

RESEARCH ARTICLE

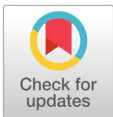
***Trametes cubensis* 버섯 추출물이 소의 대동맥 내피세포의 혈관 기능에 미치는 효능**장수정¹ 이동형² 김성환² 박헌용^{1,*}¹단국대학교 분자생물학과/나노센서바이오텍연구소, ²단국대학교 미생물학과**Effect of *Trametes cubensis* Extract on Vascular Function of Bovine Aortic Endothelial Cells**Sujeong Jang¹, Dong Hyeung Lee², Seong Hwan Kim², and Heonyong Park^{1,*}¹ Department of Molecular Biology & Institute of Nanosensor and Biotechnology, Dankook University, Cheonan 31116, Korea² Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan 31116, Korea

*Corresponding author: heonyong@dankook.ac.kr

ABSTRACT

Mushrooms have been extensively used as traditional medicines to treat cancer and inflammatory diseases. In this study, we examined whether *Trametes cubensis* extract (TCE) exerted beneficial effects on cardiovascular function. First, we demonstrated that TCE was non-cytotoxic and enhanced cell proliferation of bovine aortic endothelial cells (BAEC). Moreover, TCE induced cell migration and blocked lipopolysaccharide-induced adhesion of monocytes to BAEC. We performed a variety of cell signaling studies, showing that TCE activates p38 MAPK and generates reactive oxygen species (ROS). Our results showed that TCE-induced vascular functions were mediated by p38 MAPK, but not by ROS. These results provide insights into bio-medical applications of TCE as a preventive or therapeutic agent for treating cardiovascular diseases including atherosclerosis.

Keywords: Cell migration, Endothelial cells, Heterotypic cell adhesion, p38 MAP kinase, *Trametes cubensis*

**OPEN ACCESS**

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2020 March, 48(1): 1-13
<https://doi.org/10.4489/KJM.20200001>

Received: December 26, 2019**Revised:** March 26, 2020**Accepted:** March 27, 2020

© 2020 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

버섯은 12,000여 종 이상이 존재하며 그 중에 최소 2,000여 종의 버섯을 섭취할 수 있다[1]. *Trametes cubensis* 버섯은 구멍장이버섯과(Polypoaceae)의 송편버섯 (*Trametes*)속의 버섯으로 아열대로 변하고 있는 국내의 환경에 맞추어 재배가 가능하여 국내 생물산업의 자원으로 활용이 가능하다[2]. 구멍장이버섯과 버섯 추출물의 효능은 human immunodeficiency virus (HIV) type 1의 활성을 저해하고 세포독성이 있는 것으로 알려져있지만[3], *T. cubensis* 버섯 추출물(*Trametes*

cubensis extract, TCE)의 기능성 연구는 매우 미흡하다. 일반적으로 버섯의 기능성 물질들은 이차 대사산물로 다른 포식자나 병원균으로부터 자신을 방어하기 위해 버섯이 만들어내는 유기물들이다[4]. 이러한 이차 대사산물은 인간의 면역기능에 유리하게 작용하기도 하며[5,6], 또한 이차 대사산물이 진화적으로 버섯의 방어 기능을 위해 생성된 물질임을 고려하면, 인간에게 감염이 되는 병원균의 항생제로 사용될 가능성도 있다[7].

T. cubensis 버섯의 기능성을 추측하기 위한 이차 대사산물에 대한 정보도 현재는 매우 미흡하다. 일반적으로 버섯이 갖고 있는 기능성 물질들을 근거로 추측해 보면, *T. cubensis* 버섯의 기능성 물질은 아마도 페놀계[8], 알칼로이드[9], 다당류[10] 물질에 포함될 수 있다. 그 중에서도 β -glucan이라는 물질은 항염과 항암의 효과를 가지고 있다[11,12]. 이를 근거로 추측해보면 TCE는 항염증이나 항암효과 있을 것으로 예측할 수 있다. 항염증 기능은 혈관의 기능과 불가분의 관계에 있다. 따라서 본 연구에서는 TCE가 혈관 기능에 어떤 효과가 있는가를 파악하고자 하였다.

혈관에서 발생하는 대표적인 질환인 동맥경화는 미국과 유럽 및 서구화된 국가에서 가장 높은 사망률을 나타내는 질환이다[13]. 우리나라의 경우도 점차 서구화되어 감에 따라 동맥경화의 발생 위험도가 증가하고 있다. 이러한 동맥경화는 혈관벽에 콜레스테롤이 과다하게 축적되어서 동맥경화반이 발생하여 성장하면서 혈관이 막히는 것으로 알려져 있고, 최근에는 그의 병인이 염증반응에 의해 발생한다고 알려졌다[14, 15]. 혈관 내에서 염증반응은 알려지 원이나 감염에 의해 시작된다. 염증반응이 발생한 곳에서는 cytokine이라 하는 면역반응을 유발하는 물질이 방출되고, 이 물질에 의해 혈액을 따라 순환하고 있던 단핵구들이 화학주성(chemotaxis)에 의해 염증반응이 발생한 곳으로 모이게 된다[16]. 화학주성이 일어나는 단계는 먼저 혈관부착분자에 의해 단핵구가 혈관내피세포에 이중세포부착한 후, 혈관내피층을 뚫고 감염이나 상처가 일어난 부위로 이동한 후 염증반응을 일으킨다. 이러한 염증반응은 감염원을 제거하기 위한 방어기전으로 중요하게 작동하지만, 만성으로 진행되면 단핵구에서 유래한 대식세포에 cholesterol과 oxidized low density lipoprotein (ox LDL)이 함께 쌓이면서 포말세포로 변화한 후 동맥경화반이 형성되어 동맥경화의 진행을 악화시킨다[12, 15, 16]. 이와 같은 사실을 근거하면, TCE가 위에서 기술된 특정 단계를 차단하거나 약화시키면 항동맥경화 기능을 갖고 있는 지를 파악할 수 있을 것이다.

