

꽃송이버섯 추출물이 RAW 264.7 세포에서 TNF- α , iNOS, IL-1 β 유전자 발현에 미치는 영향

한 효 상^{*}

중부대학교 보건행정학과 교수

Effect of Water Extract of *Sparassis crispa* on the Expression of TNF- α , iNOS and IL-1 β Genes in RAW 264.7 Cells

Hyo-Sang Han, Ph.D^{*}

Dept. of Health Administration, Joongbu University, Professor

Abstract

Purpose : The purpose of this study was to examine the anti-inflammatory effects of *Sparassis crispa* (SC). SC is a well-known traditional herbal remedy and its mushroom is used for treatment of inflammation. Many diseases that are increasing recently have characteristics of inflammatory diseases. Researchers are finding bioactive substances from natural products that can promote treatment and prevention of inflammation. We investigated the effect of water extracted from SC on the expression of effector genes involved in the function of RAW 264.7 cells.

Methods : Effects of RAW 264.7 cells on cell viability, antioxidation, and mRNA expression were examined using water extracts from SC. A 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay was performed to determine the effect of water extracts from SC on cell viability in RAW 264.7 cells. Inflammation of RAW 264.7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS) treatment and expression levels of inflammatory cytokine TNF- α , iNOS and IL-1 β gene were analyzed using quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) analysis.

Results : The MTS assay was performed on RAW 264.7 cells after treatment with various concentrations of water extracts of SC. Treatment of RAW 264.7 cells with water extracts from SC and LPS at a concentration of 0.125, 0.5 mg/ml for twenty four hours promoted mRNA expression of TNF- α , iNOS and IL-1 β .

Conclusion : MTS assay was applied to RAW 264.7 cells after various concentrations of water extracts of SC. Through experimental demonstration of anti-oxidant and anti-inflammatory effects of water extracts from SC, we suggest that SC is a valuable material for the prevention and treatment of various inflammatory diseases.

Key Words : anti-inflammation, lipopolysaccharide, MTS assay, RAW 264.7 cell, Sparassis crispa

^{*}교신저자 : 한효상, hanhs@joongbu.ac.kr

논문접수일 : 2021년 1월 7일 | 수정일 : 2021년 2월 2일 | 게재승인일 : 2021년 2월 19일

I. 서론

최근 증가하고 있는 각종 질병의 원인은 대부분 염증성 질환의 특성을 가지고 있다. 이러한 이유로 치료 예방에 관련된 생리활성 물질에 대한 소재를 천연물에서 찾고자하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 염증(Inflammation)은 신체의 여러가지 위해 상황에서 감염 또는 생존하기 위한 항상성을 유지하기 위하여 필요한 면역반응이다(Dai & Medzhitov, 2017). 염증 반응을 유발하는 사이토카인들 중에서 IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6 등이 사이토카인 발현을 유도하여 염증 반응을 일으킨다. 사이토카인 신호의 생리학적 미세 조정 외에도 신호의 특성이나 효력 변경이 병태생리학적 반응에 중요할 수 있으며 새로운 치료 접근법도 제공할 수 있다(Lin & Leonard, 2019).

LPS(Lipopolysaccharide; 리포 다당류)는 대부분의 그람 음성균의 외막 바깥쪽을 구성하는 내독소로 친수성 다당류와 지질 A 로 불리는 소수성 성분으로 구성된다. 지질 A 는 내 독소의 주요 생물 활성을 담당하며 면역 세포에서 병원체 관련 분자로 알려져 있다(Wang & Quinn, 2010).

NO는 L-아르기닌(L-arginine)에서 내피 NOS (eNOS), 뉴런 NOS (NeOS), 유도성 NOS (iNOS)의 세 가지 이소 형태를 포함하는 효소들의 작용을 통해 합성된다. 이들 중 iNOS에서 유래된 NO가 염증 조건 중 포도당과 지질대사를 포함한 여러 생화학적 경로와 에너지 대사의 규제에 중심적인 역할을 한다(Sarit & Oren, 2019).

TNF는 항상성 및 질병 병인에 중요한 기능을 가진 다발성 사이토카인(cytokine)이다. TNF 수용체 신호 전달의 모델은 선형 유비퀴틴화 및 염증, 세포 사멸 및 괴사와 같은 다른 기능적 결과와 연결된 별개의 신호 전달 복합체의 형성하는 것으로 알려져 있다(George & Lionel, 2016).

