

## Phorbol Ester로 유도된 COX-2의 발현에 미치는 녹차의 항산화성분 EGCG의 억제 효과와 그 분자 생물학적 작용기전

서울대학교 약학대학

나 혜 경 · 서 영 준

### Inhibitory Effects of the Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate on Phorbol Ester-Induced COX-2 Expression in Human Breast Epithelial Cells

Hye-Kyung Na and Young-Joon Surh

*Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy,  
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*

There are multiple lines of compelling evidence from epidemiologic and laboratory studies supporting that frequent consumption of green tea is inversely associated with the risk of several types of human cancer and other chronic diseases. The chemopreventive and chemoprotective effects of green tea have been attributed to its polyphenols, and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) has been recognized as a major active constituent of green tea. Abnormal upregulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) is implicated in the pathogenesis of several types of malignancies. In the present study, we have examined the effects of EGCG on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced COX-2 expression in human breast epithelial (MCF-10A) cells. EGCG inhibited TPA-induced COX-2 expression in a concentration dependent manner. EGCG inhibited activation of COX-2 promoter by TPA as determined by using pCOX-2-Luc containing the entire COX-2 promoter region. To elucidate the underlying mechanism of COX-2 down-regulation by EGCG, we examined its effects on the activation of transcriptional factors known to regulate expression of *Cox-2*. EGCG attenuated the DNA binding and transcriptional activities of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), which is one of the major transcription factors known to regulate COX-2 gene expression. EGCG blocked the TPA-induced phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  which is an inhibitory subunit of the NF- $\kappa$ B complex sequestered in the cytoplasm. EGCG also inhibited the DNA binding activity and transcriptional activity of activator protein-1 (AP-1), another transcription factor

known to regulate COX-2 expression. Likewise, DNA binding activity of C/EBP was suppressed by EGCG. Therefore, inhibition of TPA-induced COX-2 expression by EGCG is likely to be mediated by blockade of DNA binding activity of NF- $\kappa$ B, AP-1 and C/EBP in the MCF-10A cells.

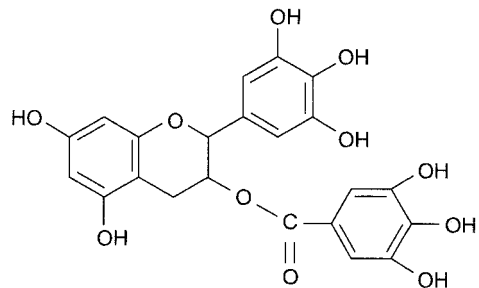
**Key Words:** (-)Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), Cyclooxygenase-2, TPA, Transcription factor, Human breast epithelial cells

## 서 론

암(cancer)은 다단계(multi-stage)로 진행되며, 크게 개시단계(initiation), 촉진단계(promotion) 그리고 진행단계(progression) 세 과정으로 구분된다. 이러한 일련의 다단계 발암과정(multi-stage carcinogenesis) 중 적어도 어느 한 과정을 억제하거나 또는 그 진행을 지연시킴으로써 암 예방을 기대할 수 있다. 최근에는 식이 또는 약용으로부터 유래하는 독성이 없는 안전한 화학물질을 이용하여 정상세포가 암세포로 전이되는 과정을 억제하는 화학적 암예방(chemoprevention)이 암연구의 새로운 전략으로 많은 관심을 받고 있다.<sup>1)</sup> 인도의 전통 생약 및 카페의 노란색소로 사용되고 있는 curcumin을 비롯한 포도껍질에 포함되어 있는 resveratrol, 고추의 매운 맛 성분인 capsaicin, 생강의 gingerol, 마늘의 allyl sulfide류, 녹차의 (-)epigallocatechin-3-gallate (EGCG), 토마토의 lycopene, 벌꿀집 성분 중 하나인 caffeic acid phenethyl ester, 배추류에 함유되어 있는 indol-3-carbinol 등은 다양한 암세포의 성장억제를 비롯한 암화과정을 억제하는 대표적 식이유래 화학적 암예방제로서 주목받고 있다.<sup>1)</sup>

여러 가지 역학연구 결과에 따르면 녹차의 섭취가 암예방을 비롯한 심장질환에 효과 있는 것으로 확인되었다.<sup>2)</sup> 녹차에는 epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), epicatechin (EC), (-)epigallocatechin-3-gallate (EGCG)와 같은 많은 폴리페놀류 화합물들이 함유되어 있다. 특히 녹차의 폴리페놀류 중 50% 이상을 차지하는 EGCG (Fig. 1)가 녹차의

대표적 생리 활성 물질로 알려져 있다.<sup>3,4)</sup> EGCG의 항산화, 항염증, 항돌연변이 및 항암작용에 대한 많은 연구 결과들이 제시되고 있다.<sup>5,6)</sup> EGCG는 세포 내에 축적되어 있는 활성산소종을 제거함으로써 세포 내 DNA 손상을 막을 뿐 아니라 실험동물을 이용한 종양모델에서 발암과정을 억제하는 것으로 보고되었다.<sup>7~11)</sup> 예를 들어 EGCG (4 mg/kg, 또는 10 mg/kg)를 랫드에 경구투여시 N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)에 의해 유도되는 랫드의 위암발생률과 종양의 수가 61%까지 감소되었다.<sup>11)</sup> 이 외에 EGCG는 다양한 암세포의 세포주기를 차단하거나, 세포사멸을 유도함으로써 암세포의 성장을 억제하며, 혈관신생을 억제함으로써 암전이를 저해한다.<sup>12~14)</sup> 최근에는 EGCG가 암세포의 telomerase 활성을 억제함으로써 암세포의 노화(senescence)와 세포사멸을 유도한다는 연구결과가 있다.<sup>15,16)</sup> EGCG의 항암효과에 대한 분자 생물학적 기전으로는 세포주기에 관련된 단백질(cyclin, cyclin dependent kinase, cdk in-



