

RAW264.7 대식세포에서 표고버섯과 다시마 혼합 추출액의 항염증 효과

김수봉* · 강순아**,**

호서대학교 벤처대학원 융합공학과 박사과정 학생, *호서대학교 보건산업연구소 연구원
호서대학교 벤처대학원 융합공학과 교수, *호서대학교 보건산업연구소 소장

Anti-Inflammatory Effects of Shiitake Mushroom and Kelp Mixture Extracts in RAW264.7 Cell

Soo Bong Kim* and †Soon Ah Kang**,**

Ph.D. Student, Dept. of Convergence Science and Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

*Researcher, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

**Professor, Dept. of Convergence Science and Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

***Director, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

Abstract

We investigated the anti-inflammatory effects of shiitake mushroom and kelp (SMK) mixture extracts in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine RAW 264.7 cells. Treatment of RAW 264.7 cells with LPS significantly increased NO (nitric oxide) production, pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-6, and IL-1 β), and inflammation-related genes (COX-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS)). In cytotoxicity testing using RAW 264.7 cells, SMK mixture extracts in the range of 1-16 μ g/mL did not inhibit cell proliferation. However, SMK mixture extracts significantly inhibited NO production in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). SMK treatment significantly decreased TNF- α , IL-6, IFN- γ , and IL-1 β levels compared to the LPS group, and similarly, pro-inflammatory cytokine mRNA levels also decreased. SMK mixture extracts reduced the mRNA expression of COX-2 and iNOS in RAW 264.7 cells compared to LPS ($p < 0.05$). The above results show that SMK mixture extracts suppressed the inflammatory response induced by LPS. In particular, the extracts were shown to regulate the inflammatory response by suppressing the expression of inflammatory cytokines and inflammation-related enzymes.

Key words: anti-inflammatory effect, shiitake mushroom and kelp mixture, RAW 264.7 cells

서론

염증은 생체의 방어기작으로 발병 요인에 의하여 감염 혹은 상처반응 시에 일어나는 반응으로(Wang 등 2002), 다양한 장기들에 영향을 줌으로써 비만, 당뇨, 심혈관질환, 천식, 치매, 암 등을 유발하는 요인이 된다(Hotamisligil GS 2017). 과량 생산되는 염증 매개 물질은 과한 면역반응을 일으키면서 질환을 악화시키게 되므로 염증 관련 유전자들의 활성력을 억제한다면 염증 매개 물질들의 생성을 억제하면서 질병을 억제할 수 있다. 이에 다양한 식품소재 혹은 약용작물의 염증 관련 인자를 억제할 수 있는 효능 연구가 진행되고 있다.

법제한 소리쟁이의 NO 생성을 억제하며 전 염증성 사이토카인의 발현을 감소하는 항염증 효과 연구(Kim & Kang 2019), 쪽으로부터 생성되는 청대 추출물의 염증 유발 사이토카인 감소 효과 및 염증 조절 효과(Jang & Kang 2022), 복분자의 면역기능 활성 효과(Jo JK 2013), 미나리 과에 속하는 회향의 에틸아세테이드 층의 항염증 효과(Yang 등 2014) 등의 다양한 소재 연구가 진행되고 있다.

버섯은 일반적으로 탄수화물, 지질, 단백질, 비타민 및 무기질과 같은 영양소가 골고루 함유되어 있으며, 맛과 향을 내므로 식용으로 이용되어왔다. 최근에는 버섯의 영양성분 및 약효성분이 분석되면서 또한, 단백질 및 아미노산이 풍부

† Corresponding author: Soon Ah Kang, Professor, Dept. of Convergence Science and Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea. Tel: +82-2-2059-2353, Fax: +82-2-2059-1405, E-mail: sakang@hoseo.edu

하게 함유되어 있어서 관심이 높은 식품 원료이다(Hong 등 1989). 특히, 표고버섯(*Shiitake Mushroom: Lentinus edodes*)은 참나무 혹은 밤나무 등에 기생하며 특유의 맛을 내면서 향이 강하다(Oh 등 2015). 해조류인 다시마(*Laminaria japonica*; kelp, sea tangle)는 독특한 맛과 향을 가지고 있고, 정미성분이 풍부하여 다양한 국물을 우려내는 조미 재료로 많이 활용하고 있다. 다시마는 열량이 매우 낮고 비타민과 칼슘, 마그네슘, 칼륨 및 인산 등 무기질, 식이섬유소가 풍부하며 요오드의 함량이 다른 해조류에 비하여 높아 건강기능성 식품 소재로 많이 알려져 있다(Shin 등 2011).

