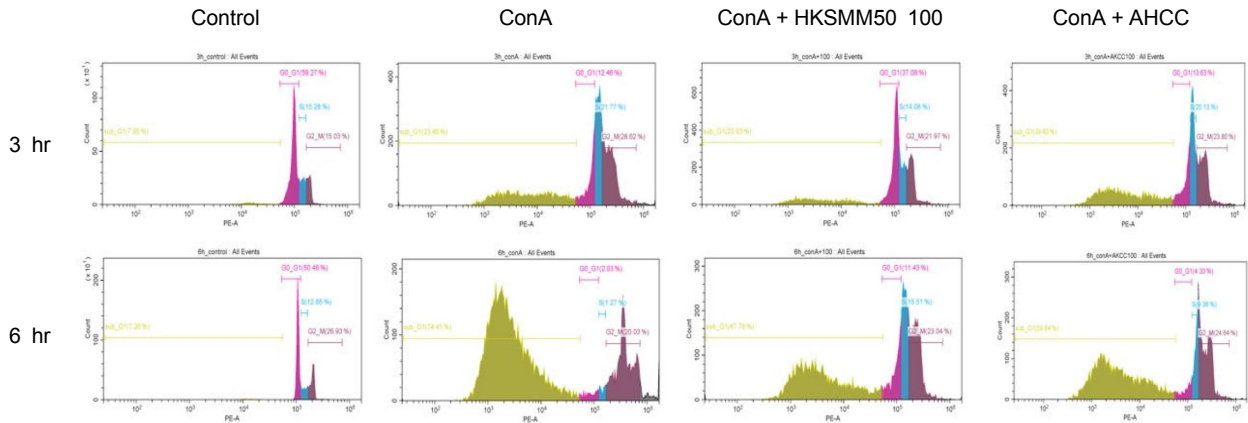


Fig. 9.Suppressions of apoptosis in ConA-treated Jurkat cells by HKSMM50 samples. Jurkat cells were treated with ConA and HKSMM50 and AHCC samples for 3 hr and 6 hr. The proportion of apoptotic cells (sub. G1 phase DNA) was measured by flow cytometric analysis using propidium iodide (PI) staining. AHCC represents a positive control.

Table 1. Suppressions of the apoptosis of ConA-treated Jurkat cells by HKSMM50 sample

Treatment <sup>1)</sup>	3 hr (%) <sup>2)</sup>				Treatment <sup>1)</sup>	6 hr (%) <sup>2)</sup>			
	Sub_G1	G0_G16h	S	G2_M		Sub_G1	G0_G16h	S	G2_M
Control	7.95	59.27	15.28	15.03	Control	7.26	50.48	12.85	26.93
ConA	33.46	12.46	21.77	28.62	ConA	74.41	2.03	1.27	20.03
ConA+HKSMM50 (25 µg/ml)	41.72	12.55	19.49	23.85	ConA+HKSMM50 (25 µg/ml)	74.06	5.07	3.17	17.04
ConA+HKSMM50 (50 µg/ml)	22.40	37.03	14.75	22.77	ConA+HKSMM50 (50 µg/ml)	50.89	15.78	10.45	21.48
ConA+HKSMM50 (100 µg/ml)	23.93	37.08	14.08	21.97	ConA+HKSMM50 (100 µg/ml)	47.76	11.43	15.51	23.04
ConA+AHCC <sup>3)</sup> (100 µg/ml)	39.83	13.63	20.13	23.80	ConA+AHCC <sup>3)</sup> (100 µg/ml)	59.84	4.33	9.38	26.64

<sup>1)</sup>Jurkat cells were treated with ConA, followed by HKSMM50 or AHCC sample, and then incubated for 3 and 6 hr.  
<sup>2)</sup>The proportion of apoptotic cells (sub\_G1 phase DNA) was measured by flow cytometric analysis using propidium iodide (PI) staining.  
<sup>3)</sup>AHCC represents a positive control.