**Fig. 1.** The chemical structure of (-)epigallocatechin-3-gallate (EGCG).

hibitor), 세포사멸에 관련된 단백질(Bax, Bcl-2, p53)을 비롯한 발암촉진에 관련된 유전자(cyclooxygenase-2, ornithin decarboxylase, protein kinase C)들의 발현 조절들을 들 수 있다.<sup>17~21)</sup> 아울러 세포증식 및 염증반응에 관련된 유전자 발현을 조절하는 대표적 전사인자인 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 및 activator protein-1 (AP-1) 그리고 이들의 상위 신호전달분자로서 세포 내 신호중폭에 있어 중요한 역할을 하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)인 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK1/2), p38 MAPK, c-Jun N-terminal kinase (JNK)의 활성화도 EGCG에 의해 조절되는 것으로 보고되었다.<sup>22~25)</sup> 또한 EGCG는 matrix metalloprotease-9 (MMP-9)의 분비 및 focal adhesion kinase (FAK)의 tyrosine phosphorylation을 억제함으로써 암전이를 억제하였다.<sup>26)</sup>

발암 과정 중 종양 촉진 단계시 수반되는 염증 (inflammation)과정에는 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$ 와 같은 proinflammatory cytokine의 생성 및 프로스타그란딘 생합성에 관여하는 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현 증가가 종종 관찰된다.<sup>27,28)</sup> 많은 실험적, 역학적 조사결과에 따르면 비정상적인 COX-2의 발현증가가 세포의 증식을 유도하며, 암세포의 아포토시스를 통한 세포사멸에 저항성을 갖게 하며, 혈관신생(angiogenesis) 및 침윤과정(invasion)을 촉진함으로써 세포의 악성종양화에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>29~31)</sup> 즉 COX-2는 염증발현을 물론 암을 비롯한 각종 퇴행성 질환의 병리학적 현상의 발현 및 진행과정에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>32,33)</sup> 이런 맥락에서 COX-2의 부적절한 과다 발현유도를 억제하는 것이 화학적 암예방에 있어 상당히 효과적이고 실리적인 방법으로 여겨지고 있으며, 암예방 후보 물질을 검색하거나 이들의 작용 기전을 규명하는데, COX-2가 중요한 분자적 지표로 사용되고 있다.<sup>34)</sup>

본 연구에서는 EGCG의 종양촉진 억제효과에 대한 분자적 기전을 규명하고자 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)에 의해 유도되는 COX-2 발현과 관여하는 세포 내 신호전달 체계에 미치는 EGCG의 효과를 인체유방 상피세포(MCF-10A)를 이용하여 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 1) 실험재료

EGCG는 Wako Pure Chemical Industries (Japan)에서 구입하였으며, TPA는 Alexis Chemical Industries (San Diego, C.A, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 nutrient (DMEM/F12), L-glutamine, horse serum, penicillin/streptomycin/fungizone mixture는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서, COX-2 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, C.A. USA)에서, ECL chemiluminescent detection reagent와 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP는 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL)에서 각각 구입하여 사용하였다. TPA와 EGCG 용매로 사용한 dimethyl sulfoxide 그리고 actin 항체는 Sigma에서 구입하였다. pGL2 기본 벡터에 인체 COX-2 프로모터와 luciferase 유전자가 연결된 pCOX-2-Luc은 Dr. H. Inoue (National Cardiovascular Center Research, Japan)로부터, NF- $\kappa$ B와 AP-1 binding element에 luciferase 유전자가 결합한 pNF- $\kappa$ B-Luc과 pAP-1-Luc은 각각 김영미 교수(울산대학교 의과대학)와 권택규 교수(계명대학교 의과대학)로부터 공급받았다.

### 2) 세포 배양

인체유방상피세포(MCF-10A)는 DMEM/F-12, 10  $\mu$ g/ml insulin (bovine), 100 ng/ml cholera toxin, 0.5  $\mu$ g/ml hydrocortisone, 20 ng/ml recombinant human epidermal growth factor (rhEGF), 200  $\mu$ M L-glutamine, 100  $\mu$ g/ml penicillin/streptomycin/fungizone mixture, 5% horse serum이 함유된 배지상에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다.

