

# 혈관내피세포에서 TNF- $\alpha$ 로 유도되는 혈관염증에 대한 썩(*Upogebia major*) 효소가수분해물의 억제 효과

김소연 · 양지은 · 송재희<sup>1</sup> · 맹상현 · 이지현 · 윤나영\*

국립수산과학원 식품위생가공과, <sup>1</sup>서해수산연구소 갯벌연구센터

## Inhibition Effect of Enzymatic Hydrolysate from Japanese Mud Shrimp *Upogebia major* on TNF- $\alpha$ -induced Vascular Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)

So-Yeon Kim, Ji-Eun Yang, Jae-Hee Song<sup>1</sup>, Sang-Hyun Maeng, Ji-Hyun Lee and Na-Young Yoon\*

Food Safety and Processing Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

<sup>1</sup>Tidal Flat Research Center, National Institute of Fisheries Science, Gunsan 54014, Korea

Arteriosclerosis is the major cause of coronary artery and cerebrovascular disease, which are leading causes of death. Pro-inflammatory cytokines induce injury to vascular endothelial cells by increasing cell adhesion molecules, leading to vascular inflammation, a major risk factor for the development of arteriosclerosis. In the current study, we investigated the inhibitory effect of enzymatic hydrolysate from Japanese mud shrimp *Upogebia major* on the inflammation of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). We first evaluated the antioxidant and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of eight *U. major* enzymatic hydrolysates: alcalase, papain,  $\alpha$ -chymotrypsin ( $\alpha$ -Chy), trypsin, pepsin, neutrase, protamex and flavourzyme. Of these,  $\alpha$ -Chy exhibited potent antioxidant and ACE inhibitory activities. The  $\alpha$ -Chy hydrolysate was fractionated by two ultrafiltration membranes of 3 and 10 kDa. The  $\alpha$ -Chy hydrolysate of *U. major* and its molecular weight cut-off fractions resulted in a significant reduction in NO production and a decrease in cell adhesion molecules [vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and endothelial-selectin (E-selectin)] and pro-inflammatory cytokines [interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)] in TNF- $\alpha$ -stimulated HUVECs. These results suggest that enzymatic hydrolysate from *U. major* can be used in the control and prevention of vascular inflammation and arteriosclerosis.

Key words: *Upogebia major*, Enzymatic hydrolysate, Atherosclerosis, HUVEC, TNF- $\alpha$

### 서론

최근 영양과잉 및 불균형, 운동부족, 스트레스 등으로 발생하는 고혈압, 고지혈증, 당뇨병과 같은 대사증후군은 죽상동맥경화증을 일으키는 주요 위험인자로, 이들 질환의 증가로 인해 유발되는 심혈관 질환으로 사망률이 증가하면서 사회적 문제로 대두되고 있다(Lee et al., 2012a). 혈관 내피세포에서 일어나는 대표적인 염증성 질환인 죽상동맥경화증은 혈관이나 혈관벽 내 염증 생성으로 염증성 사이토카인의 자극에 의해 혈류 중 단핵세포 또는 거식세포가 혈관내피세포에 부착하게 되면서 시작된다(Packard and Libby, 2008). 혈관의 내막에 콜레스테롤이 침착되고, 내피세포가 증식하면 죽종이 형성되는데 이는 혈관의 내강을 좁히고 혈전을 형성하며, 협심증, 심근경색, 심내막염, 부정맥 등의 심장질환을 비롯하여 뇌경색, 뇌출혈과 같은 뇌혈관질환, 그 외에도 신부전, 허혈성 사지질환과 같은 각종 합병증을 유발하기도 한다(Lee et al., 2012b; Cho et al., 2016). 이러한 심혈관계 질환과 여러가지 합병증을 유발하는 혈관성 염증을 억제할 수 있는 안전하고 효과가 좋은 혈관성 염증 억제제를 천연물로부터 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있다.

썩(*Upogebia major*)은 우리나라 서해안, 제주를 포함하는 남

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0127>



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.

Korean J Fish Aquat Sci 51(2) 127-134, April 2018

Received 6 February 2018; Revised 27 February 2018; Accepted 2 March 2018

\*Corresponding author: Tel: +82. 82. 51. 720. 2652 Fax: 82. 51. 720. 2669

E-mail address: 82. 51. 720. 2652

해안, 일본 오키나와를 제외한 일본 전 해역, 중국의 황해 북부와 러시아 극동지역의 블라디보스토크와 사할린 지역에 분포하며, 갯벌이나 조간대의 모래가 섞인 진흙질 바닥에 구멍을 파고 군락을 이루며 사는 쪽과의 갑각류이다. 쪽은 갑각류 특유의 맛을 내며, 우리나라, 일본, 중국을 비롯하여 베트남, 타이완 등 전세계 많은 지역에서 식용으로 이용하고 있다(Hong, 2013).

새우와 게와 같은 갑각류에는 키틴, 키토산, carotenoids 색소 등의 유용 물질을 다량 함유하고 있으며, 이들 물질은 항균, 항바이러스, 항산화, 항염증 등 다양한 생리활성이 보고되어 있다(Pan et al., 2000; Rosa and Barracco, 2010; Sindhu and Sherief, 2011; Oh and Jung, 2015). 그러나 쪽에 대한 연구는 서식환경과 생태특성에 관한 연구가 주를 이루고 있고, 쪽의 식품학적 특성이나 생리활성에 관한 연구는 보고되어 있지 않다.