식품 소재인 표고버섯의 기능성은 항산화 효과 및 항암 효능(Qi 등 2013), 항균 효과(Kim 등 2002; Han 등 2015), 혈당 강하 효과 및 비만 예방효과(Cho & Bang 2004) 등의 연구 결과가 보고되었다. 다시마에 함유된 알긴산은 수용성 식이 섬유 혈중 콜레스테롤 및 혈중 중성지방 저하 효과, 체내 나트륨의 과다 흡수 억제 효과, 중금속 흡수 방지 및 배출 효과가 있고 (Kang HJ 1994; Kim 등 2000) 후코이단 성분이 풍부하여 항암 작용 및 항혈액응고작용 등 다양한 활성을 갖고 있다(Nakashima 등 1987; Haroun-Bouhedja 등 2000; Kim 등 2011). 일반적으로 육수의 재료로 사용하는 다시마와 표고버섯을 혼합한 조미 농축액을 첨가하여 제조한 돌산갓김치의 품질특성(Oh 등 2015), 다시마, 버섯, 갓을 첨가한 김치의 항산화 효과(Ha & Kang 2018), 다시마 첨가 배추김치의 항산화 효과 및 지질산화작용 억제(Ku 등 2007) 등이 있다. 해조류는 특히, 다시마, 미역, 청각 등은 리그닌, 섬유소, 알긴산이 풍부하고, 항산화력이 강한 소재로 알려져 있다(Cho 등 1993). 이에 본 연구에서는 표고버섯과 다시마 혼합추출액을 첨가한 김치의 항염증 연구를 위한 기초연구자료로 활용하기 위하여 표고버섯과 다시마 혼합추출액의 RAW264.7 대식세포에서의 항염증효과를 연구하여 항염증 기능성김치의 개발에 도움을 주고자하며 또한 다양한 육수로 사용 시 항염증 기능성 소재로의 활용성을 높이고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 준비

본 실험에 사용한 다시마와 표고버섯은 2023년 3월에 완제품 형태로 대형할인판매점에서 구매하여 그라인더로 분쇄하여 60 mesh를 통과한 분말을 사용하였고 실험 전까지 -20°C 에 보관하였다. 다시마와 표고버섯 물 추출액은 다시마분말 50 g과 표고버섯 분말 50 g에 2 L의 3차 증류수를 넣고 실온에서 24시간 추출한 후 Whatman No. 2 여과지(Whatman, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd, Tokyo, Japan)로 여과한 후 65°C 에서 농축, 동결 건조과정을 통하여 분말화하였다(Kim SJ 2012;

Park 등 2018). 다시마와 표고버섯 물 추출물은 동결건조 분말을 농도별로 DPBS(Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 희석하여 여과한 후, 실험에 사용하였다.

2. RAW 264.7 세포 배양

대식세포 RAW 264.7는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아 사용하였다. 세포 배양을 위한 배지는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액에 10% fetal bovine serum(FBS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)과 100 U/mL농도의 penicillin-streptomycin(PS, Welgene Inc., Gyeongsan, Korea)을 혼합하여 사용하였다. 배양기에서 배양조건은 37°C , 5% CO_2 에서 실시하였다(Amrouch 등 2006; Lee 등 2014).

3. 세포독성분석

대식세포 RAW 264.7를 well 당 3×10^5 cells/mL를 96 well plate에 배양하였고 각 well 당 시료를 20 μL 씩 첨가하고 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양시켰다. 배양 후에는 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol 2-yl]-2,5diphenyl tetrazolium bromide) 용액을 50 μL 씩 첨가하고 4시간 incubation한 후 MTT 용액을 제거한 다음 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 150 μL 씩 분주한 후 Wallac Victor3 1420 Multilabel Counter(Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Nitric oxide(NO) 생성 농도 측정

RAW 264.7 세포의 NO 생성량 측정은 Griess reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 Luna automated cell counter(Logos Biosystems, Anyang, Korea)로 세포의 수를 측정하였다. 96-well plate의 각각의 well당 3×10^5 cells/mL 농도로 분주한 후 24시간 배양 후 lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 투여한 후 0.2 μm 필터(GVS Filtration Inc., Bloomer, WI, USA)로 여과한 시료를 0.1 mg/mL 농도로 48시간 처리하였다. Griess 용액을 배양 상층액에 각각 처리한 후, Wallac Victor3 1420 Multilabel Counter(Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA)로 550 nm에서 흡광도(OD)를 분석하였다(Livak & Schmittgen 2001).

5. 전염증성 사이토카인 분비량 측정

세포배양액 내의 전염증성 사이토카인 분비량을 측정하기 위하여 enzyme-linked immunosorbent assay kit(BioLegend, San Diego, CA, USA)의 microplate에 anti-mouse TNF- α , IFN-

γ, IL-6, IL-1β mAb를 분주한 후 24시간 코팅하였다. 세척용액은 0.05% Tween 20을 함유한 phosphate buffered saline-Tween(PBST) 용액으로 세척하고 10% FBS로 블러킹 시킨다. PBST 용액으로 세척 후 2시간이 지난 후 다시 PBST 용액으로 세척한 후 제조사에서 제공한 실험방법에 의하여 Optical density는 Wallac Victor3 1420 Multilabel Counter (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다(Livak & Schmittgen 2001).