TCE의 혈관기능을 평가하는 또 다른 방법은 산화질소(nitric oxide, NO)의 양 변화를 측정하는 것이다. NO는 다양한 염증반응 표지자 중의 하나인데, 여러가지 버섯추출물들은 이 산화질소의 생성을 저해하는 효과가 있어 염증반응을 낮출 수 있다고 보고되었다[17]. 또한 NO는 혈관층에 직접 작용하여 혈관을 확장시킨다. 최근에 NO의 기능은 더 많이 알려져 혈관 확장과 함께 인슐린 분비, 혈관생성, 신호전달 등의 여러 가지 생리학적 기능도 보고되었다[18]. 그러나 산화질소가 과도하게 생성된다면 오히려 염증을 유발하기 때문에 심혈관계 질환, 혹은 암을 유발한다[18]. 따라서 산화질소가 과도하게 생성되는 것은 제한되어야 한다.

한편 혈관은 한번 손상되면, 뇌출혈과 같은 중대한 질환이 일어나게 되어 치유가 빠르게 일어나야 한다. 뿐만 아니라 조직이나 기관이 손상되어도 빠르게 치유(wound healing)가 되어야 한다. 상처치유가 일어날 때 대표적으로 일어나는 주요 현상은 혈관신생과 내피세포의 이동(endothelial cell migration)이다[19]. 따라서 TCE의 새로운 혈관기능을 평가할 때 TCE가 내피세포 이동에 어떤 효과를 미치는 지를 분석하는 것은 초기 혈관기능을 탐색할 때 필수적으로 수행되어야 한다.

본 연구에서는 TCE가 혈관에서 우리가 추론한 기능을 알아보기 위하여 다양한 세포생물학적인 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

재료 준비

Trametes cubensis 균사를 potato dextrose agar (PDA) 배지에 접종한 후 25°C에서 10일간 암조건으로 배양하였다. 배양된 균사체를 수확하여 -80°C에서 동결건조를 실시하고 액체질소를 이용하여 분말화 하였다. 건조분말 50 mg을 20 mL의 순수 ethanol에 현탁하고 상온에서 24시간동안 정지한 상태로 추출한 후, 최종농도를 20 mg mL⁻¹가 되도록 감압농축 (N-1110, EYELA, Japan)한 것을 TCE로 하였다.

세포배양

BAEC (bovine aortic endothelial cell)은 30-32개월된 도축되는 소의 대동맥에서 내피세포를 분리해 내어 배양접시에 성장시킨 후 확보한 일차세포이다[20]. 본 실험에 사용한 BAEC은 계대수 8에서 13사이의 세포를 사용하였다. BAEC은 20% 소태아혈청(fetal bovine serum, Wel GENE Inc., Korea)과 0.5% 항생제(streptomycin/ penicillin)가 포함된 DMEM (glucose 1 g L⁻¹, Wel GENE Inc., Korea)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. THP-1 세포는 급성 단구성백혈병에서 유래한 부유세포(suspension cell)이다. THP-1 세포의 배양은 10% 소태아혈청과 0.5% 항생제가 포함된 RPMI 1640 (Wel GENE Inc., Korea)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포성장 실험

세포성장은 cell viability assay kit (Daeillab Service Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 평가하였다. BAEC을 전면 성장한 후 2시간 동안 혈청기아 시킨 후, 다양한 농도(10 pg mL⁻¹-1 ng mL⁻¹)의 TCE를 처리하여 최대 24시간 동안 배양하였다. 그 후 WST reagent (Daeillab Service Co., Ltd., Seoul, Korea)와 반응시킨 후 450 nm에서의 흡광도를 측정하여 세포성장 비율을 결정하였다.

산화질소(NO) 측정

BAEC을 35 mm 배양접시에서 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 뒤, 혈청기아 배지로 교환한 후 2시간 동안 추가 배양하였다. 100 pg mL⁻¹ 농도의 TCE를 0-60분 동안 시간별로 처리한 후 HEPES 완충액(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM glucose, 5 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, pH 7.4)으로 2회 세척하고 칼슘이온 운반체(calcium ionophore A23187, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1 µM을 20분간 처리하였다. 10 µM의 DAF-2 DA (diaminofluoresceins diacetate, EMD Millipore Corp., USA)와 30분 동안 반응시킨 후, HEPES 완충액으로 3회 세척한 후 세포를 수확하여 초음파 파쇄로 분해하였다. 그 후, 세포 분해액을 원심분리하여 상층액을 얻은 뒤, 형광분석계(Spectrofluorophotometer)를 이용하여 형광강도(Ex: 495 nm, Em: 515 nm)를 검출하여 상대적인 NO량을 측정하였다.

활성산소(reactive oxygen species, ROS) 측정

BAEC을 전면 성장시키고 2시간 동안 혈청기아 시킨 후 $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ 의 TCE를 최대 60분 동안 시간별로 처리하였다. 그 후에 KRH 완충액(129 mM NaCl , 5 mM NaHCO_3 , 4.8 mM KCl , $1.2 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, 1 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 2.8 mM glucose , 10 mM HEPES , pH 7.4)으로 2회 세척 후 $100 \mu\text{M DCF-DA}$ 와 30분간 반응시켰다. 그 후에 KRH 완충액으로 2회 세척한 후 세포를 수확하고 초음파 파쇄하여 분해하였다. 분해액의 상층액을 얻은 후 형광분석계(spectrofluorophotometer)를 이용하여 형광강도(Ex: 485 nm , Em: 530 nm)를 검출하여 활성산소의 양을 계산하였다.

세포이동 실험

전면 성장한 BAEC을 혈청기아 시킨 후, 찰과기를 이용하여 창상선을 만든 후에, 떨어진 세포를 PBS로 2회 세척하여 제거한 후, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ 농도의 TCE를 0-24시간 동안 처리하였다. 이와 같이 처리한 세포의 변화를 시간 별로 현미경을 통해 관찰 및 촬영하였다. 창상선에 의해 비워진 일정한 지역으로 이동한 세포 수를 세어 세포 이동 정도를 평가하였으며 세포이동에 미치는 TCE의 효과는 음성대조군과 비교하여 정량화하였다.

세포부착 실험

BAEC을 전면 성장 시킨 후에 혈청 기아 배지를 이용하여 12 시간 동안 추가 배양하였다. 한편, THP-1세포를 배양한 후에 Calcein AM (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)을 $1 \mu\text{M}$ 처리하고 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 조건에서 45 분간 염색하였다. 그 뒤에 PBS를 이용하여 3회 세척하고 전면 성장한 BAEC이 부착된 배양판에 THP-1 세포를 동량으로 분주한 뒤, 부착되지 않은 THP-1 세포를 충분히 세척한 후, 부착되어 있는 THP-1 세포를 형광현미경으로 관찰하였다.