본 연구에서는 쪽 효소가수분해물의 혈관성 염증 억제 효과를 평가하기 위하여, 사람 혈관 내피세포인 human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)에 종양괴사인자인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )로 염증반응을 유도하여, 쪽 효소가수분해물이 염증 유발 인자인 NO, 동맥경화를 유발하는 세포부착인자[vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and endothelial-selectin (E-selectin)]와 이들의 생성에 관여하는 염증성 사이토카인 [interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)]에 미치는 영향을 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 재료

쪽(*U. major*)은 2016년 3월에 충남보령 갯벌에서 5 kg을 채집하였으며, 세척 후 통째로 동결건조하여 분쇄한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하여 사용하였다. Alcalase<sup>®</sup> 2.4L (Alc), papain (Pa),  $\alpha$ -chymotrypsin ( $\alpha$ -Chy), trypsin (Try), pepsin (Pep), serine,  $\alpha$ -phthalaldehyde (OPA)은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, Neutrase (Neu),

Protamex (Pro), Flavourzyme (Fla)은 Novo Co. (Novozyme Laboratories, Copenhagen, Denmark)에서 구입하였다. 2, 2'-azino-bis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid] (ABTS<sup>+</sup>), potassium persulfate, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), sodium phosphate, potassium ferricyanide [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ], trichloroacetic acid (TCA), L-ascorbic acid, hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL), sodium borate, angiotensin I-converting enzyme (ACE), hydrochloric acid, pyridine, benzene sulfonyl chloride (BSC), captopril, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Griess reagent는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, iron (III) chloride ( $\text{FeCl}_3$ )는 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan), cell lysis buffer는 Cell signaling technology, Inc (Danvers, MA, USA), nitrite standard는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다. human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)과 Endothelial Growth Medium-2 (EGM<sup>TM</sup>-2 Medium)은 Lonza (Walkersville, MD, USA)에서 구입하였으며, penicillin-streptomycin solution은 Cellgro (Herndon, VA, USA), trypsin ethylenediaminetetraacetic acid (Trypsin-EDTA)는 Gibco (Grand Island, NY, USA), Cell Proliferation Reagent water-soluble tetrazolium salt (WST-1)은 Roche (Mannheim, Germany) 그리고 ELISA kit는 R&D systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 쪽 효소가수분해

쪽 동결건조물 각 10 g씩에 8개 효소(Alc, Pa,  $\alpha$ -Chy, Try, Pep, Neu, Pro, Fla)를 처리하였으며, 효소량은 쪽의 단백질 함량 대비 1%를 처리하였다. 이때 쪽의 효소가수분해물의 조단백질 함량은 41.39 g/100 g이었다(결과 미제시). 8개 효소를 이용한 쪽의 가수분해는 Table 1에 나타난 조건하에서 8시간 동안 가수분해하였다. 가수분해 후, 효소의 불활성화를 위하여  $100^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 가열하였다. 불활성화된 시료는 4,450 g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 따로 분리하였다. 상층액은 동결건조 후 사용시까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

Table 1. The conditions of enzymatic hydrolysis and degree of hydrolysis of the enzymatic hydrolysates of Japanese mud shrimp *Upogebia major*

Enzyme	Buffer	pH	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	DH <sup>1</sup> (%)
Alcalase (Alc)	0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	8.0	50	63.82 $\pm$ 0.04
$\alpha$ -Chymotrypsin ( $\alpha$ -Chy)	0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	8.0	37	67.91 $\pm$ 0.02
Flavourzyme (Fla)	0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	7.0	50	67.84 $\pm$ 0.03
Neutrase (Neu)	0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	8.0	50	65.76 $\pm$ 0.08
Papain (Pa)	0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	6.0	37	65.09 $\pm$ 0.05
Pepsin (Pep)	0.1 M Glycine-HCl	2.0	37	67.47 $\pm$ 0.06
Protamax (Pro)	0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	8.0	45	67.32 $\pm$ 0.09
Trypsin (Try)	0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	8.0	37	63.13 $\pm$ 0.04

DH<sup>1</sup>, degree of hydrolysis. Enzymatic hydrolysates were obtained from 8 hour under the optical conditions.

### 가수분해도(Degree of hydrolysis, DH)

쪽의 효소가수분해물의 가수분해도는 Adler-Nissen (1979)법을 변형하여 측정하였으며, 그 값은 *o*-phthaldialdehyde (OPA)가 결합된 free amino groups 값으로 환산하여 나타내었다 (Adler-Nissen, 1986).

$$DH = h / h_{\text{tot}} \times 100$$

$h_{\text{tot}}$ 은 protein equivalent 당 총 peptide bonds 수를,  $h$ 는 가수분해된 결합수이다.

### 가수분해물 분획

쪽의 8개의 효소가수분해물을 10 mL 증류수에 녹인 후, 3 kDa과 10 kDa의 ultrafiltration membranes (Amicon Ultra-filter devices; Millipore, Billerica, MA, USA)을 이용하여 920 g에서 20분간 반복적으로 원심분리하여 분자량별로 각각 분획하였다(<3 kDa, 3-10 kDa, >10 kDa). 분자량별로 분획된 분획물은 동결건조하여 사용하였다.

### ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성

ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거활성은 Roberta et al. (1999) 방법을 변형하여 측정하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate buffer를 각각 1:1의 비율로 혼합한 후 4℃의 암소에서 하룻동안 방치시킨다. ABTS<sup>+</sup> 라디칼 용액이 734 nm 파장에서 0.7-1의 흡광도를 갖도록 증류수로 희석하여 10 μL의 시료에 희석한 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 용액 190 μL를 혼합한 후 실온의 암실에서 10분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였고, ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소

거 활성은 라디칼의 활성을 50%로 저해하는 농도인 IC<sub>50</sub> (mg/mL)으로 나타내었다.

