

혈관내피세포의 발아에 미치는 상황버섯 추출물의 효과

오 인 숙 · † 김 환 규

전북대학교 자연과학대학 생물과학부, 생리활성물질연구소
(접수 : 2006. 4. 20., 게재승인 : 2006. 7. 12.)

Effect of Phellinus Extracts on Sprouting in Porcine Pulmonary Artery Endothelial Cells

In Suk Oh and Hwan Gyu Kim†

Division of Biological Sciences, Research Center of Bioactive Materials, Chonbuk National University,
Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

(Received : 2006. 4. 20., Accepted : 2006. 7. 12.)

One of the steps in angiogenesis is the degradation of the underlying basement membrane via proteases. Endothelial cells release proteinases to degrade the extracellular matrix for their sprouting *in vivo*. In this study, we examined the effect of water extracts of *Phellinus linteus* (Phellinus extracts) and combination of Phellinus extracts and fibroblast growth factor (FGF-2) on cultured porcine pulmonary artery endothelial cells (PPAECs). Phellinus extracts induced sprouting of PPAECs, which was inhibited by MMPs and plasmin inhibitors, and induced the secretion of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and plasmin. At high concentration of Phellinus extracts (200~400 µg/mL), the active MMP-2 secretion was induced. It is therefore, suggested that Phellinus extracts induces the sprouting of cultured endothelial cells by means of increased active MMP-2 and plasmin secretion. Also, combination with Phellinus extracts and FGF-2 produced an enhanced effect on sprouting and secretion of active MMP-2, and MMP-3 and plasmin from PPAECs.

Key Words : *Phellinus linteus*, sprouting, MMP, plasmin

서 론

혈관신생은 기존의 미세혈관으로부터 새로운 혈관이 만들어지는 것으로서 배란, 배발생 및 상처 치유 등 여러 정상적인 생리적 조건 동안에 고도로 조절되는 과정이다(1). 혈관신생 과정에 이상이 생기면 류마티스성 관절염, 당뇨병성 망막증, 종양의 성장 및 전이 등 병적인 상태를 초래하게 된다(2). 혈관신생 초기 단계에는 여러 종류의 단백질 분해효소 및 이들의 억제물질이 관여한다고 알려져 있다. 혈관신생이 일어나기 위해서는 혈관신생 유도인자에 의한 혈관내피세포의 증식, 이동 및 발아 (sprouting)가 요구되는데(1, 3), 이때 기질 재구성 과정에 MMPs 및 플라스민 등이 필요하다(4, 5).

MMPs는 Zn²⁺-결합, Ca²⁺-의존성 endopeptidase로서 세포외 기질을 분해하는데 중요한 역할을 수행한다고 알려져

있다(6). MMPs는 여러 생리적 과정 및 질병에도 관여하는데(7), 두 경우 모두 혈관신생 및 혈관재구성과 관련되어 있다. MMPs는 지금까지 26 종류가 알려져 있으며, 세포외기질의 재구성 과정에 중요한 역할을 하는 MMPs로는 MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-3와 MMP-12 등이다(8-10). MMP-2는 내재성 억제제인 tissue inhibitors of metalloproteinase-2 (TIMP-2)와 1:1의 복합체를 형성하는 방법으로 활성이 조절된다(11, 12).

Phellinus 속의 상황버섯 (*P. linteus*)은 항-종양 및 기타 의학적 활용가능성 때문에 많은 연구가 이루어지고 있다. 상황버섯 자실체로부터 정제된 활성 polysaccharide는 체액성 및 세포성 면역, 항-종양, 항-돌연변이 및 항-혈관신생 활성을 보인다고 알려져 있다(13-16). FGF-2는 평활근 세포의 성장, 상처치유 및 조직재생, 조혈과 내피세포의 분열, 이동 등 혈관신생을 유도하고 신경계의 분화 및 기능조절에도 중요한 역할을 수행한다(17). 또한 FGF-2는 혈관신생 과정 동안 MMP-3와 urokinase type plasminogen activator 등 여러 분자의 발현을 조절하는데, 이러한 분자들은 내피세포의 혈관신생 과정에서 나타나는 침윤성 표현형 발현에도 관여한다(18).