웨스턴 블롯팅 (Western blotting)

BAEC이 담긴 배양접시를 RIPA buffer (150 mM NaCl , 50 mM Tris-HCl pH 8.0, $0.5\% \text{ sodium deoxycholate}$, $1\% \text{ NP-40}$, $0.1\% \text{ SDS}$)를 이용하여 용해하였다. 세포분해액 내의 단백질은 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 단백질을 크기 별로 분리한 후, polyvinylidene difluoride membrane (Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Germany)으로 옮긴 후에 상온에서 1시간 동안 blocking ($5\% \text{ non-fat powdered milk}$, 1X PBS , $0.1\% \text{ Tween 20}$) 하였다. 그 다음 원하는 단백질을 1차 항체와 2차 항체를 처리한 후, enhanced chemiluminescence detection method (Amersham, Buckinghamshire, UK)으로 발광시켜 chemi-doc (Bio-RAD, Hercules, CA, USA)으로 단백질 밴드를 촬영하였다. 웨스턴 블롯팅을 위해 사용한 1차 항체의 표적 항원들은 I κ B- α (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), phospho-I κ B α (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), phospho-p38 MAPK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), SAPK/JNK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), phospho-SAPK/JNK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), Actin (SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) 등이다.

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.

결과

TCE의 세포 독성

TCE의 혈관에서의 효능을 알아보기 위해 먼저 세포 독성 실험을 진행하였다. 실험 결과 그림 1에서 볼 수 있듯이 어느 농도에서도 세포 독성은 나타나지 않았으며 오히려 세포 성장이 최대 150% 증가하였다. 세포성장의 증가는 TCE를 처리한 후 6시간부터 서서히 유의성있게 증가하였고 (Fig. 1A), 세포성장에 미치는 효과는 10 pg mL⁻¹-1 ng mL⁻¹에서의 농도별 차이는 없었지만(Fig. 1B), 10 ng mL⁻¹ 이상의 농도에서는 세포성장 효과가 유의성있게 감소하였다(data not shown). 이 결과는 TCE가 혈관내피세포에서 세포 독성을 나타내지 않고 오히려 세포의 성장을 증진시키는 효과가 있음을 보여주는 것이다.

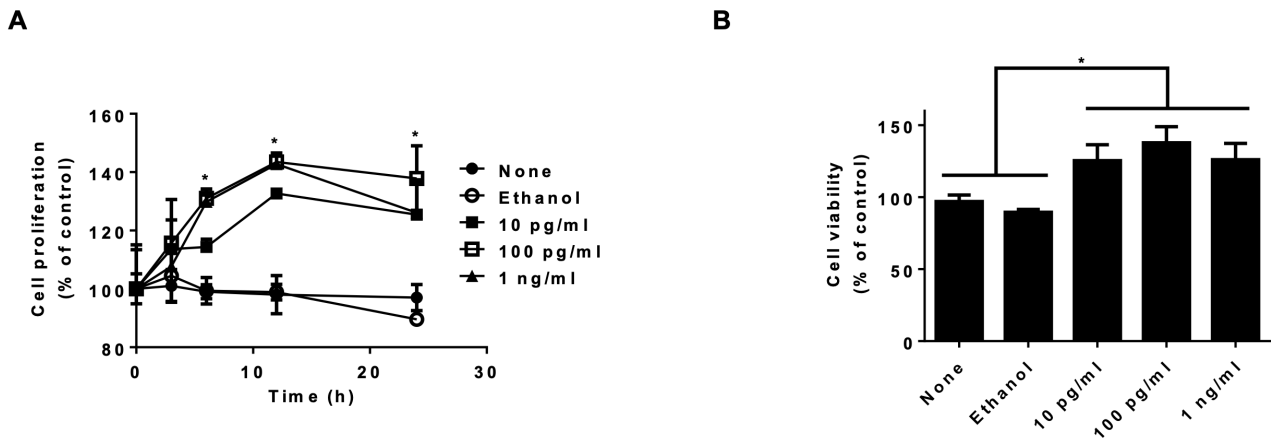


Fig. 1. *Trametes cubensis* extract (TCE) induces cell proliferation in bovine aortic endothelial cells (BAEC). (A) Confluent BAEC were serum-starved for 2 hr and then cells were treated for up to 24 hr (0, 3, 6, 12, 24 hr) with none, ethanol or various concentrations of TCE. Cells were incubated with WST-1 reagent for 2 hr. Then, viable cell numbers were counted using optical density (OD) at 450 nm. Data were plotted as line graphs (mean±SE, n=3). (B) Bar graphs represent the percentages of cell proliferation in 24 hr point after treated TCE. Data were plotted as bar graphs (mean±SE, n=3). * $p < 0.05$.

세포이동에 영향을 미치는 TCE 효과

BAEC에 TCE를 처리하였을 때 세포이동이 변화하는 지 관찰하였다. 내피세포의 세포이동은 상처 치유와 밀접한 관련이 있으며 혈관신생(angiogenesis), 배아형태형성(embryonic morphogenesis)과 같은 생리학적 기능 조절에도 깊은 연관이 있다. Fig. 2A의 위 그림은 TCE를 처리한 후에 시간별로 세포가 이동하는 것을 현미경으로 관찰한 후 촬영한 사진이다. Fig. 2A의 아래 그래프는 이동한 세포의 정량값을 나타내었다. 24시간이 지난 후에 TCE를 처리한 세포가 처리하지 않은 세포보다 통계적으로 유의하게 더 많이 이동하였음을 알 수 있었다. 이 결과는 TCE가 상처 회복과 혈관신생에 효과가 있음을 암시하는 것이다.

Lipopolysaccharide (LPS) 에 의해 촉발된 THP-1 세포의 혈관내피세포 부착에 영향을 미치는 TCE의 효과

Fig. 2B의 위 사진은 BAEC에 LPS와 TCE를 단독 혹은 혼합 처리한 후 calcein AM으로 염색된 THP-1 세포의 부착정도를 관찰한 형광현미경 사진이다. Fig. 2B의 아래 그래프는 THP-1의 부착정도를 정량화한 것이다. LPS만 단독 처리한 세포에서는 THP-1세포의 혈관내피세포 부착이 증가하였지만, TCE와 혼합처리하면 부착이 유의성있게 약 60% 정도 감소한 것을 알 수 있었다. 또한 TCE만 단독 처리한 세포에서는 대조군에서와 같은 정도로 이중세포 부착이 일어난 것으로 보아 TCE 자체는 THP-1 세포부착에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. LPS에 의해 유발된 단핵구의 이중세포부착 증진효과는 TCE에 의해 억제되며, TCE가 단핵구의 이중세포 간 부착을 억제하여 염증반응 억제기능에 효능이 있음을 암시한다.

