

영지버섯균 발효 꾸지뽕나무 가지 톱밥 추출물의 항염증 활성

박세은¹ · 김명곤² · 김 승¹¹광주대학교 식품생명공학과²전북대학교 식품공학과Anti-inflammatory effects of *Cudrania tricuspidata* twig sawdust fermented with *Ganoderma lucidum* myceliumSe-Eun Park¹, Myung Kon Kim², and Seung Kim^{1*}¹Department of Food Science and Biotechnology, Gwangju University, Gwangju, 61743, Korea.²Department of Food Science and Technology, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

ABSTRACT: In this study, we evaluated the anti-inflammatory effect of extract from *Cudrania tricuspidata* twig sawdust fermented with *Ganoderma lucidum* mycelium. Fermented *Cudrania tricuspidata* twig sawdust extracted with 70% ethanol and elucidated the potential signaling pathway in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. Fermented *Cudrania tricuspidata* twig sawdust inhibits LPS-stimulated nitric oxide (NO) production without affecting cell viability in a dose-dependent manner and production of LPS-induced pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α and prostaglandin2 (PGE₂). Fermented *Cudrania tricuspidata* twig sawdust also suppressed the expression of the pro-inflammatory mediators such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Moreover, Fermented *Cudrania tricuspidata* twig sawdust significantly attenuated LPS-induced I κ B degradation and suppressed nuclear factor kappa B (NF- κ B) nuclear translocation. These results suggest that fermented *Cudrania tricuspidata* twig sawdust may have great potential for the development of anti-inflammatory agent.

KEYWORDS: *Cudrania tricuspidata* twig sawdust, *Ganoderma lucidum* mycelium, Fermentation, Inflammation

서 론

꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 뽕나무과의 낙엽 교목으로 한국, 일본, 중국 등에서 주로 자생하며 뽕잎 대용, 식용, 약용, 종이 원료 등 다양한 분야에서 활용되고

있다. 동의보감에서는 강장, 자양, 숙취해소 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 줄기는 부인병, 잎은 습진, 폐 결핵, 타박상, 급성 관절염, 열매는 청열과 양혈 치료에 사용되어 왔다(Choi *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2011). 줄기는 xanthenes, flavonoids 등의 폴리페놀(polyphenol) 성분이 다량 함유되어 있으며 항산화, 항균, 항암, 항당뇨, 항염, 간보호 등 다양한 분야에서 효능 연구가 보고 되어 있다(Kim *et al.*, 2009; Kim and Kim, 2005; Kim *et al.*, 2012; Joo *et al.*, 2009).

영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 전세계적으로 분포하며 한국, 일본, 중국 등에서 강장, 이뇨, 해독, 항균, 면역, 진해, 진통, 신경쇠약, 불면증, 급·만성 간염, 위궤양, 혈압 강하 등을 치료하기 위해 사용되어 왔다(Shio, 2003). 영지버섯의 자실체와 균사체는 항염, 항당뇨, 면역조절, 항암, 항종양, 고혈압 등 다양한 생리활성이 보고되어 있으며 polysaccharide, triterpene, nucleoside, steroid, 등 다양한 물질들이 함유되어 있다(Chen *et al.*, 1980; Furusawa *et al.*, 1992; Waser and Weis, 1999).

염증은 외부 자극에 의한 감염, 조직 손상 대한 생체 조

J. Mushrooms 2021 September, 19(3):225-233
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2021.19.3.225>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

Se-Eun Park(Researcher), Myung Kon Kim(Professor),
 Seung Kim(Professor)

*Corresponding author

E-mail : seungk@gwangju.ac.kr

Tel : +82-62-670-2718, Fax : +82-62-670-2761

Received August 30, 2021

Revised September 14, 2021

Accepted September 27, 2021

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.

직의 면역반응이다(Jeong *et al.*, 2012). 다양한 면역세포에서 일어나는 복합적인 과정으로 대식세포와 같은 면역세포가 바이러스와 같은 외부 자극에 반응하여 식세포작용(phagocytosis)을 하거나 염증매개물질들을 분비하여 제거하는 과정 또한 포함된다(Vane *et al.*, 1994). 대식세포는 선천 및 후천 면역을 담당하는 세포로, lipopolysaccharide (LPS) 및 사이토카인 같은 인자들에 의해 활성화 되고, nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E2 (PGE₂), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) 같은 염증매개 인자를 생성한다(Kang *et al.*, 2006; Lawrence *et al.*, 2002). NO는 L-arginine에서 inducible nitroxide synthase (iNOS)에 의해 생성되며 면역, 혈관확장, 세포신호 전달 등 다양한 기능을 가지고 있지만 NO의 과다 생산은 염증을 유발하여 정상 조직에 손상을 입히고 관절염, 아토피, 암, 천식, 폐혈증, 염증성 질환 등을 악화시킬 수 있으며 노화의 원인이 되기도 한다(Paradise *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2014). iNOS와 TNF- α 와 같은 염증매개 인자들의 생성은 nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 포함하는 다양한 전사 인자들에 의해 조절된다(Cho *et al.*, 2008; Medicherla *et al.*, 2015). 염증매개 인자의 생성을 유도하는 효소나 사이토카인의 발현을 저해하거나, 관련 인자의 발현에 중요한 신호전달인자로 작용하는 전사인자들의 활성 조절은 염증 관련 질환의 치료 또는 예방을 위한 주요 target으로 여겨지고 있으며 최근에는 기존에 사용되고 있는 항염증제의 부작용을 줄일 수 있는 천연물 유래 항염증 소재 개발을 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다(Park *et al.*, 2012).

