

Heme 산화효소 발현 유도체로서 Isoflavone-Free 검은콩 펩타이드의 항고혈압 활성

신미경 · 권용현 · 안창원** · 신동석** · 박수현** · 최보화 · 홍순선* · 강주희 · 박창신#

인하대학교 의과대학 의학전문대학원 약리학교실 의약물독성연구소,

*특성화교실 임상시험센터, **(주)농심 R&BD 센터

(Received May 18, 2012; Revised June 12, 2012; Accepted June 15, 2012)

Antihypertensive Effects of Novel Isoflavone-Free Black Soy Peptide Mixture as HO-1 Inducer

Mi-Kyung Shin, Yong-Hyun Kwon, Chang-Won Ahn**, Dong-Seok Shin**, Soo-Hyun Park**,
Bo-Hwa Choi, Soon-Sun Hong*, Ju-Hee Kang and Chang-Shin Park#

Department of Pharmacology and Medicinal Toxicology Research Center, Center for Advanced Medical Education,
Inha University College of Medicine by BK-21 Project, Inha University, Incheon 400-712, Korea

*Department of Biomedical Sciences and Clinical Research Center, Inha University, Incheon 400-712, Korea

**R&BD Center, NongShim Co., Ltd., Seoul 156-709, Korea

Abstract — We previously reported that the novel isoflavone-free peptide mixture (black soybean peptide, BSP) had several beneficial effects like antiobesity and hypotriglyceridemic effect. However, there are no reports for BSP on anti-hypertensive activity. BSP induced heme oxygenase-1 (HO-1) in HUVECs, thus investigated the HO-1-induced activity in HUVECs and the anti-hypertensive effects in SHR animal model. BSP significantly induced HO-1 expression both at transcriptional and protein levels in a time- and dose-dependent manner as measured by RT-PCR and Western blot analysis, respectively. These inductions were abolished by pretreatment of *N*-acetyl-cystein (NAC, 1~10 mM), but not by employing Tempol, a superoxide dismutase (SOD) mimetic (1~5 mM). As expected, enzymatic activity (~2 fold) determined by bilirubin formation assay and cGMP concentration (~6 fold) were significantly increased in BSP-treated cells. Based on the numerous evidences on the beneficial effects of HO-1 and our results, we investigated *in vivo* effects of BSP on the anti-hypertensive activity. The administration of BSP (1% in drinking water) significantly decreased mean blood pressure (BP) (from 218.6±6.99 to 190.0±3.42 mm Hg, $p < 0.01$). This result indicates that BSP is strong inducer of HO-1 expression, which may be triggered by oxidative stress, and has anti-hypertensive activity.

Keywords □ isoflavone-free peptide mixture, heme oxygenase-1, SHR, anti-hypertension

고혈압(hypertension)은 관상동맥질환, 심근경색, 뇌졸중, 신부전 및 심부전 등을 포함하는 다양한 심혈관계 질환 유발의 가장 중요한 위험인자이면서 흔한 유병율을 갖는 질환이다.^{1,2)} 그러나 원인이 확인되는 고혈압 환자는 약 15% 이하로 2차적 고혈압(secondary hypertension)이며, 대부분이 원인을 알 수 없는 본태성 또는 원발성 고혈압(essential 또는 primary hypertension) 환자이다.³⁾ 이런 고혈압 증상을 효과적으로 조절하기 위한 대표적인 약리학적 경로는 이노작용, 교감신경 억제, 혈관확장 및

angiotensin 생성 또는 작용 억제와 같은 4가지 기전에 기초한다.⁴⁾ 고혈압 환자들의 대부분이 이들 기전에 근거하여 약물을 장기적으로 복용하며 단독 또는 병용투여로 처방된다. 특히, 본태성 고혈압은 산화적 스트레스와 함께 다양한 염증반응 유발과 연관되어 항산화 활성을 가지는 물질들이 혈관손상을 보호하거나 고혈압 증상을 억제할 수 있었다.^{5,6)} 동물모델에서 본태성 고혈압 증상이 나타나고 진행되는 정도가 사람과 가장 유사한 경우는 SHR(spontaneously hypertensive rat) 유전적 모델이며, 노화가 진행되면서 혈압은 비례하여 상승한다.^{7,8)} 이들 고혈압 동물모델에서도 항산화 기전이 혈압을 조절할 수 있는 또 하나의 경로로 작용하였다.^{9-11,20)}

Heme oxygenase(HO)는 조직 및 세포내 heme의 생성 및 축

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 032-890-0962 (팩스) 032-887-7488
(E-mail) parkshin@inha.ac.kr

적을 억제하기 위한 heme 분해효소이며, 다양한 유도체들에 의해 유도발현되는 HO-1(inducible form)과 세포내에서 항상 일정한 정도로 존재하는 HO-2(constitutive form) 효소들이 세포내 세포, 조직 및 기관보호를 위하여 그 활성을 나타낸다. 이와 같은 보호작용은 HO 효소활성으로 생성되는 세포내 주요성분인 철분(iron)의 생성, 그리고 일산화탄소(carbon monoxide, CO) 및 담즙색소인 biliverdin과 bilirubin들의 항산화효과 등의 중요한 기전에서 비롯된다.¹⁵⁾