IL-1 β 는 염증조절복합체(inflammasome) 매개 활성화 후 카스파제 -1(caspase-1)에 의해 처리되는 유일한 사이토 카인으로 다양한 면역 세포 유형의 염증 신호에 의해 유도된다(Rebekka 등, 2018).

균류는 진핵생물의 하나로, 효모와 곰팡이, 버섯 등이

포함되며, 진균류라고 부르기도 한다. 균류 중 버섯은 영양생장세대에 균사체로 살아가다가 생식생장세대에 자실체를 만드는 곰팡이를 버섯이라고 부른다. 버섯 균사체는 기질의 유기물을 분해하는 효소를 내어 가용성 영양분을 만들고 이것을 균사체의 성장에 이용한다. 균사체는 습도, 온도, 산도, C/N 율 등 다양한 환경요소가 적합한 상태로 유지되면 기질 내에서 지속적으로 성장한다(Kim 등, 2017).

버섯류는 옛날부터 세계의 각 민족들 사이에서 영양소 보급원으로 먹거나 한방약 또는 민간약으로 쓰이거나 하면서 생활속에 받아들여졌다. 버섯은 생물이라고도 해도 식물처럼 엽록소가 없기 때문에 광합성에 의해 영양분을 만들 수 없기 때문에 버섯은 살아 있는 수목의 뿌리나 줄기에 기생하면서 거기에서 균계(菌系)를 잠입시켜서 균근(菌根)을 뺏고 그곳으로부터 영양분을 얻어 생육한다.

꽃송이버섯(*Sparasis crispa*)은 민주름버섯목(aphyllophorales), 꽃송이버섯과(sparassidaceae)에 속하는 버섯으로 우리나라를 비롯하여 중국, 일본, 북아메리카, 유럽, 호주 등에 분포되어 있다. 자실층(hymenium)은 각각 작은 갓의 아랫면 또는 바깥쪽에 있고 평활하며, 처음에는 옅은 노랑이나 성장하면 밝은 황갈색으로 되고 최종적으로 갈색으로 된다. 또한 조직은 얇고 탄력성이 있으며 씹는 질감과 향이 좋아 식용으로서 가치가 있으며, 자실체 (fruit body)높이 10~25 cm이고 밑 부분은 굽고 줄기가 공통의 자루를 가지고 있고 위쪽으로 갈라져 짧은 분지를 형성하고 가장자리는 꽃양배추 모양으로 흰색이다(Cho, 2012).

꽃송이버섯은 주로 베타글루칸(beta-glucan)이나 프로테오글루칸(proteoglucan)으로 렌티난(lentinan), 소니필란(schizophyllan), 클레스틴(polysaccharides-Krestin), active hexose correlated compound (AHCC) 그리고 polysaccharide-P 등이 그 성분들이다. 꽃송이버섯의 β -글루칸 함유량은 일본식품분석센터에 따르면 약 43.6 %였으며 이는 β -글루칸이 많이 함유되어 있다는 송이버섯(약 18.1 %), 잎새버섯(약 15~20 %), 영지버섯(약 8~15 %), 느타리버섯(약 7~12 %) 아가리쿠스(약 11.6 %) 등에 비해 적게는 2 배 많게는 3 배 이상 높은 결과이다(Nakajima, 2014).

꽃송이버섯 추출물이 마우스 대식세포인 RAW 264.7

세포 세포활성도 작용에 미치는 영향을 조사하고자 RAW 264.7 세포에 꽃송이버섯 추출물과 LPS 로 처리한 후 RAW 264.7 세포에 6 시간과 반응시켰을 때 경과하였을 때 나타나는 NF- α , iNOS, IL-1 β 의 mRNA 발현을 확인하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 연구방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용한 꽃송이버섯은 한국 서울의 동양허브 주식회사로부터 구입하였고, 약재는 실험에 사용하기 전 단계에 ultrasonic cleaner를 사용하여 불순물을 제거하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 열수추출은 boiling pots (boiling pots, Daewoong, Korea), filter paper (Filter paper, Advantec No.2, Japan) , rotary vacuum evaporator (Rotary vacuum evaporator, Eyela, Japan), Freeze dryer (Freeze dryer, Eyela, Japan), ultrasonic cleaner (Ultrasonic cleaner, Branson, USA) 등이 사용되었으며, 세포배양은 FBS (FBS, WELGENE, Korea), 100 U/ml penicillin, DMEM media (Penicillin, DMEM media, WELGENE, Korea), 100 μ g/ml streptomycin (Streptomycin, WELGENE, Korea), DPBS (DPBS, Corning, USA), Trypsin-EDTA (Trypsin-EDTA, WELGENE, Korea), LPS from Escherichia coli 0127:B8 (LPS, Sigma, USA), MTS solution (MTS, Promega, USA), water bath (Water bath, HAAKE, Germany), CO2 incubator (CO2 incubator, Thermo, USA), microplate reader (Microplate reader, Molecular Devices EMax Plus, USA) 등이 사용되었고, RT-PCR은 eCube Tissue RNA Mini Kit (RNA Mini Kit, PhileKorea, Korea), 2X Prime Q-mater Mix (Q-mater Mix, GENET BIO, Korea), RNase inhibitor (RNase inhibitor, Enzynomics, Korea), 5X M-MLV RT reaction buffer (RT reaction