따라서, 본 연구에서는 Raw264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 염증 관련 매개 물질인 NO, PGE₂의 생성과 관련 단백질의 발현 양상 및 염증성 사이토카인 측정을 통해 영지버섯균을 이용하여 발효된 꾸지뽕나무 잔가지 톱밥 추출물의 항염증 효과를 검증하여 기능성 소재로서 활용 가능성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 균주

본 실험에서 사용한 꾸지뽕나무 잔가지는 김제에서 직접 채취하여 건조시킨 후 실온에서 보관하며 사용하였다. 영지버섯(*G. lucidum* KACC 42231) 균주는 농촌진흥청 한국 농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양 받아 사용하였다.

꾸지뽕나무 잔가지 발효 및 추출물 제조

Fig. 1의 과정을 통해 꾸지뽕나무 잔가지 발효 및 추출물을 제작하였다. 먼저, 영지버섯 균주는 맥아배지(malt extract broth; Kisan biotech, Seoul, Korea)에서 25°C에

서 1주일간 배양 후 꾸지뽕나무 줄기를 배지로 이용하여 25°C에서 20일간 배양한 후 잔가지 발효를 위한 톱밥종균으로 사용하였다. 꾸지뽕나무 잔가지 톱밥 제조를 위해 잔가지를 건조 후 파쇄기로 2~3 mm의 크기로 분쇄하고 냉동 꾸지뽕 열매 1 kg에 3리터의 온수(90°C)를 가하고 믹서기로 균질화시켜 얻은 퓨레와 혼합하여 꾸지뽕나무 잔가지 분쇄물의 수분함량을 65% 정도로 조정하였다. 꾸지뽕나무 잔가지 분쇄물을 버섯배양용 비닐봉지에 넣어 121°C에서 45분간 살균 후 톱밥종균을 5% 정도로 접종하여 25°C에서 1주일간 배양하고 동결건조하였다.

영지버섯균 발효 꾸지뽕나무 잔가지 톱밥과 꾸지뽕나무 잔가지 각각 100 g에 70% 에탄올 300 ml을 가하고 상온에서 1주일간 침지추출 하였다. 추출액을 filter paper (Advantec, Tokyo, Japan)로 여과하고 회전 감압농축기 (Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)로 농축한 후 동결건조 (Ilshin Lab, Dongducheon, Korea) 시켜 얻은 분말상태의 추출물은 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 꾸지뽕나무 잔가지 추출물은 8.1 g을 얻었고 약 8.1%의 수율을 나타냈으며 발효 추출물은 6.7 g을 얻었고 약 6.7%의 수율을 나타냈다.

세포배양

RAW264.7 세포는 한국 세포주은행에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 10% FBS (fetal bovine serum; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 첨가한 DMEM 배지 (Dulbecco's modified eagle medium) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며 세포밀도가 70~80%가 되었을 때 cell scraper를 이용하여 계대배양하며 실험에 사용하였다.

세포 독성 측정

추출물의 세포독성을 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) assay를 사용하여 측정하였다. 세포를 96-well plates에 분주하여 배양한 후, 추출물을 농도별로 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 각각의 well에 MTT 용액 (5 mg/ml) 10 μ l와 배지 90 μ l를 처리하였다. Formazan 생성을 위해 37°C에서 4시간 동안 배양하여 MTT를 환원시켰다. 배지를 제거하고 생성된 formazan을 100 μ l DMSO 로 녹여준 후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 세포독성을 분석하였다

Nitric oxide (NO) 생성량 측정

NO의 배지 내 농도를 griess reagent를 이용하여 측정하였다. Raw264.7세포는 세포밀도가 70~80% 정도 되었을

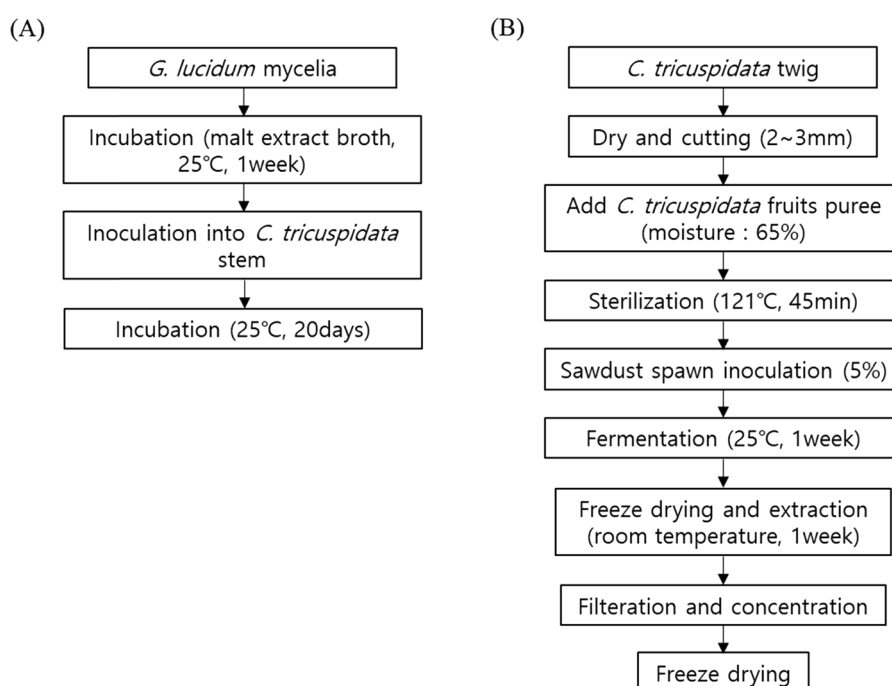


Fig. 1. A flow diagram for preparation of (A) sawdust spawn and (B) extract of fermented *C. tricuspidata* twig sawdust.