### DPPH 라디칼 소거 활성

DPPH 라디칼 소거 활성은 Blois (1958) 방법을 변형하여 측정하였다. 메탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 160 μL와 시료 40 μL를 각각 혼합하고, 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였고, DPPH 라디칼 소거 활성은 라디칼의 활성을 50%로 저해하는 농도인 IC<sub>50</sub> (mg/mL)으로 나타내었다.

### Reducing power 측정

Reducing power는 Oyaizu (1986) 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 100 μL에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6)와 1% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>를 각 100 μL씩 차례로 넣어 혼합한 뒤, 50℃에서 20분간 반응시킨다. 반응 후 10% TCA를 100 μL 첨가하고, 2,000 g에서 10분간 원심분리한다. 상층액 200 μL에 0.1% FeCl<sub>3</sub> 40 μL를 반응시킨 뒤, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였고, 환원력은 최대 효과의 50%에 도달하는데 필요한 농도인 EC<sub>50</sub> (mg/mL)로 나타내었다.

### ACE 억제 효과 측정

ACE 억제 효과는 Li et al. (2005) 방법을 변형하여 측정하였다. 20 μL의 시료에 50 μL의 5 mM HHL, 0.1M sodium borate buffer (pH 8.3)를 37℃에서 5분간 반응시킨다. 1 U ACE를 10 μL을 넣고 37℃에서 30분간 방치한다. 1 M HCl을 100 μL와 sodium borate buffer (320 μL), pyridine (600 μL), BSC (200

Table 2. The antioxidant and ACE inhibitory activities of eight enzymatic hydrolysates of Japanese mud shrimp *Upogebia major*

(mg/mL)

Samples	ABTS <sup>+</sup> (IC <sub>50</sub> <sup>1</sup> )	DPPH (IC <sub>50</sub> )	Reducing power (EC <sub>50</sub> <sup>2</sup> )	ACE (IC <sub>50</sub> )
Alcalase (Alc)	0.09±0.00 <sup>c3</sup>	3.23±0.22 <sup>c</sup>	3.10±0.18 <sup>b,c</sup>	0.07±0.06 <sup>c</sup>
α-Chymotrypsin (α-Chy)	0.09±0.00 <sup>c</sup>	2.87±0.18 <sup>d</sup>	1.77±0.13 <sup>d</sup>	0.08±0.05 <sup>c</sup>
Flavourzyme (Fla)	0.09±0.00 <sup>c</sup>	4.28±0.21 <sup>b</sup>	2.81±0.19 <sup>c</sup>	0.17±0.08 <sup>a</sup>
Neutrase (Neu)	0.08±0.00 <sup>c</sup>	5.61±0.69 <sup>a</sup>	3.38±0.42 <sup>b</sup>	0.18±0.20 <sup>a</sup>
Papain (Pa)	0.13±0.00 <sup>b</sup>	3.56±0.61 <sup>c</sup>	2.60±0.09 <sup>c</sup>	0.11±0.28 <sup>b</sup>
Pepsin (Pep)	0.18±0.00 <sup>a</sup>	4.72±0.28 <sup>b</sup>	5.93±0.66 <sup>a</sup>	0.17±0.05 <sup>a</sup>
Protamax (Pro)	0.09±0.00 <sup>c</sup>	4.59±0.17 <sup>b</sup>	2.64±0.32 <sup>c</sup>	0.02±0.05 <sup>d</sup>
Trypsin (Try)	0.12±0.00 <sup>b</sup>	3.68±0.38 <sup>c</sup>	3.62±0.22 <sup>b</sup>	0.11±0.08 <sup>b</sup>
<sup>A</sup> L-Ascorbic acid (μg/mL)	5.61±0.09 <sup>d</sup>	4.46±0.27 <sup>e</sup>	4.71±0.00 <sup>e</sup>	
<sup>B</sup> Captopril (ng/mL)				0.25±0.05 <sup>e</sup>

<sup>1</sup>IC<sub>50</sub> (50% inhibition concentration) values of ABTS<sup>+</sup> and DPPH radical scavenging, and ACE inhibitory activities were expressed as a mean ±SD. <sup>2</sup>The reducing power was expressed as an EC<sub>50</sub> (concentration of the 0.5 absorbance) value. <sup>3</sup>Mean within the same row with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test (P<0.05). <sup>A</sup>L-ascorbic acid was used as a positive control of ABTS<sup>+</sup> and DPPH radicals scavenging and reducing power. <sup>B</sup>Captopril was used as a positive control of ACE inhibitory activity. ABTS<sup>+</sup>, 2, 2'-azino-bis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ACE, angiotensin I-converting enzyme.

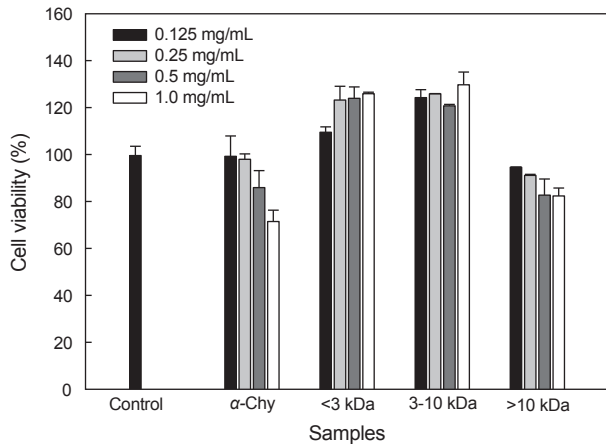


Fig. 1. The cell viability of the  $\alpha$ -chymotrypsin hydrolysates of Japanese mud shrimp *Upogebia major* and its molecular weight cut-off fractions in HUVEC. HUVEC, human umbilical vein endothelial cell.