6. 염증관련 사이토카인 mRNA 발현 측정

RAW 264.7를 well 당 3×10^5 cell/mL의 농도로 96 well plate에 배양하였고 37°C, CO₂ incubator에서 배양을 24시간 진행 후 배지는 제거하고 염증 유발인자인 1 µg/mL LPS를 투여한 후 0.2 µm 필터로 여과한 시료를 48시간 동안 첨가하였다(Livak & Schmittgen 2001; Song 등 2017). Real Time-Quantitative Polymerase Chain Reaction(RT-qPCR) 방법은 배지 제거 후 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 용액을 활용하여 RNA 분리과정 후 NanoDrop ND-1000(NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) 미량 분광광도계를 활용하여 사이토카인을 정량하였다. NanoDrop ND-1000은 미량의 핵산과 단백질 농도를 빠르고 정확하게 측정하는 미량 분광광도계로서 1 µL의 샘플을 고정밀도와 재현성있게 측정할 수 있으며, 220~750 nm의 전 스펙트럼을 사용한다. 정량되어진 RNA는 Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 역전사반응을 거쳐 cDNA를 합성하였다. cDNA와 사이토카인 각각의 primer, SYBR green(Solis biodyne, Tartu, Estonia) 시약을 혼합 후 thermal cycler BioRad CFX-96 real time system(BioRad, Hercules, CA, USA) 기기를 활용하여 사이토카인 유전자 발현을 분석하였다.

7. 통계처리

모든 실험에 대한 결과는 평균±standard deviation(SD)로 표시하였고, RT-qPCR 결과값은 평균±standard error(SE)로 표시하였다. 모든 실험에 대한 통계처리는 SPSS v18 statistical software package(SPSS Inc., Westlands, Hong Kong)를 이용하여 군간의 분산분석은 one-way analysis of variance(ANOVA)로 하였고 Con 군과 LPS 군의 유의성 검증은 Student *t*-test로 검증하였고 LPS 군과 시료 처리군간의 검증은 Duncan's 다중검정법으로 *p* value가 <0.05일 때 유의성을 판별하였다.

결과 및 고찰

1. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 대식세포에서 다시마와 표고버섯 혼합 추출물

(SMK)을 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 µg/mL 농도별로 각각 처리한 후 세포 생존율 측정 결과 93~100%로 나타났다. SMK의 농도가 1 µg/mL에서 99.47±0.80%, 4 µg/mL에서 97.54±1.25%, 16 µg/mL에서 93.27±4.53%로 생존율을 보이면서 세포 증식을 유도하였다. 따라서 이 농도 범위에서는 세포에 독성을 나타내지 않으면서 세포 염증성 인자의 억제작용에 효과적일 것으로 보였다(Fig. 1A). 또한 LPS와 SMK 추출물을 동시에 처리한 경우, LPS만 처리하면 72.10±2.80%의 생존율을 보이지만 SMK 추출물을 농도별로 처리하였을 때 LPS 처리에 의한 세포독성을 SMK에 의하여 억제하는 것으로 확인되었다(Fig. 1B). LPS 처리에 의하여 활성화된 TLR4는 NF-κB를 유도하여 TNF-α, IL-6, IL-1β 및 COX-2의 전사를 촉진한다고 보고되었다(Lu 등 2008). 따라서 세포 생존율 실험 결과를 바탕으로 1, 4, 16 µg/mL의 SMK 농도 범위를 항염증 효과 실험의 농도로 선정하였다.

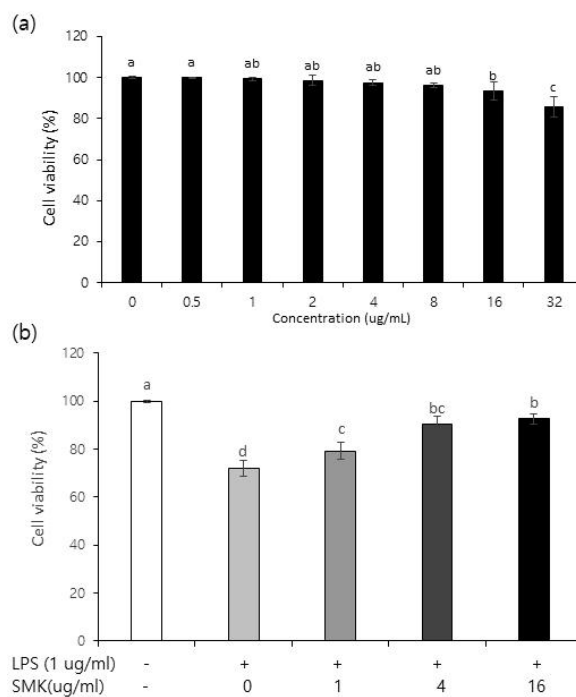


Fig. 1. Effect of shiitake mushroom and kelp mixture extracts (SMK) on RAW 264.7 cell viability (A) and SMK on LPS-induced RAW 264.7 cell (B). LPS: treated with LPS (1 µg/mL). shiitake mushroom and kelp mixture extracts (SMK): treated with various concentrations (1, 4, and 16 µg/mL) of with LPS (1 µg/mL). ^{a-d}Means with the different letters on the bars are significantly different (*p*<0.05) by Duncan's multiple range tests.