### 3) Western blot analysis

MCF-10A 세포( $2 \times 10^5$  cells/ml)를 6-well plate에 2 ml씩 깔고, 90~100%의 confluency가 될 때까지 배양 후 TPA (10 nM)를 단독 또는 다양한 농도의 EGCG와 함께 4시간 동안 처리하였다. 이후 약물을 처리한 MCF-10A 세포를 차가운 PBS buffer로 2~3번 세척하였으며, 100  $\mu$ l lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM

EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin)로 얼음에서 20분간 lysis 시킨 다음,  $12,000\times g$ 에서 15분간 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 단백질 함량은 BCA reagent (Pierce, IL, USA)로 정량하였으며, 30  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 12.5% SDS-PAGE에서 전기영동한 후 PVDF membrane (Gelman Sciences)에 transfer하였다. Membrane은 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)로 blocking 시킨 다음 3% fat-free dry milk-PBST에 희석된 COX-2 항체로 2시간 동안 반응시켰다. Membrane을 PBST 용액으로 5분간 3회 세척한 후 3% fat-free dry milk-PBST에 희석한 horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody로 1시간 동안 반응시켰다. PBST 용액으로 5분간 3회 세척한 후 enhanced chemiluminescence detection reagent (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech., Arlington Heights, IL, USA)로 1분간 반응한 뒤 x-ray 필름에 노출시켰다.

#### 4) 핵단백질의 분리

MCF-10A 세포( $5\times 10^6$  cells/ml)를 100 mm plate에 배양하여 TPA (10 nM) 단독 또는 EGCG와 함께 2시간 동안 배양하였다. 약물을 처리한 MCF-10A 세포는 차가운 PBS로 3번 정도 세척한 후 스크래퍼를 사용하여 세포를 긁은 후  $11\times g$ 에서 5분간 원심분리하여 수확하였다. 수확한 세포에 200  $\mu\text{l}$  lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.8, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF)를 넣고 얼음에 15분간 나둔 후  $12,000\times g$ 에서 원심분리하여 cytosol 분획을 얻었다. 여기에서 얻어진 pellet에 50  $\mu\text{l}$  Buffer C (30 mM HEPES, pH 7.8, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 450 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.3 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10% (v/v) glycerol, 0.1% Nonidet P-40)를 넣어 pellet를 suspension한 후 20분간 얼음에 방치하였다.  $12,000\times g$ 에서 15분간 원심분리 후 핵 단백질을 얻어  $-70^\circ\text{C}$ 에 보존하였다.

#### 5) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

핵 단백질(5~10  $\mu\text{g}$ )에 Buffer C (30 mM HEPES, pH 7.8, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 450 mM NaCl, 1

mM DTT, 0.3 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10% (v/v) glycerol)를 넣어 90  $\mu\text{l}$ 가 되게 한 다음, 85  $\mu\text{l}$  Buffer D (30 mM HEPES, pH 7.8, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 0.3 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10% (v/v) glycerol)와 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  poly (dI-dC)를 넣어 실온에서 30분 동안 방치하였다. 사용한 probe는 5 pmole의 NF- $\kappa$ B, AP-1, C/EBP oligonucleotide (Promega, Madison, USA)에 polynucleotide kinase (Takara, Japan)와 [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP를 넣어  $37^\circ\text{C}$ 에서 40분간 end-labeled 시킨 다음 Nick spin column (Amersham Pharmacia Biotech. Buckinghamshire, UK)을 이용하여 정제하여 사용하였다. 정제한 100,000 cpm 상당의  $^{32}\text{P}$ -end labeled-double strand-oligonucleotides를 반응액에 혼합하여 30분간 상온에서 반응시켰으며, 2  $\mu\text{l}$  0.1% bromophenol blue를 첨가하여 6% nondenaturing polyacrylamide 상에서 DNA-protein complex를 분리하였다. 분리 후 gel dryer를 이용하여 gel을 건조시켰다. Competition assay를 위해 10~100배 정도 더 많은 양의 oligonucleotide를 반응액에 먼저 넣어 반응시킨 다음  $^{32}\text{P}$ -end labeled-double strand-oligonucleotides을 넣었다.

#### 6) Transfection과 Luciferase assay

각각의 플라스미드 DNA는 Jetstar 2.0 (Genomed, Korea)을 이용하여 제조회사의 방법에 따라 분리하였다. MCF-10A 세포( $2\times 10^5$  cells/ml)를 6-well plate에 배양한 후 각각의 DNA를 DOTAP (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) liposomal transfection kit를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 transient transfection시켰다. 이때 transfection의 효율을 알기 위해  $\beta$ -galactosidase 플라스미드도 함께 transfection하였다. Transfection 16시간 이후 해당 약물을 4시간 정도 처리하였으며, 70  $\mu\text{l}$  reporter lysis buffer (Promega Co., Madison, USA)로 세포를 lysis 시킨 후  $12,000\times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 15분간 원심분리하여 상등액을 취해  $-70^\circ\text{C}$ 에 저장하였다. Luciferase activity는 4  $\mu\text{l}$  시료에 20  $\mu\text{l}$  luciferase assay reagent (Promega Co., Madison, USA)를 실온에서 혼합한 후 즉시 luminometer (AutoLumat LB 953, EG & G Berthold, Bad Wildbad, Germany)에서 측정하였다. Galactosidase

activity 측정을 위해 50  $\mu$ l 시료에 50  $\mu$ l 2X  $\beta$ -galactosidase assay buffer (Promega Co., Madison, USA)를 혼합하여 37°C에서 30분 내지 3시간 동안 반응시킨 후 166  $\mu$ l의 1 M sodium carbonate로 반응을 종결시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Luciferase activity는  $\beta$ -galactosidase 값으로 보정한 후 표시하였다.

7) 통계처리

통계처리는 Student's *t*-test를 사용하여 실시하였으며  $P < 0.05$ 는 통계적 유의성의 지표로 사용하였다.

