

Effect of Fermented Garlic Extract on Adhesion of THP-1 Cells to Bovine Aortic Endothelial Cells

Ohseong Kwon¹, Jina Song¹, Heui Jong Yu² and Heonyong Park^{1*}

¹Department of Molecular Biology & Institute of Nanosensor and Biotechnology, Dankook University, 119 Dandae-ro, Dongnam-gu, Cheonan-si, Chungnam 31116, Korea

²Health Food R&D Center, Bioland, 152, Manhae-ro, Danwon-gu, Ansan-si, Gyeonggi-do 15407, Korea

Received December 23, 2016 / Revised March 9, 2017 / Accepted March 9, 2017

Fermented garlic extract (FGE) is a well-known functional food containing cycloalliin. Here we tested if FGE has an effect on the vascular system. We found that FGE had an effect on monocytic adhesion to endothelial cells, which occurs at the initial step of processes of inflammation. From dose-dependent experiments, 0.1 to 1 µg/ml of FGE appeared to inhibit lipopolysaccharide (LPS)-enhanced heterotypic cell adhesion between THP-1 and BAECs. This result indicates that FGE blocks vascular inflammation. Then we found that FGE activates eNOS and Akt in BAECs. The phosphorylation of eNOS was maximally elevated 10 min after FGE treatment. Parallely, the phosphorylation of Akt was also maximally increased 10 min after FGE treatment. Consistently, it was found that FGE enhanced the production of nitric oxide. We then examined whether NO mediates THP-1 cell adhesion to BAECs. Both Akt and eNOS inhibitors appeared to reverse an inhibitory effect of FGE. These findings indicate that FGE inhibits LPS-enhanced heterotypic cell adhesion via Akt and eNOS. In conclusion, FGE plays an important role in prevention of inflammatory diseases.

Key words : Akt, cell adhesion, eNOS, fermented garlic extract, nitric oxide

서 론

마늘(*Allium sativum*)은 전 세계적으로 향신료 등의 식용뿐만 아니라 한방의학의 약재로 까지 널리 이용된 한방 의약품 중 하나이다[9]. 오랫동안 많은 연구자들이 효능을 알기 위한 많은 연구를 통하여 마늘은 항죽상경화증, 항당뇨병, 항돌연변이성, 항암 및 면역 활동 등을 높이며 항균 성분으로서의 수많은 치료 효능 등이 보고 되었다[2]. 또한 마늘은 발효하여 실생활에서 많이 이용되고 있는데, 발효마늘의 생리적인 효과도 현재 많이 밝혀져 있는 상태이다. 마늘의 효능과 비슷하게도 발효마늘은 관상 동맥경화, 혈중 콜레스테롤 수치 등을 감소시키는 것과 혈관 산화도를 낮추는 심혈관 보호 기능을 가진다고 알려져 있다[10]. 또 다른 보고에 의하면, 발효마늘이 관상 동맥 질환이 있는 환자의 동맥이 석회화 되는 것을 억제한다고도 알려졌다[20]. 그러나 발효마늘의 혈관 기능에 관한 분자적 기전에 대한 이해는 아직 미미하여 더 많은 연구가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 발효마늘의 혈관기능에 관한 분자적 기전을 이해하기 위한 일련의 실험을 수행코자 하였다. 심혈관계의 분자적 기전을 이해하려면 혈관에 존재하는 내피세포를 분리 및 배양한 후 내피세포에 발효마늘 추출물을 처리하였을 때 일어나는 내피세포의 다양한 변화를 관찰하는 것이 분자적 기전을 이해하는 데에 도움을 준다. 그 이유는 내피세포는 심혈관계의 생리적 변화를 세포 신호전달을 통하여 감지하고 반응하는 세포이기 때문이다. 내피세포가 이와 같이 혈관 변화를 감지할 수 있는 이유 중의 하나는 혈관의 내강과 직접 접촉하면서, 혈관의 가장 안쪽에 위치해 있기 때문에 혈액과 직접적으로 맞닿는 부분이기 때문이다. 일례로 내피세포는 혈관의 병리적인 현상의 하나인 동맥경화 발생의 초기 단계에 민감하게 반응한다. 동맥경화는 혈관에서 발생하는 질환으로 혈관의 염증 반응에 의해서 진행되는데, 이러한 죽상 동맥경화의 초기단계에서는 혈액에서 순환하고 있는 혈구세포와 내피세포의 부착이 일어난다. 이러한 현상을 이용하여 항염증 정도를 파악하기 위해 백혈구의 내피세포 부착 정도를 측정하여 염증에 관한 효능을 평가 할 수 있다. 이 과정은 주로 혈관 내피세포에서 여러 염증성 자극에 반응하여 순환하는 백혈구 내에 발현되는 부착분자들과 내피세포의 부착분자에 의해 매개된다고 알려져 있다[1, 4]. 염증 반응이 오랫동안 지속되는 경우에 동맥경화 반(atherosclerotic plaque)이 형성되면 혈류가 차단되어 협심증, 심근경색, 심부전 등 다른 질병으로 이어질 위험이 크다[5, 12, 17]. 이러한 사실들을 근거해 보면, 내피세포는 생리학적으로 뿐만 아니라 병리학적으로도

*Corresponding author

Tel : +82-41-550-3489, Fax : +82-41-559-7941

E-mail : heonyong@dankook.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

매우 중요한 혈관기능을 조절하는 혈관 부위이다.