† Corresponding Author : Division of Biological Sciences,
Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea
Tel : +82-63-270-3352, Fax : +82-63-270-3362
E-mail : hgkim@chonbuk.ac.kr

최근 들어 성장인자를 이용한 혈관신생 치료법에 대한 연구가 많이 행하여지고 있으나, 혈관계는 여러 단계에 필요한 성장인자 및 이들의 수용체, 그리고 세포내 신호전달을 필요로 하기 때문에 치료목적으로 단일 성장인자를 사용하기에는 불충분하다(19, 20). 본 연구에서는 상황버섯 자실체의 수용성 추출물을 이용하여 혈관내피세포의 발아에 미치는 효과 및 그 작용기작을 확인하였으며, 혈관신생 유도인자인 FGF-2와의 병용효과를 확인하였다. 상황버섯 추출물은 저농도 (10~50 µg/mL)에서는 혈관내피세포의 발아를 억제하였으나, 고농도 (200~400 µg/mL)에서는 혈관내피세포의 발아를 촉진하였다. 또한 상황버섯 추출물과 FGF-2의 병용처리시 혈관내피세포의 발아는 더욱 촉진되었다. 상황버섯 추출물에 의해 MMP-2와 MMP-9의 분비가 감소되었으나 고농도에서는 (100~800 µg/mL) MMP-2의 활성화가 유도되었다. 또한 상황버섯 추출물에 의해 MMP-3 및 플라스민의 분비 증가가 유도되었으며, 이들의 분비증가에 의해 MMP-2의 활성화가 유도된 것으로 여겨진다. 본 연구 결과를 요약하면, MMPs 및 플라스민 억제제 처리에 의해 혈관내피세포의 상황버섯 추출물에 의해 유도된 발아가 억제되었으며, 상황버섯 추출물에 의해 증가된 혈관내피세포의 발아는 MMP-3 및 플라스민의 분비증가와 MMP-2의 활성화에 의한 것이라 사료된다.

재료 및 방법

시약

Recombinant human FGF-2와 antiplasmin은 R & D system (Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였고 MMPs 및 플라스민 스탠다드는 Cal-Biochem (La Jolla, CA, USA)과 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)로부터 구입하였다. MMP-2, MMP-3 및 MMP-9 enzyme immunoassay 카트는 Fuji Chemical Industries (Toyama, Japan)로부터 구입하였으며 플라스민 enzyme immunoassay 키트는 Progen (Heidelberg, Germany)으로부터 구입하였다. BB-94는 British Biotechnology (Oxford, UK)로부터 구입하였다. 배지 및 혈청은 Life Technology Inc. (Gaithersburg, MD, USA)로부터, 그의 특별히 적시하지 않은 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하여 사용하였다.

세포배양

Porcine pulmonary artery endothelial cells (PPAECs)는 Kim 등(21)의 방법에 따라 collagenase로 소화시켜 분리하였으며, 분리된 세포가 내피세포에서 유래되었는지는 anti-von Willebrand Factor 항체를 이용한 면역형광 염색방법으로 확인하였다. 이렇게 얻어진 혈관 내피세포를 20% FBS (v/v) 첨가 Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 본 연구에 사용한 primary 세포의 계대 수는 2~6 사이였다.

상황버섯 수용성 추출물의 제조

연구에 쓰인 상황버섯 시료는 초원상황버섯 (춘천, 한국)

으로부터 구입하였으며, 상황버섯 자실체로부터 수용성 추출액의 제조는 이전의 추출방법을 따랐다(22). 즉, 신선한 상황버섯 자실체 150 g을 마쇄한 다음, 3 리터의 증류수로 48시간 동안 교반시켰다. 여기서 얻어진 여과액을 증기압 (121°C, 15 pound/inch²)으로 포화시킨 다음 원심분리에 의해 응결된 단백질을 포함한 침전물을 제거하였다. 상등액을 분액깔때기를 이용하여 1 리터의 클로로포름과 혼합한 후, 수용성 분획을 1 리터의 n-hexane과 혼합한 다음 n-hexane-용해 분획을 제거하였다. 수용성 분획에 talc (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가한 다음 혼합액을 막 여과장치를 이용하여 여과시켰다. 얻어진 여과액을 동결건조시킨 다음 (3.4 g) 증류수에 현탁하였다.

혈관내피세포의 발아 Assay

혈관내피세포의 발아 assay는 Kim 등의 방법(21)에 따라 행하였다. 즉, PPAECs 세포를 microcarrier beads (직경 175 µm; Sigma) 상에서 confluent하게 성장시킨 다음, 2.0%의 FBS와 지시된 만큼의 상황버섯 추출물 및 시약이 포함된 피브린 젤 (2.5 mg/mL)에 방치하였다. 피브린 젤을 DMEM 배지에서 24시간 마다 동량의 상황버섯 추출물 및 지시된 시약을 첨가하면서 배양한 다음, 3일째에 도립현미경을 이용하여 (100 ×) 발아된 세포의 수를 세었다.