결 과

1) TPA에 의해 유도된 COX-2의 발현에 대한 EGCG의 영향

인체유방 상피세포에 TPA (10 nM) 처리시 COX-2의 발현이 유도되었으며, EGCG (5~100  $\mu$ M)가 TPA에 의해 유도된 COX-2의 발현을 농도 의존적으로 억제함을 Western blot analysis를 통해 확인하였다(Fig. 2). 특히 100  $\mu$ M EGCG에 의해 TPA로 유도된 COX-2의 발현이 거의 완전히 억제되었다.

2) TPA에 의해 유도된 COX-2 promoter 활성화에 대한 EGCG의 효과

유전자의 발현 조절은 일반적으로 표적 유전자의 promoter에 전사인자들이 결합함으로써 가능하게 된다. 특정 유전자의 발현 조절에는 여러 가지 전사인자의 활성화가 관여한다. TPA가 COX-2의 promoter 활성화를 통해 COX-2의 발현을 유도하는지 확인하기 위해 pCOX-2-Luc를 transient하게

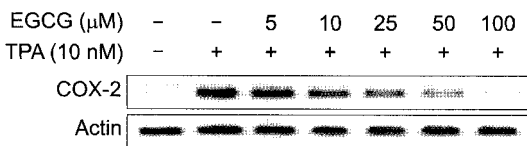


Fig. 2. Inhibitory effects of EGCG on TPA-induced COX-2 expression in MCF-10A cells. MCF-10A cells were treated with indicated concentrations of EGCG in the presence or absence of TPA (10 nM) for 4 h.

transfection한 MCF-10A 세포에 TPA 또는 TPA와 EGCG를 동시처리한 후 luciferase 활성을 측정하였다. TPA는 COX-2의 promoter 활성화를 유도하였으며, EGCG가 TPA에 의해 활성화된 COX-2의 transcriptional activity를 억제함을 확인하였다(Fig. 3).

3) 다양한 전사인자에 대한 EGCG의 영향

COX-2의 promoter에는 NF- $\kappa$ B, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP), cAMP response element binding (CREB)를 비롯한 다양한 전사인자가 결합할 수 있는 element가 존재하는데, 이들 3개의 전사인자는 COX-2의 발현을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>35)</sup> MCF-10A세포에서 TPA에 의해 활성화되는 전사인자가 무엇인지 알아보기 위해 주요전사인자에 대해 EMSA와 transient transfection을 실시하였다.

NF- $\kappa$ B는 암에 관련된 유전자의 발현을 담당하는 inducible transcription factor 뿐만 아니라 COX-2의 발현을 조절하는 대표적인 전사인자로 알려져 있다.<sup>36~38)</sup> 전사인자인 NF- $\kappa$ B는 Rel protein의 종류인 Rel A (p65), c-Rel, Rel B, NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B2 (p52/100)가 homodimer 또는 he-

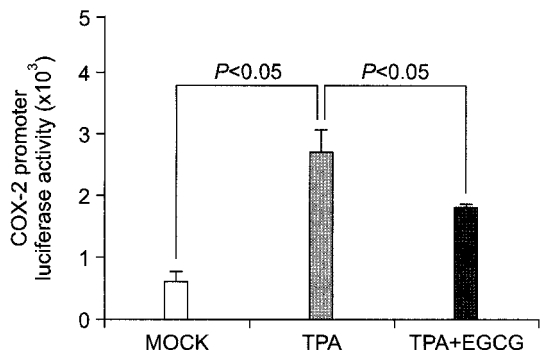
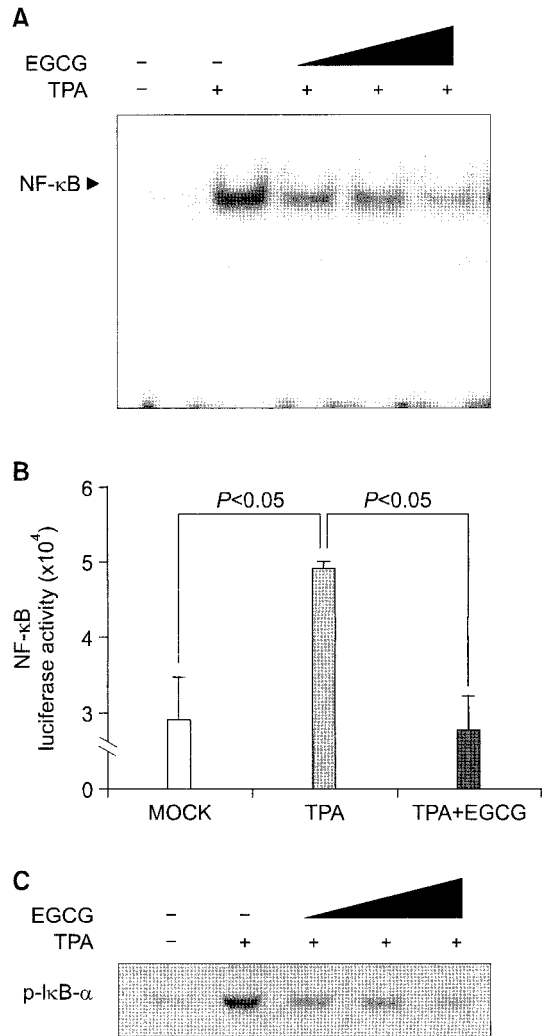