때 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하고 cell scraper로 세포를 떼어낸 후 96-well plate에 분주하여 12 시간 배양한 후 추출물을 농도별로 4시간동안 전처리하고 lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 를 1 µg/ml의 농도로 처리하여 18시간 배양하였다. 세포 배양액 100 µl를 취한 후 griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 1% α -naphthylamide in H₂O) 100 µl를 혼합하여 상온에서 10분 동안 반응시킨 후, microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 548 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 Sodium nitrate (NaNO₂)로 표준곡선을 이용하여 산출하였다.

Prostaglandin E₂ (PGE₂) 및 inflammatory cytokine 생성량 측정

Raw264.7세포를 96-well plate에 분주하여 12시간 배양한 후 추출물을 농도별로 4시간동안 전처리하고 LPS (1 µg/ml)를 처리하여 18시간 배양하였다. 배지 내에 생성된 PGE₂ 및 cytokine의 농도는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. 추출물과 LPS 처리 후 배지를 원심분리하고 -70°C에 보관하며 실험에 이용하였다. 제조사에서 제공한 manual에 따라 실험을 진행하고 microplate reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Standard의 흡광도로부터 표준곡선을 구하고 이를 이용하여 흡광도로부터 PGE₂ 및

사이토카인의 농도를 정량하였다.

Western blot 분석

Raw264.7세포에 추출물을 4시간동안 전처리하고 LPS (1 µg/ml)를 18시간 동안 처리한 후 PBS로 세포를 세척하였다. 세포를 원심분리하여 얻은 pellet에 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Nadeoxycholate and 0.1% SDS)를 넣고 20분간 4°C에서 방치한 후 12,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (ThermoFisher, Waltham, MA, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 20 µg을 sample buffer와 섞어 100°C에서 5분간 끓인 후, 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 단백질을 분리하였다. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 단백질을 transfer하고 blocking solution (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween20, 5% nonfat milk)으로 2시간 동안 blocking 하였다. 1차 항체를 희석하여 4°C에서 overnight 시킨 후 TBS-T(10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween20) 용액으로 membrane을 10분씩 3회 세척하고, 2차 항체는 1:2,500으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시켰다. TBS-T로 membrane을 10분씩 3회 씻어준 후 ECL detection kit (ThermoFisher, Waltham, MA, USA)를 처리한 membrane의 단백질 밴드를 image reader (Microchemi 4.2, DNR, Neve Yamin, IS)로 가시화하여 발현량을 분석하였다.

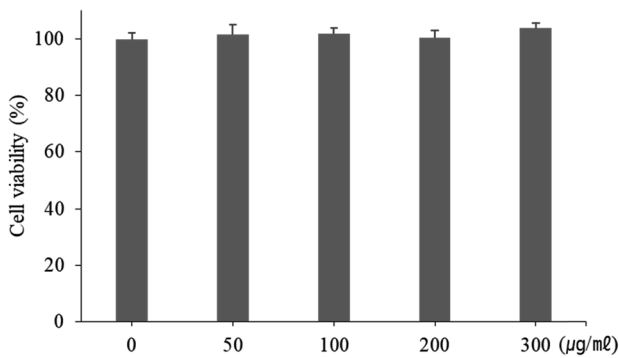


Fig. 2. Effect of ethanol extract from fermented *C. tricuspidata* twig with *G. lucidum* mycelium on cell viability of Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of fermented *Cudrania tricuspidata* for 24 h. After incubation, cell viability was assessed using the MTT assay. Values are expressed as mean±SD (n=4)

Cytoplasmic and nuclear fraction

Raw264.7 세포를 100 mm culture dish에 분주하여 12시간 배양하고 추출물을 농도별로 4시간동안 전처리한 후 LPS (1 µg/ml)를 30분 동안 처리하였다. 처리 후 세포를 PBS로 세척하고 원심분리 하여 pellet을 얻었다. nuclear and cytoplasmic protein extraction (ThermoFisher, Waltham, MA, USA)를 제조사에서 제공한 manual에 따라 실험을 진행하여 세포질과 핵을 분리하였다. 분리된 단백질은 western blot을 통해 분석하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하여 실시하였으며, 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계적 분석은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 이용하여 실시하였고, $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

Raw264.7 세포에 대한 세포독성

발효 추출물이 Raw264.7 세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였다(Fig. 2). 발효 추출물을 50~300 µg/ml 농도로 처리하였을 때 모든 농도에서 세포 생존율은 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으므로 대식세포에 대한 독성이 없는 것으로 확인되었다. 따라서 이 결과를 바탕으로 동일한 농도 범위 내에서 실험을 진행하였다.

NO 및 PGE₂ 생성에 미치는 영향

NO는 염증반응의 대표적인 지표물질로 iNOS에 의해 L-arginine으로부터 생성되며, LPS에 의해 발현된 iNOS에 의해 과도하게 NO의 생성이 많아지면 염증반응을 유발하여 세포독성, 조직손상 등의 원인이 되는 것으로 알려져 있으며 이로 인해 염증반응과 관련된 다양한 질병과 노화의 원인이 되기도 한다(Paradise *et al.*, 2010; Skidgel *et al.*, 2002). 한편, PGE₂는 염증 매개 인자로 cyclooxygenase에 의해 arachidonic acid로부터 합성되며 염증반응, 종양 전이 등의 세포 신호전달 과정에도 관여한다(Posadas *et al.*, 2000). 발효 추출물이 NO, PGE₂의 생성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 RAW264.7 세포에 추출물을 농도별로 4시간 동안 전처리하고 LPS를 18시간 처리한 후 측정하였다. LPS를 단독으로 처리한 군은 NO 생성을 급격하게 증가시킴을 확인하였다. 발효추출물은 LPS 단독 처리군과 비교했을 때 농도의존적으로 NO의 생성이 감소하는 것으로 나타났으며($p < 0.05$) 300 µg/ml 농도에서는 80%까지 NO의 생성을 감소시킴을 확인하였고 반면에 꾸지뽕나무 추출물은 300 µg/ml 농도에서 62%까지 NO의 생성을 감소시켰으며 발효추출물에 비해 낮은 억제효과를 나타냈다(Fig. 3A). MTT assay를 이용