buffer, Promega, USA), M-MLV reverse transcriptase (M-MLV reverse transcriptase, Promega, USA), Qubit RNA Assay Kit (RNA Assay Kit, molecular probes, USA), The Qubit 2.0 Fluorometer (Fluorometer, Invitrogen, USA), AriaMx (AriaMx, Agilent, USA) 등이 사용되었다.

2. 방법

1) 꽃송이버섯 열수추출물 제조

꽃송이버섯을 50 g 으로 측정하고 1 차 증류수 2,000 ml를 환류추출기에 함께 넣은 뒤 끓는 지점으로부터 추가로 2 시간 동안 가열하여 추출하였고, 추출액을 감압 여과하기 위해 filter paper 로 여과하고 여과액을 rotary vacuum evaporator 를 이용 농축액을 얻어 동결건조기를 이용하여 건조된 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 꽃송이버섯 16.2 g 이었다.

2) 세포 배양

RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 구매하였다. 5 % CO2 가 존재하는, 배양온도 37 $^{\circ}$ C 조건을 유지해주었고, 1 %의 antibiotic antimycotic 와 10 %(v/v)의 FBS (fetal bovine serum)를 추가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)를 이용하여 배양하였다.

3) 세포활성도 평가

꽃송이버섯 추출물이 RAW 264.7 세포에 영향을 주는 세포활성도를 살펴보기 위하여 MTS assay 수행하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2,500 cells/well로 분주하여 24 시간 배양한 후 꽃송이버섯 추출물을 다양한 농도별(0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml)로 첨가하고 24 시간 동안 배양하였으며, 대조군과 LPS를 처리한 실험군의 농도는 각각 저농도(0.125 mg/ml)와 고농도(0.5 mg/ml)로 진행하였다. MTS 시약 20 μ l 를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후 490 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 세포활성도는 다음의 식으로 계산하였다.

세포활성도 (%) = (시료첨가군 흡광도 - 시료 흡광도 / 대조군 흡광도) \times 100

4) Quantitative RT-PCR

RAW 264.7 세포를 1.0 x 10⁶ cells/well로 나누어 넣고 24 시간 동안 6 well culture dish에 배양하였으며, 1 µg/ml의 LPS와 0.125, 0.5 mg/ml의 꽃송이버섯 추출물을 세포에 넣은 후 24 시간 배양시켰다. 각 시료에 첨가된 배지를 제거한 후 PBS를 이용해 세척한 뒤 RNA를 eCube Tissue RNA Kit를 사용하여 추출하였으며 The Qubit 2.0 Fluorometer로 정하였다. cDNA를 생성하기 위하여 1 µg의 RNA에 1 µl의 dNTP mix (10 mM)와 1 µl의 andom Hexamer (100 pmol/µl)를 넣은 뒤 DEPC-treated water로 부피 10 µl가 되도록 하였다. 5 분간 65 °C에서 반응시킨 뒤 얼음을 사용하여 온도를 낮춘 후 4 µl의 DEPC-treated

water, 1 µl의 Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, 1 µl의 RNase inhibitor, 4 µl의 5 x Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase reaction buffer를 추가 첨가하였다. 혼합된 반응물을 10 분 동안 37 °C에서 방치한 뒤 50 °C에서 1 시간 반응하여 cDNA를 합성하였다. TNF-α, IL-1β, iNOS mRNA의 발현량을 qRT-PCR로 수행하였다. 합성한 cDNA를 증류수를 이용하여 20 %로 희석시킨 뒤 5 µl를 10 µl의 2x Prime Q-mater Mix, 1.5 µl의 10 pmol/µl forward primer, 2 µl의 nuclease free water, 1.5 µl의 10 pmol/µl reverse primer와 섞고 qRT-PCR을 수행하였다(Table 1).