HKSMM50 (25~100 µg/ml) 처리(3시간, 6시간)는 cell proliferation, NFAT 활성화(발현된 NFAT가 cytosol에서 nucleus에로의 이동) 및 IL-2 및 IFN-γ의 함량을 증가시켰고, COX-2 활성화와 apoptosis는 감소시켰다. 따라서, ConA로 활성화된 Jurkat cells에서 HKSMM50의 면역증가 효과를 확인할 수 있었다.

### 고찰

Human T lymphocyte인 Jurkat cells은 ConA에 의해 활성화 되면 NFAT protein이 activation (dephosphorylation)되어 IL-2 및 IFN-γ 등의 immunostimulatory cytokines의 합성이 증가되어 면역 활성을 나타낸다(Fig. 10) [7, 18, 46]. 본 연구에서 ConA로 활성화한 Jurkat cells에 HKSMM50 처리는 cytosol의 NFAT protein 함량은 낮추었고(Fig. 4), nucleic

NFAT protein 함량을 높여(Fig. 5), IL-2 함량(Fig. 6)과 IFN-γ 함량(Fig. 7)을 증가시켰다. 또한 HKSMM50은 ConA로 활성화한 Jurkat cells의 COX-2 활성을 감소시켰고(Fig. 8), apoptosis를 억제하였다(Fig. 9, Table 1).

많은 버섯 자실체 및 균사체의 추출물은 면역기능을 증가시킨다고 보고되었는데, 이들 중 표고버섯 관련 추출물이 가장 우수한 면역증진 역할을 한다고 밝혀졌다[2, 5, 6, 10, 28]. Park 등[33]은 표고버섯, 떡갈버섯, 새송이버섯, 민자주방망이버섯의 열수추출물을 투여한 생쥐의 spleen T 및 B lymphocytes의 IFN-γ/IL-4 비와 TNF-α의 생성이 표고버섯 처리에서 높아 표고버섯의 면역작용이 가장 높음을 시사하였다. 또한 Park [32] 등은 표고버섯 균사체의 ethanol과 열수추출물이 sarcoma 180 세포로 처리된 mouse에서 survival rate를 28% 증가시키고, tumor를 63% 감소하였다고 보고하였다. 이와 같은 표고버섯의 면역증



진 효과는 표고버섯에 함유된 수많은 nutraceuticals 및 pharmaceuticals에 기인하지만 그 중에서 가장 중요한 면역증진과 관련 물질은 HKSMM50에도 15.4% 포함되어 있는 β-glucan 인 LNT이다.

LNT는 mouse macrophages, dendrite cells, peritoneal exudate cells 및 splenocytes 등의 면역세포를 직접 활성화하여 IL-1α, IL-1β, TNF-α, IFN-γ 등을 비롯한 immunostimulatory cytokines 생성을 유도하였다[28, 31, 39]. 또한 LNT는 간접적으로 T 세포 활성을 통하여 항종양 효과를 나타낸다. LNT는 Jurkat cells의 TCR/CD3에 결합하여 NFAT protein의 activation에 의한 면역증강에 효과를 나타내는데, 이에 관한 연구내용은 많지않다. LNT와 화학적 구조가 비슷한 잎새버섯 (Maitake mushroom, *Grifola frondosa*)의 β-glucan인 crudue *Grifola frondosa* polysaccharide (CGFP)는 Jurkat T cells에서 IL-5의 생성을 증가시켰다[34]. 우슬(*Achyranthes bidentata*)의 β-glucan은 human T cell에 작용하여 IFN-γ의 분비를 촉진시켰고[19], *Tinospora cordifolia* 유래 RR1 β-glucan은 T cell의 증식을 촉진하고 IL-1, IL-12, IL-18 및 IFN-γ의 합성을 촉진시켰다[14]. 따라서 본 연구에서 ConA로 활성화한 HKSMM50 (15.4% β-glucan 함유)의 NFAT protein의 activation에 의한 IL-2와 IFN-γ의 생성 증가는 LNT가 Jurkat cells의 TCR/CD3 receptor에 결합에 기인하는 것으로 생각된다