발효마늘추출물이 일으키는 내피세포의 생리적 변화에 관한 분자적 기전을 알아보기 위하여 본 연구에서는 발효마늘추출물을 처리하였을 때 변화하는 다양한 내피세포의 신호전달물질의 활성의 변화를 western blot을 통해 확인하였다. 세포 신호전달은 eNOS의 활성을 조절하는 신호전달 경로를 표적으로 실험을 진행하였다. eNOS는 산화질소를 합성하는 내피세포 효소로 알려져 있는데, eNOS에 의해 합성된 산화질소는 혈관 기능을 조절하는데 매우 중요한 가스호르몬으로 알려져 있다. 산화질소는 매우 적은 양으로도 확산과 반응이 빠른 혈관 확장제로 작용하며, 단핵구의 혈관 부착, 혈소판 응집, 평활근 세포의 증식을 억제하는 등 혈관의 기능을 강화시키는 특징이 있기 때문에 일차적인 표적 신호전달 물질이다. 이러한 산화질소가 혈관에서 결핍되면 혈구 세포의 침윤, 혈전증, 동맥경화 반 형성 등의 병리적 현상이 야기된다[12, 14, 18]. 본 연구에서 이와 연계되는 내피세포의 생리적 특성 변화를 관찰하였는데, 이는 세포 성장, 세포 이동 및 단핵구의 내피세포 부착 등이다. 종합해서 요약하면 본 연구에서는 혈관 내피세포 내의 산화질소 생성이 발효마늘추출물에 의하여 조절되는지 여부를 확인하였으며, 그에 관여하는 신호전달 경로를 조사하였다. 또한 변화하는 산화질소의 양이 어떤 혈관기능에 어떻게 작용하는지 조사하였다.

재료 및 방법

재료

발효마늘추출물의 제조방법

본 실험에서 사용한 유산균발효 마늘추출물은 경남 가월영농조합에서 생산한 창녕산 마늘을 구입하여 다음과 같이 조제하였다. 마늘 5 kg과 증류수 10 kg을 발효조(MJS U3, Marubishi, Tokyo, Japan)에서 혼합, 교반하면서 121°C에서 1시간 동안 멸균하였다. 37°C로 냉각한 후 *Lactobacillus plantarum* BL2 종균배양액 200 mL를 접종, 2일간 배양하였다. 배양 종료 후 50°C에서 24시간 동안 숙성 과정을 거친 다음, 멸균, 여과 및 농축하여 발효마늘추출물로 사용하였다. 발효마늘 추출물의 지표물질은 기존의 연구 결과에 의하여 황화합물 중 가장 많은 함량으로 포함된 cycloalliin으로 결정하였다[8]. Cycloalliin의 함량은 HPLC (Alliance HPLC, Waters Co., Milford, MA, USA)를 활용한 Ichikawa 등의 분석법을 변형하여 분석하였다[8].

세포배양

소 대동맥 내피세포인 BAEC (bovine aortic endothelial cell)은 세포 외 기질에 부착하여 성장하는 세포(adhesive cell)이다. 이 세포는 소의 대동맥에서 추출하여 사용되는데, 계대수가 8에서 12 사이의 일차세포를 실험에 사용하였다. BAEC은 20% 소태아혈청(fetal bovine serum (FBS), Welgene,

Seoul, Korea)과 항생제(50 µg/ml penicillin/streptomycin)가 포함된 DMEM (glucose 1 g/l, Welgene)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 또한 세포 부착 실험에 사용된 THP-1은 부유하여 자라는 부유세포(suspension cell)로 배양의 조건은 BAEC과는 다르게 RPMI1640 (Welgene)를 이용하여 10% 소태아혈청과 0.5% 항생제를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포성장 실험

세포성장은 cell viability assay kit (Daeillab Service Co., LTD, Seoul, Korea)를 이용하여 평가하였다. 전면 성장한 BAEC을 최소 12시간 동안 혈청기아 시킨 후, 다양한 농도의 발효마늘추출물을 처리하여 0-24 시간 동안 배양하였다. 그 후 PBS (phosphate buffered saline)로 2 회 세척하여 WST reagent와 반응시켜 세포성장 비율을 결정하였다.

세포이동 실험

전면 성장한 BAEC에 2 mM thymidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 혈청기아상태에서 24 시간 동안 처리하여 세포의 성장을 중지시킨 뒤 PBS (phosphate buffered saline)로 2 회 세척하였다. 그 후 scarper 칼라기를 이용하여 창상선을 만든 후 다시 PBS로 2회 세척하고 유산균발효마늘추출액 100 ng/ml와 µg/ml를 0~24시간 동안 처리하였다. 처리 시간에 따른 세포의 이동을 관찰하였으며, 창상선을 기준으로 이동한 세포 수를 계산하여 비교하였다.

세포부착 실험

실험에 앞서 BAEC을 전면 성장시켜 놓은 뒤 혈청기아배지를 이용하여 16시간 동안 추가로 배양 해 놓았다. 다음으로 조건에 맞게 유산균발효마늘추출물과 각종 시약을 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 12시간 추가로 배양 하였다. BAEC을 배양 하는 동안 부유세포인 THP-1 세포에 Calcein AM (Enzo life science)을 2 µg이 되게 넣어 주고 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 45분 동안 염색 시켰다. 그 후 원심분리기를 통해 형광 염색된 THP-1만을 확보하여 PBS로 2회 세척 해주었다. 그 후 조건 별로 전면 성장시켜 놓은 BAEC 위에 동량으로 첨가하여 부착된 THP-1 세포의 수를 관찰하였다. 관찰 후 부착된 세포와 전체 세포의 비율을 계산하여 정량화 하였다.