$\mu$ L)를 반응물에 각각 첨가한 후 37 °C에서 30분간 암소에 두고, 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 captopril을 사용하였고, ACE 억제 효과는 ACE의 활성을 50%로 억제하는 농도인  $IC_{50}$ (mg/mL)로 나타내었다.

#### 세포배양

HUVEC 세포는 2% fetal bovine serum (FBS)와 vascular endothelial growth factor (VEGF)가 포함되어있는 Endothelial Growth Medium-2 (EGM<sup>TM</sup>-2 Medium)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

#### 세포독성 측정

시료의 세포독성을 확인하기 위해 HUVEC 세포에서 WST-1을 이용하여 cell viability를 측정하였다. 96 well plate에 HUVEC 세포를  $5 \times 10^3$  cells/well이 되도록 분주한 후, 시료를 농도별로 처리하여 40 시간 동안 배양한 후, 각 well당 WST-1 용액을 10  $\mu$ L씩 처리하여 2시간 동안 반응시킨 다음, ELISA reader (US/MQX 200; Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Nitric oxide (NO) 생성 억제 측정

HUVEC 세포를 6 well plates에 24시간 배양한 후, 시료를 농도별로 처리하고 2시간 후에 TNF- $\alpha$  (20 ng/mL)를 처리한 후 40시간 배양하였다. 배지를 제거하고, lysis buffer 120  $\mu$ L 넣은 후 cell을 긁어 모으고, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액 100  $\mu$ L와 Griess reagent 100  $\mu$ L를 암소에서 20분간 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 NO의 농도를 결정하였다.

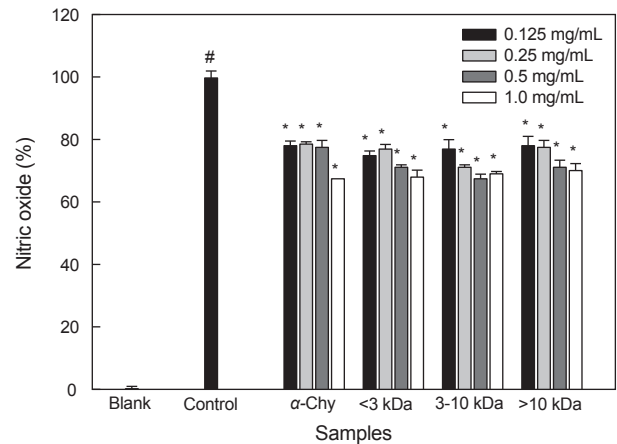


Fig. 2. The inhibition effect of the  $\alpha$ -chymotrypsin hydrolysates of Japanese mud shrimp *Upogebia major* and its molecular weight cut-off fractions on the production of nitric oxide (NO) in TNF- $\alpha$  stimulated HUVEC. All data are presented as means $\pm$ SD of three independent experiments. \*P<0.05 compared with TNF- $\alpha$  treatment only. #P<0.01, compared with the TNF- $\alpha$ -nontreated group. TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , HUVEC, human umbilical vein endothelial cell.

#### 세포부착인자(Cell adhesion molecules, CAMs) 생성량 측정

HUVEC 세포를 6 well plates에 24시간 배양한 후, 시료를 농도별로 처리하고 2시간 후에 TNF- $\alpha$  (20 ng/mL)를 처리한 후 40시간 배양하였다. 상층액을 모아 ELISA kit (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 VCAM-1, ICAM-1, E-selectin의 발현량을 ELISA reader (US/MQX 200; Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

#### 사이토카인(Cytokines) 생성량 측정

HUVEC 세포를 6 well plates에 24시간 배양한 후, 시료를 농도별로 처리하고 2시간 후에 TNF- $\alpha$  (20 ng/mL)를 처리하였다. 이를 40시간 배양한 후 상층액을 모아 ELISA kit (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 IL-6, IL-8, MCP-1의 발현량을 ELISA reader (US/MQX 200; Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

#### 통계

결과는 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타내었으며, 통계처리는 SAS 프로그램(SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하였으며, Duncan의 multiple-comparison test와 Student t-test로 P<0.05에서 결과간의 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 효소가수분해 및 가수분해도

동결건조한 썩을 8개의 효소로 가수분해하고, 각각의 효소가수분해물의 가수분해도를 측정하였다(Table 1). 썩의 가수분해도는  $\alpha$ -Chy 가수분해물( $67.91 \pm 0.02\%$ ) > Fla 가수분해물( $67.84 \pm 0.03\%$ ) > Pep 가수분해물( $67.47 \pm 0.06\%$ ) > Pro 가수분해물( $67.32 \pm 0.09\%$ ) > Neu 가수분해물( $65.76 \pm 0.08\%$ ) > Pa 가수분해물( $65.09 \pm 0.05\%$ ) > Alc 가수분해물( $63.82 \pm 0.04\%$ ) > Try 가수분해물( $63.13 \pm 0.04\%$ )의 순으로 나타났다. 8개의 효소가수분해물 중  $\alpha$ -Chy 가수분해물의 가수분해도가 가장 높은 것으로 나타났다.