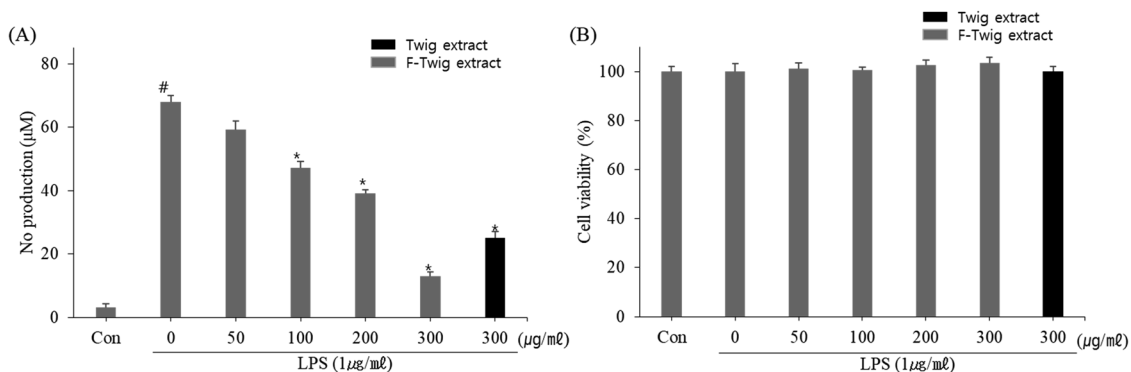


Fig. 3. Effect of ethanol extract from fermented *C. tricuspidata* twig with *G. lucidum* mycelium and *C. tricuspidata* twig on (A) NO production and (B) cell viability in LPS-stimulated RAW264.7. Cells were pretreated with fermented *Cudrania tricuspidata* for 4 h and then exposed to LPS for 18 h. NO production was measured by Griess reagent and cell viability was measured by MTT assay. The data presented are the means±SD of three independent experiments. # $P < 0.05$ vs. control group; * $P < 0.05$ vs. LPS group.

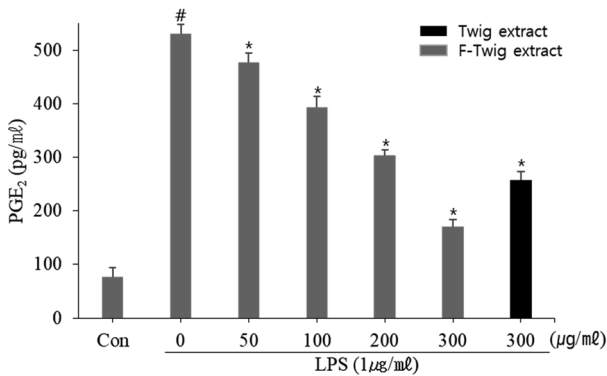


Fig. 4. Effect of ethanol extract from fermented *C. tricuspidata* twig with *G. lucidum* mycelium and *C. tricuspidata* twig on production of PGE₂ and inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW264.7. Cells were pretreated with fermented *Cudrania tricuspidata* for 4 h and then exposed to LPS for 18 h. NO production was measured by Griess reagent and cellviability was measured by MTT assay. The data presented are the means±SD. of three independent experiments. #P<0.05 vs. control group; *P<0.05 vs. LPS group.

하여 발효추출물과 LPS가 처리에 의해 세포생존율에 미치는 영향을 확인한 결과, 세포의 생존율에 영향을 주지 않음을 확인 하였다(Fig. 3B). 또한, LPS 단독 처리한 군에 비해 발효추출물을 처리한 군에서도 농도 의존적으로 PGE₂의 생성 억제 효과가 있는 것을 확인할 수 있었으며 (p<0.05), 특히 300 µg/ml 농도로 처리 시 PGE₂ 생성을 67%까지 감소시켰다(Fig. 4). 반면에, 꾸지뽕나무 잔가지 추출물의 경우 300 µg/ml 농도에서 NO는 62%, PGE₂는 51%의 억제 효과를 나타내었고 발효 추출물에 비해 낮은 억제 활성을 확인할 수 있었다(Fig. 3, 4). Kim 등(2017)은 동충하초 균사체 발효 추출물이 LPS에 의한 대식세포의 NO 생성을 유의적으로 억제하였으며 염증 반응 억제에 효과가 있음을 보고한 바 있다. 이는 본 연구