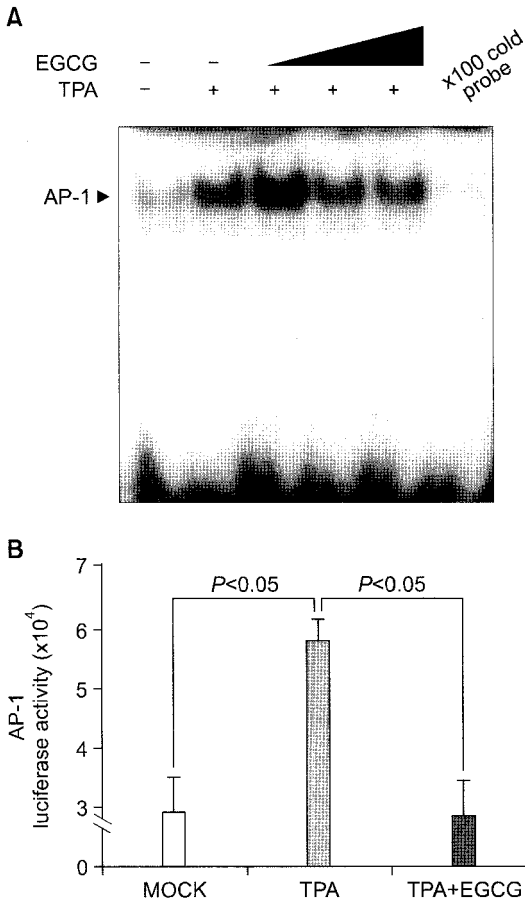
Fig. 3. Effects of EGCG on TPA-induced activation of COX-2 promoter. MCF-10A cells were transfected with a total 2.5  $\mu$ g of COX-2 promoter construct and pGL2-basic control vector together with pCMV3.0- $\beta$ -galactosidase vector (0.5  $\mu$ g). After transfection, the cells were treated with TPA (10 nM) in the presence or absence of EGCG (100  $\mu$ M) for 4 h. The COX-2 promoter activity was assessed by the luciferase activity and was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity.

terodimer를 이루면서 I $\kappa$ B라는 inhibitory protein에 의해 세포질 내에 inactive한 상태로 존재한다.<sup>39)</sup> 다양한 자극(UV, TPA, 다양한 cytokine 등)에 의해 활성화된 I $\kappa$ B kinase (IKK)에 의해 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 serine 잔기가 인산화됨으로써 NF- $\kappa$ B는 I $\kappa$ B- $\alpha$ 로부터 떨어져 나간다.<sup>40)</sup> 인산화된 I $\kappa$ B- $\alpha$ 는 ubiquitin-conjugating enzyme cascade를 통해 ubiquitination이 된 후 proteosome에 의해 분해 된다. 결국 inhibitory protein인 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 이탈로 남아있는 NF- $\kappa$ B는 세포질에서 핵 내로 이동하여 COX-2 promoter에 위치하는 NF- $\kappa$ B binding site에 결합함으로써 COX-2의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.<sup>41)</sup> MCF-10A 세포에서 TPA에 의해 NF- $\kappa$ B의 DNA binding activity와 transcriptional activity가 증가함을 확인하였으며, EGCG는 TPA에 의해 활성화된 NF- $\kappa$ B의 전사활성을 억제하였다(Fig. 4A, 4B). I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화는 NF- $\kappa$ B의 활성화과정에 있어 필수적이다. EGCG에 의한 NF- $\kappa$ B의 DNA binding 억제가 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화 억제와 관련 있는지를 알아보하고자 cytosol 분획에서 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화 정도를 Western blot analysis를 통해 확인하였다. TPA가 I $\kappa$ B- $\alpha$ 를 인산화 하였으며, EGCG가 TPA에 의한 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화를 억제하였다(Fig. 4C). 위의 결과로부터 EGCG에 의한 NF- $\kappa$ B의 DNA binding 억제는 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화 억제를 통해 이루어짐을 알 수 있다.

또 다른 대표적 전사인자인 AP-1 또한 세포증식 및 분화 유도에 관련된 유전자 발현 조절에 중요한 역할을 수행한다. NF- $\kappa$ B와 마찬가지로 AP-1도 growth factor, cytokines, UV irradiation 등에 의해 활성화 되며, COX-2의 발현 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>42)</sup> Subbaramaiah 등<sup>43)</sup>의 보고에 의하면 TPA에 의해 활성화된 AP-1은 COX-2의 프로모터에 존재하는 CRE site를 경유하여 COX-2의 발현을 조절한다고 하였다. MCF-10A 세포에서도 TPA가 AP-1의 DNA binding activity를 증가하였으며(Fig. 5A), 또한 pAP-1-Luc를 transient하게 transfection 한 MCF-10A 세포에서 TPA에 의해 AP-1의 transcriptional activity가 증가함을 확인할 수 있었다. 그러나 EGCG 처리로 TPA에 의해 활성화된 AP-1의 DNA binding activity와 transcriptional activity가 현저히 억제되