최근에 항염증 및 항산화 활성을 보이는 HO-1(heme oxygenase-1) 유도 발현이 산화적 스트레스로 유발되는 혈관내피세포 손상을 보호하고, 특히 최종 산물인 CO(carbon monoxide) 농도의 증가는 혈관 평활근내 cGMP 생성을 촉진하므로 뚜렷한 혈관이완 활성을 나타낸다.¹²⁻¹⁵⁾ Kim 등¹⁶⁾은 HO-1의 유도발현 또는 CO의 생성이 작용하는 세포 신호전달 경로들을 보고하였으며, Morita¹⁷⁾는 동맥경화증을 포함하는 심혈관계 질환에 HO-1의 세포 및 기관 보호 효과를 확인하였고, Ndisang 등²¹⁾은 고혈압 조절에 CO의 작용기전 및 효과를 본태성 고혈압의 증상 조절을 위한 주요 기전으로 제시하였다. 특히, SHR 동물모델을 이용하여 HO/CO 경로의 활성을 유도 촉진하여 혈압을 조절하는 *in vivo* 실험 결과에서는 세포내 sGC(soluble guanylyl cyclase) 촉진 및 cGMP 농도 증가를 확인하고 HO/CO-sGC/cGMP 작용기전이 입증된 바 있다.^{18,19)}

본 연구에서는 HO-1의 활성을 기초한 항고혈압 효과가 기대되는 새로운 peptide 혼합물을 사용하고자 한다. 이 물질은 (주)농심에서 개발된 검은콩(*Rhynchosia volubilis*)으로부터 분리 정제한 새로운 isoflavone-free peptide mixture(BSP: 50.7% 조단백량, 4.6% 수분량)²²⁾로, 최근에 우리는 BSP의 체중조절(항비만) 및 혈당조절(항당뇨병) 효과를 확인하였고, 작용기전으로 AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진과 ER stress/인슐린 저항성의 개선효과 기전을 각각 제시한 바 있다.^{23,24)} 그러나 항고혈압 효과에 대한 BSP의 활성은 측정된 바 없어 인체 혈관내피세포(HUVECs, human umbilical vein endothelial cells)와 19주된 SHR 동물모델을 이용하여 HO-1 효소를 중심으로 유도 발현 및 HO의 생화학적 활성, 그리고 SHR 동물모델의 항고혈압 효과를 확인하고자 한다.

재료 및 실험방법

HUVECs 배양

연구에 사용된 human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)은 인간을 기원으로 하는 세포주이며 (주)바이오버드(Bio-bud, Seoul, Korea)에서 분양받았다. HUVEC은 20% fetal bovine serum(FBS, Gibco, Grand Island, NY), 1% 항생제(penicillin/streptomycin, Gibco), 25 mM HEPES(Boehringer Mannheim

GmbH, Germany), 10 unit/ml Heparin(Sigma, St. Louis, MO), 2.2 g/l sodium bicarbonate(Sigma), 20 ng/ml의 bFGF(Bio-bud)가 첨가된 Medium 199 배양액(Gibco)을 100 mm 세포배양 dish(TPP, Trasadingen)에 10 ml 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 시약 처리 들어가기 전에 HUVEC은 bFGF가 들어가지 않은 1% FBS M199 배양액에서 16시간 동안 배양하였다. 그 후 시약들을 serum free M199 배양액에 넣고 실험하였다.

HO-1 mRNA 전사체의 RT-PCR 실험

HO-1의 전사량을 측정하기 위해 HUVEC의 RNA를 TRI reagent(Molecular research center, Cincinnati, USA)를 이용한 chloroform/isopropanol 방법으로 추출하였다. Takara RNA PCR kit의 설명에 따라 1 µg의 HUVEC의 RNA를 random 9-mer와 AMV reverse transcriptase XL(Takara, Kyoto, Japan)과 반응시켰다. 인간의 HO-1 cDNA에서 제작한 primer(sense, AAG ATT GCC CAG AAA GCC CTG GAC; antisense, AAC TGT CGC CAC CAG AAA GCT GAG)를 이용하여 94°C 변성 40초, 58°C annealing 40초, 72°C 신장반응 1분 30초를 30회 반복하여 증폭시켰다. 증폭된 HO-1은 1% TBE agarose gel을 통해 확인하였다. 위의 대조군으로는 18S rRNA(sense, 5'-TGC ATG TCT AAG TAC GCA CG-3'; antisense, 5'-TTG ATA GGG CAG ACG TTC GA-3')를 이용하였다.

Western blot 분석

시료 단백질 25 µg을 100°C에서 10분간 가열한 후, 8~16% Tris-glycine gradient gel(Novex, Invitrogen, Netherlands)에서 125 volt로 전기영동하였다. 전기영동 시 gradient gel에 의해 분리된 단백질은 15 volt로 4°C에서 하룻밤 동안 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane(Millipore, Miliford, MA)으로 이동시켰다. 전기영동된 membrane은 blocking buffer(TBS-T 용액에 녹인 5% BSA)로 1시간 동안 처리하여 항체와의 비특이적 결합을 억제시켰다. TBS-T(0.1% Tween 20, 10 mM Tris base, 100 mM NaCl, pH 8.0)로 씻어낸 후, 마우스 단일 항체인 HO-1(Stressgen, Victoria, Canada), β-actin과 다클론 항체인 HO-2(Santacruz)를 각각 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBS-T로 세척 후, 1000배로 blocking buffer에 희석된 2차 항체(anti-mouse IgG-HRP, anti-rabbit IgG-HRP)를 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBST로 다시 세척한 후 ECL(Pierce)에 membrane을 2분간 반응시킨 후, X-ray film(Kodak, USA)에 감광시켰다.