2. NO 생성량 분석

Raw 246.7 세포에 LPS를 처리하면 NO 생성능력은 대조군에 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였고($p < 0.05$)(Fig. 2), SMK 농도별 처리에 의하여 LPS에 의하여 증가한 NO 생성능력을 농도 의존적으로 감소시켰다($p < 0.05$). 이런 결과는 Raw 264.7 세포에서 LPS에 의하여 유도된 염증을 다시마 물 추출물의 NO 생성 억제효과 연구(Hwang 등 2017; Jung 등 2019)와 유사한 억제효과 결과를 보였다. L-아르기닌으로부터 iNOS에 의하여 합성되는 NO는 면역계 시스템에서 가장 활발하게 다기능적으로 역할을 한다(Bogdan C 2001). NO의 생성을 증가시키는 다양한 유도물질 중 하나인 LPS는 iNOS와 전염증성 사이토카인을 활성화시켜 NO 생성을 증가시켰다(Korhonen 등 2005). 본 연구 결과에서 LPS 처리에 의하여 NO 생성량이 증가하였고 이는 전염증성 사이토카인을 활성화시키면서 증가시킬 수 있으므로 LPS로 유도한 후 다시마와 표고버섯 혼합 추출물(SMK)이 전염증성 사이토카인에 미치는 영향을 보고자 하였다.

3. 전염증성 사이토카인 분비량 측정

LPS처리에 의하여 대식세포에서 면역조절을 하는 여러 인자들의 분비를 자극하여 발현되는 pro-inflammatory 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 및 IL-6의 분비량 변화 결과는 Fig. 3에 보여주었다. TNF- α 는 염증질환에 가장 중요한 조절 인자로서 세포의 성장과 분화과정에 중요한 조절 작용을 하는데 다량 분비되면 세포 독성을 가져오는데 대식세포에 LPS

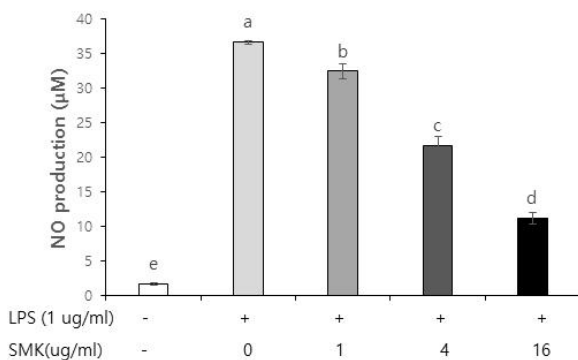


Fig. 2. Effect of shiitake mushroom and kelp mixture extracts (SMK) on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cell. LPS: treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). shiitake mushroom and kelp mixture extracts (SMK): treated with various concentrations (1, 4, and 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). ^{a-c}Means with the different letters on the bars are significantly different ($p < 0.05$) by Duncun's multiple range tests.

를 처리한 군에서 LPS를 처리하지 않은 군에 비하여 유의하게 높아졌다($p < 0.05$)(Fig. 3). SMK 농도별 처리에 의하여 LPS에 의하여 증가한 TNF- α 의 함량을 농도 의존적으로 감소시켰다(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 333.47 \pm 9.54 pg/mL , 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 312.58 \pm 9.05 pg/mL)($p < 0.05$)(Fig. 3A). 그리고 LPS(122.32 \pm 10.35 pg/mL)는 LPS 미처리군(59.35 \pm 2.12 pg/mL)에 비해 IFN- γ 의 함량을 증가시켰다($p < 0.05$)(Fig. 3B). SMK 4와 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 LPS에 의하여 증가된 IFN- γ 전염증성 사이토카인 수준을 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 3B). 대식세포는 LPS 혹은 lipoteichoic acid에 의한 자극에 의하여 활성화되면서 면역반응 혹은 염증반응에 중요한 역할을 한다(Liu 등 2019). 염증반응은 국소적 반응으로 상처 혹은 감염 등으로 손상된 조직에 염증 매개인자 즉, TNF- α 와 IL-6들이 만들어지면서 부종, 발열, 통증 등 반응을 유발한다(Yi 등 2017).

LPS는 대조군(Con)에 비하여 IL-6 및 IL-1 β 농도를 유의하게 증가시켰다($p < 0.05$)(Fig. 4). SMK는 4와 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 LPS에 의하여 증가된 IL-6 사이토카인 수준을 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 4A). 또한 SMK는 LPS로 염증이 유도된 대식세포에서 IL-1 β 의 분비량을 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 4B). 따라서, SMK는 LPS로 유도된 대식세포에서 IL-6와 IL-1 β 의 농도를 감소시키는 결과를 보였다. Hwang 등 (2017)의 연구에서는 LPS 처리에 의해 RAW264.7 대식세포에서 염증관련 사이토카인 TNF- α 수치를 증가하였고, IL-6과 IL-1 β 수치 역시 대조군에 비해 유의적인 증가를 보였고, 해조류 추출물 중 다시마보다 톳을 발효시킨 군에서 TNF- α 와 IL-6 농도가 유의적인 감소를 보였다. Kang 등(2014)의 연구에서는 LPS로 염증 유도된 대식세포에서 생산이 증가된 IL-6, IL-1 β 와 TNF- α 수치를 다시마 뿌리 에탄올 추출물에 의하여 유의적으로 낮추었다. Hwang 등(2022) 연구에서는 우선 TNF- α 의 경우 RAW 264.7 대식세포에 LPS로 염증을 유도 후 자외선 조사한 표고버섯 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리 시 TNF- α 농도가 65% 억제하였다고 하였다. 이렇게 다양한 표고버섯의 항염증 활성화와 다시마의 활성화 연구를 바탕으로 본 연구에서의 다시마와 버섯의 혼합추출물 SMK는 LPS로 유도된 대식세포의 염증반응에서 전염증성 사이토카인의 농도를 감소시킴을 증명시켜주었다.