COX-2는 inflammation, platelet aggregation, neurotransmitter release, smooth muscle contraction 등과 같은 수많은 biological effects를 나타내는 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)를 합성하는 효소이다[16, 38]. COX-2가 수많은 고형암에서 과발현된다는 것으로 보고되어[38], 대장암, 위암, 유방암 및 전립선암과 인간 전립선암 세포에서 과발현되었다[25]. 따라서 COX-2 효소 및 PGE<sub>2</sub> 합성이 chemoprevention과 anti-tumor therapy의 주요 타겟이 됨을 의미한다[25]. Iniguez 등[16]은 Jurkat cells이 TCR/CD3 또는 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)에 의한 활성화는 COX-2 mRNA와 protein이 빠르게 유도되었고, COX-2의 선택적 억제제인 NS398 및 celecoxib에 의해 early 또는 later events인 IL-2 및 IFN-γ 생성이 억제되었음을 보고하였다. 이와 같은 결과는 Jurkat cells에서 NF-kB와 NFAT protein expression 억제에 기인한다고 하였다. 반면에, Kundu 등[24]은 PMA로 활성화한 mouse skin에서 resveratrol은 COX-2 protein expression과 NF-kB activation이 억제되었음을 보고하였다. 본 연구에서는 HKSMM50은 ConA로 활성화된 Jurkat cells에서 NFAT protein activation이 증진되었지만(Fig. 4, Fig 5), COX-2 활성은 억제되었다(Fig. 8). 따라서 ConA로 활성화된 Jurkat cell에서의 HKSMM50에 의한 COX-2 활성억제는 더 연구가 수행되어야 할 것이다.

Apoptosis가 진행되는 동안 mitochondria에서 전자전달계와 에너지대사의 파괴, caspase-specific활성화 단백질

방출, 세포 내로 ROS유출, 세포 내 물질 환원 등과 같은 변화가 일어난다. 따라서 세포내로 방출된 ROS는 신호전달 및 신경전달, 세포증식 및 macrophages활성화 등을 포함한 다양한 과정에 관여하며[15, 35], ROS는 apoptosis 유도와 밀접한 관계가 있다[20, 41, 42]. ROS는 췌장 β-세포 감소를 유도하여 type 1 및 2형 당뇨병의 발병을 유도하지만[41, 42], 정상세포에서 apoptosis과정을 통해 비정상적이거나 손상된 세포를 제거하고[11, 35], 암세포에서는 apoptosis 과정을 유도하여 암세포를 제거한다[12, 35]. 이와 같은 연구결과는 세포 내에서의 ROS가 apoptosis를 유도한다는 것이다. 본 연구에서는 HKSMM50은 ConA로 활성화된 Jurkat cells에서 apoptosis를 억제하였다(Fig. 9). 이 결과는 HKSMM50이 항산화성을 나타내기 때문인 것으로 추정된다. 많은 phenol화합물[47]이나 버섯 및 버섯균사체 추출물에 함유된 polyphenols과 polysaccharides (β-glucan 및 LNT)가 항산화성이 있음이 보고되었다[3, 4, 8, 9, 12, 23, 45]. Song 등[37]은 HKSMM50이 β-glucan (15.4%)와 polyphenol류(3.4 mg/g)를 함유하고 있어 RAW264.7 cell에서 SOD와 catalase의 활성을 증가시켰다. Feher 등[9]