### 항산화 및 ACE 억제 활성

우리 몸의 대사과정 또는 외부적 요인에 의해서 생성되는 활성산소종은 세포막과 DNA 손상, 단백질과 지질의 산화를 초래하면서 세포에서의 신호전달체계를 망가뜨리고 면역력을 저하시키는 등 세포의 정상적인 기능을 차단함으로써 염증, 동맥경화, 암 등 여러 만성질환을 유발한다(Nardin, 2001). 체내에서 활성산소종의 증가는 동맥경화 생성과정에서 각종 cytokine, growth factor 등의 분비를 증가시키고, 혈관긴장도의 증가, 염증세포의 침착, 세포분열 및 apoptosis를 유발한다고 알려져 있다(Kunsch and Medford, 1999).

고혈압은 심혈관계 질환을 일으키는 주요 위험인자 중 하나로 동맥경화증의 예방과 관리를 위해서는 이를 예방하는 것이 중요하다. 고혈압과 관련된 혈관 염증을 유발할 수 있는 인자들 중 가장 핵심으로는 angiotensin-II가 있는데, 이는 혈관내피 세포 평활근 세포에서 superoxide anion의 형성을 유도하여 산화적 스트레스를 증가시키며, VCAM-1, IL-6, MCP-1 등의 발현을 증가시켜 염증반응을 유도한다. ACE는 angiotensin-I을 angiotensin-II로 전환시킴으로써 혈관을 수축시키고, 신장에서 나트륨과 수분의 과흡수를 일으켜 혈압을 상승시킨다. 따라서 이러한 작용을 저해하는 ACE 억제제는 고혈압을 비롯한 심혈관질환의 치료에 널리 사용되고 있다(Parish and Miller, 1992; Paul et al., 2006; Takahashi et al., 2011).

혈관 염증의 유발에 관여하는 활성산소종 및 ACE의 활성을 억제하는 능력을 확인하기 위하여 썩의 8개 효소가수분해물의 항산화 활성(ABTS<sup>+</sup> 및 DPPH 라디칼 소거 활성, reducing power)과 ACE 억제 활성을 측정하였다(Table 2). 썩 효소가수분해물의 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능은 IC<sub>50</sub> 값이 0.08-0.18 mg/mL 였으며, 이들 중 Alc,  $\alpha$ -Chy, Fla, Neu, Pro 가수분해물에서 높은 활성을 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성에서는 8개의 효소가수분해물 중  $\alpha$ -Chy 가수분해물이 IC<sub>50</sub> 값이  $2.87 \pm 0.18$  mg/mL로 가장 높은 활성을 보였으며, Reducing power에서도  $\alpha$ -Chy 가수분해물이 EC<sub>50</sub> 값이  $1.77 \pm 0.13$  mg/mL로 가장 강한 활성을 나타내었다. ACE 억제활성에서는 썩의 Alc,  $\alpha$ -Chy,

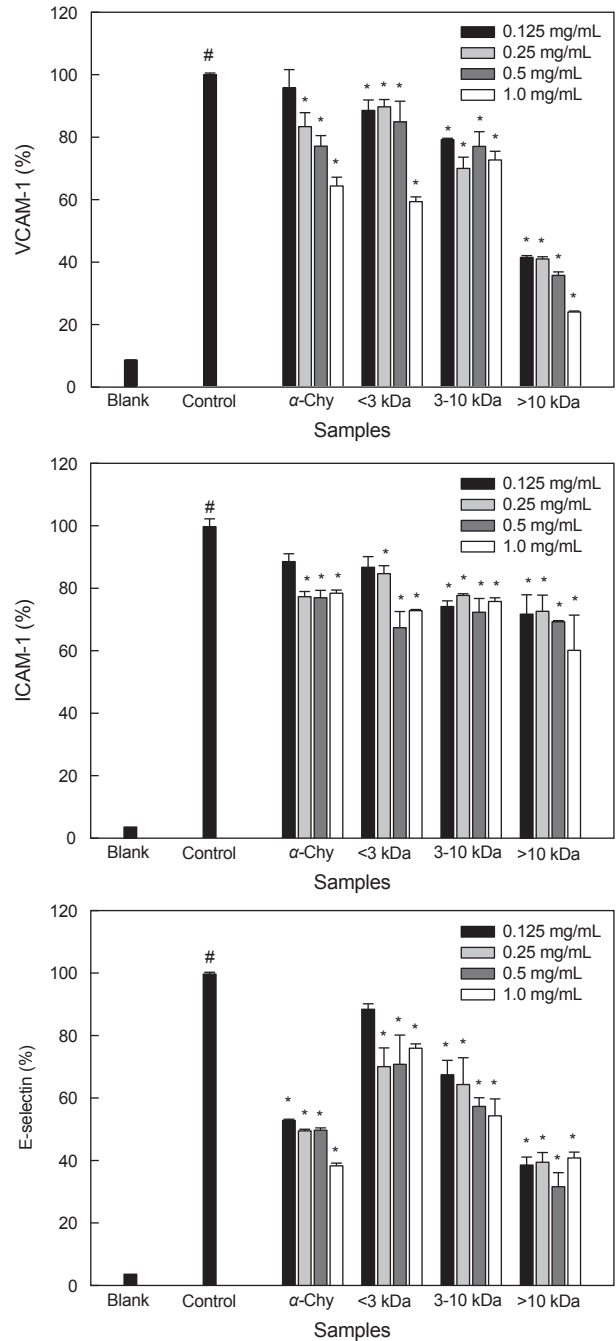


Fig. 3. The inhibition effect of the  $\alpha$ -chymotrypsin hydrolysates of Japanese mud shrimp *Upogebia major* and its molecular weight cut-off fractions on the expression of adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin) in TNF- $\alpha$ -stimulated HUVEC. All data are presented as means $\pm$ SD of three independent experiments. \*P<0.05 compared with TNF- $\alpha$  treatment only. #P<0.01, compared with the TNF- $\alpha$ -nontreated group. VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; E-selectin, endothelial-selectin; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell.