Table 1. Primer sequences

Gene		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp (°C)
IL-1β	F	AGG TCA AAG GTT TGG AAG CA	129	58
	R	TGA AGC AGC TAT GGC AAC TG		
TNF-α	F	AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT	103	58
	R	CCA CCA CGC TCT TCT GTC TAC		
iNOS	F	CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT	95	58
	R	CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG		
GAPDH	F	CCA TGG AGA AGG CTG GGG	195	58
	R	CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC		

IL-1β : interleukin 1 beta, TNF-α : tumor necrosis factor-α, iNOS : inducible nitric oxide synthase, GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

3. 통계처리

실험 성적은 평균치±표준편차(mean±SD)로 처리하였으며, 모든 실험은 3 회 반복 실시하였다. 실험군과 대조군의 평균 차이를 student's t-test 로 분석, p 값이 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의미한 차이로 판정하여 처리하였다.

Ⅲ. 결 과

1. RAW 264.7 세포에 미치는 세포활성도 영향

꽃송이버섯 추출물이 RAW 264.7 세포의 세포활성도에 미치는 작용을 확인하기 위하여 MTS assay 를 수행하였다. 꽃송이버섯 추출물을 농도(0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml)에 따라 RAW 264.7 세포에 24 시간 처치한 결과 모든 농도에서 RAW 264.7 세포에 영향을 주는 세포활성도상

Table 2. Cell viability

Concentration (mg/ml)	Cell viability
Control	100
0.125	131.20±3.68**
0.25	168.80±9.25**
0.5	199.90±5.88***
1	291.60±14.00***
2	554.90±29.86***

SC : water extracts of *Sparassis crispa*
 Control : Not treated with SC.
 p<0.01, *p<0.001 compared to the Control.

승(100 % 이상)시켰다(Fig 1).

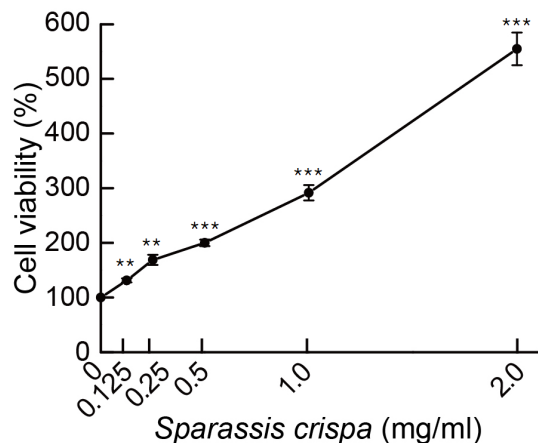


Fig 1. Effect of SC on cell viability on RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated for 24 hours with directed concentrations of *Sparassis crispa*. Cell viability was measured by MTS analysis. **p<0.01, ***p<0.001. SC; water extracts of *Sparassis crispa*

2. RAW 264.7 세포의 염증 반응(TNF-α)에 미치는 영향

전체 농도 중에 가장 높은 농도인 2.0 mg/ml의 SC를 처리한 RAW 264.7 세포가 554.9±29.8 % 만큼 생존율을 보여주었다. 이러한 이유로 RAW 264.7 세포에 추출물을 처리한 농도의 추후 실험은 2.0 mg/ml의 1/10 농도인 0.25 mg/ml(168.8±9.2 %)를 기준으로 저농도(0.125 mg/ml, 131.2±3.6 %)와 고농도(0.5 mg/ml, 199.9±5.8 %)로 진행하였다.

꽃송이버섯 추출물을 LPS를 처리하지 않은 RAW 264.7 세포와 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포의 면역반응에 미치는 영향을 24 시간 처리한 뒤 TNF-α의 발현을 확인하였다. LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에 꽃송이버섯 추출물 0.125, 0.5 mg/ml를 처리한 결과 대조군대비 약 2 배 증가하였고, LPS 처리후 저농도(0.125 mg/ml)의 꽃송이버섯 추출물에서 약 10 % 증가되었으며, LPS 처리후 고농도(0.5 mg/ml)의 꽃송이버섯 추출물에서 유사하게 발현되었다. 결과적으로 LPS만 처리한 RAW 264.7 세포보다 소폭 증가하여 TNF-α의 mRNA 발현이 촉진되었다(Fig 2).