에서도 동일한 경향을 나타냈으며 연구 결과를 통해서 꾸지뽕나무 잔가지 추출물보다 발효 추출물의 항염증 활성이 우수함을 확인하였으며, 발효 추출물이 LPS에 의해 증가된 NO와 PGE₂의 생성을 감소시킴으로써 대식세포에서 염증 반응을 억제시키는 것에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

inflammatory cytokine 생성에 미치는 영향

Cytokine은 면역세포에 의해 분비되며 면역세포의 활성화, 증식 및 분화를 조절하여 염증반응을 매개하는 인자로 TNF-α와 IL-1β는 대표적인 inflammatory cytokine으로 알려져 있다. TNF-α는 T 림프구의 세포 증식, 생존, 분화, 사멸을 조절하며 염증반응을 유도하며 IL-1β와 같은 inflammatory cytokine 생성에 주도적인 역할을 한다. IL-1β는 염증반응 초기에 분비되어 숙주면역반응의 염증 매개자로서 작용한다(Seo *et al.*, 2014). 이러한 inflammatory cytokine들은 LPS로 유도된 대식세포에서 과도하게 생성되어 NO 및 PGE₂의 생성을 유도하며 염증 반응을 유발하며 악화시킨다. 발효 추출물이 inflammatory cytokine의 생성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 RAW264.7 세포에 추출물을 농도별로 4시간 동안 전처리하고 LPS를 18시간 처리한 후 측정된 결과 LPS 처리에 의해 IL-1β, TNF-α의 생성이 유의적으로 증가하였지만 발효 추출물에 의해 모든 사이토카인이 생성을 농도의존적으로 감소시킴을 확인하였다(p<0.05) (Fig. 5). 발효 추출물 300 µg/ml에서 IL-1β 생성이 74%까지 감소됨을 확인하였으며 TNF-α는 58%까지 감소됨을 확인하였다. 따라서 발효 추출물의 inflammatory cytokine의 생성 억제를 통해 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

iNOS와 COX-2는 NO의 생성 및 TNF-α, IL-1β와 같은 염증 매개 인자들의 생성을 유도하는 것으로 알려져 있다.

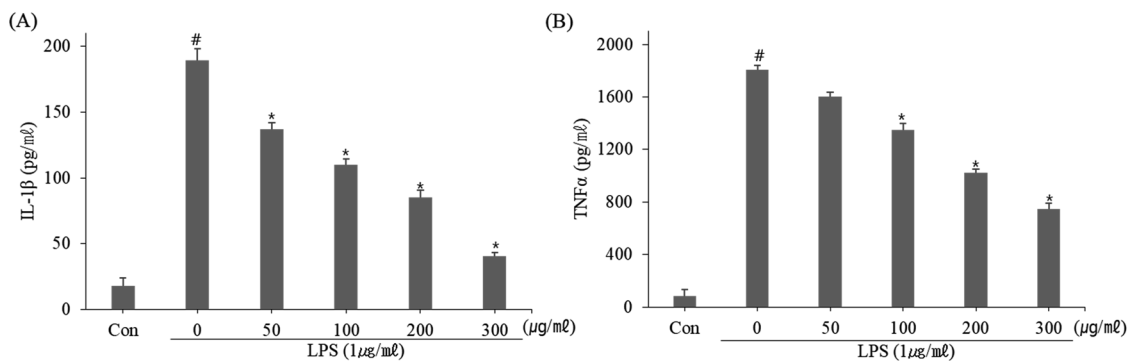


Fig. 5. Effect of ethanol extract from fermented *C. tricuspidata* twig with *G. lucidum* mycelium on production of (A) IL-1β and (B) TNF-α in LPS-stimulated RAW264.7. Cells were pretreated with fermented *Cudrania tricuspidata* for 4 h and then exposed to LPS for 18 h. Protein expression was measured by western blot. The data presented are the means±SD of three independent experiments. #P<0.05 vs. control group; *P<0.05 vs. LPS group.

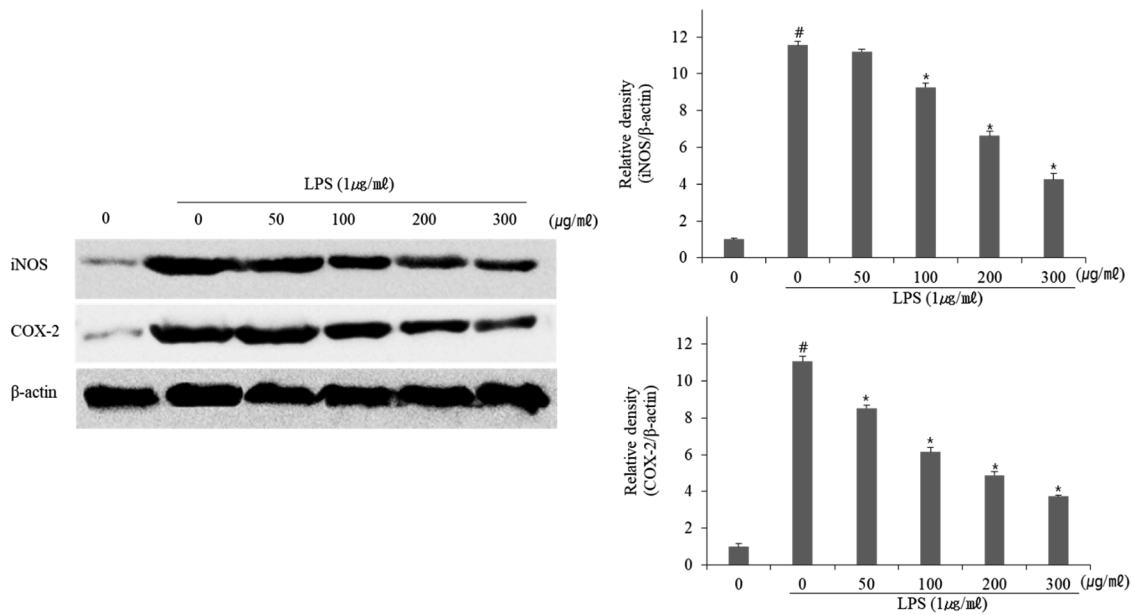


Fig. 6. Effect of ethanol extract from fermented *C. tricuspidata* twig with *G. lucidum* mycelium on expression of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW264.7. Cells were pretreated with fermented *Cudrania tricuspidata* for 4 h and then exposed to LPS for 18 h. Protein expression was measured by western blot. The data presented are the means±SD. of three independent experiments. #P<0.05 vs. control group; *P<0.05 vs. LPS group.