Heme oxygenase(HO)의 생화학적 활성도 측정

분리된 단백질을 2 mM MgCl₂, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml trypsin inhibitor, 1 mM PMSF가 들어간 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)에 섞어준 뒤, 일

음에 넣은 상태에서 5초씩 2분간 초음파 분쇄기로 파쇄하였다. 이를 4°C에서 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액만 모아준 뒤, 단백질을 정량을 하여 동량의 단백질이 반응하게 만들었다. HO의 반응액은 0.8 mM NADPH, 2 mM glucose-6-phosphate, 0.2 U glucose-6-phosphate dehydrogenase, 20 µM hemin, 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4), 2 mg의 쥐의 간으로부터 추출한 cytosol 단백질로 이루어져 있으며, 실험군의 단백질과 1대 1로 섞은 뒤 37°C의 수조에 1시간 동안 방치하였다. 반응이 끝난 후, 얼음에 2분 이상 방치한 뒤 464 nm와 530 nm에서 ELISA reader(Power Wave_x 340, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT)로 측정하였다.

cGMP 농도 측정

세포 내 cGMP의 농도를 측정하기 위해 R&D의 cyclic GMP immunoassay kit(R&D, Minneapolis, MN)를 사용하였다. 시약 처리가 끝난 세포에 0.1 M HCl을 넣고 10분간 상온에 놓아 두어 해리시킨 뒤 600×g로 실온에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리된 샘플의 상층액만을 취하여 건조시켜준 뒤, cGMP를 측정하였다. 먼저 건조된 시료와 standard 시료를 ED2 assay buffer에 녹였다. 여기에 아세틸화 시켜주는 용액을 넣고 2초간 섞어준 뒤, 이들을 microplate에 넣어주었다. 여기에 cGMP 결합 용액, cGMP 항체 용액을 각각 넣고 2시간 동안 흔들며 반응시켰다. 세척 용액으로 3회 세척 후, pNPP 기질을 넣고 1 ELISA reader(Power Wave_x 340)로 405 nm의 파장에서 cGMP 농도 값을 측정하였다.

동물모델 실험

동물모델 실험과정은 인하대학교 의과대학 Animal Ethics Committee에서 승인되었고, Korean Academy of Medical Science에 의해 제시된 동물실험에 대한 가이드에 따라 수행하였다. 14주된 수컷 Wistar/ST(n=16)와 SHR(n=24)을 구입하여(Orient-Bio laboratory Animal Research Center Co., Ltd.(경기도 가평) 1주일간 안정 기간을 두고 이후에 매일 신선한 BSP 용액(물에 1% 농도)과 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 하여 실험군(각각 n=10)과 대조군(각각 n=8)을 구별하여 4주간 복용 실험을 수행하였다. BSP 복용 후 19주가 된 시기에 평균 혈압, 심방동수 및 몸무게와 심장 무게를 측정하였고 혈액 5 ml에서 혈청을 분리하였다. SHR 모델에서 혈압 측정 시 비선택성 교감신경계 조절제인 labetalol(labetalol hydrochloride, 5 mg/kg)을 이용한 양성대조군(positive control, n=4)을 함께 비교하였다.

혈압측정

최근에 본 연구진이 동물모델에서 전신 혈압을 측정할 때 마취제나 기구에 대한 스트레스를 피하기 위하여 Awake 상태에서

대퇴부 동맥에 삽입된 카테터(PE-10, Becton Dickinson)를 이용한 방법을 적용하였다.²⁵⁾ 이 카테터를 SHR 모델에서만 피부를 통해서 외부로 노출하여 압력 측정기에 연결하였다(Research Grade BP transducer, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA).

혈청분석

BSP 복용 중에 간장내 독성 정도를 확인하기 위하여 아래 방법을 이용하여 혈청내 AST와 ALT 값을 측정하였고, 전체 콜레스테롤과 중성지방, HDL 및 LDL 농도도 측정하였다(KAMSI, Seoul).

AST(GOT) – 혈청 시료 중의 AST는 L-Aspartate와 α-ketoglutarate를 Oxaloacetate와 L-Glutamate로 전환시켜, oxaloacetate가 NADH의 존재 하에 MDH의 작용으로 L-Malate로 전환될 때 340 nm에서 NADH의 감소속도를 측정하였다(IFCC법, HBi, Korea).

ALT(GPT) – 혈청 시료 중의 ALT는 L-alanine과 α-ketoglutarate를 pyruvate와 L-glutamate로 전환시켜, pyruvate가 NADH의 존재 하에 LDH의 작용으로 lactate로 전환될 때 340 nm에서 NADH의 감소 속도를 측정하였다(JSCC 법, HBi, Korea).