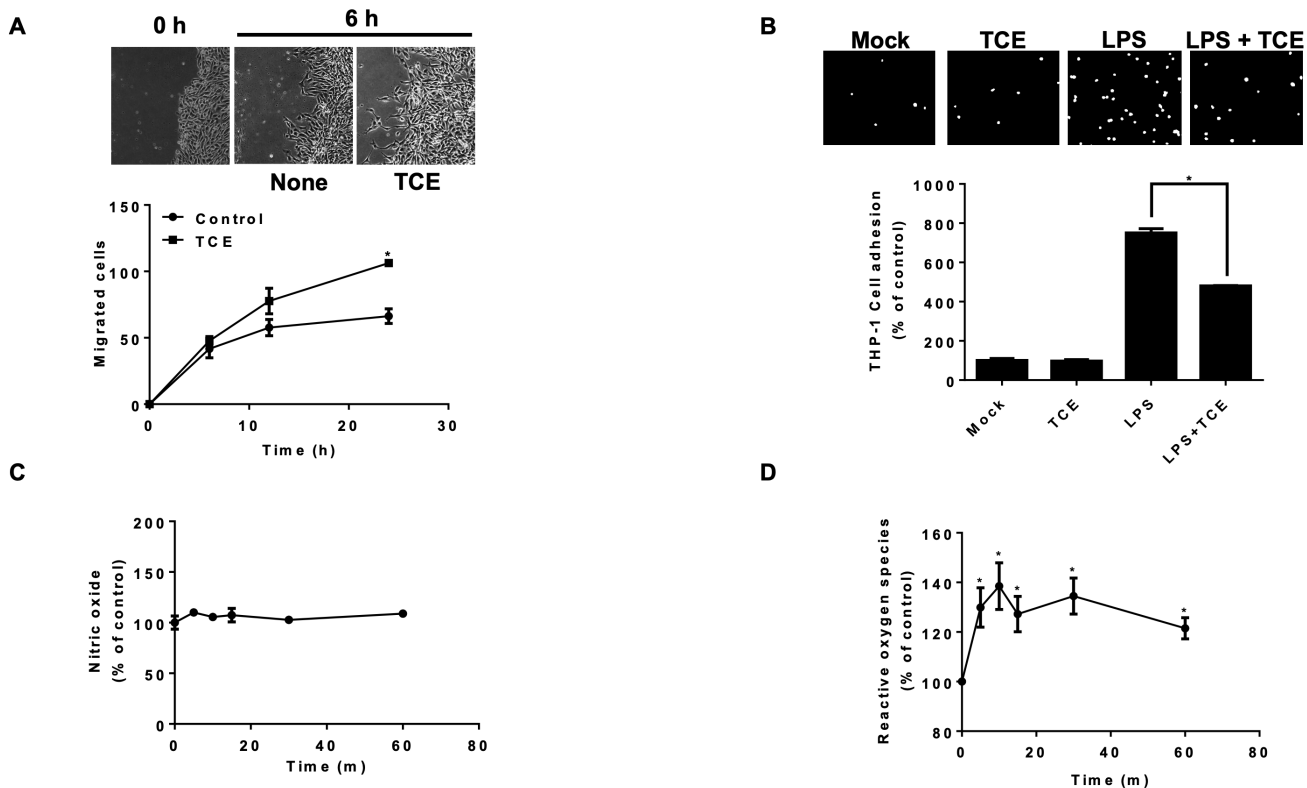


Fig. 2. *Trametes cubensis* extract (TCE) regulates cell migration, reactive oxygen species (ROS) production and lipopolysaccharide (LPS)-induced monocyte adhesion in bovine aortic endothelial cell (BAEC). (A) Confluent BAEC were serum-starved for 2 hr and scratched by a scraper. Then cells were incubated with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of TCE for up to 24 hr (0, 3, 6, 12, 24 hr). Migrated cells were observed under a microscope (top panel). In bottom panel, cell migrations were quantified and plotted as line graphs (mean $\pm$ SE, $n=3$). (B) Confluent BAEC were serum-starved for 2 hr and treated with 500 ng mL^{-1} LPS and/or 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TCE for 16 hr. THP-1 cells were stained with 5 μM Calcein AM and then aliquoted into BAEC culture dishes. Then we observed adhesive THP-1 cells under a fluorescence microscope after removing unbound THP-1 cells (top panel). In bottom panel, adhesive THP-1 cells were counted and plotted as bar graphs (mean $\pm$ SE, $n=3$). (C) Confluent BAEC were serum-starved for 2 hr and treated with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TCE for various periods of incubation time (0, 5, 10, 15, 30, 60 min). Then, cells were incubated with 5 μM diaminofluoresceins diacetate (DAF) 2-DA. Nitric oxide (NO) amounts were monitored by fluorescence (Ex: 495 nm, Em: 515 nm). (D) Confluent BAEC were serum-starved for 2 hr and treated with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TCE for various periods of incubation time (0, 5, 10, 15, 30, 60 min). Then, cells were incubated with 100 μM DCF-DA. ROS amounts were monitored by fluorescence (Ex: 485 nm, Em: 530 nm). Data were plotted as line graphs (mean $\pm$ SE, $n=3$). * $p<0.05$.

