

청국장 에탄올 추출물의 혈관내피세포 증식과 이동 촉진효과

황재성¹ · 성대일¹ · 이환명² · 정영신¹ · 김한복^{1*}

¹호서대학교 생명공학과, 기초과학연구소, ²호서대학교 한방화장품과학과

Ethanol Extracts of Chungkookjang Stimulate the Proliferation and Migration of Human Umbilical Vascular Endothelial Cells

Jae Sung Hwang¹, Dae Il Sung¹, Whan Myung Lee², Young Shin Chung¹, and Han Bok Kim^{1*}

¹Department of Biotechnology, The Research Institute for Basic Sciences,

²Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Asan 336-795, Republic of Korea

(Received June 23, 2014 / Accepted August 9, 2014)

In the fermented soybean product known as "chungkookjang", diverse bioactive compounds are produced when the soybean proteins are degraded during fermentation. Vascular endothelial cells (EC) are crucial in vein function and the formation of new vessels. A treatment to stimulate formation of new blood vessels is needed in cerebrovascular diseases that lead to ischaemic stroke and heart attack, as well as for diabetic ulcers. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) stimulates EC formation. The effect of Chungkookjang ethanol extract (CEE) on the proliferation of EC was studied. CEE (100, 1000 µg/ml) and boiled CEE were as effective as VEGF (10 ng/ml) for the proliferation of human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC). The effect of CEE on the migration of HUVEC was investigated using sprout analysis. CEE (100 µg/ml) was as effective as VEGF (10 ng/ml) for the migration of HUVEC. Isolation of specific peptides influencing the growth and migration of EC is needed.

Keywords: Chungkookjang, HUVEC, peptide, sprout assay, VEGF

청국장은 대두발효식품으로 대두단백질이 발효 중 분해되면서 다양한 생리활성물질이 만들어질 수 있다(Matsui *et al.*, 2004). 본 연구에서는 청국장발효 에탄올추출물이 혈관내피세포 증식에 미치는 영향을 조사하여 보았다. HUVEC, 혈관 내피세포는 많은 질환과 생체조직의 정상적인 생리기능 유지에 밀접한 관련이 되어 있다. 또한 체내에 들어오는 여러 가지 물질들이 가장 먼저 만나는 세포이기 때문에 약효성분이나 질병유발 물질을 검출할 때 매우 중요하다(Pugsley and Tabrizchi, 2000). HUVEC은 혈관의 기능은 물론 신생혈관 생성을 주도하는 세포이다(Folkman and Klagsber, 1987).

신생혈관 생성이란 기존 혈관으로부터 혈관을 구성하는 세포가 발달되고 증식하여 새로운 혈관을 생성하는 과정이다. 생리적으로는 상처 치유, 배란 및 월경에 영향을 준다(Folkman and Cotran, 1976). 상처가 날 경우 상처에 영양소와 산소의 공급 및 노폐물을 제거해 주는 역할을 한다. 상처 치유는 세 단계로 나눌 수 있는데 첫 번째 단계의 염증기에서 혈관 수축, 혈소판 응고 등이 일어나며 곧 새로운 모세혈관이 형성되는 육아기로 전환된다. 이 시기에는 여러 성장인자가 분비되는데, 이 중에서 TGF-β