측정값 통계처리

본 내용에서 측정된 실험은 3번의 반복실험을 통하여 필요시 대조군과 실험군 간의 차이 정도를 통계적으로 분석하였으며 유의성 검증은 평균값±표준편차로 구간 unpaired Student's *t* test (HUVECs 결과) 또는 Mann-Whitney 방법(*in vivo* 결과)을 적용하였다($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$).

실험 결과 및 고찰

HUVECs에서 HO-1의 전사체 발현

HO-1의 전사체 유도발현을 확인하기 위하여 수행한 RT-PCR 결과에서 HUVECs에 배양액 용매로 BSP(0.1, 0.5 그리고 1.0 mg/ml) 3가지 농도를 16시간 동안 처리하였을 때, 농도-의존적(평균 126%, 201% 그리고 347%)으로 mRNA의 발현양이 증가하였다(Fig. 1A). 또한 가장 높게 발현된 BSP 농도(1 mg/ml)를 시간별로 처리하였을 때 시간-의존적으로 mRNA 발현양이 증가하였으나 8시간 때에 가장 높은 발현의 양을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 이 결과들은 3번의 반복실험을 통한 평균값을 제시한 것이다.

HUVECs에서 HO-1 단백질 발현

본 실험조건에서 전사체발현의 최대 증가를 나타낸 BSP 1 mg/

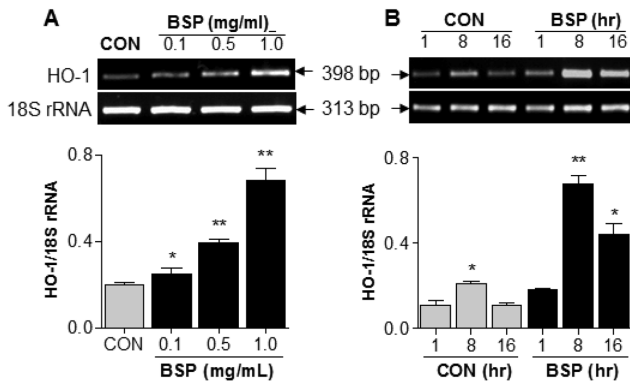


Fig. 1 – Effects of BSP on expression of HO-1 mRNA in HUVECs. The cells were treated with BSP (1 mg/ml), and then detected by RT-PCR. The expression levels of HO-1 were compared at the three different doses (A) and three time points (B). Data are means \pm SD of three repeated experiments or values. * P <0.05 and ** P <0.01 compared to untreated controls.

mL의 농도를 전사체 발현 이후에 진행되는 해석(translation) 단계를 고려하여 3가지 다른 시간 4, 8 그리고 22시간 동안 각각 처리하였을 때 전사체 발현과는 다소 차이가 있게 시간-의존적으로 22시간 때 가장 높은 발현의 양을 보였다(Fig. 2A). 이 결과 또한 3번의 반복실험을 통한 평균값이다.

다양한 세포들에서 HO-1의 발현은 세포보호를 포함하여 주로 이로운 활성을 나타내며 ROS를 포함한 다양한 산화적 스트레스로부터 세포와 기관을 보호하는 항산화 효소군에 속한다.^{13,14} 그러므로 본 연구에서처럼 BSP의 처리로 HO-1의 활성 유도가 HUVECs에서 관찰되었으므로 혈관계 손상 기전에 중요하게 작용할 것이다. 특히, HO-1의 유도발현이 고혈압 동물모델 및 인체에서도 혈압조절에 새로운 기전으로 작용하므로^{12,16} BSP에 의한 HO-1의 유도발현은 항고혈압 효과를 나타내는 새로운 펩타이드로 평가될 수 있다.

HUVECs에서 HO 생화학적 활성도와 cGMP 농도

세포에서 측정된 HO의 생화학적 활성도는 BSP 1 mg/mL의 농도로 22시간 처리한 후 측정하였을 때, 실험 세포군에서는 54.0 ± 8.9 (bilirubin nmol/mg protein/hr) 값으로 시료 처리하지 않은 대조군 31.7 ± 4.8 값보다 유의한 증가를 보였다(Fig. 2B). BSP를 처리한 후 세포내 cGMP의 농도는 기대보다 매우 높게 측정되었다. 즉, BSP를 처리하지 않은 대조 세포들에서는 0.11 ± 0.01 (pmol/mg protein)로 측정된 반면 BSP를 처리한 실험 세포군들에서는 0.61 ± 0.1 로 거의 ~6배의 증가를 보였다(Fig. 2C). 이는 HO-1의 유도발현 및 HO의 활성보다 훨씬 높은 값으로 HO 경로 이외의 활성촉진을 예견할 수 있었다.