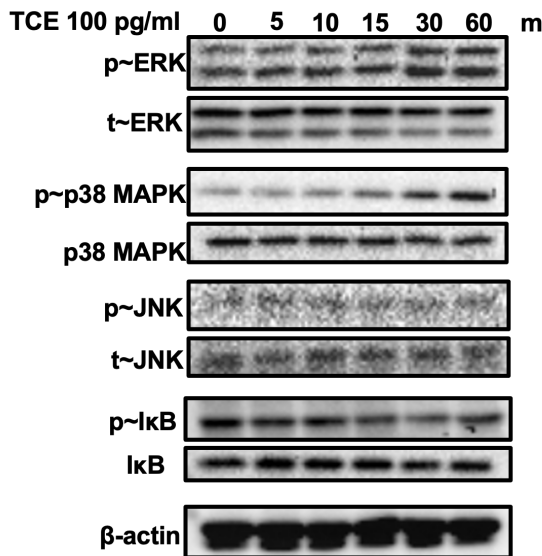
산화질소(NO)와 활성산소(ROS) 생성에 영향을 미치는 TCE효과

혈관에서 TCE의 효능을 알아보기 위해 혈관내피에서 생성되는 gasotransmitter인 NO의 양을 측정하였다. TCE를 처리한 후 NO의 양을 측정한 결과, TCE처리가 NO의 생산에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(Fig. 2C). 또한 TCE가 ROS량 변화를 유발하는 지 관찰하였다. ROS가 과도하게 생성되면 oxidative stress가 쌓이게 되면서 혈관질환을 유발할 수 있다. 그러나 소량의 ROS 생성은 건강한 혈관기능에 필요하다. 따라서 적절한 ROS 생성 조절은 혈관생리기능에 매우 중요하다. TCE에 의한 ROS 함량 변화를 측정한 결과, TCE처리가 대조군에 비하여 ROS의 양을 최대 40%까지 유의성있게 증가시키는 것을 확인하였다(Fig. 2D). 결론적으로 TCE는 NO의 생산에는 영향을 미치지 않았으나 ROS의 생산은 빠르게 증가시킴을 알 수 있었다.

TCE가 촉발하는 p38 MAPK 활성화 효과

TCE를 처리하였을 때 어떤 신호 전달 경로가 조절되는 지 알아보기 위해 다양한 신호전달 단백질들의 활성을 알아보았다. Fig. 3A를 보면 p38 MAPK의 활성이 TCE에 의해 처리시간 30분부터 유의성있게 증가하는 것을 알 수 있다. 그러나 c-Jun N-terminal kinase (JNK), I κ B- α , extracellular signal-regulating kinase (ERK)의 활성에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. Fig. 3B는 각 신호전달 물질의 활성을 정량화하여 보여준 그래프이다. p38 MAPK의 활성은 TCE 처리시간에 따라 증가하였으며, 한시간이 지나면 약 2배 가량 활성이 증가하였다.

A



B

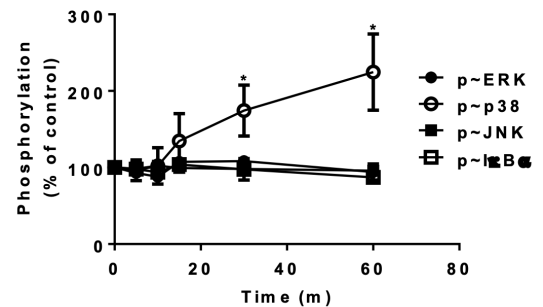


Fig. 3. *Trametes cubensis* extract (TCE) activates p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). (A) Confluent bovine aortic endothelial cell (BAEC) were serum-starved for 2 hr and treated with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TCE for 1 hr. Then cells were lysed. Proteins in cell lysates were resolved by SDS-PAGE and western-blotted with antibodies against extracellular signal-regulating kinase (ERK), p38 MAPK, SAPK/JNK, I κ B- α , and actin. (B) Bar graphs represent relative phosphorylation of ERK, p38 MAPK and JNK level (mean $\pm$ SE, n=3). * p <0.05.

p38 MAPK에 의해 조절되는 TCE의 유도 혈관생리기능

위의 결과를 종합해 보면 TCE는 p38 MAPK의 활성을 증가시켰으며 세포성장, 세포이동과 LPS에 의해 촉발된 이중세포간 부착을 감소시켰다. 따라서 세포성장, 세포이동과 이중세포부착이 p38 MAPK에 의해 조절되는 지 알아보기 위해 p38 MAPK 억제제인 SB203580을 처리하고 각각의 생리활성을 관찰하였다. Fig. 4는 SB203580을 전 처리한 후에 TCE에 의한 세포성장(Fig. 4A), 세포이동(Fig. 4B), 이중세포부착(Fig. 4C)을 관찰한 후 그 정량값들을 그래프로 나타낸 것이다. 그 결과 TCE만 처리하였을 때보다 SB203580과 TCE를 같이 처리한 세포성장상 세포이동이 유의성 있게 감소하는 것을 알 수 있었다. Fig. 4C는 LPS를 전 처리하고 TCE와 SB203580을 동시 처리한 내피세포에 THP-1 세포의 부착이 어떻게 달라지는 지 관찰한 결과이다. 흥미롭게도 SB203580이 처리된 실험군이 LPS와 TCE만을 처리한 세포보다 THP-1세포 부착이 유의성있게 증가하였다. 이 결과로 보아 TCE에 의하여 유발되는 혈관내피세포의 세포성장, 세포이동과 이중세포간 부착은 p38 MAPK에 의하여 조절되는 것임을 알 수 있었다.

TCE에 의해 촉발되는 p38 MAPK의 상부조절분자 Akt

ROS는 p38 MAPK를 활성화시키는 여러가지 요인 중의 하나이다. 따라서 ROS를 제거하고 p38 MAPK의 활성을 확인해 본다면 p38 MAPK가 ROS에 의해서 활성화되는지 알아볼 수 있다. Fig. 5A은 ROS scavenger인 NAC (N-acetyl cysteine)를 처리하고 p38 MAPK의 활성을 확인해 본 결과이다. 그림에서 보듯이 NAC만 처리하였을 때는 p38 MAPK의 활성이 거의 나타나지 않았지만 TCE 단독처리하는 p38 MAPK의 인산화 정도를 유의성 있게 증가시켰고 TCE와 NAC를 동시에 처리한 경우는 TCE 단독처리한 경우와 유의성 있는 차이를 볼 수 없었다. 따라서 ROS는 p38 MAPK의 활성화와 관련이 없는 것으로 판명되었다.