iNOS는 LPS와 inflammatory cytokine에 의해 발현이 증가하며 NO의 생성을 증가시켜 염증 반응에 의한 세포독성 및 조직 손상 등을 유발한다. COX는 arachidonic acid로부터 염증 매개 인자인 prostaglandins 합성을 촉진하며 TNF-α, IL-1β와 같은 inflammatory cytokine 생성을 유도하여 염증반응 유발한다. 발효 추출물의 NO 생성 억제 효과가 염증 관련 유전자의 발현 조절과 관련 여부를 확인하기 위하여 RAW264.7 세포에 추출물을 농도별로 4시간 동안 전처리하고 LPS를 처리한 후 iNOS와 COX-2의 발현정도를 확인하였다. 측정 결과, 무처리군에 비해 LPS 처리에 의해 증가된 iNOS와 COX-2 단백질 발현량이 발효추출물을 처리했을 때 농도 의존적으로 감소한 것을 확인하였다($p<0.05$) (Fig. 6). 이러한 결과를 통해서 발효 추출물이 iNOS, COX-2의 발현을 억제시켜 NO, PGE₂의 생성을 억제시킴으로서 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다. LPS에 의한 RAW264.7 세포의 염증반응에서 버섯 균사체 발효 추출물에 의한 염증 반응 억제와 iNOS 및 COX-2의 발현 억제에 대한 연구들이 보고된 바 있으며 이는 본 연구의 결과에서도 동일한 경향을 나타내었다 (Kim *et al.*, 2016).

NF-κB 활성화 조절에 미치는 영향

Inflammatory cytokine, iNOS 등을 포함하는 많은 염증 매개 인자의 발현은 전사인자인 NF-κB에 의해 조절된다 (Lee *et al.*, 2012). NF-κB는 세포질에서 IκB와 결합하여 불활성화 상태로 존재하지만, 세포가 LPS에 의해 자극되

면 IκB는 인산화되고 IκB로부터 NF-κB는 유리된다. 유리되며 활성화된 NF-κB는 핵 내로 이동하여 iNOS, COX-2와 같은 염증 매개 인자들의 발현을 촉진함으로써 염증 반응을 조절한다(Kawai and Akira, 2006). 염증 반응 억제 효과가 NF-κB 신호조절을 통해 일어나는지를 확인하기 RAW264.7 세포에 추출물을 농도별로 4시간 동안 전처리하고 LPS를 30분 동안 처리한 후 IκB 인산화 및 NF-κB 전이 여부를 확인하였다. LPS 단독 처리 군에서는 세포질 내의 인산화된 IκB의 양은 증가하였지만 이와 반대로 발효 추출물 처리군에서는 인산화된 IκB의 양이 감소하였으며 또한 핵 내의 NF-κB p65의 양은 LPS 단독 처리 군에서는 증가하였지만 발효 추출물 처리군에서는 감소하였다(Fig. 7). 발효 추출물에 의한 세포질에서 IκB의 인산화 억제와 핵 내의 NF-κB p65의 감소는 IκB의 분해가 억제되면서 NF-κB p65의 핵 내 전이가 억제되어 세포질 내에 존재하고 있음을 나타내고 있는 것으로 기존의 보고된 LPS에 의한 염증반응에 대한 천연물의 항염증 효과와 유사한 결과를 보여 주었다(Park *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2017). 따라서 발효 추출물의 항염증 효과는 LPS에 의해 유도되는 IκB의 분해와 NF-κB p65가 핵으로 이동을 억제함으로써 염증 매개인자들의 생성을 억제하여 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