Western Blot

각 조건 별로 전처리 된 BAEC을 분해완충액(150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)으로 하였다. 그 후 원심분리기를 이용하여 상층액을 획득하였다. 분리된 상층액을 가지고 SMART™ BCA Protein Assay Kit (iNtRON, Korea)를 이용해 세포 분해액의 단백질을 정량하였으며 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)에 loading하여 분리시켰다. 분리된 단백

질을 polyvinylidene fluoride (PVDF) 막(Millipore, Billerica, MA, USA)으로 전달시킨 후, 분석하고자 하는 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체는 p-Akt (Cell Signaling), Akt (Cell Signaling), p-eNOS (Cell Signaling), eNOS (Cell Signaling), actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., USA)을 표적으로 하는 항체를 사용하였다. 1차 항체의 반응이 끝난 후 PBS로 3회 washing 해 준 뒤 2차 항체와 연속적으로 반응시켜주었다. 이후, 이를 화학발광 검출법을 통해 X-선 필름에 감광시켜 단백질을 검출하였다.

산화질소(NO) 측정

35mm 배양접시에 분주된 BAEC을 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양 시켜 놓은 뒤 혈청기아배지로 16 시간 동안 추가 배양하였다. 그 후 원하는 조건에 맞는 유산균발효마늘추출액을 처리 해 준 후 12시간 동안 배양하였다. 그 후 HEPES 완충액(5 mM HEPES, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7.4)으로 2 회 세척하였다. 그 후 10 µg의 DAF-2 DA (diaminofluorescein diacetate)을 30분간 37°C, 5% CO₂ 조건에서 반응 시킨 후 세포를 수확하여 초음파파쇄로 분해한 후 세포 분해액을 원심분리기를 하여 13,000 rpm의 빠르기로 10분 동안 원심분리 하여 상층액을 분획하였다. 그 후 형광분석계(Spectrofluorophotometer RF-5301 PC, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 형광스펙트럼(Ex : 495 nm, Em : 515 nm, Slit : 10 nm)을 측정하여 분석하였다.

통계분석

실험결과는 mean ± S.E.로 나타내었고 분석된 데이터는 실험자료로부터 one-way ANOVA를 이용하여 유의성이 있을 경우 post-hoc test (Dunnett test)를 통해 95% 수준에서 유의성을 검증하였다.

결 과

단핵구의 내피세포 부착에 미치는 발효마늘추출물의 영향에 관한 실험결과

지표성분인 cycloalliin의 함량분석은 발효마늘추출물을

TSKgel amide column (4.5×250 mm, 5 µm)에서 분리한 후, 210 nm에서 흡광도 검출을 하는 크로마토그래피를 수행하여 지표물질을 분석하였다(Fig. 1). 본 실험에 사용된 발효마늘추출물의 cycloalliin 함량은 5.10±0.08 mg/g이다. 다음으로 이와 같이 확보한 발효마늘추출물이 내피세포에 어떤 영향을 미치는 지 알아보기 위하여 다양한 실험들을 진행하였다. 발효마늘추출물이 세포의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 Fig. 2의 실험을 진행하였다. 실험을 위해 내피세포를 혈청기아 시킨 뒤 발효마늘추출물을 100 ng/ml, 1 µm/ml 농도로 처리하였다. 그 후 cell viability assay kit를 이용하여 분석한 결과 발효마늘추출물이 세포의 성장에는 큰 영향을 미치지 못하였다. 다음으로 내피세포의 이동에 미치는 발효마늘의 효과를 관찰하였다. 내피세포의 이동은 상처 치유의 과정과 혈관을 형성하는 과정 중에 일어나는 단계다. 이러한 사실을 바탕으로 발효마늘추출물을 처리하였을 때 세포이동에 어떠한 영향이 있는지 알아보았다(Fig. 2B, Fig. 2C). 실험을 위해 내피세포에 창상선을 만들어 준 뒤 발효마늘추출물을 Fig. 2A에 처리한 농도와 동일하게 100 ng/ml, 1 µm/ml 로 처리하여 주었다. Fig. 2B에서의 사진은 이동한 세포를 촬영한 것이다. 이동한 세포 수를 바탕으로 Fig. 2C에 그래프로 나타내었다. Fig. 2C에서 보는 바와 같이 발효마늘추출물의 농도에 관계없이 세포이동에는 발효마늘추출물이 아무런 영향을 나타내지 않음을 알 수 있다. 또한 혈관내피세포의 염증 반응에 발효마늘추출물이 어떻게 관여하는지 알아보기 위하여 발효마늘추출물을 혈관내피세포에 처리한 후 단핵구 부착 정도의 변화를 관찰 하였다(Fig. 2D). 먼저 내피세포를 혈청기아 시킨 후 마늘의 효과를 보기 위하여 LPS (Lipopolysaccharide)를 처리해 주었다. LPS는 그람 음성균의 외막에 존재하는 성분으로 항원으로 인식되어 염증반응을 유도한다[16]. 자극을 유도하지 않은 상태와 유도한 상태에서 발효마늘추출물을 처리하여 나타나는 변화를 관찰하였다. Fig. 2E는 Fig. 2D에서 진행 한 실험의 세포 수를 세어 백분율로 나타낸 그래프이다. Fig. 2D를 보면 자극이 유도되지 않았을 때 발효마늘추출물이 나타내는 효과는 미미한 것을 볼 수 있다. 하지만 LPS에 의해 자극이 유도되었을 경우 발효마늘추출물을 처리해 주게 되면 부착되는 단핵구의 수가 확연히 감소하는 것을 볼 수 있으며, 이는 발효마늘추출물이 염증 반응에 어느 정도 관여한다고 볼 수

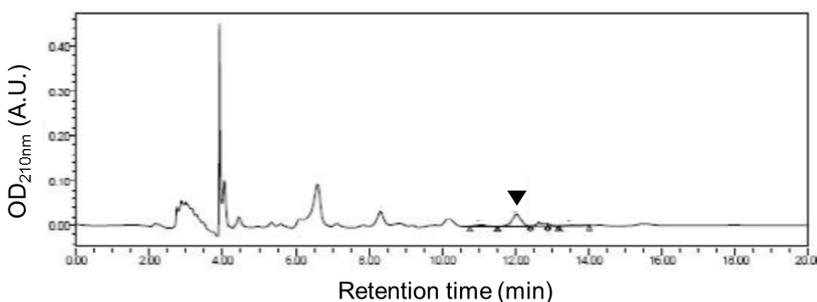


Fig. 1. HPLC chromatogram to determine the amount of cycloalliin in fermented garlic extract. This is a representative chromatogram for resolving fermented garlic extract. The arrow head indicates a cycloalliin peak at 12.02 retention time (min).