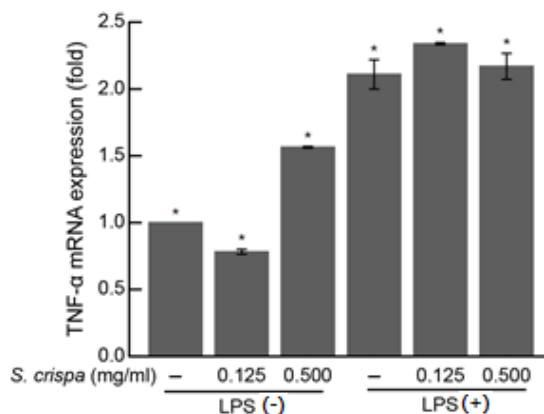


Fig 2. Effect of treating SC on stimulation of pro-inflammatory cytokines TNF-α mRNA expression for 24 hours. RAW 264.7 cells were treated with 0.125, 0.5 mg/ml of SC with 1 μg/ml of LPS or without for 24 hours. Total RNA was analyzed and isolated for mRNA expression with qRT-PCR. *p<0.05. SC; water extracts of *Sparassis crispa*

Table 3. TNF- α mRNA expression

Concentration SC(mg/ml)	LPS(-)	LPS(+)
-	1.00±0.00*	2.11±0.11*
0.125	0.78±0.02*	2.34±0.01*
0.5	1.56±0.01*	2.17±0.10*

SC : water extracts of *Sparasis crispa*

- : Not treated with SC.

*p<0.05 compared to the without, with Control.

3. RAW 264.7 세포의 염증 반응(iNOS)에 미치는 영향

꽃송이버섯 추출물을 LPS 를 처리하지 않은 RAW 264.7 세포와 LPS 로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포의 면역반응에 미치는 영향을 24 시간 처리한 뒤 iNOS 의 발현을 확인하였다. LPS 로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에 꽃송이버섯 추출물 0.125, 0.5 mg/ml를 처리한 결과 대조군대비 약 3 배 증가하였고, LPS 처리후 저농도 (0.125 mg/ml)의 꽃송이버섯 추출물에서 약 20 % 감소되었으며, LPS 처리후 고농도(0.5 mg/ml)의 꽃송이버섯 추출물에서 유사하게 발현되었다. 결과적으로 LPS 만 처리한 RAW 264.7 세포보다 소폭 낮은 수치로 iNOS 의 mRNA 발현이 촉진되었다(Fig 3).

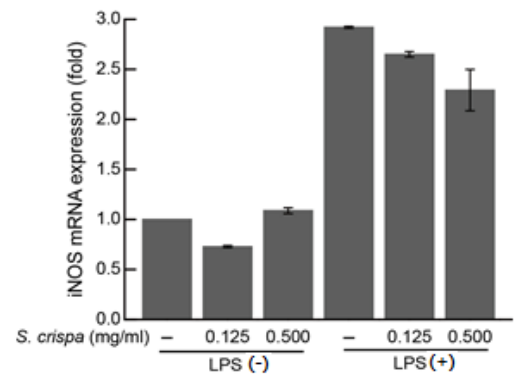


Fig 3. Effect of treating SC on stimulation of pro-inflammatory cytokines iNOS mRNA expression for 6 hours. RAW 264.7 cells were treated with 0.125, 0.5 mg/ml of SC with 1 μ g/ml of LPS or without for 24 hours. Total RNA was analyzed and isolated for mRNA expression with qRT-PCR. SC; water extracts of *Sparasis crispa*

Table 4. iNOS mRNA expression

Concentration SC(mg/ml)	LPS(-)	LPS(+)
-	1.00±0.00	2.92±0.01
0.125	0.73±0.01	2.65±0.03
0.5	1.09±0.03	2.29±0.21

SC : water extracts of *Sparasis crispa*

- : Not treated with SC.

4. RAW 264.7 세포의 염증 반응(IL-1 β)에 미치는 영향

꽃송이버섯 추출물을 LPS 를 처리하지 않은 RAW 264.7 세포와 LPS 로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포의

면역반응에 미치는 영향을 24 시간 처리한 뒤 IL-1 β 의 발현을 확인하였다. LPS 로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에 꽃송이버섯 추출물 0.125, 0.5 mg/ml를 처리한 결과 대조군대비 약 13 배 증가하였고, LPS 처리후 저농도

Table 5. IL-1 β mRNA expression

Concentration SC(mg/ml)	LPS(-)	LPS(+)
-	1.00 \pm 0.00	12.79 \pm 0.71
0.125	0.83 \pm 0.09	11.12 \pm 0.15
0.5	1.66 \pm 0.03	9.69 \pm 0.54

SC : water extracts of *Sparasis crispa*

- : Not treated with SC.