적 요

염증은 외부 자극으로부터 보호하는 중요한 면역반응이

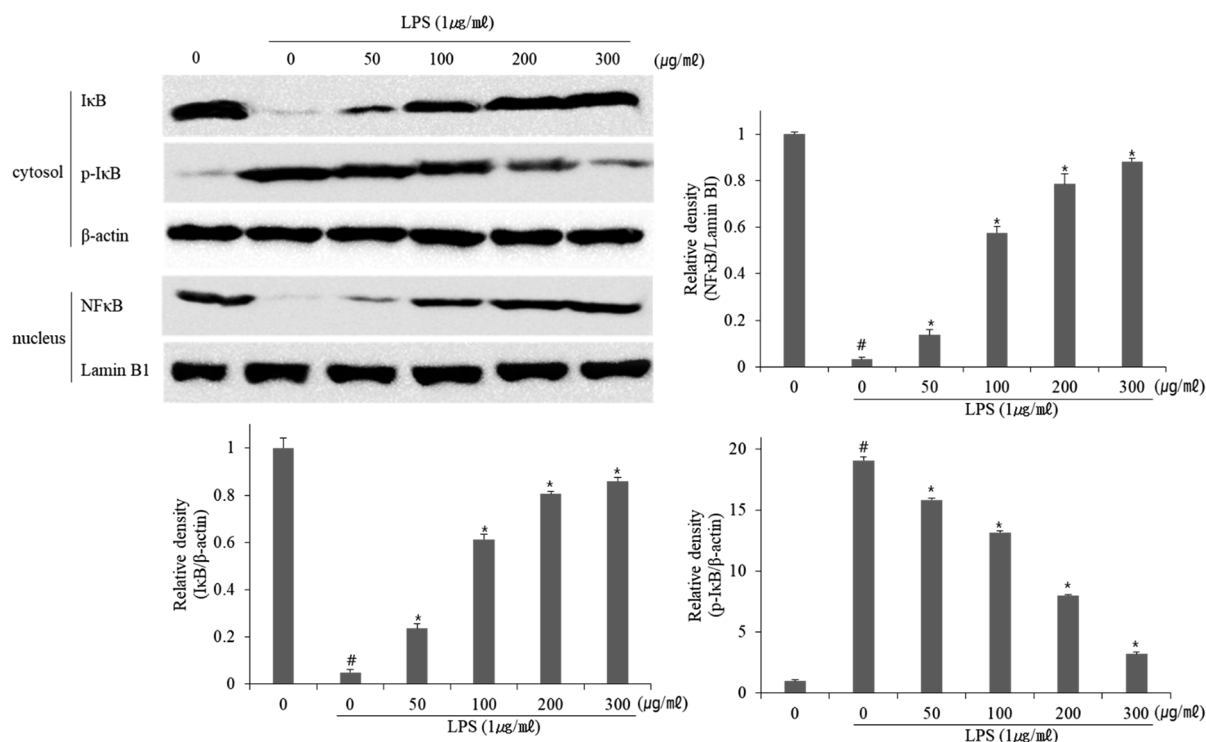


Fig. 7. Effect of ethanol extract from fermented *C. tricuspidata* twig with *G. lucidum* mycelium on NF-κB signaling activation in LPS-stimulated RAW264.7. Cells were pretreated with fermented *C. tricuspidata* for 4 h and then exposed to LPS for 30 min. The IκB degradation and NF-κB translocation were measured by western blot. The data presented are the means±SD of three independent. #P<0.05 vs. control group; *P<0.05 vs. LPS group.

다(Jeong *et al.*, 2012). 그러나 NO 및 inflammatory cytokine과 같은 염증 매개 인자의 과도한 생성은 비정상적인 염증 반응을 초래할 수 있다(Paradise *et al.*, 2010). 염증 매개 인자의 생성과 염증 신호 전달을 조절하는 중요한 역할을 하는 대식세포는 LPS 자극에 의해 NF-κB가 활성화 되어 inflammatory cytokine 등의 염증 매개 인자들이 분비가 증가되며 염증 반응을 심화시킨다(Lee *et al.*, 2012). 본 연구에서는 영지버섯균 발효 꾸지뽕나무 가지 톱밥 추출물을 이용하여 LPS로 염증을 유도한 Raw264.7세포에서 염증 관련 인자들의 생성 및 발현에 미치는 영향을 분석하여 항염증 효과를 확인하였다.

NO는 염증에서 중요한 역할을 하며 대식세포의 염증 반응 조절 평가시 대표적인 지표로 사용되며 iNOS에 의해 생성이 유도되며 PGE₂는 염증 매개 인자로 inflammatory cytokine 생성에 관여하며 COX-2에 의해 생성이 유도된다(Paradise *et al.*, 2010; Posadas *et al.*, 2000). 발효추출물이 RAW264.7세포에서 세포독성 없이 NO의 생성과 PGE₂의 생성을 감소시켰으며 이 결과는 발효 추출물 처리에 의해 iNOS와 COX-2의 발현이 감소한 것과 일치하였다. 또한 염증 반응을 조절하는 대표적인 inflammatory cytokine으로 알려진 IL-1β, TNF-α의 생성이 감소되었다. 따라서 발효추출물은 NO, PGE₂, inflammatory cytokines

생성을 감소시켜 항염증 효과를 나타낸다고 볼 수 있다. NF-κB는 iNOS, COX-2 및 inflammatory cytokine의 발현을 조절하는 전사인자로 IκB와의 결합에 의해 NF-κB의 핵 내 이동이 억제되며 불활성화상태로 존재한다. LPS 자극에 의해 IκB가 인산화 및 분해되면 NF-κB가 활성화 되어 핵 내로 이동하여 염증성 매개인자들의 발현을 유도하고, 염증성 질환 뿐만 아니라 다양한 질환을 유발시키는 것으로 알려져 있다 (Kawai and Akira, 2006; Ghosh and Karin, 2002). 본 연구에서는 LPS에 의해 자극된 RAW264.7 세포에서 IκB의 분해 및 NF-κB의 전이가 발효추출물에 의해 감소됨을 확인하였으며 발효추출물에 의한 iNOS, COX-2 및 inflammatory cytokine 감소는 NF-κB 활성화 감소에 의해 조절되는 것으로 사료된다. 이러한 결과들을 통해서 발효추출물이 NF-κB 활성화 억제를 통해 염증 매개 인자들의 생성 및 발현을 감소시킴으로서 염증 반응 억제 효과를 나타냄을 확인하여, 염증 관련 질환에 대해 예방 및 개선을 위한 항염증 기능성 소재로 사용될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 산림청(한국임업진흥원) 연구개발사업(과제