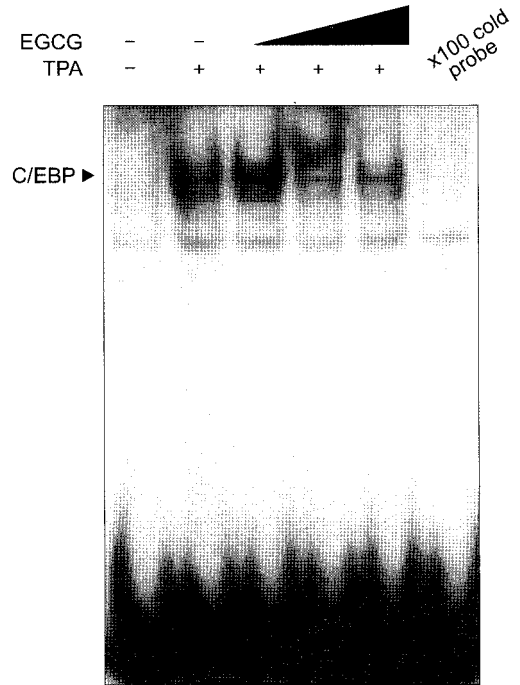
**Fig. 4.** Effects of EGCG on TPA-induced NF- $\kappa$ B activation. (A) Electrophoretic mobility shift assay was performed using the consensus NF- $\kappa$ B oligonucleotide labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP with nuclear extracts of MCF-10A cells treated with TPA in the presence or absence of EGCG (5, 25, 100  $\mu$ M) for 2 h. (B) Luciferase assay using pELAM-Luc containing the NF- $\kappa$ B binding site construct ligated with luciferase gene. After transfection with plasmid, MCF-10A cells were treated with TPA (10 nM) in the presence or absence of EGCG (100  $\mu$ M) for 4 h. (C) Western blot analysis against phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  in the cytosol fraction of MCF-10A cells treated with TPA (10 nM) in the presence or absence of EGCG (5, 25, 100  $\mu$ M) for 2 h.



**Fig. 5.** Effect of EGCG on TPA-induced AP-1 activation. (A) Electrophoretic mobility shift assay was performed using the consensus AP-1 oligonucleotide labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP with nuclear extracts of MCF-10A cells treated with 10 nM TPA in the presence or absence of EGCG (5, 25, 100  $\mu$ M) for 2 h. (B) Luciferase assay using pELAM-Luc harbouring AP-1 binding site construct ligated with luciferase gene. After transfection with plasmid, MCF-10A cells were treated with TPA in the presence or absence of EGCG (100  $\mu$ M) for 4 h.

었다(Fig. 5B). 또한 과량의 cold oligonucleotide에 의해 TPA에 의해 활성화된 AP-1의 DNA binding activity가 억제됨을 확인하였다(Fig. 5B).

NK- $\kappa$ B와 AP-1 이외에도 TPA와 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도되는 COX-2의 발현 조절에는 C/EBP 전사인자가 관여하는 것으로 보고되었다.<sup>44)</sup> C/EBP에는 C/EBP  $\alpha$ , C/EBP  $\beta$  그리고 C/



**Fig. 6.** Effect of EGCG on TPA-induced C/EBP DNA binding activity. Electrophoretic mobility shift assay was performed using the consensus C/EBP oligonucleotide labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP with nuclear extracts of MCF-10A cells treated with TPA (10 nM) in the presence or absence of EGCG (5, 25, 100  $\mu$ M) for 2 h.

EBP  $\delta$  등 3가지 이성질체가 존재하며 세포의 종류에 따라 COX-2 발현 조절에 서로 다른 C/EBP의 이성질체가 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>45)</sup> 본 실험에서 TPA 처리에 의해 C/EBP의 DNA binding activity가 증가되었으며, 이를 EGCG가 농도 의존적으로 억제함을 EMSA를 통해 확인하였다(Fig. 6). 또한 과량의 cold oligonucleotide에 의해 TPA에 의해 활성화된 C/EBP의 DNA binding activity가 억제되었다(Fig. 6).

위의 결과를 종합해 볼 때 EGCG에 의한 COX-2의 발현 억제는 NF- $\kappa$ B를 비롯한 AP-1과 C/EBP의 전사인자 활성 억제가 관여함을 알 수 있다.

## 고 찰

최근 식이 또는 약초에 함유되어 있는 다양한

폐놀성 화합물들은 강력한 항산화, 항염증작용이 있으며, 이런 특성으로 인해 식이유래 화합물들이 항돌연변이, 항암효과를 갖는다고 보고되었다.<sup>46)</sup> 특히 식이유래 화합물이 직접, 간접적으로 암을 비롯한 인간의 만성질병에 있어서 중요한 역할을 하는 유전자의 구조 및 발현 변화를 초래할 수 있음도 밝혀지게 되었다.<sup>47)</sup> 이런 맥락에서 식이와 세포/유전자와의 상호 관련성을 규명하는 영양유전체학(nutrigenomics)의 중요성이 그 어느 때보다 부각되고 있다. 영양 유전체학의 한 가지 중심분야로서 각종 발암억제 식이화합물들이 어떻게 발암과정의 특정단계를 저해, 조절하며 이들의 생체 내의 표적물질을 다양한 분자생물학적 지표를 이용하여 규명하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