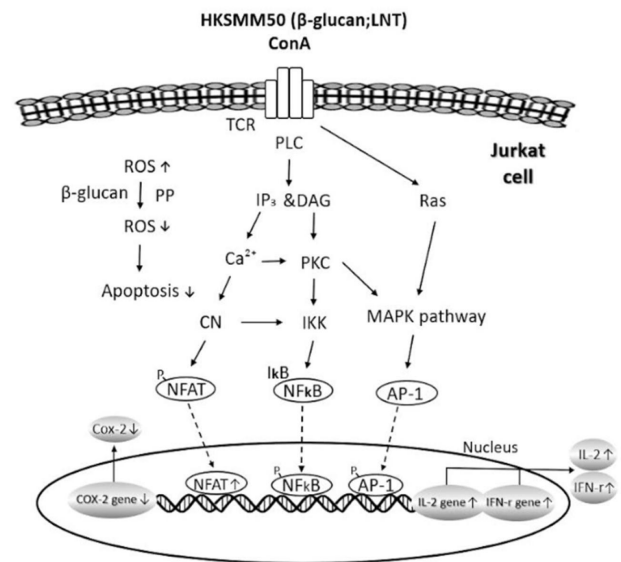


Fig. 10. A proposed mechanism by which HKSMM50 enhances immune functions in ConA-treated Jurkat cells through NFAT protein activation, and β-glucan (LNT) and polyphenols (PP) actions. β-Glucan interacted with receptors (TCR and others) on the surface of Jurkat cells to activate an NFAT protein activation (dephosphorylation), resulting in the elevation of NFAT translocation into the nucleus from the cytosol, followed by an increase in IL-2 and TNF-γ cytokine productions. Meanwhile, the antioxidant activity of β-glucan including LNT, and PP suppressed apoptosis of Jurkat cells. COX-2 protein expression was also suppressed in Jurkat cells for an unknown reason.

은 높은 농도(10 ug/ml)의 LNT는 활성 간경변증 환자의 적혈구와 림프구의 낮은 SOD 활성을 증가시켰다. 따라서, HKSMM50에 함유된  $\beta$ -glucan 및 total polyphenol의 항산화성에 의해 세포 내에서 생성된 ROS 제거에 의한 Jurkat cells의 apoptosis를 억제함을 의미한다. 그러나 Yao 등[47]은 phenol 화합물인 nonylphenol이 Jurkat cells에서 caspase-8 의존 기전에 의해 apoptosis를 유도한다고 하였다. 따라서, Jurkat cells에서 HKSMM50의 apoptosis 억제 기전에 관한 연구는 더 수행되어야 할 것이다.

결론적으로, 14%  $\beta$ -glucan과 페놀화합물을 비롯한 다양한 생리활성물질을 함유한 HKSMM50은 ConA를 처리한 human T lymphocyte인 Jurkat cells에서 NFAT protein을 활성화 시켰다(Fig. 4, Fig. 5, Fig. 10). 따라서 NFAT protein이 cytosol에서 nuclear로의 이동이 증가되어 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 합성을 증가시켰다. 또한 HKSMM50은 ConA로 활성화한 Jurkat cells에서 COX-2의 활성화와 apoptosis를 억제하였다. 따라서, HKSMM50은 인체의 면역기능을 증진시키는 소재로 활용할 수 있을 것이다.

## 감사의 글

이 논문은 2021년 경상남도 미래선도기술산업화지원 사업에 의해 수행되었습니다. (주)HK바이오텍 김정은 연구원의 그래픽 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