4. 전염증성 사이토카인 mRNA 발현

본 연구 결과 대식세포에서 TNF- α 와 IL-6 즉 전염증성 사이토카인과 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 결과는 LPS 처리 군이 미처리한 Con 군에 비교하여 유의적인 증가 현상을 보였다($p < 0.05$)(Fig. 4). LPS와 SMK를 함께 처리했을 때, TNF- α 의 mRNA 발현 정도는 LPS 처리군보다 LPS+16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군이 62.1% 감소하였다. SMK의 농도가 높을수록 항염증 효과가

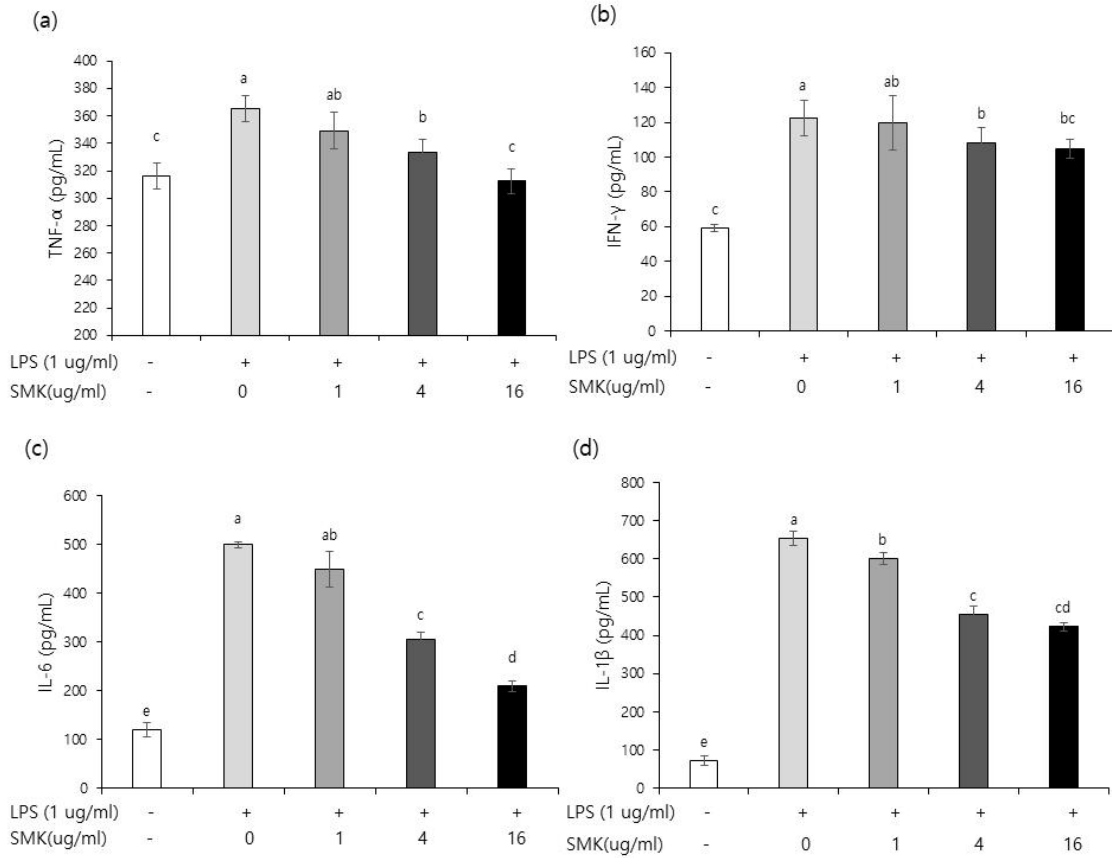


Fig. 3. Effect of shiitake mushroom and kelp mixture extracts (SMK) on pro-inflammatory cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-1 β expression level in LPS-induced RAW 264.7 cell. LPS: treated with LPS (1 μ g/mL). shiitake mushroom and kelp mixture extracts (SMK): treated with various concentrations (1, 4, and 16 μ g/mL) of with LPS (1 μ g/mL). ^{a-c}Means with the different letters on the bars are significantly different ($p < 0.05$) by Duncun's multiple range tests.

농도 의존적으로 향상되었다. 또한 IL-6의 mRNA 발현 수준도 TNF- α 와 비슷하게 LPS 처리군보다 LPS+16 μ g/mL 군이 80.2% 감소하였다. 염증관련 효소인 iNOS의 mRNA 발현 수준은 LPS 처리군보다 LPS+16 μ g/mL 군이 60.1% 감소하였다. 염증관련 매개효소인 COX-2의 mRNA 발현 수준결과는 LPS 처리군보다 LPS+16 μ g/mL 군이 53.9% 감소하였다. 염증의 발현을 조절하는 주요 전사 인자인 NF- κ B 활성화는 iNOS 및 COX-2의 생성을 매개하는데, COX-2는 정상 세포에서는 매우 낮은 활성이지만 염증반응 시 발현이 급격한 증가로 세포 염증반응을 일으키며 조직을 손상시킨다(Chen 등 2017; Huang 등 2020).