(0.125 mg/ml)의 꽃송이버섯 추출물에서 약 10 % 감소되었으며, LPS 처리후 고농도(0.5 mg/ml)의 꽃송이버섯 추출물에서 유사하게 발현되었다. 결과적으로 LPS 만 처리한 RAW 264.7 세포보다 낮은 수치로 IL-1 β 의 mRNA 발현이 촉진되었다(Fig 4).

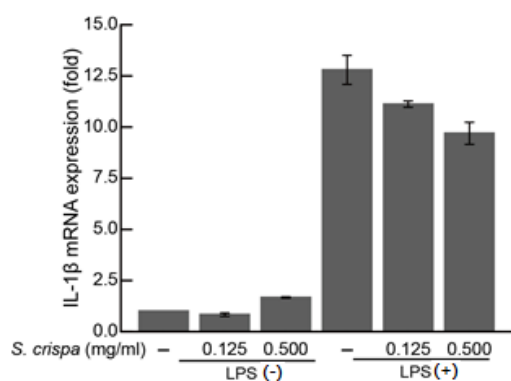


Fig 4. Effect of treating SC on stimulation of pro-inflammatory cytokines IL-1 β mRNA expression for 24 hours. RAW 264.7 cells were treated with 0.125, 0.5 mg/ml of SC with 1 μ g/ml of LPS or without for 24 hours. Total RNA was analyzed and isolated for mRNA expression with qRT-PCR. SC; water extracts of *Sparasis crispa*

IV. 고 찰

꽃송이버섯은 자실체가 성숙하면 전체는 9.5~22.5 cm로 크고, 다소 둥글며, 작은 꽃잎 모양의 갓이 모여 꽃양배추 또는 해초 모양을 이룬다. 대는 2.5~5.5 cm로 짧고 뭉툭하며 단단하고, 위쪽으로 반복하여 갈라져 짧은 분

지를 수없이 형성한다. 분지는 편평하게 되며, 얇고 파상형의 꽃잎형 또는 갓이 된다. 갓의 윗면은 평활하고, 백색 또는 담황색이나 성장 후에는 황토색을 띤다. 자실층은 각각 작은 갓의 하면 또는 바깥쪽에 있고, 평활하며, 초기에는 담황색이나 성장하면 황토색이 되고 노숙하면 갈색이 된다. 조직은 얇고, 탄력성이 있으며 유연하고, 육질형이고, 백색이다. 포문은 백색이며, 포자모양은 난형 또는 타원형이며, 표면은 평활하다(Kim 등, 2017).

꽃송이버섯은 전체 영양성분의 70 %를 탄수화물이 이루고 있고, 이 중 탄수화물의 절반 이상이 베타글루칸(β -glucan) 성분이며, 그 외에 에르고스테롤(ergosterol), 키토산(chitosan), 글리코겐(glycogen), 트레할로스(trehalos) 등 다양한 성분이 포함되어 있다(Oh 등, 2013). 꽃송이버섯은 식이섬유가 풍부할 뿐만 아니라 특히 포도당이 베타-1,3-결합으로 연결된 주쇄에 베타-1,6-결합의 측쇄를 가져 식용 가능한 버섯 중에서 베타 글루칸(β -glucan)의 함량이 가장 높은 것으로 알려져 있다(Lim 등, 2012). 꽃송이버섯은 배지조성에 따라 베타글루칸 함량이 달라질 수 있으며, 대 부분에 많고, 대에서는 최대 약 59.5% 까지 함유하고 있다(Wang 등, 2014).