있다. 따라서 Fig. 2의 결과를 토대로 발효마늘추출물은 세포 성장과 세포이동에는 효과를 나타내지 못했지만, 단핵구 부착을 통해 일어나는 염증 반응에는 발효마늘추출물이 억제효과가 있음을 알 수 있었다.

혈관 내피세포의 신호전달 물질의 활성화에 영향을 미치는 발효마늘추출물의 효과에 관한 실험결과

발효마늘추출물을 시간과 농도 별로 달리 처리 하였을 경우 변화하는 신호전달물질들의 활성을 관찰하였다(Fig. 3). 실험에서 알아본 신호전달물질은 eNOS (endothelial nitric oxide synthase)와 Akt이다. eNOS는 혈관의 생리적 기능 유지에 중요한 산화질소를 생성하는 효소로 알려져 있으며, Akt는 세포 성장에 관여하는 신호전달물질이다[3, 13]. Fig. 3A는 발효마늘추출물 처리 시간에 따라 변화하는 신호전달물질의 활성을 western blot으로 관찰한 결과와 그 결과를 정량화하여 그래프로 나타낸 그림이다. 실험에 사용된 발효마늘추출물의 농도는 100 ng/ml로 처리한 뒤 5분~60분 사이의 활성 변화를 관찰하였다. eNOS와 Akt 모두 10분에서 그 발현이 최대인 것을 확인 할 수 있었다. 다음으로 Fig. 3B에서 보는 바와 같이 발효

마늘추출물을 농도별로 처리하여 신호전달물질의 활성 변화를 관찰한 실험결과, eNOS와 Akt의 활성은 0.1 µg/ml일 때 가장 높은 것으로 확인 되었다. 이를 바탕으로 발효마늘추출물이 혈관내피세포에 가장 효율적으로 영향을 미치는 시간은 처리 후 10분이며 그 농도는 0.1 µg/ml일 때 인 것을 알 수 있었다.

발효마늘추출물에 의해 생성되는 산화질소 변화량 측정 실험결과

Fig. 3의 결과와 같이 eNOS의 발현이 발효마늘추출물을 처리해 줘에 따라 증가하는 것을 보고 산화질소의 양에는 어떠한 변화가 있는지 알아보기위한 실험을 진행하였다. 산화질소는 신경, 혈관내피, 유도성 산화질소 합성 효소에 의해 L-arginine으로부터 합성된다. 특히 산화질소는 부착 분자와 chemokine의 발현을 조절함으로써 혈관내피세포에 대한 백혈구의 부착을 조절한다고 알려져 있다[13]. 이러한 사실을 바탕으로 혈관내피세포에 발효마늘추출액을 0.1 µg/ml 처리 한 후 시간에 따른 산화질소의 양을 측정하였다. 세포 내 산화질소양의 변화를 측정한 결과 10분에서 가장 많은 양의 산화질소를 관