Hwang 등(2022)의 연구에서는 LPS로 유도시킨 대식세포에서 TNF- α mRNA 발현은 LPS 처리군에서 5.8배 증가하였으나 자외선 조사한 표고버섯 추출물이 1.8배를 보였고, IL-6 mRNA 발현은 LPS 처리군에서 4배 증가하였으나 자외선 조사한 표고버섯 추출물이 2.8배를 보였고, IL-1 β mRNA

발현은 LPS 처리군에서 16.6배 증가하였으나 자외선 조사한 표고버섯 추출물이 1.2배를 보였다. 가장 의미있게 감소시킨 사이토카인은 IL-1 β 였다. 이런 결과는 자외선 조사 표고버섯의 비타민 D2가 염증매개물질 발현을 저해하는 것으로 보고하였다. Lee JY(2011) 연구에서 다시마의 친유성 화합물의 항염증 효과 즉, NO와 PGE2의 생성 억제효과, iNOS와 COX-2 mRNA 발현 억제, 단백질 발현 억제효과, TNF- α , interleukin- 1 β , interleukin-6의 생성 억제효과를 보였다.

동의보감에서는 다시마 혹은 미역을 염증과 관련된 질환을 치료하는데 사용했다고 한다. 다시마 추출물의 항염증 활성을 쥐의 부종과 충혈 등 다양한 방법으로 실험 시 methylene chloride 추출물이 해열, 진통, 충혈억제, 혈류억제 효과가 높게 나타났고 에탄올 추출물이 부종 억제 효과가 높게 나타났다(Kang JY 2008). 만성염증반응은 다양한 장기 손상을 초래하며 대사질환을 유발하여 비만, 암, 당뇨병, 천식, 심혈관질환 등을 유발하게 된다(Hotamisligil GS 2017). TNF- α 는 생물

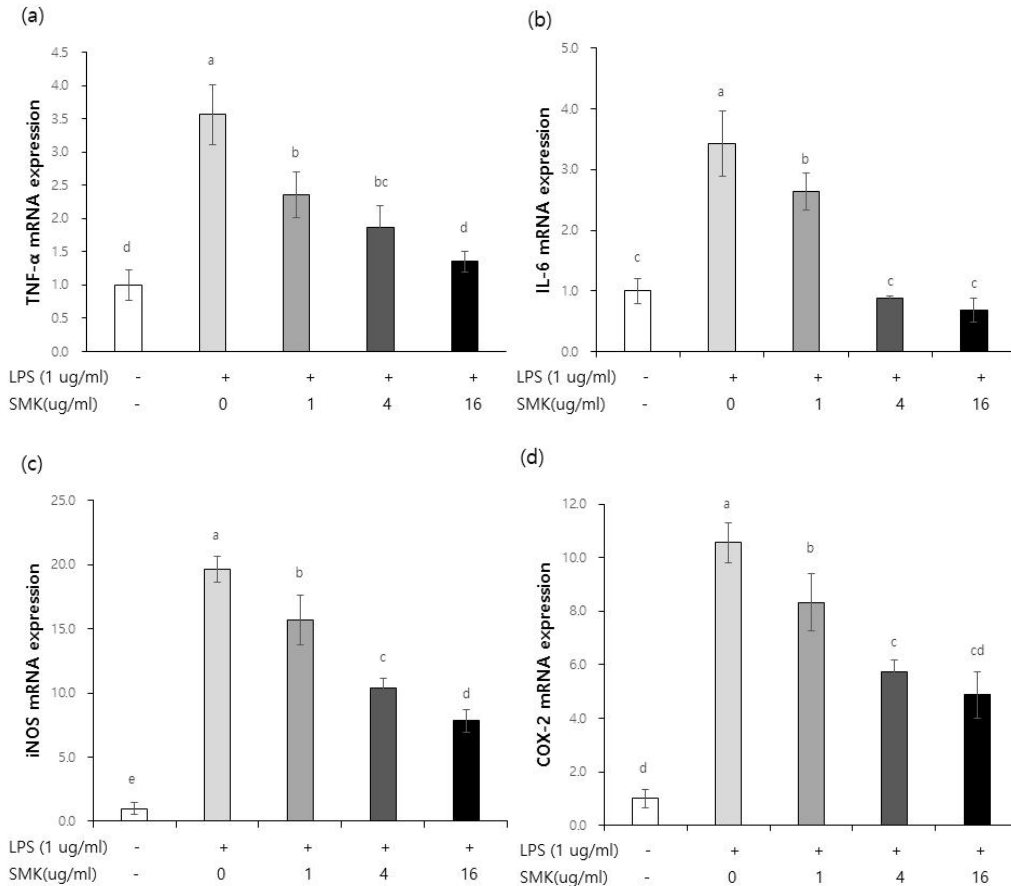


Fig. 4. Effect of shiitake mushroom and kelp mixture extracts (SMK) on mRNA expression of TNF- α , IL-6, iNOS and COX-2 in LPS-induced RAW 264.7 cell. LPS: treated with LPS (1 μ g/mL). shiitake mushroom and kelp mixture extracts (SMK): treated with various concentrations (1, 4, and 16 μ g/mL) of with LPS (1 μ g/mL). The mRNA expression levels were calculated based on 18S rRNA, which was used as a control (no treatment fold ratio=1). ^{a-e}Means with the different letters on the bars are significantly different ($p < 0.05$) by Duncun's multiple range tests.