HO 활성으로 촉진되는 cGMP 농도의 증가는 유사한 정도로 비례하지만 BSP를 처리한 본 연구결과에서는 매우 높은 농도로

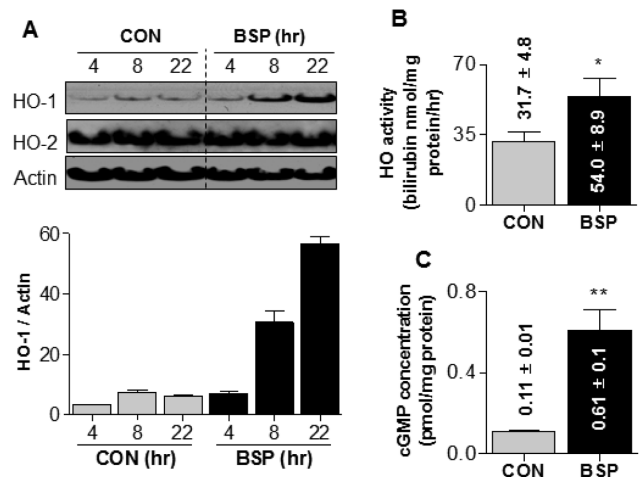


Fig. 2 – Effects of BSP on expression of HO-1 and HO-2 and HO activity in HUVECs. The cells were treated with BSP (1 mg/ml), and then detected by Western blotting. The expression or induction levels for HO-1 and HO-2 were compared at the three time points (A). HO activity was determined with crude cell extracts by bilirubin formation rates (B). The concentration of cGMP released was measured in cell medium (C). Data are means \pm SD of three repeated experiments or values. * P <0.05 and ** P <0.01 compared to untreated controls.

측정되었다. 일반적으로 HO 활성으로 생성되는 CO는 cGMP 생성효소인 sGC의 활성을 촉진하는 경로이므로 BSP에 의한 일부 활성이 작용했음을 알 수 있고,^{18,19} 또 다른 경로, 즉 혈관내피세포에서 일정하게 존재하거나 또는 활성화되는 eNOS(endothelial nitric oxide synthase)/NO의 경로를 예견할 수 있다.²⁶⁻²⁸ NO 또한 sGC의 heme-affinity가 강해서 cGMP 생성에 주요한 경로이다.

본 연구에서는 BSP의 HO-1 유도발현으로 예견되는 항고혈압 효과를 고혈압 동물모델 *in vivo*에서 확인하는 것이지만, eNOS의 활성에 대한 NO의 생성 가능성도 배제할 수 없는 중요한 경로로 여겨진다. 왜냐하면 우리의 이전 실험에서 BSP는 C2C12 근육세포에서 AMPK의 활성 촉진을 의미하는 AMPK 인산화 정도를 유의하게 증가시켰다.²³ 본 연구 결과에는 제시하지 않지만 HUVECs에서도 BSP가 AMPK의 인산화 정도를 농도-의존적으로 촉진시키는 결과를 확인하였으며, 이는 AMPK 하위 경로에 위치하는 eNOS의 인산화 활성부위인 Ser1177 촉진 결과와 연관됨이 잘 알려져 있으므로 AMPK-eNOS 신호전달 경로를 충분히 예상할 수 있었다.²⁹ 우리는 특히 BSP 처리로 뚜렷한 증가를 보였던 cGMP 농도를 근거로 HO/CO-sGC/cGMP 경로 뿐 아니라 eNOS/NO-sGC/cGMP 경로의 가능한 활성 경로를 확인할 것이다.

최근에는 AICAR(5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside)과 혈당강하제인 metformin과 같은 AMPK 활성제들이 혈압을 낮출 수 있음이 보고되었고 이 기전도 AMPK-

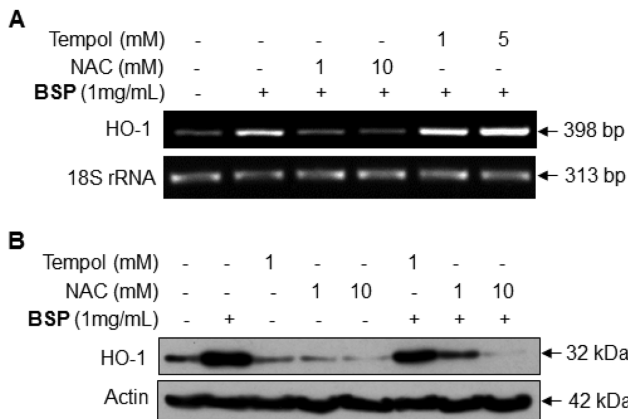


Fig. 3 – BSP-induced HO-1 expression was blocked by pretreatment of N-acetyl-cystein (NAC), but not by Tempol in HUVECs. Cells were pretreated for 30 min with Tempol (1 and 5 mM) or NAC (1 and 10 mM) and then BSP (1 mg/ml) was treated for 16 h. The expression patterns of mRNA (A) and protein (B) are similar.

eNOS/NO-sGC/cGMP 경로에 근거하는 것이다.³⁰⁾

HUVECs에서 HO-1 유도의 가능한 경로

HO-1의 유도발현이 세포독성 효과로 유도되는지 또는 다른 경로가 작용하는지를 확인하기 위하여 대표적인 reactive oxygen species(ROS) 경로를 조절하는 2가지 항산화제를 사용하였다. 즉, BSP 처리 후에 세포내 활성산소(superoxide anion)의 생성이 HO-1을 유도했는지를 확인하기 위하여 Tempol(1, 5 mM)을, 아니면 일반적인 ROS가 원인인지를 확인하기 N-acetyl-cystein (NAC; 1, 10 mM)를 전처리한 후 BSP를 처리하였다. 흥미롭게도 BSP에 의한 HO-1의 유도발현이 NAC 2가지 농도 모두에서 억제되었으나, Tempol 전처리에서는 변화가 없거나 다소 증가하는 경향이 있었다(Fig. 3). 이 결과는 전사체와 단백질 발현 모두에서 같은 양상으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 BSP에 의한 HO-1의 유도발현이 ROS의 생성으로 유도될 수 있음을 의미한다.