Pro 가수분해물들이 높은 활성을 나타내었다.

이들 결과로부터 썩의 8개 효소가수분해물 중 항산화 및 ACE 억제능에서 높은 활성을 나타낸  $\alpha$ -Chy 가수분해물로부터 혈관성 염증 억제 활성을 평가하고자 하였다.

**HUVEC 세포에 대한 독성**

HUVEC에 대한 썩  $\alpha$ -Chy 가수분해물과 분획물의 세포독성을 측정하였다(Fig. 1). 썩  $\alpha$ -Chy 가수분해물과 분획물을 농도별(0.125-1 mg/mL)로 처리한 결과, 썩  $\alpha$ -Chy 가수분해물은 0.125-0.5 mg/mL의 농도에서는 80% 이상의 생존율을 나타내었으며, 분획물에서는 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.

**NO 생성 억제 효과**

염증 매개 물질 중 하나인 NO의 과도한 생성은 림프구 증식을 억제하고 정상세포에 손상을 유발하여 염증질환을 유발한다고 알려져 있다(Korhonen et al., 2005). TNF- $\alpha$ 로 염증 반응을 유도한 HUVEC 세포에서 썩의  $\alpha$ -Chy 가수분해물과 분획물들의 염증 매개 물질인 NO 생성 억제 효과를 측정하였다(Fig. 2). 썩  $\alpha$ -Chy 가수분해물과 분획물은 HUVEC 세포에서 TNF- $\alpha$ 의 처리로 과량 생성된 NO를 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다.

**세포부착인자(Cell adhesion molecules, CAMs)의 발현에 미치는 영향**

혈관의 만성 염증성 질환인 동맥경화는 세포부착인자의 매개로 혈중에 존재하는 고농도의 콜레스테롤을 이동시키는데 관여하는 지질단백질과, 세포외 기질, 칼슘과 면역세포가 혈관내피세포에서 침착되어 발생한다(Peter et al., 1997; Koo et al., 2014). 동맥경화의 진행과 관련된 대표적인 염증 표지자는 세포부착인자(VCAM-1, ICAM-1, E-selectin)와 염증성 사이토카인(IL-6, IL-8, MCP-1)이 알려져 있으며, 이들은 각각 독립적인 위험인자로 보고된 바 있다(Bae et al., 2008).

본 연구에서는 TNF- $\alpha$ 로 염증 반응이 유발된 HUVEC 세포에서 썩의  $\alpha$ -Chy 가수분해물과 분획물들이 세포부착인자의 발현에 미치는 영향을 평가하였다(Fig. 3). TNF- $\alpha$  처리에 의해 유도된 VCAM-1은 썩  $\alpha$ -Chy 가수분해물을 처리함에 따라 농도의존적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 특히, 0.25 mg/mL 이상의 농도를 처리한 군에서는 유의적인 감소를 나타내었다. 또한, 썩  $\alpha$ -Chy 가수분해물의 3개의 분획물, <3 kDa 분획물, 3-10 kDa 분획물, >10 kDa 분획물들은 모든 농도(0.125-1 mg/mL)에서 VCAM-1의 발현을 유의적으로 감소시켰으며, 특히 >10 kDa 분획물을 처리한 군에서 가장 강력한 억제 효과가 나타났다.

HUVEC 세포에서 염증 반응으로 과량 발현된 ICAM-1은 썩  $\alpha$ -Chy 가수분해물을 처리함에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 0.25 mg/mL 이상의 농도를 처리한 군에서 유의적으로 감