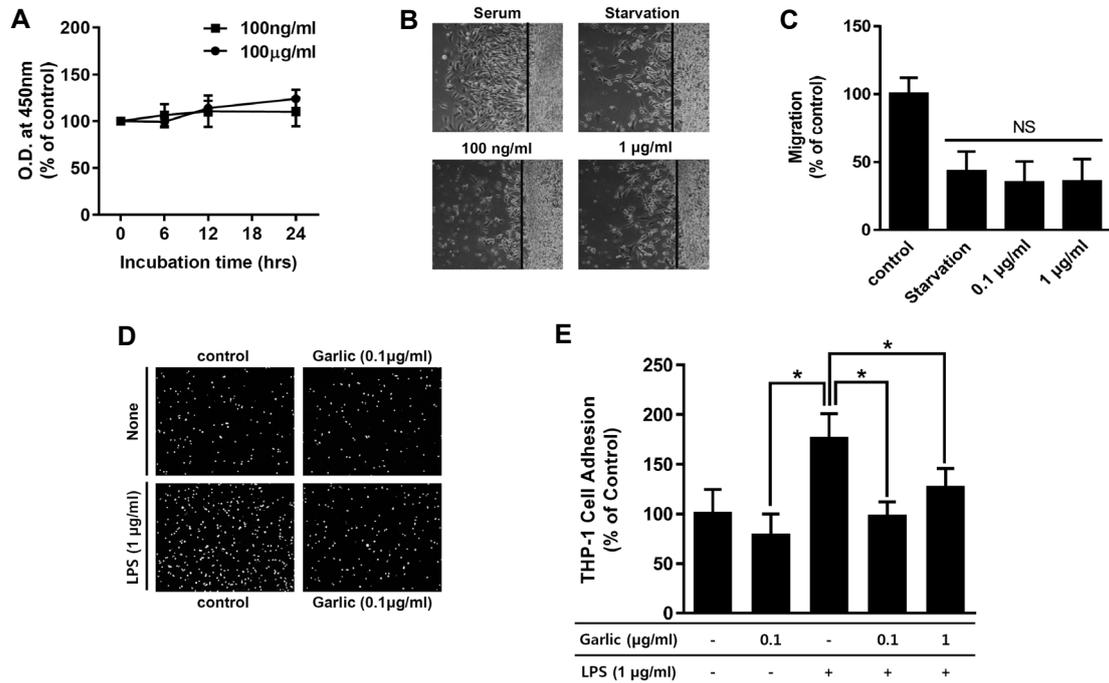


Fig. 2. Fermented garlic extract inhibits lipopolysaccharide-induced heterotypic adhesion between BAECs and THP-1 cells. (A) BAECs were serum-starved for at least 12 hr and treated with 0.1 or 1 µg/ml fermented garlic extract (FGE). Then cell proliferation was detected by using WST-1 reagent. (B) FGE had no effect on cell migration. Serum-depleted BAECs were scraped immediately after treating cells with indicated concentrations of FGE. Then cells were additionally incubated for 24 hr and observed under a microscope. (C) Cell migration was quantified by counting migrated cells in the same area. The bar graph represents means ± S.E. (n=3). (D) Serum-depleted BAECs were pre-treated with 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) with or without indicated concentrations of FGE for 12 hr. Then Calcein AM-stained THP-1 cells were added into BAEC culture dishes. After 1 hr incubation, non-adherent THP-1 cells were washed away with PBS. Subsequently, adherent cells were observed under fluorescent microscope. (E) Adherent THP-1 cells were counted in the same field. Bar graph represents means ± S.E. (n=3).

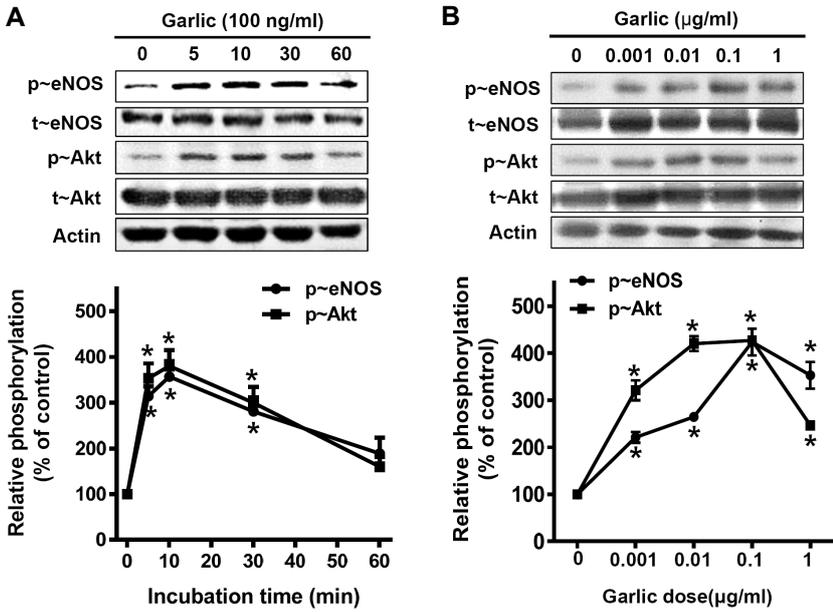


Fig. 3. Fermented garlic extract activates eNOS and Akt. (A) Serum depleted BAECs were treated with 100 ng/ml fermented garlic extract (FGE) for indicated periods of incubation time. Then cells were harvested and lysed. Proteins in the cell lysates were resolved with SDS-PAGE and immunoblotted with indicated antibodies. (B) Western blots for dose-dependent experiments. Cells were treated with FGE for 10 min.

찰됨을 알 수 있었다(Fig. 4).

산화질소에 의하여 조절되는 단핵구 부착 실험결과

산화질소가 염증 반응을 조절한다는 사실을 바탕으로 [12, 13, 20] 산화질소 생산을 억제 하였을 때 단핵구의 부착에는 어떠한 변화가 있는지 실험하였다(Fig. 5). 먼저 phosphoinositide 3-kinases를 억제하여 Akt의 억제자로 작용하는 wortmannin을 처리한 실험결과 발효마늘추출물을 처리하였을 때 나타나는 단핵구 부착의 억제효과가 wortmannin에 의해 사라짐을 알 수 있었다. 이는 Akt가 억제되면 내피세포에서는 LPS에 의해 유도된 염증 반응이 발효마늘추출물로 인해 감소

되지 않는다는 것을 알 수 있다. 즉, Akt가 발효마늘추출물의 염증억제기능에 중요한 조절 물질로 작동함을 의미한다. 또한 산화질소의 합성을 억제하는 L-NAME을 처리하였을 때에도 LPS로 유도된 단핵구의 부착을 억제하는 발효마늘추출물의 효과가 나타나지 않았다. 이는 앞서 wortmannin을 처리하고 관찰한 실험결과와 비슷하게 산화질소의 합성이 억제되면 염증 반응이 감소되지 못하여 단핵구의 부착이 증가했다고 볼 수 있다. 따라서 앞선 실험들과 비교해 보았을 때 산화질소는 혈관 내피세포의 염증 반응에 관여하며 발효마늘추출물이 이러한 산화질소의 생성에 관여하여 단핵구 부착을 차단하는 기능을 갖는다는 것을 알 수 있다.