이중 COX-2는 암예방효과가 탁월한 화학적 암 예방제를 검색하고 그 기전 연구를 규명하는데 중요한 분자 지표로 사용되고 있다.<sup>34)</sup> Chun 등<sup>38)</sup>은 curcumin이 TPA에 의해 활성화되는 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해와 NF- $\kappa$ B의 subunit 중 하나인 p65의 핵내로의 이행(translocation) 및 DNA binding activity 억제함으로써 TPA에 의해 유도된 COX-2의 발현 저해를 마우스 피부암 모델에서 보여주었다. 또한 이 연구에서는 curcumin에 의한 NF- $\kappa$ B의 DNA binding activity 억제가 NF- $\kappa$ B의 상위 신호전달 분자인 MAPKs 중 하나인 ERK1/2의 활성화 억제를 통해 이루어짐을 제시하였다. Banerjee 등<sup>48)</sup>은 resveratrol에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화억제와 COX-2를 비롯한 침윤에 관련된 단백질인 MMP-9 발현 억제가 7,12-dimethylbenz[a] anthracene에 의해 유도된 유방암 억제와 관련되는 것으로 보고하였다. Murakami 등<sup>49)</sup>도 resveratrol이 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 억제하여 LPS 또는 interferon- $\gamma$ 에 의해 유도된 COX-2 발현을 억제한다고 보고하였다. Li 등<sup>11)</sup>에 따르면 EGCG 또한 NMBA로 유도한 esophageal 발암모델에서 종양의 수를 억제하였으며, 이러한 EGCG의 발암억제 효과는 COX-2의 발현 및 PGE2의 생성 억제, 그리고 cyclin D1의 발현 억제와 관련 있을 것으로 제시하였다. Kundu 등<sup>50)</sup>은 EGCG가 TPA에 의해 유도된 ERK1/2의 활성 억제를 통해 COX-2의 발현을 억제한다고 보고하였다. EGCG가 인체피부상피세포인 HaCaT세포에서 free radical을 생성하는 2,2'-azobis(2-amidino-propane)

dihydrochloride에 의해 유도되는 COX-2의 발현을 p38 MAPK와 ERK1/2 활성화억제를 통해 억제함이 발표되었다.<sup>23)</sup> 또한 EGCG는 AP-1과 NF- $\kappa$ B의 활성을 차단함으로써 TPA에 의한 마우스 상피세포 JB6의 악성세포로의 형질변환을 억제하였다.<sup>51)</sup> 이 연구에 따르면 EGCG가 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 Ser32부분의 인산화를 억제함으로써 NF- $\kappa$ B의 활성을 현저히 억제하는 것으로 확인되었다. 위의 결과들을 종합해 볼 때 EGCG의 항암효과는 세포의 항상성 유지 및 세포의 증식/발암과정에 관련된 유전자들의 발현 조절에 가장 중심적인 역할을 하는 구성요소인 NF- $\kappa$ B와 AP-1 그리고 이들 상위 신호전달 분자인 ERK1/2, p38 MAPK, JNK와 같은 MAPKs의 활성 억제를 통해 나타남을 알 수 있다. 이미 이들 신호전달 물질들이 COX-2의 발현을 조절하는 중요한 인자임은 여러 보고를 통해 제시된 바 있다.

본 연구에서는 인체유방상피세포에서 EGCG가 COX-2의 발현을 조절하는 대표적인 전사인자인 NF- $\kappa$ B, AP-1 및 C/EBP의 활성 억제를 통해 TPA에 의해 유도된 COX-2의 발현을 억제함을 제시하였다. EGCG에 의해 억제된 다양한 전사인자의 활성억제에 MAPKs가 관여하는지에 대한 구체적인 실험은 현재 진행 중이다.

또한 본 실험에서는 흥미롭게도 EGCG에 의해 TPA로 유도되는 COX-2의 발현이 억제되는 농도에서 대표적 항산화효소인 heme oxygenase-1 (HO-1)의 발현이 유도되는 것도 관찰되었다(Na HK and Surh YJ, unpublished observation). HO-1은 heme을 carbon monoxide (CO), bilirubin과 free iron으로 전환하는데 관여하는 효소로서, HO-1의 생성물인 carbon monoxide가 IL-1 $\beta$ 과 같은 다양한 cytokine의 생성을 억제함이 보고된 바 있다.<sup>52)</sup> Human femoral endothelial cells에서 angiotensin II에 의해 유도된 COX-2의 발현이 HO-1의 inducer인 SnCl<sub>2</sub>에 의해 억제되는 반면에 HO-1 억제제인 ZnDPP에 의해 오히려 발현이 증가됨이 보고되었다.<sup>53)</sup> 또한 SnCl<sub>2</sub>를 rat kidney에 처리하였을 때 조직 특이적으로 COX-2의 발현과 활성이 억제되었다.<sup>54)</sup> 한편 COX-2의 선택적인 억제제인 SC58125에 의해 HO-1의 발현이 더 많이 유도되었다.<sup>55)</sup> 이러한 보고들을 종합해 볼 때 COX-2의 발현과 HO-1



발현에는 서로 상반된 조절기전이 존재하며, 이는 기존에 보고된 바와는 다른 COX-2 억제에 대한 새로운 기전으로 제시될 수 있으리라 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단에서 지원하는 젊은 과학자 연구활동 지원사업 및 2004년도 서울대학교 종합약학연구소 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