꽃송이버섯의 약리효과에 대한 연구는 1999년 동경약과대학에서 꽃송이버섯에서 유래한 β -글루칸의 구조와 항종양 활성에 대해 보고한 후 약 20여년간 항산화, 항염, 항암, 항당뇨 등 다양한 분야에서 연구되어지고 있다(Nakajima, 2014). 약리작용으로는 Kim 등(2018)은 골관절염 억제효과를 Kim 등(2013)은 면역세포 활성화 및 항암 효과를 Lee 등(2012)는 지질분해효과를 Lee 등(2014)는 항비만효과를 Kimura 등(2013)은 피부 상태 개선 효과에 대하여 Kim 등(2015)은 야생 꽃송이버섯의 생리활성 물질을 탐색하여 기능성 식품 개발에 이용하기 위해 꽃

송이버섯 물 추출물과 유기용매 분획물의 혈전 용해 활성과 트롬빈 저해 활성, 항염증 활성 및 항산화활성을 보고하여 식용뿐만 아니라 약용으로도 많이 활용되고 있어 이를 이용한 여러 기능성 식품 개발에 가능성이 높은 버섯중의 하나이다(Lee 등, 2016).

꽃송이버섯의 추출물인 항암효과에 대해서는 많은 연구가 이루어졌으나, 항염증반응의 세부적인 효과에 대해서는 보고되지 않았다.

최근 사이토카인(cytokine)의 염증을 포함한 면역 반응 조절기능에 관한 연구가 진행되고 있으며 인터페론(interferon), 인터루킨-2(interleukin-2), 인터루킨-4(interleukin-4)과 같은 염증을 유발하는 물질을 저해하는 메커니즘을 발견한다면, 면역질환의 치료에 도움이 될 것이다(Spangler 등, 2015).

염증은 국소 부위에 통증, 부종 그리고 발적화를 동반한 수분의 축적을 의미하는데 이런 항염증효과는 혈관벽의 투과성, 혈류 속도의 감소, 국소 모세혈관의 지름 등을 증가시키는 것에서 온다(Kuprash & Nedospasov, 2016).

MTS assay를 통하여 꽃송이버섯 추출물이 RAW 264.7 세포에 대한 세포활성도의 작용을 확인한 결과 꽃송이버섯 추출물의 다양한 농도(0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml)별로 RAW 264.7 세포에 24 시간 처리한 결과 모든 농도에서 RAW 264.7 세포에 미치는 세포활성도를 증가시켰다.

꽃송이버섯 추출물이 염증 반응에 미치는 작용을 확인하고자 qRT-PCR을 통해 RAW 264.7 세포에 꽃송이버섯 추출물을 처리한 후 iNOS, TNF- α , IL-1 β 의 mRNA 발현량을 확인한 결과 mRNA 발현이 촉진되었고, LPS를 통해 염증을 일으킨 RAW 264.7 세포에 꽃송이버섯 추출물 24 시간, 0.125, 0.5 mg/ml를 처리한 결과 TNF- α 의 mRNA 발현을 소폭 증가시키거나 동등하게 발현되었고, iNOS와 IL-1 β 의 mRNA 발현을 저농도(0.125 mg/ml)보다 고농도(0.5 mg/ml)에서 농도 의존적으로 감소시켰다.

이러한 실험 결과들을 통해 꽃송이버섯 추출물은 바이러스, 박테리아 같은 외부 항원에 대한 면역 반응을 촉진 시킴으로써 방어면역을 유도하고, 염증 반응의 빠른 완화를 유도하는 항염증 효능이 있을 것으로 생각된다. 향후 꽃송이버섯 추출물을 이용한 항염제 개발에 대한 특

성에 대한 분자수준의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구에서 꽃송이버섯 추출물이 염증 반응에 미치는 효과를 알아보기 위하여, 24 시간 RAW 264.7 세포에 꽃송이버섯 추출물을 처리한 뒤 나타나는 염증 반응을 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RAW 264.7 세포에 꽃송이버섯 추출물을 모든 농도로 24 시간 처리한 결과 세포활성도를 증가시켰다.
2. RAW 264.7 세포에 꽃송이버섯 추출물을 24 시간 0.125, 0.5 mg/ml 농도로 처치했을 때 iNOS, TNF- α , IL-1 β 의 mRNA 발현을 촉진하였다.
3. 24 시간 LPS를 통해 염증을 일으킨 RAW 264.7 세포에 꽃송이버섯 추출물 0.125, 0.5 mg/ml를 처리한 결과 TNF- α 의 mRNA 발현을 유의미하게 증가시켰다.

이번 연구 결과는 꽃송이버섯 추출물의 항염증 연구에 도움을 줄 것으로 사료되며, 추후 꽃송이버섯 추출물의 염증 억제 효능에 대한 보다 심도 깊은 연구가 필요한 것으로 사료되는 바이다.