와 PDGF라는 물질은 상처 치유 촉진인자로 알려져 있다. 이 때 VEGF도 분비가 되며 VEGF와 TGF-β와 같은 성장 인자들의 자극에 의해 새로운 혈관 형성과 기질 단백질의 합성에 의해 상처 회복이 촉진된다. 두 번째 단계에서 피부상피가 만들어지고, 혈관신생이 일어나고, 섬유가 형성된다. 세 번째 단계에서 세포의 기질이 변화되면서 교원질 섬유가 증가한다(Kwon and Park, 2009). 심근경색, 뇌경색 등 허혈성 질병들에서 신생혈관 생성을 촉진하여 치료하는 치료법이 개발되고 있다(Fox *et al.*, 1996). 암이나 당뇨병 망막증은 신생혈관 생성의 억제가 필요하다. 특히 암의 경우 혈관 생성에 대해 많은 연구가 진행되고 있다. 거의 대부분의 종양세포는 혈관을 이용하여 산소와 영양소를 공급받으며 전이를 한다. 종양세포에서는 강력한 혈관 생성 인자들을 분비한다. 그 중 VEGF는 많은 종양세포에서 관찰되는 동시에 가장 강력한 혈관 생성 인자로 알려져 있다(Folkman and Cotran, 1976; Folkman and Klagsber, 1987; Leung *et al.*, 1989; Alguie, 1994; Brooks *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1996, 1998, 1999; Fox *et al.*, 1996; Asahara *et al.*, 1997; Bailer and Gornik, 1997; Bohem *et al.*, 1997; Crubayko *et al.*, 1997; Ferra and Davis-Smyth, 1997; Bowen, 1998; Jung and Kim, 2000; Cho *et al.*, 2006)

이러한 암을 억제하기 위해 신생혈관 생성을 억제하는 기작에 대한 연구가 폭넓게 진행되었다. 종양과 혈관 생성 사이에서

*For correspondence. E-mail: hbkim@hoseo.edu; Tel.: +82-41-540-5624; Fax: +82-41-548-6231

의 상관관계는 주로 대장암에서 연구되어 보고되었다. 혈관 생성 억제인자를 발견하고 항 종양 효과를 확인하였으며 여러 연구에서 혈관 생성인자와 억제인자 사이의 생성기전 연구가 진행되고 있으며 이를 이용하여 종양세포를 조절하기 위한 연구도 시행 중에 있다(Brooks *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1996, 1998, 1999; Asahara *et al.*, 1997; Bailer and Gornik, 1997; Bohem *et al.*, 1997; Bowen, 1998; Cho *et al.*, 2006).

반면에 신생혈관 생성은 상처치유, 뇌졸중, 심근경색 등의 치료에서 필요하다.

백태를 *B. licheniformis* B1 균주를 이용하여 발효시켰다. 상기 균주를 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 12시간 동안 진탕 배양하여 사용하였다. 백태를 18시간 동안 수지하고 121°C에서 30분간 고압 증기로 쪼낸 후 대두 100 g당 균주 배양액이 1%가 되게 접종하였다. 접종된 대두는 40°C 배양기에서 48시간 동안 발효시켰다. 발효된 청국장을 동결건조기를 이용하여 완전히 동결 건조 한 후 미세하게 분쇄하여 분말 청국장을 제조하였다.

분말로 제조된 청국장 200 g을 80% 에탄올 600 ml에 섞어주고 48시간 동안 진탕 시켰다. 진탕 시킨 청국장을 1,000×g로 원심 분리하여 상등액만 수거하였다. 수거된 상등액을 거름종이로 걸러낸 후 걸러져 나온 용액을 감압 증류를 이용하여 증류하였다. 증류 후 물질들을 수거하여 다시동결 건조하였다(Fig. 1, Hwang *et al.*, 2012).

인간 유방암 세포주인 MCF-7과 인간 땀줄 혈관내피세포인 HUVEC을 세포배양에 사용하였다. MCF-7 세포는 10% FBS와 1% Antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양된 MCF-7가 80% 정도 자라면 계대배양을 실시하였으며 계대배양 시에는 PBS를 이용하여 세척해 주었고, Trypsin-EDTA를 이용하여 부착된 세포를 분리시켰다. HUVEC은 20% FBS와 1% Antibiotic-antimycotic, 3 ng/ml bFGF, 5 µg/ml heparin을 첨가한 M-199 배지를 이용하여 0.1% 젤라틴이 코팅된 배양접시와 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양된 HUVEC 또한 계대배양을 실시하였고, 계대배양시에는

역시 PBS를 이용하여 세척해 주었으며 Trypsin-EDTA를 이용하여 부착된 세포를 분리하였다.