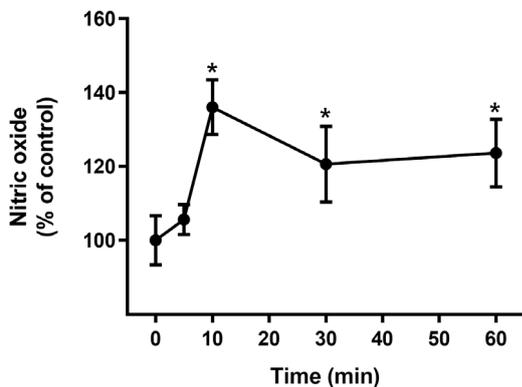


Fig. 4. Fermented garlic extract produces nitric oxide in BAECs. BAECs were incubated with 100 ng/ml fermented garlic extract (FGE) and 150 nM SNAP in HEPES for indicated periods of incubation time. Subsequently, cells were reacted with 100 nM DAF-2. Amount of nitric oxide (NO) was detected by DAF fluorescence. Data were plotted on the line graph (mean ± S.E., n=3)

고 찰

혈관 생리기능에 미치는 마늘의 효능은 오랜 기간동안 연구 되었고, 알려진 효능은 항죽상경화증, 항당뇨병, 항돌연변이성, 항암, 면역 기능 향상 및 항균 효과 등이다[2]. 이와 같은 효능을 갖는 마늘은 발효를 통해 유효성분이 증가된다. 발효시킨 마늘은 cycloalliin을 포함한 유기 황 화합물인 S-allyl cysteine (SAC), S-methyl cysteine (SMC), S-ethyl cysteine 등이 발효되지 않은 마늘에 비해 증가한 것이 보고되었다[8, 11]. 또한, 발효하지 않은 마늘에 비해 유기 황 화합물의 증가와 더불어 항산화효과도 증가하였다[11].

혈관에서 유동하는 단핵구의 혈관벽 부착은 혈관에 염증반응이 일어났음을 의미한다. 이러한 염증반응은 동맥경화 발생 초기에 주로 일어나는데, 초기 염증반응에 의해 분비되는 화학주화성물질에 의해 단핵구는 염증이 발생한 주위에 모이게 되고, 내피세포가 발현하는 세포부착 단백질에 의하여 결합한 후 내피 층 안으로 이동하여 혈관벽을 비후시킨다[15, 17]. 이

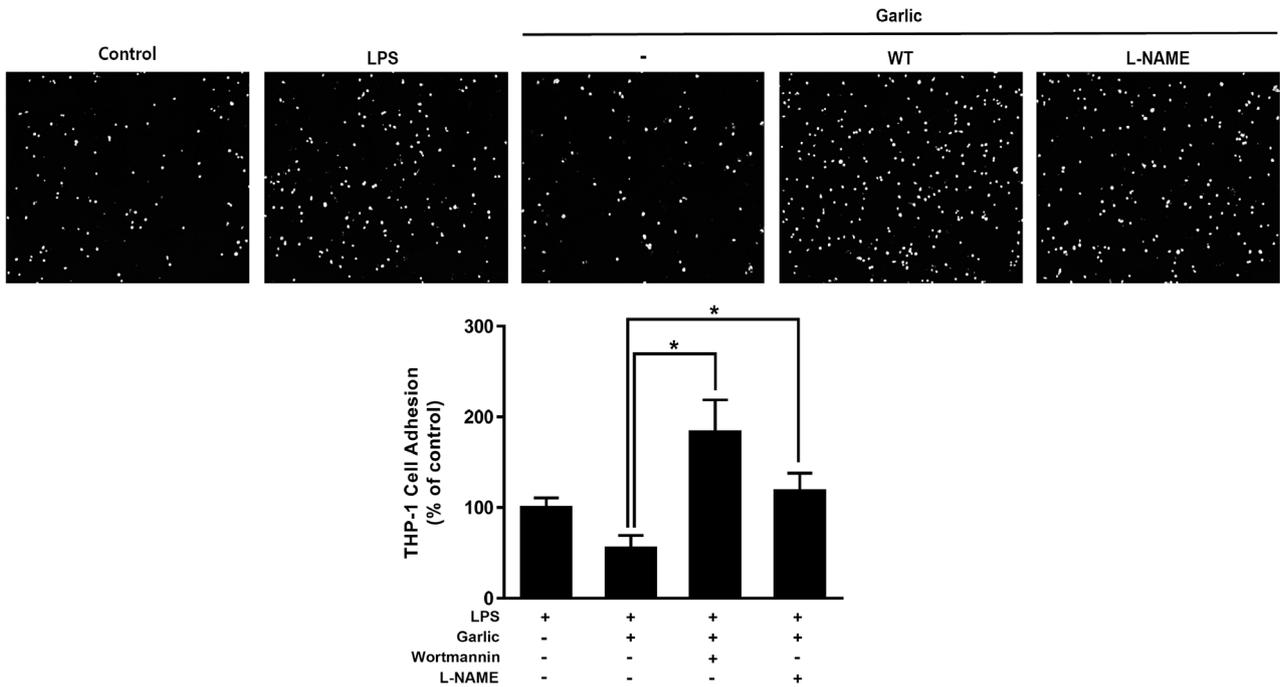


Fig. 5. Nitric oxide plays a key role in the FGE induced inhibition of heterotypic adhesion of THP-1 to BAECs. Cell adhesions were measured as shown in Fig. 1A. Top panels show adhesive THP-1 cells. Quantified data are shown in the bar graphs (bottom panel). Bar graph represents means \pm S.E. (n=3).

러한 일련의 과정 중의 하나인 단핵구의 혈관부착에 발효마늘이 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 단핵구의 내피세포 부착실험을 본 연구에서 수행하였다. LPS를 처리하여 유사 염증 현상을 유도한 뒤 발효마늘추출물을 처리한 경우와 처리하지 않은 경우의 혈관내피세포의 변화를 관찰 한 결과, 발효마늘추출물을 처리한 혈관 내피세포에는 단핵구 부착이 감소되었다. 이는 동맥경화가 유발 되었을 때 나타나는 염증반응이 발효마늘추출물에 의하여 의미있게 줄어들었다고 볼 수 있으며 발효마늘추출물은 동맥경화 발생을 억제하는데 효과가 있다고 사료된다.