학적 활성도 있고, 면역 및 염증성 반응, 숙주방어 등에 중요한 조절 역할을 한다. TNF- α 의 농도가 낮을 때는 세포의 면역 방어 활성을 보이지만 과도한 TNF- α 생성은 열을 발생하며 NO 생성 및 IL-1 β 와 IL-6의 발현을 통하여 일부 사이토카인 매개로 하는 염증반응의 증폭을 촉진한다(Hernandez 등 2020). 본 연구에서 SMK의 농도가 높을수록 전 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6 mRNA 발현 감소 및 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 감소 현상은 만성염증을 유도하는 다양한 대사성질환을 예방할 수 있는 생리활성이 뛰어난 항염증 기능성 소재로의 가능성을 보였다.

요약 및 결론

본 연구에서는 다양한 소재의 맛과 기능을 촉진하는 다시

마와 표고버섯의 혼합 추출물(SMK)의 항염증 효과를 분석하기 위해 진행되었다. RAW 264.7 대식세포를 이용하여 세포 독성 실험을 진행한 결과, SMK는 1~16 μ g/mL 범위에서 대식세포에서 세포 증식을 억제하지 않았다. Raw 264.7 대식세포에 LPS 단독 처리군은 LPS 처리하지 않은 Con 군에 비교하여 NO 생성이 증가하였으나 SMK를 1, 4, 16 μ g/mL 농도 별 병행으로 처리했을 때 NO 생성이 유의하게 감소하였다. 전염증성 사이토카인(TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 β) 분비량은 LPS 군에 비교하여 SMK를 처리하였을 때 유의적으로 감소하였으며, TNF- α , IL-6의 mRNA 발현수준도 감소하였다. 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현수준도 LPS 처리한 군에 비교하여 유의적인 감소를 보였다. 이상의 결과를 통해 다시마와 표고버섯의 혼합추출물은 RAW 264.7 대식세포에서 염증반응을 억제하였고, 특히 전염증성 사이토카인

분비량과 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하면서 다시마와 표고버섯의 혼합추출물이 염증반응을 조절하는 결과를 보여주었다.

감사의 글

이 논문은 2022년도 호서대학교의 재원으로 학술연구비 지원을 받아 수행된 연구임(202201850001).

References

- Amrouche T, Boutin Y, Prioult G, Fliss I. 2006. Effects of bifidobacterial cytoplasm, cell wall and exopolysaccharide on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production. *Int Dairy J* 16:70-80
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2:907-916
- Chen X, Zhao X, Wang H, Yang Z, Li J, Suo H. 2017. Prevent effects of lactobacillus fermentum HY01 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Nutrients* 9:545
- Cho YJ, Bang MA. 2004. Effects of dietary sea tangle on blood glucose, lipid and glutathione enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food Cult* 19:419-428
- Cho YS, Ha BS, Park SK, Chun SS. 1993. Contents of carotenoids and chlorophylls in dolsan leaf mustard (*Brassica juncea*). *Korean J Diet Cult* 8:153-157
- Ha SH, Kang SA. 2018. Effect of addition of mushroom and sea tangle extracts and mustard leaf on anti-oxidant properties of kimchi. *Korean J Food Nutr* 31:471-477
- Han SR, Kim MJ, Oh TJ. 2015. Antioxidant activities and antimicrobial effects of solvent extracts from *Lentinus edodes*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44:1144-1149
- Haroun-Bouhedja F, Ellouali M, Sinquin C, Boisson-Vidal C. 2000. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thromb Res* 100:453-459
- Hernandez J, Ashley D, Cao R, Abraham R, Nguyen T, To K, Yegiazaryan A, David Akinwale A, Tiwari RK, Venketaraman V. 2020. Cyclic peptide [R₄W₄] in improving the ability of first-line antibiotics to inhibit *Mycobacterium tuberculosis* inside *in vitro* human granulomas. *Front Immunol* 11:1677
- Hong JS, Kim YH, Kim MK, Kim YS, Sohn HS. 1989. Contents of free amino acids and total amino acids in *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Korean J Food Sci Technol* 21:58-62
- Hotamisligil GS. 2017. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* 542:177-185
- Huang CF, Huang JJ, Mi NN, Lin YY, He QS, Lu YW, Yue P, Bai B, Zhang JD, Zhang C, Cai T, Fu WK, Gao L, Li X, Yuan JQ, Meng WB. 2020. Associations between serum uric acid and hepatobiliary-pancreatic cancer: A cohort study. *World J Gastroenterol* 26:7061-7075
- Hwang MS, Pyo J, Kim HJ, Do SG, Song ID, Kim KM. 2022. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of *Lentinula edodes* extract by UV irradiation. *J Life Sci* 32:368-374
- Hwang Y, Chae I, Lee Y. 2017. Anti-inflammatory effects of fermented *Laminaria japonica* and *Hizikia fusiforme* water extracts with probiotics in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell line. *J East Asian Soc Diet Life* 27:1-8
- Jang SJ, Kang SA. 2022. Anti-inflammatory effect of Chung-Dae in LPS-treated RAW 264.7 cells. *Korean J Food Nutr* 35:116-126
- Jo JK. 2013. Immune enhancement effect of *Rubus coreanus* Miquel extract in RAW264.7 cells. Master's Thesis, Kyung Hee Univ. Seoul. Korea
- Jung KI, Kim BK, Kang JH, Oh GH, Kim IK, Kim M. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory activities of water and the fermentation liquid of sea tangle (*Saccharina japonica*). *J Life Sci* 29:596-606
- Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Bark SW, Park WM, Kim BR, Ahn NK, Choi YU, Ahn DH. 2014. Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *Korean J Food Sci Technol* 46:729-733
- Kang HJ. 1994. Effects of sodium alginate and cellulose on lipoprotein composition and lipid metabolism in rats. Master's Thesis, Pusan National Univ. Busan. Korea
- Kang JY. 2008. Anti-inflammatory activities of *Undaria pinnatifida* and *Laminaria japonica* (Phaeophyta). Master's Thesis, Pukyong National Univ. Busan. Korea
- Kim H, You J, Jo Y, Lee Y, Park I, Park J, Jung MA, Kim YS, Kim S. 2013. Inhibitory effects of *Lentinus edodes* and rice with *Lentinus edodes mycelium* on diabetes and obesity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42:175-181
- Kim HJ, Kwon MJ, Song YO. 2000. Effects of solvent fractions of Korean cabbage kimchi on antioxidative enzyme activities and fatty acid composition of phospholipid of rabbit fed 1% cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29:900-907