HUVECs에서 BSP의 처리로 세포독성이 없었으므로 독성유발의 ROS 생성보다는 생리적 농도의 ROS가 작용한 것으로 본다. 이런 생리적 작용의 ROS 활성화는 다양한 세포들에서 관찰되며, 세포사를 초래하지 않는 경우에 가장 가능한 기전으로 작용한다.³¹⁾

In vivo 실험

간장 기능 및 lipid parameter들의 측정 – 본 연구에서 분리된 혈청시료에서 간기능 정도를 분석하기 위한 ALT 및 AST 측정치는 Wistar와 SHR 모델간 차이가 없었으며, 지질 성분에서도 두 모델간 측정치들에서 통계적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다(Table I). BSP를 처리한 후에도 두 모델 간 그리고 대조군과 실험군간 측정치들에서 유의한 차이가 없었다. 이는 BSP 처리기간을 포함한 19주령의 모델에서는 간장내 활성 정도와 혈중 지질 및 콜레스테롤 농도에 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 그러나, 우리의 이전 실험에서는 고지방 식이로 유발된 모델에서 BSP가 처리가 혈중 중성지방을 감소시키는 유의한 효과가 있었으며,²³⁾ 이는 모델의 차이 또는 처리 농도 및 시간 등이 차이가 있으므로 직접적인 비교는 어려울 것이다.

체중, 심장무게 및 평균 혈압

BSP 처리 시간을 포함하여 19주된 상태에서 Wistar와 SHR 모델의 체중의 감소는 주로 대조군인 Wistar에서만 관찰되고 Wistar보다 유의하게 적은 체중의 SHR(340±13.8 vs 408.0±9.8 g, $p<0.001$)에서는 4주간의 BSP 효과가 없었다(Fig. 4A). 이미 BSP의 항비만 효과는 입증되었으며,²³⁾ AMPK와 같은 주요한 활성 기전도 입증된 바 있다. 특히, 심장의 무게에서 매우 흥미로운 결과를 확인할 수 있는데, SHR에서 체중대비 심장의 무게는 Wistar에 비하여 유의한 차이로 크고, 이는 SHR 모델의 심장에서 잘 알려진 hypertrophy 결과이다.³²⁾ 특히 BSP의 처리가 SHR에서 이 비율을 통계적으로 유의하게 감소시킬 수 있었다(0.39±0.02 vs 0.34±0.03, $p<0.05$)(Fig. 4B). 이는 BSP의 anti-hypertrophy의 효과를 의미하므로 새로운 BSP의 효과로 평가될 수 있다. 전술한 것과 같이 BSP는 근육세포와 간장 세포 등에서 AMPK의 활성화물질을 확인되었는데,²³⁾ hypertrophy 조절 기전에 중심 경로인 AMPK-mTOR/p70S6K의 기전이 BSP에 중요한 표적이 될 수 있을 것이므로 계속 연구를 진행할 것이다.

평균혈압을 측정하기 위한 대퇴부 동맥내 카테터 삽입은 SHR 모델에서만 수행하였다. 4주간의 BSP 처리는 SHR의 평균혈압을 통계적으로 유의하게 감소시켰으며(218.6±6.99 vs 190.0±3.42 mmHg, $p<0.05$), 카테터를 통하여 labetalol(5 mg/kg)이 주입된 대조군과도 비교될 수 있었다(Fig. 4C). 이와 같은 BSP

Table I – Effects of BSP for 4 weeks on plasma biochemical parameters in Wistar and SHR models

	Wistar	Wistar-BSP		SHR	SHR-BSP	
ALT (U/l)	67.75±20.45	53.25±23.19	$p>0.05$	64.75±9.91	56.20±13.14	$p>0.05$
AST (U/l)	110.0±21.80	139.8±77.24	$p>0.05$	124.3±13.10	124.6±42.93	$p>0.05$
Total cholesterol (mg/dl)	83.25±5.32	72.75±12.45	$p>0.05$	71.0±1.41	75.40±3.78	$p>0.05$
TG (mg/dl)	32.25±7.68	32.0±11.37	$p>0.05$	42.25±10.87	55.20±8.86	$p>0.05$
HDL (mg/dl)	79.00±9.38	65.75±11.44	$p>0.05$	69.00±3.74	67.80±6.76	$p>0.05$
LDL (mg/dl)	10.50±0.58	8±0.23	$p>0.05$	9.52±0.87	11.0±2.92	$p>0.05$