청국장 추출물 100 mg을 멸균된 증류수 1 ml에 녹인 후 1% FBS가 첨가된 M-199 배지를 이용하여 농도가 각각 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 µg/ml이 되도록 순차 희석하였다. 열처리한 청국장 추출물의 HUVEC 증식효과를 결정하기 위해 M-199와 청국장 추출물을 각각 0.002, 0.02, 0.2, 2, 20, 200, 2000 µg/ml가 되도록 순차 희석한 뒤 100°C에서 30분간 가열하였다. 가열한 배지를 충분히 식힌 뒤 2% FBS-M199와 동량으로 희석하였다. 96 well plate에 0.1% 젤라틴을 30분간 코팅하였으며 각각 2.5×10^3 cell이 되도록 도말 하여 부착시켰다. 부착시킨 세포는 CO₂ 배양기에서 CO₂ 5%, 37°C에서 24시간 배양하였다.

배양한 세포의 성장 및 대사를 멈추게 하기 위해 배지를 완전히 제거해 주고 1% FBS가 첨가된 M-199로 1회 세척하였다. 세척 후 1% FBS가 첨가된 M-199를 처음과 동량을 넣어주고 6시간 동안 두어 정지시켰다. 정지시킨 세포의 배지를 제거하고 준비된 시료 100 µl를 well에 처리하였다. 처리한 세포는 CO₂ 배양기에서 36시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 아무 처리를 하지 않은 세포와 10 ng/ml VEGF를 처리한 세포를 사용하였다. XTT reagent를 M199 배지와 동량으로 섞어준 후 청국장 추출물을 처리하여 배양한 plate에 각 well당 40 µl가 되도록 나누어 주었다. 30분 후 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Collagen Type I 90 µl와 10× DMEM 10 µl, 1 N NaOH/ 1× DMEM 2.5 µl를 혼합하여 세포 지지체용의 collagen 혼합액을 제조하였다. HUVEC의 이동을 결정하기 위해, 배양한 HUVEC과 collagen 혼합액을 2.5×10^5 cell/10 µl가 되도록 혼합한 후 48 well plate에 각각 2.5 µl씩 점적하였다. 점적된 혼합액이 마른 후 청국장 추출물을 처리하였다. 청국장 추출물은 각각 0.1, 1, 10, 100 µg/ml가 되도록 1% FBS-M199 배지와 혼합하여 사용하였다. 시료를 처리한 세포는 CO₂ 배양기에서 36시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 아무 처리도 하지 않은 세포와 VEGF 10 ng/ml를 처리한 세포를 사용하였다.

혈관내피세포는 신생혈관 생성에 중요한 역할을 한다. 신생혈관 생성은 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 만들어지는 일련의 과정이며 유도물질과 억제물질간의 균형에 의하여 정교하게 조절되는 것으로 알려져 있다. 신생혈관은 상처의 치유나 종양의 성장 과정에서 영양분과 산소의 공급 및 노폐물의 제거를 위한 필수적인 과정이다. VEGF가 강력한 혈관형성 촉진인자로 알려져 있다. 혈관 생성은 VEGF 등 혈관 생성 유도물질에 의해 시작되어, 혈관을 둘러싼 기저막이 분해되고, 혈관내피세포가 성장, 이동되어 공간적인 배열이 이루어지면서 혈관이 생성된다(Choi and Kim, 2003). 청국장이 혈관내피세포에 주는 영향과 세포의 증식을 확인하기 위하여 청국장 CEE를 처리하여 XTT 분석을 하였다. XTT 시약이 발색하는 450 nm의 파장에서 각각의 시료의 농도를 달리하여 측정한 결과 0.001, 0.01, 0.1, 1 µg/ml의 경우 대조군과 특별한 차이는 나타나지 않았다. 그러나, CEE(청국장 에탄올 추출물)의 농도가 높아질수록 세포의 증식과 이동이 10 µg/ml의 경우부터 대조군과 차이가 나타나기 시작하였으며 100, 1000 µg/ml 같은 경우에는 VEGF를 처리한 대조군과 비슷