- Kim JH, Lee DS, Lim CW, Park HY, Park JH. 2002. Antibacterial activity of sea-mustard, *Laminaria japonica* extracts on the cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans*. *Korean J Fish Soc* 35:191-195
- Kim SH, Kang SA. 2019. Anti-inflammatory effects of beopje processed curly dock (*Rumex crispus* L.) in LPS-induced murine RAW264.7 cell lines. *Korean J Food Nutr* 32: 408-416
- Kim SJ. 2012. Preventive effects of beopje ginger and taemyeongcheong on *in vivo* gastritis and colitis. Master's Thesis, Pusan National Univ. Busan. Korea
- Kim YS, Kang CO, Kim MH, Cha WS, Shin HJ. 2011. Contents of water extract for *Laminaria japonica* and its antioxidant activity. *KSBB J* 26:112-118
- Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:471-479
- Ku HS, Noh JS, Kim HJ, Cheigh HS, Song YO. 2007. Antioxidant effects of sea tangle added Korean cabbage kimchi *in vitro* and *in vivo*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36:1497-1502
- Lee JY, Jun DY, Yoon YH, Ko JY, Woo KS, Woo MH, Kim YH. 2014. Anti-inflammatory effect of flavonoids kaempferol and biochanin A-enriched extract of barnyard millet (*Echinochloa crus-galli* var. *frumentacea*) grains in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *J Life Sci* 24:1157-1167
- Lee JY. 2011. Anti-inflammatory effect of lipophilic compounds from *Laminaria japonica* in the LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Master's Thesis, Pukyong National Univ. Busan. Korea
- Liu M, Mu H, Peng W, Zhao L, Hu W, Jiang Z, Gao L, Cao X, Li N, Han J. 2019. Time-dependent C5a and C5aR expression in dental pulp cells following stimulation with LTA and LPS. *Int J Mol Med* 44:823-834
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402-408
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42:145-151
- Nakashima H, Kido Y, Kobayashi N, Motoki Y, Neushul M, Yamamoto N. 1987. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1524-1528
- Oh SK, Kim KW, Park WM, Kim NH, Bae SO, Choi MR. 2015. Quality characteristics of dolsan leaf mustard kimchi added with seasoning of sea tangle and *Lentinus edodes*. *J Life Sci* 25:557-567
- Park ES, Song GH, Lee SM, Kim TY, Park KY. 2018. Increased anti-inflammatory effects of processed curly dock (*Rumex crispus* L.) in *ex vivo* LPS-induced mice splenocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 47:599-604
- Qi Y, Zhao X, Lim YI, Park KY. 2013. Antioxidant and anticancer effects of edible and medicinal mushrooms. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42:655-662
- Shin TS, Xue Z, Do YW, Jeong SI, Woo HC, Kim NG. 2011. Chemical properties of sea tangle (*Saccharina japonica*) cultured in the different depths of seawater. *Clean Technol* 17:395-405
- Song GH, Park ES, Lee SM, Kim TY, Park KY. 2017. An Atopic Preventive Drink (APD) reduces Th2 cytokines in LPS-treated Raw 264.7 cells. *TANG Humait Med* 7:e15
- Wang Y, Vodovotz Y, Kim PKM, Zamora R, Billiar TR. 2002. Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. *Ann NY Acad Sci* 962:415-422
- Yang IJ, Yu HY, Lee DU, Shin HM. 2014. Anti-inflammatory effects of the fruits of *Foeniculum vulgare* in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Life Sci* 24:981-987
- Yi MR, Kang CH, Bu HJ. 2017. Antioxidant and anti-inflammatory activity of extracts from kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gonglodes*). *J Korean Oil Chemists Soc* 34:189-202

Received 06 November, 2023
Revised 05 December, 2023
Accepted 07 December, 2023