ROS이외에 p38 MAPK의 상부조절인자(upstream molecule)로 알려진 분자 중의 하나는 Akt이다[21]. 따라서 이를 확인하기 위하여 Akt의 저해제인 wortmannin (Wort)을 전처리한 후 p38 MAPK의 인산화 정도를 조사하였다. Fig. 5B에서 보듯이 Wort을 전처리하였을 때, p38 MAPK의 인산화가 증가하는 것을 관찰하였다. 이는 Akt는 p38 MAPK의 억제자임을 의미한다. 또한 TCE와 Wort를 동시 처리한 경우 p38 MAPK의 인산화가 부가적으로 더욱 증가하는 것은 Akt가 p38 MAPK의 억제자임을 지지하는 것이다. 흥미롭게도 TCE는 Akt 인산화를 억제하였다(Fig. 5C).

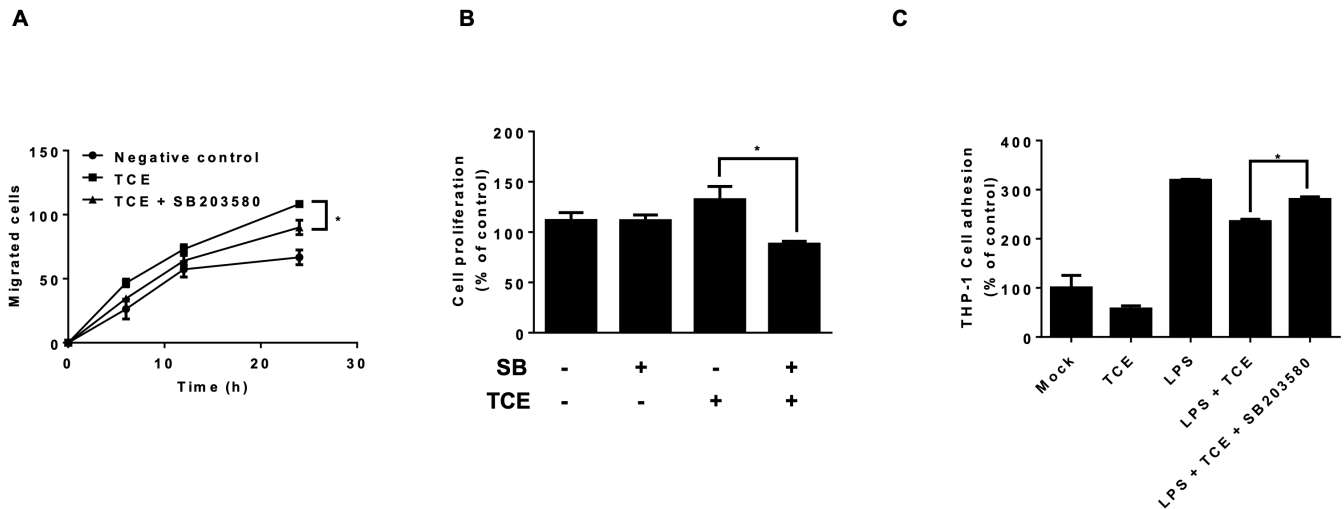


Fig. 4. *Trametes cubensis* extract (TCE)-induced cell migration, proliferation and monocyte adhesion are regulated by p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). (A) Confluent bovine aortic endothelial cell (BAEC) were serum-starved for 2 hr and treated with 100 pg mL⁻¹ of TCE and/or 10 μM SB203580 up to 24 hr (0, 3, 6, 12, 24 hr). Migrated cells were observed under microscope. Cell migrations were counted and plotted as line graphs (mean±SE, n=3). (B) Confluent BAEC were serum-starved for 2 hr and treated with 100 pg mL⁻¹ of TCE and/or 10 μM SB203580 for 24 hr. Cell proliferation was measured as previously described in Fig. 1. Cell proliferation was plotted as bar graph (mean±SE, n=3). (C) Confluent BAEC were serum-starved for 2 hr and treated with 500 ng mL⁻¹ lipopolysaccharide (LPS), 100 pg mL⁻¹ TCE or 10 μM SB203580 for 16 hr. THP-1 cells were stained with 5 μM Calcein AM and then aliquoted into BAEC culture dishes. Then we observed adhesive THP-1 cells under fluorescence microscope after removing unbound THP-1 cells. Adhesive THP-1 cells were counted and plotted as bar graphs (mean±SE, n=3). **p*<0.05.