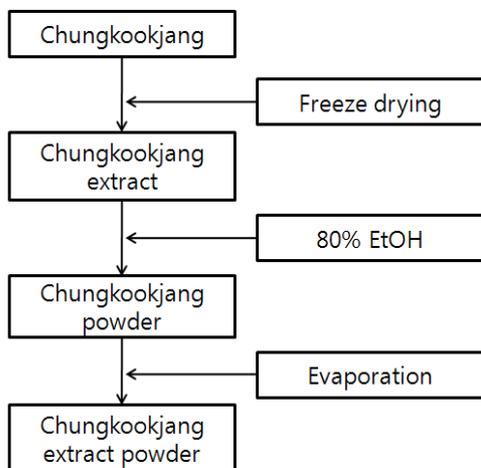


Fig. 1. Preparation of Chungkookjang ethanol extract (CEE).

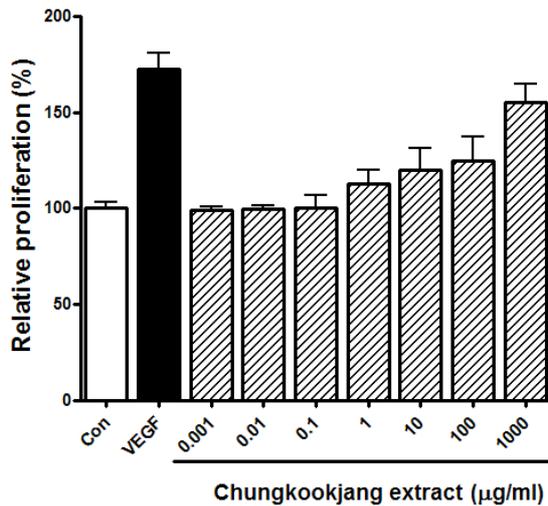


Fig. 2. Proliferation assay of HUVEC. Growth of cells treated with CEE or VEGF (10 ng/ml) were determined using XTT. con; VEGF or CEE was not added to the culture media. Compared to con, VEGF; $p=0.001$, CEE (1000 $\mu\text{g/ml}$); $p=0.0014$

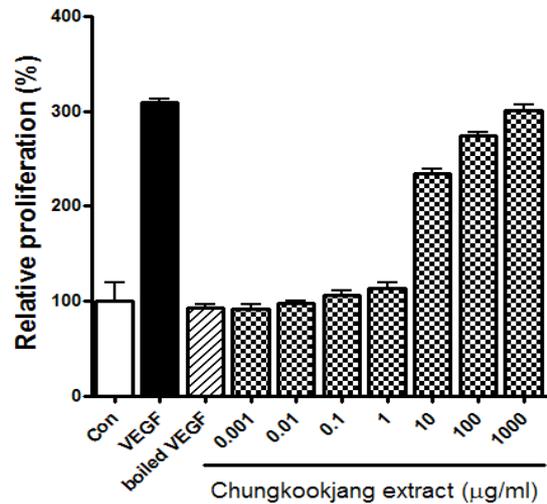


Fig. 3. Proliferation assay of HUVEC. Growth of cells treated with boiled CEE or boiled VEGF (10 ng/ml) were determined using XTT. con; VEGF or CEE was not added to the culture media. Compared to con, VEGF; $p=0.0007$, boiled VEGF; $p=0.059$, CEE (1,000 $\mu\text{g/ml}$); $p=0.001$

한 양상을 띠며 세포를 증식시켰다(Fig. 2). 청국장 추출물에 존재하는 혈관 생성 촉진인자가 열에 대한 안정성을 가지는지 확인하기 위하여 CEE를 가열한 뒤 HUVEC에 처리하였을 때, 가열된 VEGF는 세포를 증식시키지 못했지만, 가열된 CEE는 세포를 증식시켰다(Fig. 3). 이는 CEE에 존재하는 HUVEC 증식 촉진물질이 단백질보다는 열에 안정성이 있는 peptide임을 시사해 준다. 또한 이들 혈관 내피세포 증식 촉진 peptide류는 *B. licheniformis* B1이 분비하는 protease에 의해 대두 단백질이 분해되어 생성되었으므로, 다른 균주에 의해 생성된 peptide류는 혈관 내피세포 증식 촉진효과가 없을 수 있다