배양 배지에서 MMPs 및 플라스민의 측정

PPAECs 세포를 24-well plate에 세포밀도가 5 × 10⁴ cell/cm²이 되도록 접종한 다음, 20% 혈청이 첨가된 DMEM 배지에서 24시간 배양한 후 confluent한 혈관내피세포를 무-혈청 및 무-phenol red 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 새로운 배지로 세포를 세척한 다음 대조 완충용액 혹은 지시된 시약을 지정된 시간만큼 처리하였다. MMPs 및 플라스민의 실제양은 제조 회사의 지시에 따라 enzyme immunoassay 키트로 측정하였다.

젤라틴 Zymography

MMPs의 기질 분해 활성은 젤라틴 zymography를 행하여 확인하였다(12). 이를 위해, PPAECs 세포를 24-well plate에 세포밀도가 5 × 10⁴ cell/cm²이 되도록 접종한 다음, 20% 혈청이 첨가된 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. 이후, 새로운 배지로 세척한 다음 PPAECs 세포를 무-혈청 및 무-phenol red 배지에서 대조완충용액 또는 상황버섯 추출물을 처리한 후 12시간 동안 배양하였다. 젤라틴 zymography는 MMPs의 기질인 젤라틴을 SDS-PAGE의 전개 젤에 첨가한 후 환원조건에서 전기영동하였다. 이후 1% Triton X-100 완충용액에서 재변성시킨 다음 배양 완충용액 (0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.02 M NaCl, 5 mM CaCl₂와 0.02% Brij-35)에서 16시간 반응시켰다(37°C). 이후 0.5% Coomassie brilliant blue R250으로 3시간 염색시킨 다음, 10% acetic acid, 30% 메탄올에서 투명한 밴드가 나타날 때까지 탈색시켰다.

Western Hybridization

단백질분해효소 억제제 (10 g/mL trypsin, 10 g/mL

aprotinin, 10 g/mL leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 200 mM Na₃VO₄, and 100 mM NaF가 포함된 완충용액 (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, and 1 mM EGTA)으로 세포를 용해시킨 다음 원심분리 (14,000 g)에 의해 상등액을 얻은 후, BCA protein assay reagents (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 단백질을 10% SDS-polyacrylamide 겔 상에서 분리한 다음, nitrocellulose 막으로 옮긴 후, 2% skim milk 함유 TBS 완충용액에 넣어 막의 비특이적 부위들을 차단하였다. 완충용액을 제거한 다음 1차 항체와 함께 배양한 후, horseradish peroxidase-conjugated 2차 항체를 처리한 다음 ECL (Amersham International, Buckingham, UK)로 발색시켰다.

통계처리

자료는 평균 ± SD로 나타냈으며, 유의성은 Student-Newman-Keuls test에 의한 one-way ANOVA를 이용하여 검사하였다. 통계적 유의성은 P < 0.05를 기준으로 하였다.

결과 및 고찰

발아에 미치는 상황버섯 추출물 및 FGF-2의 효과

혈관내피세포의 발아는 혈관신생에서 내피세포의 이동과 함께 일어나는 초기단계의 현상이다(23). 혈관내피세포의 발아에 미치는 상황버섯 추출물 및 FGF-2의 효과를 확인하고자 microcarrier beads에 PPAECs 세포를 2~3일간 배양하여 bead 당 약 25~30 세포가 융합된 상태의 단일층을 형성하도록 한 다음, 이들 beads를 3차원-피브린 겔에 매몰시켜 배양하였다. 매 24시간마다 상황버섯 추출물 및 FGF-2를 첨가하면서 조사한 결과, 상황버섯 추출물 농도 10~50 µg/mL에서는 내피세포의 발아가 약 38~58% 억제되었다(Fig. 1). 그러나 상황버섯 추출물 농도 200~400 µg/mL에서는 약 1.42~1.47배의 발아 증가를 유도하였다. 또한 상황버섯 추출물과 FGF-2를 병용 처리한 결과 대조완충용액만 처리하였을 때보다 약 2배의 발아 유도효과를 나타냈다.