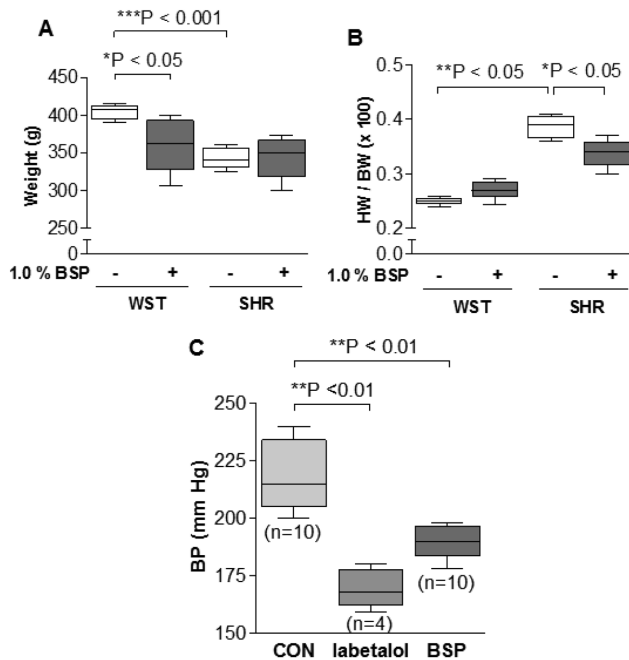


Fig. 4 – *In vivo* effects of BSP treated for 4 weeks on the mean blood pressure (BP), body weight (BW) and heart weight (HW) in Wistar and SHR models. BW was measured as gram (g) unit in Wistar (WST) and SHR groups (A). HW was also measured and noted as the 100-times higher ratio values of HW (g) to BW (g) (B). Mean BP was measured as mean arterial pressure by using femoral arterial catheter for 30 min under allowed to roam freely in the cage (C). The positive control values were compared with those of labetalol-treated group (single i.v. injection of 5 mg/ml). Data are median values with 95% CI. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to BSP-free control groups of Wistar or SHR.

의 항고혈압의 효과가 HO-1의 활성화 때문인지는 정확히 알 수 없으나, 이전의 HO-1과 AMPK와 같은 효소계 활성화 효과에 대한 다양한 보고들에 의하면 충분한 연관성이 있을 것으로 본다.^{12,13,15,29,30} 본 연구에서는 제시하지 않았으나 HUVECs에서 BSP가 HO-1 뿐 아니라 AMPK 활성을 촉진하는 결과는 확인되었으므로(미보고 결과) 보다 정확한 항고혈압 효과에 대한 작용 기전이 구명될 것이다.

또한 (주)농심에서 개발한 새로운 BSP는 isoflavone-free한 상 태이면서 분자량이 10 kDa 이하의 작은 크기의 펩타이드이다.²² 더욱이 hepta-펩타이드(IPPGVPY)가 약 50 $\mu\text{g/g}$ 의 농도로 포함된 활성화 펩타이드를 혈청내에서 측정할 바 있으므로 이 후에 연구되는 활성화 펩타이드의 약동학적인 혈중 농도 측정도 가능할 것이다.

결 론

본 연구에서는 (주)농심에서 개발한 isoflavone-free한 BSP가 혈관내피세포에서 세포독성 없이 HO-1 유전자발현을 유도함을

확인하고, HO-1 활성을 이용한 항고혈압 효과를 고혈압 동물모델에서 입증하였다. HUVECs에서 확인된 HO-1의 유도 발현과 활성화, 그리고 cGMP의 높은 세포내 농도의 결과들은 항고혈압효과를 기대할 수 있는 경로이므로 BSP의 항고혈압 효과에 대한 가능한 기전으로 제시하였다. 특히, BSP를 처리한 HUVECs에서 HO 생화학적 활성화보다 크게 차이가 있는 높은 cGMP의 농도는 HO-1 이외의 다른 신호전달 경로, 예를 들면 AMPK-eNOS/NO의 활성화 기전의 매개도 배제할 수 없었다. 우리는 BSP의 항고혈압 효과 뿐 아니라 추가적인 실험에서 anti-hypertrophy 효과 및 기전도 규명할 것이다. 따라서 BSP의 개선효과 및 작용기전을 고려하면 고혈압, 당뇨병, 비만 등과 같은 대사질환이 가장 중요한 BSP의 표적이 될 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 (주)농심의 연구지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Redon, J., Cifkova, R., Laurent, S., Nilsson, P., Narkiewicz, K., Erdine, S. and Mancia, G. : Mechanisms of hypertension in the cardiometabolic syndrome. *J. Hypertens.* **27**, 441 (2009).
- Bornstein, N., Silvestrelli, G., Caso, V. and Parnetti, L. : Arterial hypertension and stroke prevention: an update. *Clin. Exp. Hypertens.* **28**, 317 (2006).
- Birkenhäger, W. H. and Staessen, J. A. : Progress in cardiovascular diseases: cognitive function in essential hypertension. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **49**, 1 (2006).
- Blacher, J., Baes, M., Marchal, A., Younes, W., Legedz, L. and Safar, M. : New treatment strategies for hypertension. Which guidelines and how to apply them. *Presse. Med.* **34**, 1279 (2005).
- Panza, J. A., Casino, P. R., Badar, D. M. and Quyyumi, A. A. : Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. *Circulation.* **87**, 1475 (1993).
- Cai, H. and Harrison, D. G. : Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* **87**, 840 (2000).
- Biswas, S. K. and de Faria, J. B. : Which comes first: renal inflammation or oxidative stress in spontaneously hypertensive rats? *Free. Radic. Res.* **41**, 216 (2007).
- Miyagawa, K., Ohashi, M., Yamashita, S., Kojima, M., Sato, K., Ueda, R. and Dohi, Y. : Increased oxidative stress impairs endothelial modulation of contractions in arteries from

- spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* **25**, 415 (2007).
- 9) Sanchez, M., Galisteo, M., Vera, R., Villar, I. C., Zarzuelo, A., Tamargo, J., Perez-Vizcaino, F. and Duarte, J. : Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* **24**, 75 (2006).
 - 10) Duarte, J., Perez-Palencia, R., Vargas, F., Ocete, M. A., Perez-Vizcaino, F., Zarzuelo, A. and Tamargo, J. : Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* **133**, 117 (2001).
 - 11) Aoi, W., Niisato, N., Miyazaki, H. and Marunaka, Y. : Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 892 (2004).
 - 12) Brune, B. and Ullrich, V. : Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol. Pharmacol.* **32**, 497 (1987).
 - 13) Johnson, R. A., Colombari, E., Colombari, D. S., Lavesa, M., Talman, W. T. and Nasjletti, A. : Role of endogenous carbon monoxide in central regulation of arterial pressure. *Hypertension.* **30**, 962 (1997).
 - 14) Ryter, S. W. and Choi, A. M. : Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress. *Antioxid. Redox. Signal.* **4**, 625 (2002).
 - 15) Abraham, N. G. and Kappas, A. : Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free. Radic. Biol. Med.* **39**, 1 (2005).
 - 16) Kim, H. P., Ryter, S. W. and Choi, A. M. : CO as a cellular signaling molecule. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **46**, 411 (2006).
 - 17) Morita, T. : Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1786 (2005).
 - 18) Ndisang, J. F., Zhao, W. and Wang, R. : Selective regulation of blood pressure by heme oxygenase-1 in hypertension. *Hypertension.* **40**, 315 (2002).
 - 19) Elmarakby, A. A., Faulkner, J., Posey, S. P. and Sullivan, J. C. : Induction of hemeoxygenase-1 attenuates the hypertension and renal inflammation in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol. Res.* **62**, 400 (2010).
 - 20) Turkseven, S., Kruger, A., Mingone, C. J., Kaminski, P., Inaba, M., Rodella, L. F., Ikehara, S., Wolin, M. S. and Abraham, N. G. : Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes. *AM. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **289**, H701 (2005).
 - 21) Ndisang, J. F., Tabien, H. E. and Wang, R. : Carbon monoxide and hypertension. *J. Hypertens.* **22**, 1057 (2004).
 - 22) Rho, S. J., Park, S., Ahn, C. W., Shin, J. K. and Lee, H. G. : Dietetic and hypocholesterolaemic action of black soy peptide in dietary obese rats. *J. Sci. Food. Agric.* **87**, 908 (2007).
 - 23) Jang, E. H., Moon, J. S., Ko, J. H., Ahn, C. W., Lee, H. H., Shin, J. K., Park, C. S. and Kang, J. H. : Novel black soy peptides with antiobesity effects: activation of leptin-like signaling and AMP-activated protein kinase. *Int. J. Obes.* **32**, 1161 (2008).
 - 24) Jang, E. H., Ko, J. H., Ahn, C. W., Lee, H. H., Shin, J. K., Chang, S. J., Park, C. S. and Kang, J. H. : *In vivo* and *in vitro* application of black soybean peptides in the amelioration of endoplasmic reticulum stress and improvement of insulin resistance. *Life Sci.* **86**, 267 (2010).
 - 25) Kim, K. H., Jin, L. H., Choo G. Y., Lee, H. J., Choi, B. H., Kwak J., Yoon S. M., Park, C. S. and Lee, T. : Nonselective blocking of the sympathetic nervous system decreases detrusor overactivity in spontaneously hypertensive rats. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 5048 (2012).
 - 26) Gewaltig, M. T. and Kojda, G. : Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc. Res.* **55**, 250 (2002).
 - 27) Yetik-Anacak, G. and Catravas, J. D. : Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul. Pharmacol.* **45**, 268 (2006).
 - 28) Ryter, S. W., Alam, J. and Choi, A. M. : Heme oxygenase-1/ carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev.* **86**, 583 (2006).
 - 29) Morrow, V. A., Foufelle, F., Connell, J. M., Petrie, J. R., Gould, G. W. and Salt, I. P. : Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 31629 (2003).
 - 30) Ford, R. J., Teschke, S. R., Reid, E. B., Durham, K. K., Kroetsch, J. T. and Rush, J. W. : AMP-activated protein kinase activator AICAR acutely lowers blood pressure and relaxes isolated resistance arteries of hypertensive rats. *J. Hypertens.* **30**, 725 (2012).
 - 31) Huo, Y., Qiu, W. Y., Pan, Q., Yao, Y. F., Xing, K. and Lou, M. F. : Reactive oxygen species (ROS) are essential mediators in epidermal growth factor (EGF)-stimulated corneal epithelial cell proliferation, adhesion, migration, and wound healing. *Exp. Eye. Res.* **89**, 876 (2009).
 - 32) Thandapilly, S. J., Louis, X. L., Yang, T., Stringer, D. M., Yu, L., Zhang, S., Wigle, J., Kardami, E., Zahradka, P., Taylor, C., Anderson, H. D. and Netticadan T. : Resveratrol prevents norepinephrine induced hypertrophy in adult rat cardiomyocytes, by activating NO-AMPK pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **669**, 217 (2011).