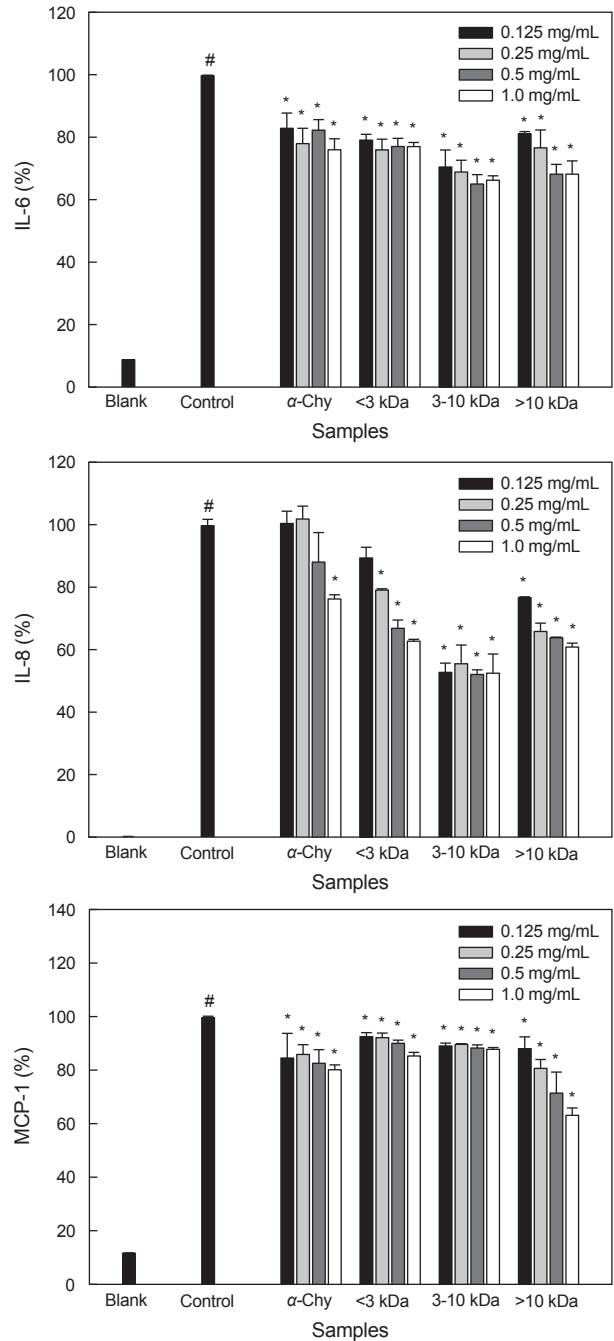


Fig. 4. The inhibition effect of the  $\alpha$ -chymotrypsin hydrolysates of Japanese mud shrimp *Upogebia major* and its molecular weight cut-off fractions on the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8 and MCP-1) in TNF- $\alpha$ -stimulated HUVEC. All data are presented as means $\pm$ SD of three independent experiments. \*P<0.05 compared with TNF- $\alpha$  treatment only. #P<0.01, compared with the TNF- $\alpha$  -nontreated group. IL-6, interleukin-6; IL-8, interleukin-8; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell.

소하였다. 분획물에서는 3-10 kDa 분획물과 >10 kDa 분획물은 0.125-1 mg/mL의 농도에서 ICAM-1 발현을 유의적으로 억제하였고, <3 kDa 분획물은 0.25 mg/mL 이상에서 유의적인 감소를 나타내었다.

HUVEC 세포에서 TNF- $\alpha$  처리로 발현된 E-selectin은 쪽  $\alpha$ -Chy 가수분해물에 의해 0.125-1 mg/mL의 모든 농도에서 유의적으로 감소되었다. 분획물 중 3-10 kDa 분획물과 >10 kDa 분획물은 0.125-1 mg/mL의 농도에서 E-selectin 발현을 유의적으로 억제하였고, <3 kDa 분획물은 0.25 mg/mL 이상에서 유의적인 감소를 나타내었다. 그중에서 특히, >10 kDa 분획물을 처리한 군은 가장 강력한 억제 효과를 나타내었다.

이들 결과로부터 쪽의  $\alpha$ -Chy 가수분해물과 분획물들은 세포 부착인자들의 발현을 유의적으로 억제하여 혈관 염증 유발을 억제하는 것으로 확인하였으며, 분획물들 중에서 >10 kDa 분획물 처리군이 가장 강력한 억제 효과를 나타내는 것으로 나타났다.

### 염증성 사이토카인(Pro-inflammatory cytokines)의 발현에 미치는 영향

염증세포를 유도하여 혈관 내로 이동시키고 염증세포의 작용을 유도하는 물질인 사이토카인은 IL-6, IL-8, MCP-1 등이 있다. IL-6는 염증 초기에 분비되어 과잉 생성시 염증성 질환을 비롯한 여러 질병을 초래하며, IL-8은 호중구의 chemoattractant로, MCP-1은 거식세포와 단핵세포의 chemoattractant로 작용하여 동맥경화의 개시와 진행에 중요한 역할을 한다(Yang et al., 2004; Sprague and Khalil, 2009).

본 연구에서는 혈관 염증에 관여하는 사이토카인의 발현에 대한 쪽 가수분해물의 억제능을 평가하고자 HUVEC에 TNF- $\alpha$ 을 처리하여 염증성 사이토카인의 발현을 유도한 뒤, 쪽  $\alpha$ -Chy 가수분해물과 분획물들을 처리하여 사이토카인의 발현 억제 효과를 평가하였다(Fig. 4).

TNF- $\alpha$ 에 의해 HUVEC에서 과량 생성된 IL-6는 쪽  $\alpha$ -Chy 가수분해물을 처리함에 따라 유의적인 IL-6 억제 효과는 나타났으나 농도의존적인 감소는 나타나지 않았다. 분획물에서는 3개의 분획물이 0.125-1 mg/mL의 농도에서 모두 IL-6의 발현량을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다.

HUVEC에서 TNF- $\alpha$ 의 처리에 의해 발현된 IL-8는 쪽  $\alpha$ -Chy 가수분해물을 1 mg/mL을 처리한 군에서 유의적인 억제 효과를 나타내었다. 분획물들 중에서는 <3 kDa 분획물은 0.25-1 mg/mL의 농도에서 유의적인 억제 효과를 나타내었으며, 3-10 kDa 분획물과 >10 kDa 분획물은 0.125-1 mg/mL의 농도에서 유의적인 IL-8 발현 억제 활성이 나타났다. 분획물들 중 3-10 kDa 분획물은 가장 강력한 IL-8 발현 억제 효과가 나타났으나, 농도의존적인 억제 효과는 나타나지 않았다.

TNF- $\alpha$ 로 과량 발현된 MCP-1은 쪽  $\alpha$ -Chy 가수분해물을 처리하였을때 0.125-1 mg/mL의 농도 모두에서 유의적인 감소를

나타내었다. 분획물에서도 3개의 분획물 모두 0.125-1 mg/mL의 농도에서 농도의존적으로 유의적인 억제 효과를 나타내었고, 특히 분획물들 중에서 >10 kDa 분획물이 MCP-1의 발현을 가장 강력하게 억제하는 것으로 나타났다.

이들 결과로부터 쪽의  $\alpha$ -Chy 가수분해물과 분획물은 HUVEC에서 TNF- $\alpha$ 의 처리에 의해 생성된 NO와 세포부착인자들의 생성을 유의적으로 억제하고, 염증성 사이토카인들 또한 유의적으로 발현을 억제함으로써  $\alpha$ -Chy 가수분해물과 분획물의 혈관염증 억제 효과를 확인하였다.