참고문헌

Cho HJ(2012). Studies on antitumor, immunopotentiating and antityrosinase effects of *Sparassis crispa*. Graduate school of Incheon University, Republic of Korea, Master's thesis.

Dai X, Medzhitov R(2017). Inflammation: memory beyond immunity. *Nature*, 550(7677), 460-461. <https://doi.org/10.1038/nature24154>.

George DK, Lionel BI(2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*, 12(1), 49-62. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169>.

Kim EJ, Yoo KH, Kim YS, et al(2015). Biological activities of wild *Sparassis crispa* extracts. *Kor J*

- Mycology, 43(1), 40-46. <https://doi.org/10.4489/KJM.2015.43.1.40>.
- Kim EN, Roh SS, Jeong GS(2018). Inhibitory effect of *Sparassis crispa* (Wulf.) extract on monosodium iodoacetate induced osteoarthritis. *Kor J Pharmacogn*, 49(3), 262-269.
- Kim IK, Yun YC, Shin YC, et al(2013). Effect of *Sparassis crispa* extracts on immune cell activation and tumor growth inhibition. *J Life Sci*, 23(8), 984-988. <https://doi.org/10.5352/JLS.2013.23.8.984>.
- Kim YS, Seok SJ, Park YJ(2017). Korea's mushroom encyclopedia. 2nd ed, Goyang, Publishing puleunhaengbog, pp.16-17, pp.250-251.
- Kimura T, Hashimoto M, Yamada M, et al(2013). *Sparassis crispa* (Hanabiratake) ameliorates skin conditions in rats and humans. *Biosci Biotechnol Biochem*, 77(9), 1961-1963. <https://doi.org/10.1271/bbb.130185>.
- Kuprash DV, Nedospasov SA(2016). Molecular and cellular mechanisms of inflammation. *Biochemistry*, 81(11), 1237-1239. <https://doi.org/10.1134/S0006297916110018>.
- Lee DS, Kim KH, Yook HS(2016). Antioxidant activities of different parts of *Sparassis crispa* depending on extraction temperature. *Korean Soc Food Sci Nutr*, 45(11), 1617-1622. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.11.1617>.
- Lee MA, Park JK, Um MH, et al(2012). Lipolytic effect of *Sparassis crispa* extracts in differentiated 3T3-L1 cells and high fat diet-induced obese mic. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41(12), 1708-1715. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.12.170>.
- Lee ML, Hou JG, Begum S, et al(2014). Anti-obesity effects of *Sparassis crispa* on high-fat diet-induced obese mice. *J Life Sci*, 24(9), 952-958. <https://doi.org/10.5352/JLS.2014.24.9.95>.
- Lim CW, Kang KK, Yoo YB, et al(2012). Dietary fiber and β -glucan contents of *Sparassis crispa* fruit fermented with *Lactobacillus brevis* and *Monascus pilosus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41(12), 1740-1746. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.12.1740>.
- Lin JX, Leonard WJ(2019). Fine-tuning cytokine signals. *Annu Rev Immunol*, 37, 295-324. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041447>.
- Nakajima M(2014). *Sparassis crispa* β -glucan 1.3. 1st ed, Seoul, Health Newspaper, pp.19-20.
- Oh DS, Kim HS, Shim BS, et al(2013). Effect of mycelial culture of cauliflower mushroom (*Sparassis crispa*) using LED lighting operation. *J Mushrooms*, 11(1), 24-31. <https://doi.org/10.14480/JM2013.11.1.024>.
- Rebekka B, Lorna M, Stephan G, et al(2018). Interleukin-1 beta-A friend or foe in malignancies. *Int J Mol Sci*, 19(8), 2155. <https://doi.org/10.3390/ijms19082155>.
- Sarit A, Oren T(2019). iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. *Free Radic Biol Med*, 146, 16-35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.411>.
- Spangler JB, Moraga I, Mendoza JL, et al(2015). Insights into cytokine-receptor interactions from cytokine engineering. *Annu Rev Immunol*, 33, 139-167. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120211>.
- Wang SJ, Kim HS, Wi AJ, et al(2014). Optimal medium composition of cauliflower mushroom(*Sparassis latifolia*) cultivation using douglas-fir wood chip and comparison of the β -glucan contents of the fruiting body. *J Korean Wood Sci Technol*, 42(4), 428-434. <https://doi.org/10.5658/WOOD.2014.42.4.428>.
- Wang X, Quinn PJ(2010). Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res*, 49(2), 97-107. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.06.002>.