혈관 생성은 증식뿐 아니라 세포의 이동으로 혈관이 만들어진다. 청국장이 세포의 이동에도 영향을 주는지 sprout 분석법으로 확인하였다(Fig. 4). 36시간 배양된 HUVEC을 관찰한 결과 아무것도 처리하지 않은 세포에서는 세포의 증식과 이동이 거의 일어나지 않은 것을 확인하였다. 반면에 VEGF를 처리한 세포에서

는 증식과 이동이 활발한 것을 확인하였다. 특히 CEE (100 $\mu\text{g/ml}$)를 처리한 경우 VEGF와 비슷한 정도의 증식과 이동이 일어났다(Fig. 4).

청국장 추출물은 HUVEC의 이동을 촉진시켜 collagen 지지체에서 공간적인 배열이 가능해졌다. 이는 생체 내에서도 청국장 추출물에 의한 혈관의 생성이 가능함을 시사해 준다. 청국장 추출물이 혈관세포의 증식과 이동을 촉진하는 것으로 보아 인체의 허혈성질환 치료에 도움을 줄 수 있을 것을 기대해 본다. 본 연구에서는 청국장 에탄올 추출물이 VEGF와 대등하게, 혈관 내피세포의 증식 및 이동을 촉진시키는 물질을 포함하고 있음을 확인하였다. VEGF와 같은 혈관 재생용 단백질 치료제는 생체 내에서 쉽게 분해되고, 높은 가격으로 인한 경제성 문제가 있다. 반면에 청국장 추출물에 존재하는 peptide성 혈관세포 증식 촉진물질은 생체 내에서 안전성과 경제성이 있을 것으로 사료된다. 앞으로 청국장 추출물에 존재하는 peptide 중에서 혈관내피세포의 증식과 이동에 직접 영향을 미치는 특정 peptide를 분리, 규명하는 작업이 필요할 것이다.

적요

청국장은 대두발효식품으로 대두 단백질이 발효 중 분해되면서 다양한 생리활성물질이 만들어진다. 혈관내피세포는 혈관의 기능은 물론 신생혈관 생성을 주도하는 세포이다. 뇌졸중이나 심근경색, 뇌경색 등의 혈관관련 질병들은 신생혈관 생성을 촉진하는 치료법이 필요하다. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)는 새로운 혈관 형성을 촉진하는 역할을 한다. 본 연구에서는 청국장 에탄올추출물(CEE)이 HUVEC (혈관 내피세포) 증식에 미치는 영향을 조사하여 보았다. 청국장 추출물(100, 1000 $\mu\text{g/ml}$)을 HUVEC에 처리했을 때, VEGF (10 ng/ml)를 처리한 대조군과 같은 정도로 세포를 증식시켰다. 열처리한 청국장추출

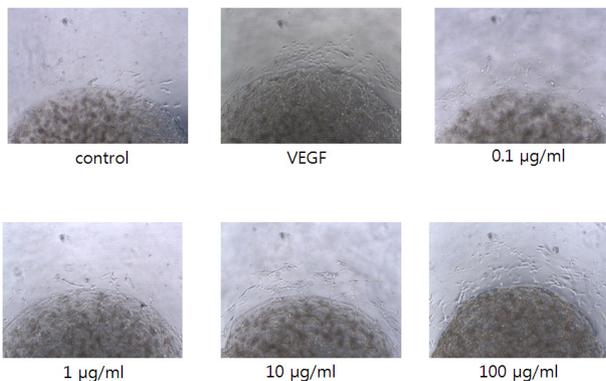


Fig. 4. Sprout assay. Sprout formation was determined by treating HUVEC with CEE or VEGF (10 ng/ml). Sprout formation was observed under the microscope.

물을 혈관 내피세포에 처리해도 세포 증식효과는 마찬가지로였다. 청국장이 세포 증식뿐 아니라 HUVEC 이동에도 영향을 주는지 sprout 분석법으로 확인하였다. 청국장 추출물(100 µg/ml)을 처리했을 때, VEGF (10 ng/ml)와 비슷할 정도로 HUVEC 이동이 일어났다. 청국장 추출물에서 HUVEC 증식과 이동에 영향을 미치는 특정 peptide의 분리가 필요할 것이다.