MMPs 및 플라스민의 분비에 미치는 상황버섯 추출물 및 FGF-2의 효과

In vivo에서, 내피세포가 발아하기 위해서는 인접한 세포외기질을 분해하여야 한다. 이 과정에 중요한 역할을 하는 효소가 MMPs 및 플라스민이다(24). 지금까지 26종의 MMPs와 4종의 TIMPs가 알려져 있으며(10), proMMP의 순차적 활성화 과정은 α2-macroglobulin이나 TIMPs 같은 내재성 억제제에 의해 조절된다. 이전의 연구 결과, proMMP-2의 active MMP-2로의 전환에는 TIMP-2와 MT1-MMP 두 가지 모두가 요구되는 것으로 알려졌다(10). MMPs가 완전히 활성화되기 전에 활성화 중간체로서 MMP-1, MMP-2, MMP-3 및 MMP-9이 TIMPs에 결합한다고 알려져 있다(25).

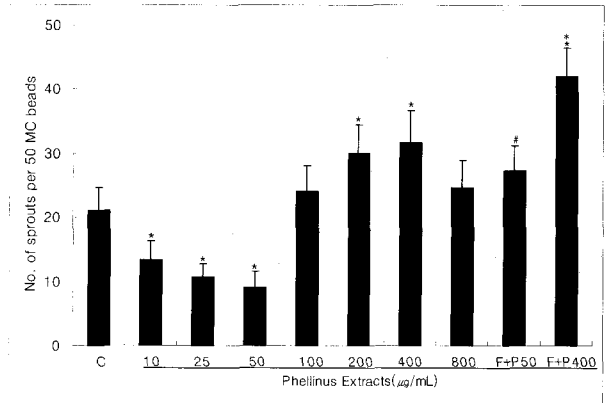


Figure 1. Effect of Phellinus extracts on sprouting activity in PPAECs. Cells grown on microcarrier beads were placed in fibrin gels containing control buffer (C), Phellinus extracts (10, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL, respectively), FGF-2 (10 ng/mL) plus Phellinus extracts (50 µg/mL) (F+P50) or FGF-2 plus Phellinus extracts (400 µg/mL) (F+P400) and were incubated with daily supplementation with the same amounts of indicated reagents. Number of endothelial sprouts with length exceeding the diameter of the microcarrier beads (175 µm) per 50 microcarrier beads was counted after 3 days. Data are mean ± SD from three independent experiments. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by the Students *t* test. **P* < 0.05 vs control buffer; #*P* < 0.05 vs Phellinus extracts (50 µg/mL); †*P* < vs Phellinus extracts (400 µg/mL).

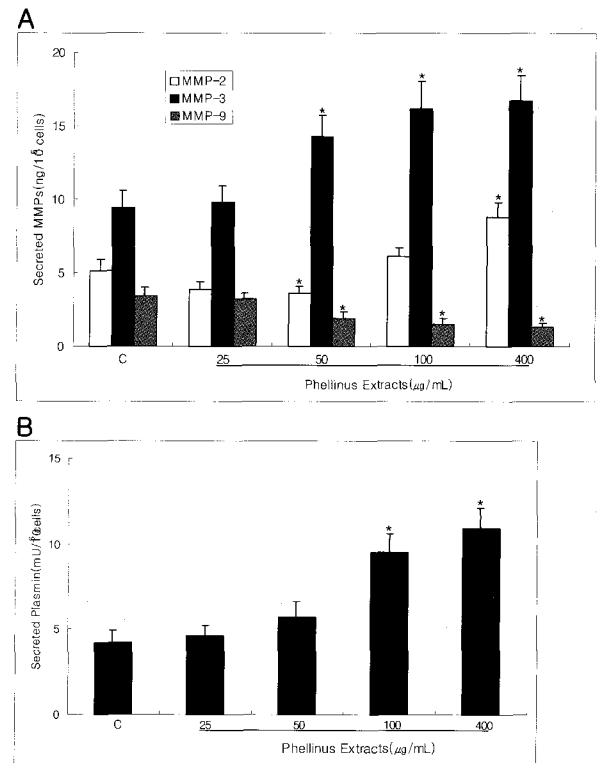


Figure 2. Effect of Phellinus extracts on the secretion of MMPs (A) and plasmin (B) in PPAECs. Cells were incubated in serum- and phenol red-free DMEM for 12 h. Then, the cells were incubated for 12 h after addition of a control buffer (C) and various amounts of Phellinus extracts (25 to 400 µg/mL), and media were quantitatively assayed by enzyme immunoassay. Bars represent the mean ± SD from three independent experiments. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by the Students *t* test. **P* < 0.05 vs control buffer.