향후, 본 연구 결과를 토대로 가장 강력한 혈관성 염증 억제 효과를 나타낸 쪽의  $\alpha$ -Chy 가수분해물의 >10 kDa 분획물로부터 활성 소재를 분리·정제하고, 구조 동정하여 활성 소재를 구명하고, 활성 소재의 효능 검증 및 기전 연구를 추가로 진행할 예정이다.

### 사 사

본 연구는 국립수산물품질관리원 수산시험연구사업의 지원으로 수행되었습니다(R2018060).

### References

Adler-Nissen J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem* 27, 1256-1262. <http://dx.doi.org/10.1021/jf60226a042>.

Adler-Nissen J. 1986. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, Barking, Essex, U.K., 110-169.

Bae JH, Park JS, Hong GR, Shin DG, Kim YJ and Shim BS. 2008. Correlation between inflammatory markers and the progression of atherosclerosis in the patients with coronary artery and disease. *Korean J Medicine* 74, 51-58.

Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200. <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>.

Cho YM, Song HS, Jang SA, Park DW, Shin YS, Jeong YJ and Kang SC. 2016. Suppression of VCAM-1 expression in human aortic smooth muscle cells treated with ethanol extracts of *Cynanchum wilfordii* radix, *Arctium lappa* L., and *Dioscorea opposita*. *Korean J Plant Res* 29, 525-531. <http://dx.doi.org/10.7732/kjpr.2016.29.5.525>.

Hong JS. 2013. Biology of the mud shrimp *Upogebia major* (de Haan, 1841), with particular reference to pest management for shrimp control in manila clam bed in the West Coast of Korea. *Ocean Polar Res* 35, 323-349. <http://dx.doi.org/10.4217/OPR.2013.35.4.323>.

Koo HJ, Park HJ, Byeon HE, Kwak JH, Um SH, Kwon ST, Rhee DK and Pyo SN. 2014. Chimese yam extracts containing  $\beta$ -sitosterol and ethyl linoleate protect against ath-

- erosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice and inhibit muscular expression of VCAM-1 *in vitro*. *J Food Sci* 79, H719-H729. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12401>.
- Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H and Moilanen E. 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 471-479. <http://dx.doi.org/10.2174/1568010054526359>.
- Kunsch C and Medford RM. 1999. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 85, 753-66. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.85.8.753>.
- Lee AS, Kim JS, Lee YJ and Kang DG. 2012a. Anti- TNF- $\alpha$  activity of *Portulaca oleracea* in vascular endothelial cells. *Int J Mol Sci* 13, 5628-5644. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms1305562P>.
- Lee SM, Lee YJ, Kim YC, Kim JS, Kang DG and Lee HS. 2012b. Vascular protective role of vitexicarpin isolated from *Vitex rotundifolia* in human umbilical vein endothelial cells. *Inflammation* 35, 584-93. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-011-9349-x>.
- Li GH, Liu H, Shi YH and Le GW. 2005. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *J Pharm Biomed Anal* 37, 219-224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2004.11.004>.
- Nardin ED. 2001. The role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease. *Ann periodontol* 6, 30-40. <http://dx.doi.org/10.1902/annals.2001.6.1.30>.
- Oh GW and Jung WK. 2015. Biomedical materials for regenerating bone tissue utilizing marine invertebrate. *Korean J Fish Aquat Sci* 48, 001-015. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0001>.
- Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucoseamine. *Jpn J Nutr* 44, 307-315. <http://dx.doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>.
- Packard RR and Libby P. 2008. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 54, 24-38. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2007.097360>.
- Pan J, Kurosky A, Xu B, Chopra AK, Copenhaver DH, Singh IP and Baron S. 2000. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. *Antiviral Res* 48, 39-47. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-3542\(00\)00117-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-3542(00)00117-0).
- Parish RC and Miller LJ. 1992. Adverse effects of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Drug Saf* 7, 14-31. [http://dx.doi.org/10.1145-5916/92/0001-0014/\\$09.00/0](http://dx.doi.org/10.1145-5916/92/0001-0014/$09.00/0).
- Paul M, Mehr AP and Kreutz R. 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86, 747-803. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00036.2005>.
- Peter K, Nawroth P, Conradt C, Nordt T, Weiss T, Boehme M, Wunsch A, Allenberg J, Kubler W and Bode C. 1997. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intracellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17,505-512. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.17.3.505>.
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y and Catherine RE. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26, 1231-1237. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Rosa RD and Barracco MA. 2010. Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebrate Surviv J* 7, 262-284.
- Sindhu S and Sherief PM. 2011. Extraction, characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of carotenoids from the shell waste of Arabian red shrimp *Aristeus alcocki*, Ramadan 1938. *Open Conf Proc J* 2, 95-103. <http://dx.doi.org/10.2174/2210289201102010095>.
- Sprague AH and Khalil RA. 2009. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 78, 539-552. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.029>.
- Takahashi H, Yoshika M, Komiyama Y and Nishimura M. 2011. The central mechanism underlying hypertension: a review of the roles of sodium ions, epithelial sodium channels, the rennin-angiotensin-aldosterone system, oxidative stress and endogenous digitalis in the brain. *Hypertens Res* 34,1147-60. <http://dx.doi.org/10.1038/hr.2011.105>.
- Yang YH, Lai HJ, Huang CM, Wang LC, Lin YT and Chiang BL. 2004. Sera from children with active Henoch-Schonlein purpura can enhance the production of interleukin 8 by human umbilical venous endothelial cells. *Ann Rheum Dis* 63, 1511-1513. <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2003.016196>.