References

- Alguie, G.H.** 1994. The transparent chamber technique as a tool in experimental tumor therapy. *American Assoc. Adv. Sci.* **1947**, 13-26.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., Van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schattman, G., and Isner, J.M.** 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-967.
- Bailer, J.C. and Gornik, H.L.** 1997. Cancer undefeated. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1569-1574.
- Bohem, T., Folkman, J., Browder, T., and O'reilly, M.** 1997. Anti-angiogenic therapy of experimental cancer dose not induce acquired drug resistance. *Nature* **390**, 404-407.
- Bowen, W.** 1998. The effects of surgical interference with blood supply on the growth of transplanted carcinoma and sarcomata. *Sci. Rep. Imperial Cancer Res. Fund.* **1908**, 146-158.
- Brooks, P.C., Montgomery, A.M.P., Rosenfeld, M., Reifeld, R.A., Hu, T., and Kiler, G.** 1994. Integrin v3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*. **79**, 1157-1164.
- Cao, Y., Ji, R.W., Davison, D., Sler, J., Marti, D., Sohndel, S., McCance, S.G., O'Reilly, M.S., Linas, M., and Folkman, J.** 1996. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 29461-29467.
- Cao, Y., O'Reilly, S., Marshall, B., Flynn, E., Ji, R.W., and Folkman, J.** 1998. Expression of angiostatin cDNA in murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J. Chin. Invest.* **101**, 1055-1063.
- Cao, R., Wu, H.L., Veitonmaki, N., Linden, P., Fanebo, J., and Shi, G.Y.** 1999. Suppression of angiogenesis and tumor growth by inhibitor KI-5 generated by plasmin-mediated proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5728-5733.
- Cho, L.J., Kim, S.H., and Kim, S.G.** 2006. Inhibition of TGFβ-1 mediated PAI-1 induction by oltipraz through selective interruption of Smad3 activation. *Cytokine* **35**, 284-294.
- Choi, J. and Kim, D.** 2003. Therapeutic angiogenesis for cardiovascular diseases: the present and future. *Kor. Circ. J.* **33**, 739-745.
- Crubayko, F., Liaudet-Coopman, D., Aigner, A., Tuveson, A.T., Berchem, G.J., and Wellstein, A.** 1997. A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch in human cancer. *Nature Med.* **3**, 1137-1140.
- Ferra, N. and Davis-Smyth, T.** 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **18**, 4-25.
- Folkman, J. and Cotran, R.** 1976. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int. Rev. Exp. Path.* **16**, 207-248.
- Folkman, J. and Klagsber, M.** 1987. Angiogenic factors. *Science* **235**, 442-447.
- Fox, S.B., Gatter, K.C., and Hris, A.L.** 1996. Tumor angiogenesis. *J. Pathol.* **179**, 232-237.
- Hwang, J.S., Kim, J.Y., Sung, D.I., Yi, Y.S., and Kim, H.B.** 2012. Fermentation of black-soybean Chungkookjang using *Bacillus licheniformis* B1. *J. Microbiol.* **48**, 216-219.
- Jung, J.O. and Kim D.K.** 2000. A method of medical treatment use angiogenesis. *J. Korean Soc. Vasc. Surg.* **16**, 265-269.
- Kwon, M.J. and Park, J.H.** 2009. Impaired wound healing in Diabetes Melitus. *Kor. Diab. J.* **33**, 83-90.
- Leung, D.W., Cachines, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N.** 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309.
- Matsui, T., Yoo, H.J., Hwang, J.S., Lee, D.S., and Kim, H.B.** 2004. Isolation of angiotensin-1-converting enzyme inhibitory peptide from Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* **40**, 355-358.
- Pugsley, M.K. and Tabrizchi, R.** 2000. The vascular system; An overview of structure and function. *J. Pharmacol. Toxicol. Mech.* **44**, 333-340.