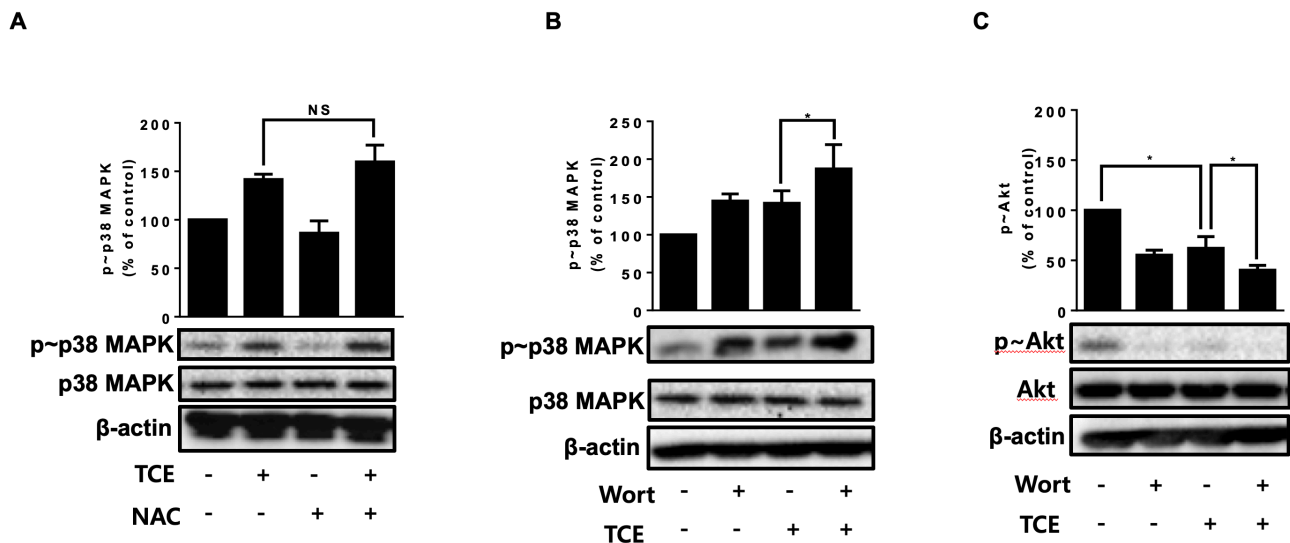


Fig. 5. p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) is not affected by reactive oxygen species (ROS), but mediated by Akt inactivation. (A) Bovine aortic endothelial cell (BAEC) were treated with 100 pg mL⁻¹ TCE for 1 hr. Then cell lysates were obtained and western-blotted with antibodies against p~p38 MAPK and actin. Quantifications were performed and data were plotted as bar graphs (mean±SE, n=3). (B) BAEC were treated with 100 pg mL⁻¹ TCE with/without 1 μM wortmannin (Wort) for 1 hr. Then cell lysates were obtained and western-blotted with antibodies against p~Akt, Akt and actin. Quantifications were performed and data were plotted as bar graphs (mean±SE, n=3). (C) BAEC were treated as described in panel B. Then cell lysates were obtained and western-blotted with antibodies against p~Akt, Akt and actin. Quantifications were performed and data were plotted as bar graphs (mean±SE, n=3). **p*<0.05.

고찰

최근에 우리나라를 포함한 동아시아 국가들에서 버섯추출물의 약리적 응용성에 관한 관심이 점점 높아지고 있다[15]. 한편, 우리나라의 기온이 아열대화 되면서 증식하는 버섯의 종류도 달라질 수 있다. 본 연구에 사용한 *Trametes cubensis* 버섯은 그러한 환경변화 때문에 국내에서 재배가 가능한 버섯으로 새로운 자원이 될 수 있다. 새로운 생물자원으로의 가치를 평가하기 위해 본 연구에서는 TCE의 혈관 내에서 어떤 기능을 갖는지를 규명하고자 하였다. 본 연구를 통해 10 pg mL^{-1} - 1 ng mL^{-1} 정도의 낮은 농도의 TCE는 혈관내피세포의 성장과 이동을 촉진시키는 것으로 나타났다. 혈관 내피세포의 성장을 촉발하게되면 혈관내피세포의 수명을 연장하여 혈관을 안정하게 유지한다[22]. 따라서 TCE는 혈관 건강을 유지시키는데 기여할 수 있을 것이다. 많은 혈관질환들이 혈관내피세포의 불안정성때문에 나타나게되는 데, 아마도 TCE는 혈관 내피세포의 수명을 늘려 혈관을 안정하게 유지시켜 혈관건강에 기여할 수 있을 것으로 추측된다. 이에 더하여 TCE를 음식물로 섭취하게되면, 혈액에서 존재하는 생리활성물질의 농도는 매우 낮게된다. 본 연구에서 나타나는 TCE의 활성농도는 1 ng mL^{-1} 이하이기 때문에 음식물로 TCE를 섭취하여도 그 활성이 나타날 수 있을 가능성이 매우 높다[23].

또한 혈관내피세포의 이동은 혈관신생에서 중요한 역할을 한다[16]. 세포이동은 세포성장 촉진효과와 함께 작용하여, 혈관이 손상을 입는 상처가 치유될 때 내피세포에서 나타나는 특성이 다[19]. 따라서 TCE의 내피세포 이동을 향상시키는 효능은 혈관이 신생되거나 혈관이 상처를 입었을 때 치유시킬 수 있는 능력이 있음을 의미한다. 또한 LPS에 의해 유도된 세포부착을 억제하는 효능은 염증반응을 억제하는 것으로 알려져 있다[17]. TCE의 세포부착 억제효과는 혈관내에서 염증반응이 발생했을 때 염증이 진행되지 못하게한다. 염증이 심화하게되면 동맥경화와 같은 염증성 혈관질환이 진행된다. 따라서 TCE의 혈구세포부착을 억제하는 효능은 또한 동맥경화의 발병을 억제하거나 예방할 가능성도 제시한다[24].

본 연구자들의 추가적인 연구에서 TCE는 산화질소의 생성에는 영향을 미치지 않지만 활성산소의 생성을 증가시키는 기능이 있으며 이는 ROS와 연관된 다양한 생리적 기능에도 TCE가 관여함을 의미한다. 적절한 농도의 ROS생성은 혈관 건강에 매우 중요하다. ROS는 혈관의 생리활성을 돕는 다양한 신호전달경로를 활성화하여 혈관을 건강하게 유지시킨다[25]. 그리고 본 연구자들은 이러한 생리학적 기능을 조절하는 핵심 신호전달 분자가 p38임을 알 수 있었다.

TCE는 Akt/p38 MAPK가 포함되는 세포 신호전달 경로를 활성화하여 세포성장과 세포이동, 그리고 이중세포간 부착을 조절한다는 것을 규명한 본 연구결과는 TCE가 작용하는 혈관기능에 관여하는 분자기전에 관한 기반지식을 제공하는 것이다. 정리하면, TCE는 혈관내피세포에서 Akt 활성화억제를 통하여 p38 MAPK를 활성화시킴으로써 세포성장과 이동을 촉진하고 단핵구 세포의 혈관내피세포 부착을 억제하는 효능이 있음을 알 수 있다(Fig. 6). 이와 같은 본 연구 결과를 통해서 TCE는 동맥경화를 포함한 심혈관계 질환의 예방과 치료, 혈관기능개선제로 개발될 가능성을 제안한다.

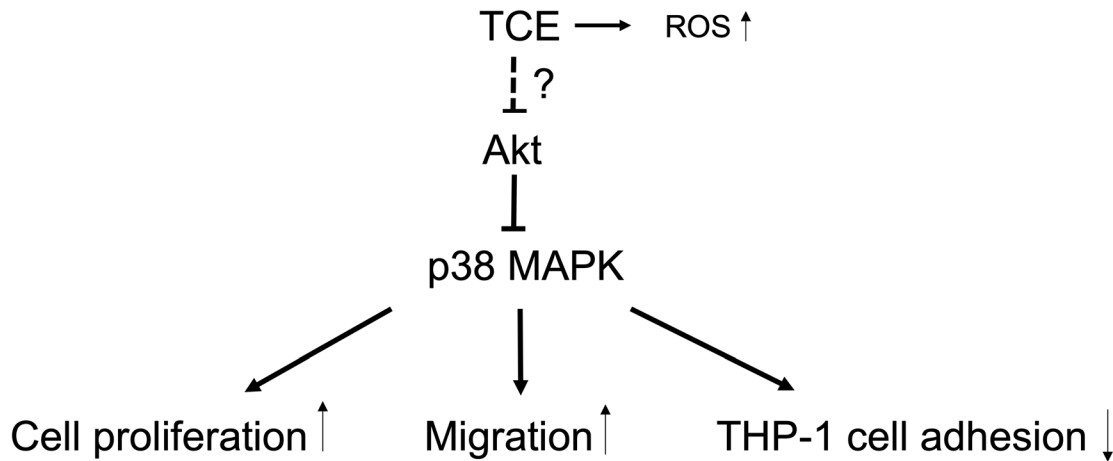


Fig. 6. Working model for vascular functions triggered by *Trametes cubensis* extract (TCE)