번호: 2021381D10-2123-BD02)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

REFERENCES

- Chen JH, Jiang RL. 1980. A pharmacological study of the Chinese drug lingzhi (ganoderma). Yao Hsueh Hsueh Pao-Acta Pharmaceutica Sinica 15: 234-244 (in Chinese).
- Cho HJ, Seon MR, Lee YM, Kim J, Kim J-K, Kim SG, Park JHY. 2008. 3,3'-Diindolylmethane suppresses the inflammatory response to lipopolysaccharide in murine macrophages. J Nutr 138: 7-23.
- Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Kim DH, Ryu J. 2009. Antioxidant activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to harvesting parts and time. Korean J Medicinal Crop Sci 17: 115-120.
- Furusawa E, Chou SC, Furusawa S, Hirazumi A, Dang Y. 1992. Antitumour activity of *Ganoderma lucidum*, an edible mushroom, on Intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in synergetic mice. Phytother Res 6: 300-304.
- Ghosh S, Ksarin M. 2002. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. Cell 109: S81-S96.
- Guo S, Qiu P, Xu G, Wu X, Dong P, Yang G, Zheng J, McClements DJ, Xiao H. 2012. Synergistic anti-inflammatory effects of nobiletin and sulforaphane in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. J Agr Food Chem 60: 2157-2164.
- Jin, KS, Lee JY, Kwon HJ, Kim BW. 2014. Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Ardisia arborescens* ethanol extract. Korean J Life Sci 24: 713-720.
- Kang DH, Kim JW, Youn KS. 2011. Antioxidant activities of extracts from fermented mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit, and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. Korean J Food Preserv 18: 236-243.
- Kang YJ, Wingerd BA, Arakawa T, Smith W. 2006. Cyclooxygenase-2 gene transcription in a macrophage model of inflammation. J Immunol 177: 8111-8122.
- Kawai T, Akira S. 2006. TLR signaling. Cell Death Differ. 13: 816-825.
- Kim JW, Kim C. 2005. Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated through Ras-ERK-NF- κ B. Biochem Pharmacol 70: 1352-1360.
- Kim JY, Chung JH, Hwang I, Kwan YS, Chai JK, Lee KH, Han TH, Moon JH. 2009. Quantification of quercetin and kaempferol contents in different parts of *Cudrania tricuspidata* and their processed foods. Kor J Hort Sci Technol 27: 489-496.
- Kim OK, Ho JH, Nam DE, Jun WJ, Hwang KT, Kang JE, Chae OS, Lee JM. 2012. Hepatoprotective effect of *Cudrania tricuspidata* extracts against oxidative damage. J Korean Soc Food Sci Nutr 41: 7-13.
- Kim YS, Joung MY, Ryu BS, Park PJ, Jeong JH. 2016. Anti-inflammatory Activities of Extracts from Fermented *Taraxacum platycarpum* D. Leaves Using *Hericium erinaceum* Mycelia. J Korean Soc Food Sci Nutr 45: 20-26.
- Kim YS, Shin WB, Dong X, Kim EK, Nawarathna WPAS, Kim HJ, Park PJ. 2017. Anti-inflammatory effect of the extract from fermented *Asterina pectinifera* with *Cordyceps militaris* mycelia in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Food Sci Biotechnol 26, 1633-1640.
- Jeong EJ, Seo H, Yang H, Kim J, Sung SH, Kim YC. 2012. Anti-inflammatory phenolics isolated from *Juniperus rigida* leaves and twigs in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophage cells. J Enzyme Inhib Med Chem 27, 875-879.
- Joo HY, Lim KT. 2009. Protective effect of glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* on liver in CCl4-treated A/J mice. Korean J Food Sci Technol 41: 93-99.
- Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. Nature Rev Immunol 2: 787-795.
- Lee GH. 2014. A study on the effect of biologically active in skin on jujube extract and extract of fermented jujube. Ph. D. Thesis. Daejeon University. Daejeon. Korea.
- Lee JW, Bae CJ, Choi YJ, Kim SI, Kim NH, Lee HJ, Kim SS, Kwon YS, Chun W. 2012. 3,4,5-Trihydroxycinnamic acid inhibits LPS-induced iNOS expression by suppressing NF- κ B activation in BV2 microglial cells. Korean J Physiol Pharmacol. 16: 107-112.
- Medicherla K, Sahu BD, Kuncha M, Kumar JM, Sudhakar G, Sistla R. 2015. Oral administration of geraniol ameliorates acute experimental murine colitis by inhibiting pro-inflammatory cytokines and NF- κ B signaling. Food Funct 6: 2984-2995.
- Paradise WA, Vesper BJ, Goel A, Waltonen JD, Altman KW, Haines GK, Radosevich JA. 2010. Nitric oxide: Perspectives and emerging studies of a well known cytotoxin. Int J Mol Sci 11: 2715-2745.
- Park JH, Ahn KJ, Lee SR. 2020. Anti-inflammatory Effects of Heat-treated Starfish Extract in Lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 Cells. J Life Sci 30: 634-639.
- Park SM, Byun SH, Kim YW, Cho JJ, Kim SC. 2012. Inhibitory effect of *Mori Folium* ethanol extract on proinflammatory mediator in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells. Kor J Herbology 27: 31-38.
- Peng XX, Zhang SH, Wang XL, Ye TJ, Li H, Yan XF, Wei L, Wu ZP, Hu J, Zou CP, Wang YH, Hu XD. 2015. *Panax Notoginseng* flower saponins (PNFS) inhibit LPS-stimulated NO overproduction and iNOS gene overexpression via the suppression of TLR4-mediated MAPK/NF- κ B signaling pathways in RAW264.7 macrophages. Chin Med 10:152015.
- Posadas I, Terencio MC, Guillén I, Ferrándiz ML, Coloma J, Payá M, Alcaraz MJ. 2000. Co-regulation between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 361: 98-106.
- Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. 2003. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. Phytother Res 17: 485-489.
- Skidgel RA, Gao XP, Brovkovich V, Rahman A, Jho D, Predescu S, Malik AB. 2002. Nitric oxide stimulates macrophage inflammatory protein-2 expression in sepsis. J Immunol 169, 2093-2101.
- Seo MJ, Kang BW, Kim MJ, Lee HH, Seo KI, Kim KH, Jeong YK. 2014. The effect of cordycepin on the production of pro-inflammatory cytokines in mouse peritoneal macrophages. Korean J Food Sci. Technol 46: 68-72.
- Shiao MS. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities, and pharmacological functions. Chem Rec 3: 172-180.

Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. 1994. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci US A* 91: 2046-2050.

Wasser SP, Weis AL. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycete mushrooms: current perspectives (Review). *Int J Med Mushrooms* 1: 31-62.