혈관기능에 미치는 가스전달체인 산화질소의 역할은 매우 중요하다. 산화질소는 혈관세포의 산화와 환원, 세포 호흡 및 숙주 방어 시스템에 관여하는 매개체로 알려져 있으며, 내피세포에 의해 생성되는 산화질소는 혈관 확장에 영향을 미치는 것으로 잘 알려져 있다[7, 19]. 산화질소는 심한 운동 및 정신적 스트레스를 받는 동안에 감소되는데, 이는 관상 동맥질환을 가지고 있는 환자에게서 심근 허혈을 유발시킬 수 있다[18, 19]. 또한 산화질소의 감소는 lipoprotein 및 foam cell formation의 형성, 동맥경화 반의 전구체의 산화로 인한 혈관 염증반응을 쉽게 일으킬 수 있게 한다[19]. 따라서 산화질소는 혈관 시스템에서 일어나는 심혈관 질환을 예방하는 기능을 가지고 있다고 볼 수 있다. 혈관의 염증 반응은 혈관 질환의 초기 신호 중 하나이며 산화질소는 이를 억제하는 중요한 혈관인자 중 하나이다. 특히 산화질소는 P-selectin의 발현을 조

절하는데 P-selectin의 발현이 증가하는 원인 중 하나는 산화질소 합성 효소의 억제에 의해 산화질소의 양이 감소하는 것이다[19]. 본 실험에서 보았던 결과처럼 산화질소 생성 효소의 저해제 처리가 단핵구 부착을 증가시키는 현상도 산화질소가 혈관기능에 중요한 인자임을 보여준 것이다.

흥미롭게도 본 연구에서 사용한 발효마늘추출물에는 발효로 인해 생겨난 유효성분들이 일으킨 단핵구 부착 억제기능은 산화질소에 의해 매개 되었다. 더 구체적인 분자기전을 알기 위하여 세포신호전달 경로에 미치는 발효마늘추출물의 효과를 관찰하였다. 발효마늘추출물의 처리량 및 처리시간에 따른 세포신호전달 분자의 활성을 관찰한 결과, ERK, JNK, p38 MAP kinase의 활성은 1 ug/ml의 발효마늘추출물 처리에 의해 특별한 변화를 관찰하지 못하였다(data not shown).

반면에 Akt 및 eNOS의 인산화를 증가시켰다. Akt는 다양한 세포기능에 역할을 하면서 eNOS의 Upstream 분자로도 알려져 있다[12]. 따라서 두 세포신호전달 분자들이 발효마늘추출물에 의하여 활성화되는 현상은 발효마늘추출물이 혈관 내피세포의 산화질소 생성 유발기능을 갖고 있음을 지지해주는 결과이다. 발효마늘추출물이 산화질소 생성을 직접 유발하는지 알기 위하여 발효마늘추출물을 처리한 후 혈관 세포내의 산화질소를 측정 한 결과, 산화질소의 양이 140%까지 증가하였다(Fig. 4).

Akt와 eNOS 및 산화질소 양 증가의 상관관계를 보다 자세히 규명해 본 단핵구 부착 실험의 결과, Akt의 활성을 억제하

는 wortmannin 및 eNOS의 활성을 억제하는 L-NAME 처리군 모두에서 발효마늘추출물이 작용하는 세포부착억제 효과가 사라졌다(Fig. 5). 이와 같은 현상은 발효마늘의 단핵구 부착 억제기능은 산화질소를 통해서 일어남을 보여주는 것이다.

본 연구에서는 발효마늘추출물이 혈관 내피세포에 미치는 생리적인 기능을 알아보았으며, 그 중에도 단핵구의 혈관 부착에 미치는 발효마늘추출물의 영향을 규명하였다. 발효마늘추출물은 혈관 내피세포의 여러 변화들 중에서 산화질소의 생성을 유발하여 단핵구의 부착을 감소 시켰고, 이는 발효마늘추출물이 혈관에서 항 염증성 효과가 있음을 보여준다. 따라서 연구 결과를 토대로 발효마늘추출물은 동맥경화를 비롯한 다양한 염증 반응의 치료 및 예방에 효과가 있는 식·의약재료가 될 수 있음을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 2016년도 교육과학기술부 수도권대학 특성화사업(CKⅡ) 단국대학교 캠퍼시오 글로벌 전문인력양성 사업의 일환으로 수행되었음.