- Adan, A., Kiraz, Y. and Yusuf, B. 2016. Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Curr. Pharm. Biotech.* **17**, 1213-1221.
- Al-Daghri, N. M., Alokail, M. S., Alkharfy, K. M., Mohammed, A. K., Abd-Alrahman, S. H., Yakout, S. M., Amer, O. E. and Krishnaswamy, S. 2012. Fenugreek extract as an inducer of cellular death via autophagy in human T lymphoma Jurkat cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **12**, 202.
- Aleem, E. 2013.  $\beta$ -Glucans and their applications in cancer therapy: focus on human studies. *Anticancer Agents Med. Chem.* **13**, 709-719.
- Bisen, P. S., Baghe, R. K., Sanodiya, B. S., Thakur, G. S. and Prasad, G. B. K. S. 2010. Lentinus edodes: A macrofungus with pharmacological activities. *Cur. Med. Chem.* **17**, 2419-2430.
- Chan, G. C. F., Chan, W. K. and Sze, D. M. Y. 2009. The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol.* **2**, 25-36.
- Chen, J. and Seviour, R. 2007. Medicinal importance of fungal beta-(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucans. *Mycol. Res.* **111**, 635-652.
- Chow, C. H., Rinco, M. and Davis, R. J. 1999. Requirement for transcription factor NFAT in interleukin-2 expression. *Mol. Cellular. Biol.* **19**, 2300-2307.
- Eveline, A. I. F., Pâmela, Q., Aneli, A., Barbosa-Dekker, R. M. and Dekker, F. H. 2022. Roles of  $\beta$ -glucans in oxidative stress and cancer. p57-75. In: Chakraborti, S., Ray, B. K., and Roychoudhry, S. (eds). *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Mechanistic Aspects*. Springer, Singapore.
- Feher, J., Karoly, G. C., Gyorgy, V., Anna, D., Zovics, B. and Gergely, P. 1989. Effect of lentinan on superoxide dismutase enzyme activity *in vitro*. *Immunopharm. Immunotoxicol.* **11**, 55-61.
- 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.
- Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S. and Thayulathi, F. 2017. Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress? *Free Radic. Biol. Med.* **104**, 144-164.
- Giese, E. C., Gascon, J., Anzelmo, G., Barbosa, A. M., da Cunha, M. A. A. and Dekker R. F. H. 2015. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other  $\beta$ -D-glucans. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 125-130.
- 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.
- Hong, H. D. 2011. New technology: Immunoregulatory actions of polysaccharides from natural plant resources. *Bull. Food Technol.* **24**, 390-409.
- Hussain, S. P., Hofseth, L. J. and Harris, C. C. 2003. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 276-285.
- Iñiguez, M. A., Punzón, C. and Fresno, M. 1999. Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: Regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. *Immunol.* **163**, 111-119.
- Jang, W. J., Kim, Y. S., Ha, Y. L., Park, C. W., Ha, Y. K. and Kim, J. O. 2010. The 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.
- Jara, E., Hidalgo, M. A., Hancke, J. L., Hidalgo, A. I., Brauchi, S., Nunez, L., Villalobos, C. and Burgos, R. A. 2014. Delphinidin activates NFAT and induces IL-2 production through SOCE in T cells. *Cell Biochem. Biophys.* **68**, 497-509.
- Jiang, M. H., Zhu, J. and Jiang, J. G. 2010. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. *Expert Opin. Ther. Targets* **14**, 1367-1402.
- Kang, S. W. 2013. Role of reactive oxygen species in cell