따라서 상황버섯 추출물 처리에 의해 유도된 혈관내피 세포의 발아증가는 MMPs 및 플라스민의 분비증가에 의한 것이거나, MMP-2의 활성화에 의한 것이라 여겨진다. 이를 확인하기 위해 PPAECs 세포에 상황버섯 추출물을 처리한 다음, PPAECs 세포로부터 배양배지를 이용하여 MMP-2, MMP-3 및 MMP-9에 대한 enzyme immunoassay를 행하였다 (Fig. 2A). 그 결과, MMP-2는 상황버섯 추출물 농도 50 μ g/mL까지는 약 30% 정도 분비가 감소되다가 100 μ g/mL에서부터 증가하기 시작하여 400 μ g/mL에서는 약 1.7배의 MMP-2 분비 유도효과를 나타냈다. 이에 비해 MMP-9은 농도-의존적으로 분비가 감소되었으며, MMP-3는 50~400 μ g/mL의 농도에서 약 1.5~1.7배 분비가 증가되었다. MMP-3는 proMMP-2의 active MMP-2로의 전환에 필요한 TIMP-2에 결합하는 방식으로 MMP-2의 활성화에 관여한다고 알려져 있다(26). 따라서 상황버섯 추출물에 의해 분비가 증가된 MMP-3의 작용으로 MMP-2의 활성화가 유도되었다고 사료된다. 한편, 상황버섯 추출물이 피브린 겔에서 세포의 발아를 유도하였기 때문에 상황버섯 추출물이 PPAECs 세포로부터 플라스민을 유도하는지를 확인한 결과(Fig. 2B), 대조완충용액에 비해 상황버섯 추출물 농도 100~200 μ g/mL에서 2.3~2.4배의 플라스민 분비 유도효과를 나타냈다. 이전의 연구 결과, 플라스민과 MT1-MMP와의 상호작용에 의해 proMMP-2의 활성화가 이루어지기도 한다고 알려져 있다(27). 따라서 상황버섯 추출물에 의한 피브린 겔에서의 혈관내피세포의 발아 유도는 피브린을 용해시키는 플라스민 분비 증가와 함께 proMMP-2의 active MMP-2로의 전환에 관여하는 플라스민의 또 다른 경로의 활성화에 의한 것이라 사료된다.

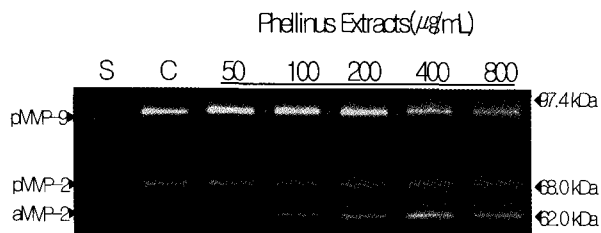


Figure 3. Gelatin zymography of MMP-2 and MMP-9 in culture medium of PPAECs treated with Phellinus extracts. Cells were incubated in serum- and phenol red-free DMEM for 12 h. Then, the cells were incubated for 12 h after addition of control buffer (C) and various amounts of Phellinus extracts (50, 100, 200, 400, 800 μ g/mL, respectively). Equal amounts of proteins (10 μ g/lane) from supernatants were loaded into each lane. Lane S contains standards of MMP-9 and MMP-2. A representative gelatin zymography from three experiments is shown.

MMP-2 및 MMP-9의 젤라틴 Zymography에 의한 검출

MMP-2 및 MMP-9의 활성을 정확히 확인하기 위해서는 젤라틴 zymography가 요구된다. 젤라틴 zymography를 이용하여 상황버섯 추출물에 의한 MMP-2 및 MMP-9의 분비량을 조사한 결과 proMMP-9은 농도-의존적으로 감소하였으며, proMMP-2는 저농도 (100 μ g/mL)에서 약간 감소하다가 100 μ g/mL 이상의 농도에서는 오히려 분비가 증가하였다 (Fig. 3). 특이한 사실은 상황버섯 추출물 농도 100~400 μ

g/mL에서 MMP-2의 활성화가 농도-의존적으로 이루어졌다. 이 결과는, 상황버섯 추출물의 농도 증가에 따른 MMP-3 및 플라스민의 증가에 의해 proMMP-2의 active MMP-2로의 전환이 촉진되었기 때문으로 사료된다.