References

- Blankenberg, S., Barbaux, S. and Tiret, L. 2003. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **170**, 191-203.
- Cellini, L., Di Campli, E., Masulli, M., Di Bartolomeo, S. and Allocati, N. 1996. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**, 273-277.
- Chiu, W. C., Chiou, T. J., Chung, M. J. and Chiang, A. N. 2016. β 2-Glycoprotein I inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by suppressing the phosphorylation of extracellular signal-regulated Kinase 1/2, Akt, and endothelial nitric oxide synthase. *PLoS One* **11**, e0161950.
- Choi, K. B., Wong, F., Harlan, J. M., Chaudhary, P. M., Hood, L. and Karsan, A. 1998. Lipopolysaccharide mediates endothelial apoptosis by a FADD-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 20185-20188.
- Choi, W., Song, J., Park, M. H., Yu, H. J. and Park, H. 2016. Effect of fermented platycodon grandiflorum extract on cell proliferation and migration in bovine aortic endothelial cells. *J. Life Sci.* **26**, 59-67.
- Eelen, G., de Zeeuw, P., Simons, M. and Carmeliet, P. 2015. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circ. Res.* **116**, 1231-1244.
- Jansson, E. Å., Huang, L., Malkey, R., Govoni, M., Nihlén, C., Olsson, A., Stensdotter, M., Petersson, J., Holm, L., Weitzberg, E. and Lundberg, J. O. 2008. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 411-417.
- Jung, E. B., Choi, J. H., Yu, H. J., Kim, K. H., Lee, S. K., Hwang, Y. I. and Lee, S. H. 2013. Organosulfur compounds in fermented garlic extracts and the effects on alcohol induced cytotoxicity in CYP2E1-transfected HepG2 cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 342-347.
- Kim, H. K. 2016. Protective Effect of garlic on cellular senescence in UVB-exposed HaCaT human keratinocytes. *Nutrients* **8**, 464.
- Larijani, V. N., Ahmadi, N., Zeb, I., Khan, F., Flores, F. and Budoff, M. 2013. Beneficial effects of aged garlic extract and coenzyme Q10 on vascular elasticity and endothelial function: the FAITH randomized clinical trial. *Nutrition* **29**, 71-75.
- Lee, H. S., Lim, W. C., Lee, S. J., Lee, S. H., Lee, J. H. and Cho, H. Y. 2016. Antiobesity effect of garlic extract fermented by *Lactobacillus plantarum* BL2 in diet-induced obese mice. *J. Med. Food.* **19**, 823-829.
- Li, T., Li, D., Xu, H., Zhang, H., Tang, D. and Cao, H. 2016. Wen-Xin Decoction ameliorates vascular endothelium dysfunction via the PI3K/AKT/eNOS pathway in experimental atherosclerosis in rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **16**, 27.
- Oliveira-Paula, G. H., Lacchini, R. and Tanus-Santos, J. E. 2017. Clinical and pharmacogenetic impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on cardiovascular diseases. *Nitric Oxide* **63**, 39-51.
- Quaschnig, T., Koçak, S., Bauer, C., Neumayer, H. H., Galle, J. and Hocher, B. 2003. Increase in nitric oxide bioavailability improves endothelial function in endothelin 1 transgenic mice. *Nephrol. Dial. Transplant* **18**, 479-483.
- Seo, J. H., Kim, J. M., Ahn, S. Y., Cho, J. G., Kim, J. M. and Park, H. Y. 2009. Effect of alliin on vascular functions. *J. Life Sci.* **19**, 976-982.
- Singh, K. K., Matkar, P. N., Muhammad, S., Quan, A., Gupta, V., Teoh, H., Al-Omran, M. and Verma, S. 2016. Investigation of novel LPS-induced differentially expressed long non-coding RNAs in endothelial cells. *Mol. Cell Biochem.* **421**, 157-168.
- Sitia, S., Tomasoni, L., Atzeni, F., Ambrosio, G., Cordiano, C., Catapano, A., Tramontana, S., Perticone, F., Naccarato, P., Camici, P., Picano, E., Cortigiani, L., Bevilacqua, M., Milazzo, L., Cusi, D., Barlassina, C., Sarzi-Puttini, P. and Turiel, M. 2010. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun. Rev.* **9**, 830-834.
- Sobrevia, L., Ooi, L., Ryan, S. and Steinert, J. R. 2005. Nitric oxide: a regulator of cellular function in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 150-166.
- Tousoulis, D., Kampoli, A. M., Tentolouris Nikolaos Papageorgiou, C. and Stefanadis, C. 2012. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **10**, 4-18.
- Weiss, N., Papatheodorou, L., Morihara, N., Hilge, R. and Ide, N. 2013. Aged garlic extract restores nitric oxide bioavailability in cultured human endothelial cells even under conditions of homocysteine elevation. *J. Ethnopharmacol.* **145**, 162.
- Yao, H. W., Zhu, X. Y., Guo, X. F. and Wang, H. 2016. An amphiphilic fluorescent probe designed for extracellular visualization of nitric oxide released from living cells. *Anal. Chem.* **88**, 9014-9021.

초록 : 혈관내피세포에 부착하는 THP-1에 대한 발효마늘추출물의 효과

권오성¹ · 송지나¹ · 유휘종² · 박현웅^{1*}

(¹단국대학교 분자생물학과 / 캠퍼시오 글로벌 전문인력양성 사업단 / 나노센서바이오텍연구소, ²(주)마이오랜드 식품연구소)

마늘은 전통적으로 cycloalliin을 포함한 기능성 식품으로 널리 알려져 있다. 본 연구를 통해 혈관계에서 발효마늘추출물이 어떤 효능을 갖는지 알아보았다. 먼저, 발효마늘추출물이 내피세포의 단핵구 부착을 억제하는 것을 관찰하였다. 농도 변화에 따른 실험결과, 발효마늘추출물을 0.1 또는 1 µg/ml 농도로 전처리 하면, LPS에 의하여 촉발되는 소 대동맥 내피세포에 달라붙는 THP-1의 부착이 억제되는 것을 확인하였다. 단핵구의 내피세포 부착이 염증반응 초기단계에 진행되는 과학적 근거를 고려하면 이와 같은 결과는 발효마늘추출물이 혈관 염증을 저해한다고 볼 수 있다. 또한 세포신호전달물질의 활성변화를 관찰한 결과, 발효마늘추출물이 소 대동맥 내피세포에서 eNOS와 Akt의 활성을 유도함을 알았다. eNOS의 인산화 반응은 발효마늘추출물을 처리한지 10분 후에 최대로 상승되었으며, 이와 유사하게 Akt도 발효마늘추출물을 처리하고 10분 후에서 인산화 반응이 최대로 상승되었다. 산화질소 양 변화 측정에서도 발효마늘추출물은 산화질소의 생성을 상승시켰다. 한편, 산화질소 생성을 저해하는 억제제 처리는 발효마늘추출물에 의해 나타나는 세포부착 저해능력을 감소시켰다. eNOS와 Akt를 매개로 하는 LPS 유도 세포 부착 정도가 발효마늘추출물에 의하여 억제된다는 것은 산화질소가 세포부착에 중요 매개물임을 의미한다. 결론적으로, 발효마늘추출물은 염증관련 질환을 예방하는 데에 중요한 역할을 한다고 할 수 있다.