요약

버섯은 예로부터 암과 염증 질환의 약재로써 많이 사용되어왔다. *Trametes cubensis* 버섯종은 현재까지 많은 연구가 이루어지지 않았고, 형태학적 특성만 알려져 있고 효능에 관한 연구 보고가 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 *T. cubensis* 균사체 추출물(*Trametes cubensis* extract, TCE)의 혈관생리학적 효능을 알아보기 위해 세포와 분자수준에서의 연구를 수행하였다. 먼저 TCE를 처리하였을 때, 세포 독성은 없었고 세포성장을 촉진시켰다. 또한 세포이동이 TCE에 의해 증가하는 것을 확인하였다. 다음으로 LPS (Lipopolysaccharide)에 의해 유도된 THP-1 세포의 내피세포 부착이 TCE에 의해 억제되는 것을 확인하였다. 또한 세포신호전달 경로 분석을 한 결과, TCE에 의해 활성산소가 증가하였으며, Akt억제를 통하여 p38 MAPK가 활성화되었다. 그리고 TCE가 촉발하는 세포성장, 세포이동, 단핵구 부착 등은 p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase)에 의해 조절되었으며, 활성산소와는 관련이 없었다. 결론적으로, TCE는 세포성장, 세포이동, 단핵구 부착을 조절하였으며, 이는 TCE가 동맥경화와 같은 심혈관계 질환의 예방 및 치료제 혹은 혈관기능개선제로 개발될 가능성이 있음을 암시한다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant (PJ01328102) from National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, the Golden Seed Project program (Center for Horticultural Seed Development, No. 213007-05-3-WTH32) from the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA), Ministry of Oceans and Fisheries (MOF), Rural Development Administration (RDA) and Korea Forest Service (KFS), and the ChemBio Specialization Program (CK- II) from Dankook University.

REFERENCES

1. Aida M, Shuhaimi M, Yazid M, Maaruf AG. Mushroom as a potential source of prebiotics: A review. *Trends in Food Sci Technol* 2009;20:567-75.
2. Roy A. Studies on Indian polypores. V. Morphological and cultural characters of *Trametes cubensis*. *Can J Bot* 1982;60:1012-15.
3. Walder R, Kalvatchev Z, Garzaro D, Barrios M. 1996. *In vitro* activity of extracts from polyporaceae against human immunodeficiency virus type 1. *Phytother Res* 1996;10:497-503.
4. Kothari V, Seshadri S. *In vitro* antibacterial activity in seed extracts of *Manilkara zapota*, *Anona squamosa*, and *Tamarindus indica*. *Biol Res* 2010;43:165-8.
5. Halpern M, Raats D, Lev-Yadun S. The potential anti-herbivory role of microorganisms on plant thorns. *Plant Signaling & Behavior* 2007;2:503-4.
6. Pereina E, Barros L, Martins A, Ferreira I. Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food chem* 2012;130:394-403.
7. Abdel AM. The history, fungal biodiversity, conservation, and future perspectives for mycology in Egypt. *IMA Fungus* 2010;1:123-42.
8. Abguri DA, McElhenney WH. Extraction of total phenolic and flavonoids from edible wild and cultivated medicinal mushrooms as affected by different solvents. *J Nat Prod Plant Resour* 2013;3:37-42.
9. Dembitsky VM. Naturally occurring bioactive Cyclobutane-containing (CBC) alkaloids in fungi, fungal endophytes, and plants. *Phytomedicine* 2014;21:1559-81.
10. Valverde ME, Hernández-Pérez T, Paredes-López O. Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. *Int J Microbiol* 2015;2015:376387.
11. Volman JJ, Ramakers JD, Plat J. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiol Behav* 2008;94:276-84.
12. Mizuno M, Morimoto M, Minato K, Tsuchida H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62:434-37.
13. de Boer OJ, van der Wal AC, Becker AE. Atherosclerosis, inflammation, and infection. *J Pathol* 2000;190:237-43.
14. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 2001;104:503-16.
15. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
16. Lamalice L, Le Boeuf F, Hout J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 2007;100:782-94.
17. Díaz-González F, Sánchez-Madrid F. Inhibition of leukocyte adhesion: An alternative mechanism of action for anti-inflammatory drugs. *Immunol Today* 1998;19:169-72.
18. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436-45.
19. Elsayed EA, El Enshasy H, Wadaan MA, Aziz R. Mushrooms: A potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. *Mediators Inflamm* 2014;2014:805841.
20. Park H, Go YM, St John PL, Maland MC, Lisanti MP, Abrahamson DR, Jo H. Plasma membrane cholesterol is a key molecule in shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* 1998;273:32304-11.
21. Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* 2002;12:311-20.

22. Maier JA, Voulalas P, Roeder D, Maciag T. Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 alpha antisense oligomer. *Science* 1990;249:1570-4.
23. Cho J, Kim S, Seo J, Ahn S, Jeong E, Park H. Novel function of lycopene in vascular endothelial cell. *K J Life Sci* 2010;20:1093-99.
24. Seo Y, Park J, Choi W, Son DJ, Kim YS, Kim MK, Yoon BE, Pyee J, Hong JT, Go YM, et al. Antiatherogenic effect of resveratrol attributed to decreased expression of ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019;39:675-84.
25. Go YM, Boo YC, Park H, Maland MC, Patel R, Pritchard Jr KA, Fujio Y, Walsh K, Darley-Usmar V, Jo H. Protein kinase B/Akt activates c-Jun NH(2)-terminal kinase by increasing NO production in response to shear stress. *J Appl Physiol* 1985;91:1574-81.