MMP-2 및 MMP-9의 발현에 미치는 상황버섯 추출물 및 FGF-2의 효과

세포 내에서 proMMP-9, proMMP-2 및 active MMP-2의 발현 양상을 확인한 결과(Fig. 4), 상황버섯 추출물 농도 50~100 μ g/mL에서 proMMP-9의 발현은 대조완충용액에 비해 약 28~44% 억제되었으며, proMMP-2는 약 25~37% 억제되었다. 반면, active MMP-2는 동일한 농도에서 약 1.2배 분비 증가가 나타났으며, 상황버섯 추출물 (100 μ g/mL)과 FGF-2 (10 ng/mL)를 병용처리시 active MMP-2의 발현양이 약 1.4배 증가하여 enzyme immunoassay(Fig. 2A) 및 젤라틴 zymography(Fig. 3)와 유사한 결과를 나타냈다.

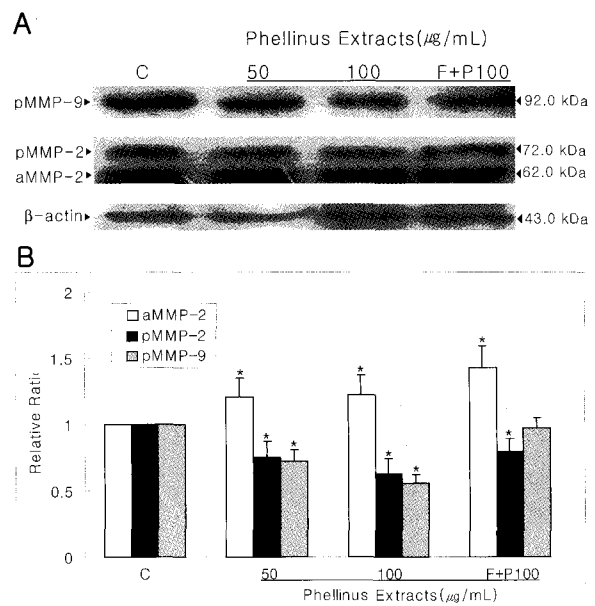


Figure 4. Effect of Phellinus extracts and FGF-2 on the expression of MMP-2 and MMP-9 in PPAECs. (A) Cells were incubated in serum- and phenol red-free DMEM for 12 h. Then, the cells were incubated for 12 h after addition of a control buffer (C) and various amounts of Phellinus extracts (50, 100 μ g/mL, respectively) or FGF-2 (10 ng/mL) plus Phellinus extracts (400 μ g/mL) (F+P100). Fifteen microgram of protein was used for western blot. The protein was separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with MMP-2 and MMP-9 specific antibodies. Protein expression levels of β -actin in cell lysates were used as a control. (B) Densitometric analyses of the blots are presented as the relative ratio of induction of the MMP-2 or MMP-9 by addition of Phellinus extracts. The MMP-2 or MMP-9 expression by addition of control buffer for 12 h is arbitrarily presented as 1. Data are mean \pm SD from three independent experiments. * P < 0.05 vs control buffer.

MMPs 및 플라스민 억제제에 의한 혈관내피세포 발아의 억제

세포가 발아하기 위해서는 세포외기질의 분해, 세포간 부착 및 탈리, 그리고 세포외기질 성분내 대한 세포의 부착 및 탈리 등이 요구된다(28). 여기에 관련된 효소가 MMPs 및 플라스민으로 본 연구 결과, 상황버섯 추출물 처

리에 의해 MMP-3 및 플라스민의 분비증가가 유도되었으며 혈관신생 유도인자인 FGF-2와의 병용처리에 의해 그 효과가 더욱 상승되었다. 한편 상황버섯 추출물 처리시 고농도 (100~400 $\mu\text{g/mL}$)에서 혈관내피세포의 발아가 촉진되었으므로(Fig. 1), MMPs 및 플라스민의 분비증가가 상황버섯 추출물에 의해 유도된 혈관내피세포의 발아에 주된 요인일 수 있다. 이를 확인하기 위해 MMPs 및 플라스민 억제제를 사용하여 혈관내피세포의 발아에 미치는 효과를 확인하였다(Fig. 5). 예상한 바와 같이 광범위 MMP 억제제인 BB-94 (20 ng/mL)과 플라스민 억제제인 α_2 -antiplasmin (100 mU)에 의해 상황버섯 추출물에 의해 유도된 혈관내피세포의 발아가 약 40~44% 억제되어 피브린 젤에서 확인된 상황버섯 추출물에 의한 발아유도는 MMPs 및 플라스민의 분비증가에 의한 것이라 여겨진다.