- death pathways. *Hanyng Med. Rev.* **33**, 77-82.
21. Kim, H. H., Ha, S. U., Park, M. Y., Jeong, S. H., Bhagwan, B. P., Abuyaseer, A., Kim, J. O., Ha, Y. L. and Kim, G. S. 2022. Immune enhancing and anti-inflammatory effect of HK shiitake mushroom mycelium (HKSM) using Balb/c mice. *J. Life Sci.* **32**, 447-454.
  22. 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* 1-20.
  23. Kofuji, K., Aoki, A., Tsubaki, K., Konishi, M., Isobe, T. and Murata, Y. 2012. Antioxidant activity of  $\beta$ -Glucan. *ISRN Pharmaceut.* **2012**, 125864. doi:10.5402/2012/125864.
  24. Kindu, J. K., Shin, Y. K., Kim, S. H. and Shur, Y. J. 2006. Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF- $\kappa$ B in mouse skin by blocking I $\kappa$ B kinase activity. *Carcinogenesis* **27**, 1465-1474.
  25. Lieberman, R. 2002. Chemoprevention of prostate cancer: current status and future directions. *Cancer Meta. Rev.* **21**, 297-309.
  26. Mallya, R. and Bhitre, M. J. 2021. Cytotoxic activity and initiation of apoptosis via an intrinsic pathway in Jurkat cells by leaf extract of *Zanthoxylum rhetsa*. *Nutr. Cancer* **73**, 1768-1779.
  27. Márquez, N., Sancho, R., Macho, A., Calzado, M. A., Fiebich, B. L. and Muñoz, E. 2004. Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factors of activated T-cells and NF- $\kappa$ B transcription Factors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**, 993-1001.
  28. McCormack, E., Skavland, J., Mujic, M., Bruslerud, Ø. and Gjertsen, B. T. 2010. Lentinan: hematopoietic, immunological, and efficacy studies in a syngeneic model of acute myeloid leukemia. *Nutr. Cancer* **62**, 574-583.
  29. Ministry of Food and Drug Safety. 2022. Standards and specifications of healthy functional foods. 3-25(237p), 3048(361p) and 3-53(388p).
  30. Ministry of Food and Drug Safety. 2010. HK shiitake mushroom mycelium. Certificate of health functional food ingredient for liver health. No. 2010-35.
  31. Najafipour, R., Farivar, T. N. and Johari, P. 2014. Effect of lentinan in the induction of apoptosis on gastric adenocarcinoma cells. *Biotech. Health Sci.* **1**, e19195.
  32. Park, H. J., Heo, Y. and Kim, J. B. 2011. Immunomodulating effect of edible mushrooms. *J. Life Sci.* **14**, 515-520.
  33. Park, S. O. and Kim, J. M. 2012. Functional food for immune regulation: beta-Glucan. *Food Sci. Ind.* **45**, 39-47.
  34. Radic, N., Jevnikar, Z., Obermajer, N., Krist, J., Kos, J., Pohleven, F. and Strukelj, B. 2010. Influence of culinary-medicinal maitake mushroom, *Frifolia frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (aphyllophoromycetideae) polysaccharides on gene expression in Jurkat T lymphocytes. *Int. J. Med. Mushrooms* **12**, 245-255.
  35. Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S. and Dmitriev, A. A. 2019. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxi. Med. Cell Longev.* **2019**, 6175804. doi.org/10.1155/2019/6175804.
  36. Sobieralski, K., Siwulski, M., Lisiecka, J., Jdrylicza, M., Sas-Golak, I. and Fruyska-Jówiak, D. 2012. Fungi-derived  $\beta$ -glucan as a component of functional food. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* **11**, 111-128.
  37. Song, C. Y., Oh, T. W., Kim, H. H., Lee, Y. B., Kim, J. O., Kim, G. S. and Ha, Y. L. 2022. Anti-inflammatory efficacy of HK shiitake mycelium in LPS-treated RAW 264.7 cells through down-regulation of NF- $\kappa$ B activation. *J. Life Sci.* **32**, 491-500.
  38. Taketo, M. M. 1998. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 1609-1620.
  39. Trivedi, S., Patel, K., Belgamwar, V. and Wadher, K. 2022. Functional polysaccharide lentinan: Role in anti-cancer therapies and management of carcinomas. *Pharmacol. Res.-Mor. Chin. Med.* **2**, 100045. doi:10.1016/j.prmcm.2022.100045.
  40. van Tonder, A., Jubert, A. M. and Cromarty, A. D. 2015. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res. Notes* **8**, 847-856.
  41. Volpe, C. M. O., Vollar-Delfino, P. H., dos Anjos, P. M. G. and Nogioera-Machado, J. A. 2018. Cellular death, reactive oxygen species (ROS), and diabetic complications. *Cell Death Dis.* **9**, 119-124.
  42. Wagener, F. A. D. T. G., Dekker, D., Berden, J. H., Scharstuhl, A. and van der Vlag, J. 2009. The role of reactive oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney. *Apoptosis* **14**, 1451-1458.
  43. Wang, J., Dong, S., Liu, C., Wang, W., Sun, S., Gu, J., Wang, Y., Boraschi, D. and Qu, D. 2010. beta-Glucan oligosaccharide enhances CD8(+) T cells immune response induced by a DNA vaccine encoding hepatitis B virus core antigen. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 645213. doi: 10.1155/2010/645213.
  44. Wang, L. C., Chu, K. H., Liang, Y. C., Lin, Y. L. and Chiang, B. L. 2010. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nuclear factor- $\kappa$ B and protein kinase B signaling pathways and induces caspase-3 expression in primary human CD4+ T cells. *Clinic. Exp. Immunol.* **160**, 223-232.
  45. Wang, H., Liu, Y., Qi, Z., Wang, S., Liu, S., Li, X., Wang, H. and Xia, X. 2013. An overview on natural polysaccharides with antioxidant properties. *Curr. Med. Chem.* **20**, 2899-2913.
  46. Wiskocil, R., Weiss, A., Imboden, J., Kamin-Lewis, R. and Stobo, J. 1985. Activation of a human T cell line: a two-stimulus requirement in the pretranslational events involved in the coordinate expression of interleukin 2 and gamma-interferon genes. *J. Immunol.* **134**, 1599-1603.
  47. Yao, G., Ling, L., Luan, J., Ye, D. and Zhu, P. 2007. Nonylphenol induces apoptosis of Jurkat cells by a caspase-8-dependent mechanism. *Int. Immunopharmacol.* **7**, 444-453.