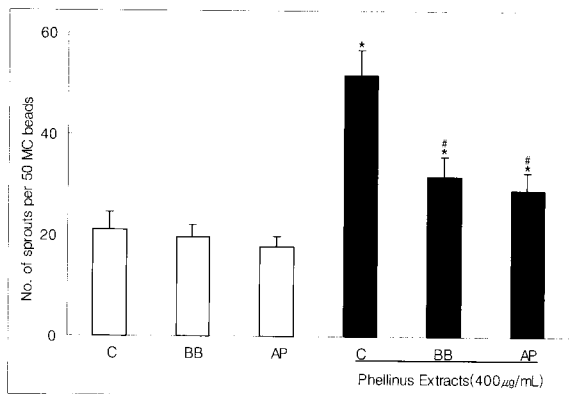


Figure 5. Effect of MMPs and plasmin inhibitors on Phellinus extracts-induced endothelial cell sprouting. PPAECs were grown to confluence on microcarrier beads, which were then placed in gelatinized 24-well plates in medium containing 2.0% FBS with addition of buffer, BB-94 (20 ng/mL) (BB), α_2 -antiplasmin (100 mU) (AP), alone or with Phellinus extracts (400 $\mu\text{g/mL}$). Cells were incubated with daily supplementation with the same amounts of indicated reagents. Number of endothelial sprouts with length exceeding the diameter of the microcarrier beads (175 μm) per 50 microcarrier beads was counted after 3 days. Data are mean \pm SD from three independent experiments. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by the Student's *t* test. **P* < 0.05 vs control buffer.

요약

본 연구에서는 상황버섯의 수용성 추출물을 이용하여 PPAECs 세포의 발아에 미치는 효과 및 그 작용기작을 알아보고자 하였다. 상황버섯 추출물을 10~50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하면 PPAECs 세포의 발아가 약 38~58% 억제되었으나, 200~400 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서는 약 1.42~1.47배의 발아 증가를 유도하였다. PPAECs 세포에 상황버섯 추출물을 처리한 결과, MMP-2는 상황버섯 추출물 농도 50 $\mu\text{g/mL}$ 까지는 약 30% 정도 분비가 억제되다가 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서부터 증가하기 시작하여 400 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 약 1.7배의 MMP-2 분비 증가 효과를 나타냈다. 이에 비해 MMP-9의 분비는 농도-의존적으로 감소되었으며, MMP-3는 50~400 $\mu\text{g/mL}$ 에서 약 1.5~1.7배의 분비 증가 효과를 보였다. 또한 100~200 $\mu\text{g/mL}$

농도의 상황버섯 추출물에서 피브린 젤의 용해 및 MMP-2의 활성화에 관여하는 플라스민의 분비증가가 약 2.4배 유도되었다. 한편 상황버섯 추출물 처리시 고농도 (100~400 $\mu\text{g/mL}$)에서 PPAECs 세포의 발아가 촉진되었으며, 이러한 효과는 MMPs 및 플라스민 억제제에 의해 약 40~44% 억제되어 피브린 젤에서 확인된 상황버섯 추출물에 의한 발아 증가는 MMPs 및 플라스민의 분비증가에 의한 것이라 사료된다.

감사

이 논문은 2004년도 전북대학교 지원 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Risau, W. (1997), Mechanisms of angiogenesis, *Nature* **386**, 671-674.
- Folkman, J. and Y. Shing (1992), Angiogenesis, *J. Biol. Chem.* **267**, 10931-10934.
- Millauer, B., S. Witzmann-Voos, H. Schnurch, R. Martinez, N. P. Moller, W. Risau, and A. Ullrich (1993), High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis, *Cell* **72**, 835-846.
- Pepper, M. S. (2001), Extracellular proteolysis and angiogenesis, *Thromb. Haemost.* **86**, 346-355.
- Zhou, Z., S. S. Apte, R. Soiminen, R. Cao, G. Y. Baaklini, R. W. Rausser, J. Wang, Y. Cao, and K. Tryggvason (2000), Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 4052-4057.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (1996), Matrix metalloproteinases and the development of cancer, *Chem. Biol.* **3**, 895-904.
- Nelson, A. R., B. Fingleton, M. L. Rothenberg, and L. M. Matrisian (2000), Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications, *J. Clin. Oncol.* **18**, 1135-1149.
- Anita, E. Y., A. N. Murphy, and W. G. Stetler-Stevenson (1998), 72 kDa gelatinase (gelatinase A) : structure, activation, regulation, and substrate specificity, In *Matrix Metalloproteinase*, W. C. Parks and R. F. Mecham, Eds., pp. 85-113, Academic Press. London. UK.
- Frederick, J. and J. F. Woessner Jr. (1998), The matrix metalloproteinase family, In *Matrix Metalloproteinase*, W. C. Parks and R. F. Mecham, Eds., pp. 1-14, Academic Press. London. UK.
- Sounni, N. E. and A. Noel (2005), Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression, *Biochimie* **87**, 329-342.
- Kim, H. G. and G. Y. Koh (2000), Lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells through an NF- κ B-dependent pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 401-405.
- Nagase, H. (1997), Activation mechanisms of matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.* **378**, 151-160.
- Kim, H. M., S. B. Han, G. T. Oh, Y. H. Kim, D. H. Hong, N. D. Hong, and I. D. Yoo (1996), Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*, *International J. Immunopharmacol.* **18**, 295-303.
- Lee, H. J., H. J. Lee, E. S. Lim, K. S. Ahn, B. S. Shim, H. M. Kim, S. J. Gong, D. K. Kim, and S. H. Kim (2005), Cambodian *Phellinus linteus* inhibits experimental metastasis of melanoma cells in mice via regulation of urokinase type plasminogen activator, *Biol. Pharmaceu. Bull.* **28**, 27-31.

15. Shon, Y. H. and K. S. Nam (2001), Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes, *J. Ethnopharmacol.* **77**, 103-109.
16. Song, Y. S., S. H. Kim, J. H. Sa, C. Jin, C. J. Lim, and E. H. Park (2003), Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*, *J. Ethnopharmacol.* **88**, 113-116.
17. Baird, A. (1994), Fibroblast growth factors: activities and significance of non-neurotrophin neurotrophic growth factors, *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 78-86.
18. Kinoshita, M. and K. Shimokado (1999), Autocrine FGF-2 is responsible for the cell density-dependent susceptibility to apoptosis of HUVEC : A role of a calpain inhibitor-sensitive mechanism, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 2323-2329.
19. Chae, J. K., L. Kim, S. T. Lim, M. J. Chung, W. H. Kim, H. G. Kim, and G. Y. Koh (2000), Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2573-2578.
20. Ferrara, N. and K. Alitalo (1999), Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors, *Nat. Med.* **5**, 1359-1364.
21. Kim, I., S. O. Moon, K. N. Koh, H. Kim, C. S. Uhm, H. J. Kwak, N. G. Kim, and G. Y. Koh (1999), Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin-related protein induces endothelial cell sprouting, *J. Biol. Chem.* **274**, 26523-26528.
22. Oh, I. S., J. W. Han, and H. G. Kim (2005), Water extracts of *Aralia elata* root bark enhances migration and matrix metalloproteinases secretion in porcine coronary artery endothelial cells, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **10**, 372-377.
23. Klagsbrun, M. and P. A. D'Amore (1991), Regulators of angiogenesis, *Annu. Rev. physiol.* **53**, 217-239.
24. Grant, D. S. and H. K. Kleinman (1997), Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix, *EXS* **79**, 317-333.
25. Benbow, U., G. Buttice, H. Nagase, and M. Kurkinen (1996), Characterization of the 46-kDa intermediates of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1) obtained by site-directed mutation of phenylalanine 83, *J. Biol. Chem.* **271**, 10715-10722.
26. Nguyen, Q., F. Willenbrock, M. I. Cockett, M. O'Shea, A. J. Docherty, and G. Murphy (1994), Different domain interactions are involved in the binding of tissue inhibitors of metalloproteinases to stromelysin-1 and gelatinase A, *Biochemistry* **33**, 2089-2095.
27. Okumura, Y., H. Sato, M. Seiki, and H. Kido (1997), Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator, *FEBS. Lett.* **402**, 181 - 184.
28. Davis, G. E. and D. R. Senger (2005), Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization, *Circ. Res.* **97**, 1093-1107.