**초록 : HK표고버섯균사체의 ConA로 처리된 Jurkat cells에서 NFAT 활성화를 통한 면역증진**오태우<sup>2</sup> · 문연규<sup>3</sup> · 김훈환<sup>4</sup> · 김근섭<sup>4</sup> · 김정옥<sup>1</sup> · 하영래<sup>1\*</sup>

(1)주HK바이오텍 부설 연구소, (2)한국한의학연구원, (3)한국독성연구소, (4)경상국립대학교 수의과대학)

HK shiitake mushroom mycelium (HKSMM: 14%  $\beta$ -glucan)은 식품의약품안전처의 개별인정형 간 건강기능식품 원료이다. HKSMM의 50% ethanol 추출물 (HKSMM50)에 대한 면역증강 효과를 Concanavalin A (ConA)로 활성화한 human T lymphocyte Jurkat cells에서 연구하였다. Active hexose correlated compound (AHCC)는 positive control로 사용하였다. ConA로 활성화한 Jurkat cells에 HKSMM50 (0, 25, 50, 100  $\mu$ g/ml) 및 AHCC (100  $\mu$ g/ml)를 처리하고 3시간 또는 6시간 배양하였다. Jurkat cells의 cytosol과 nucleus에 함유된 transcription factor인 nuclear factor of activated T cells (NFAT) 함량은 Western blotting으로 측정하였다. Interleukin-2 (IL-2)와 interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) 함량 및 cyclooxygenase-2 (COX-2) 활성은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit로 분석하였다. HKSMM50은 cytosolic NFAT protein 함량은 낮추었고, nuclear NFAT protein 함량은 증가시켰다. IL-2와 IFN- $\gamma$  함량은 증가되었고, COX-2 활성과 apoptosis는 억제되었다. AHCC 효과는 HKSMM50의 효과와 유사하였다. 이와 같은 결과는 HKSMM50이 ConA로 활성화된 Jurkat cells에서 NFAT protein을 활성화시켜, IL-2와 IFN- $\gamma$  함량을 증가시켰음을 의미한다. 또한 HKSMM50은 COX-2 활성과 apoptosis를 억제하였다. 따라서 이와 같은 결과는 HKSMM이 면역증진을 위한 건강기능식품 원료로 사용할 수 있음을 의미한다.