- 1) Surh YJ. Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals. *Nature Rev Cancer* 2003; 3: 768-780.
- 2) Yang CS, Landau JM. Effects of tea consumption on nutrition and health. *J Nutr* 2000; 130: 2409-2412.
- 3) Mukhtar H, Ahmad N. Green tea in chemoprevention of cancer. *Toxicol Sci* 1999; 52: 111-117.
- 4) Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Sueoka E, Matsuyama S, Imai K, Nakachi K, Fujiki H. Green tea and cancer chemoprevention. *Mutat Res* 1999; 428: 339-344.
- 5) Fujiki H. Two stages of cancer prevention with green tea. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 589-597.
- 6) Kuroda Y, Hara Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat Res* 1999; 436: 69-97.
- 7) Sugisawa A, Kimura M, Fenech M, Umegaki K. Anti-genotoxic effects of tea catechins against reactive oxygen species in human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 2004; 559: 97-103.
- 8) Kavanagh KT, Hafer LJ, Kim DW, Mann KK, Sherr DH, Rogers AE, Sonenshein GE. Green tea extracts decrease carcinogen-induced mammary tumor burden in rats and rate of breast cancer cell proliferation in culture. *J Cell Biochem* 2001; 82: 387-398.
- 9) Li ZG, Shimada Y, Sato F, Maeda M, Itami A, Kaganoi J, Komoto I, Kawabe A, Imamura M. Promotion effects of hot water on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats. *Oncol Rep* 2003; 10: 421-426.
- 10) Mimoto J, Kiura K, Matsuo K, Yoshino T, Takata I, Ueoka H, Kataoka M, Harada M. (-)-Epigallocatechin gallate can prevent cisplatin-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Carcinogenesis* 2000; 21: 915-919.
- 11) Li ZG, Shimada Y, Sato F, Maeda M, Itami A, Kaganoi J, Komoto I, Kawabe A, Imamura M. Inhibitory effects of epigallocatechin-3-gallate on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats. *Int J Oncol* 2002; 21: 1275-1283.
- 12) Liang YC, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem* 1999; 75: 1-12.
- 13) Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor  $\kappa$ -B and induction of apoptosis. *Oncogene* 2004; 23: 2507-2522.
- 14) Jung YD, Ellis LM. Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *Int J Exp Pathol* 2001; 82: 309-316.
- 15) Naasani I, Seimiya H, Tsuruo T. Telomerase inhibition, telomere shortening, and senescence of cancer cells by tea catechins. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249: 391-396.
- 16) Mittal A, Pate MS, Wylie RC, Tollefsbol TO, Katiyar SK. EGCG down-regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to suppression of cell viability and induction of apoptosis. *Int J Oncol* 2004; 24: 703-710.
- 17) Ahmad N, Cheng P, Mukhtar H. Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 328-334.
- 18) Chung JH, Han JH, Hwang EJ, Seo JY, Cho KH, Kim KH, Youn JI, Eun HC. Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes. *FASEB J* 2003; 17: 1913-1915.
- 19) Hastak K, Gupta S, Ahmad N, Agarwal MK, Agarwal ML, Mukhtar H. Role of p53 and NF- $\kappa$ B in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene* 2003; 22: 4851-4859.
- 20) Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 $\beta$ -induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1097-1105.
- 21) Levites Y, Amit T, Youdim MB, Mandel S. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/

- cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *J Biol Chem* 2002; 277: 30574-30580.
- 22) Chung JY, Park JO, Phyu H, Dong Z, Yang CS. Mechanisms of inhibition of the Ras-MAP kinase signaling pathway in 30.7b Ras 12 cells by tea polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate and theaflavin-3, 3'-digallate. *FASEB J* 2001; 15: 2022-2024.
  - 23) Cui Y, Kim DS, Park SH, Yoon JA, Kim SK, Kwon SB, Park KC. Involvement of ERK and p38 MAP kinase in AAPH-induced COX-2 expression in HaCaT cells. *Chem Phys Lipids* 2004; 129: 43-52.
  - 24) Vayalil PK, Katiyar SK. Treatment of epigallocatechin-3-gallate inhibits matrix metalloproteinases-2 and -9 via inhibition of activation of mitogen-activated protein kinases, c-jun and NF- $\kappa$ B in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Prostate* 2004; 59: 33-42.
  - 25) Chen NY, Ma WY, Yang CS, Dong Z. Inhibition of arsenite-induced apoptosis and AP-1 activity by epigallocatechin-3-gallate and theaflavins. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19: 287-295.
  - 26) Liu JD, Chen SH, Lin CL, Tsai SH, Liang YC. Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (-)-epigallocatechin-3-gallate and dacarbazine in mice. *J Cell Biochem* 2001; 83: 631-642.
  - 27) Maihofner C, Charalambous MP, Bhambra U, Lightfoot T, Geisslinger G, Gooderham NJ; Colorectal Cancer Group. Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and NF- $\kappa$ B in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2003; 24: 665-671.
  - 28) DuBois RN, Awad J, Morrow J, 2nd Roberts LJ, Bishop PR. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor- $\alpha$  and phorbol ester. *J Clin Invest* 1994; 93: 493-498.
  - 29) Yamada R, Ogita S. Association between overexpression of cyclooxygenase-2 and suppression of apoptosis in advanced cancer of the uterine cervix after cyclic balloon-occluded arterial infusion. *Oncol Rep* 2001; 8: 1259-1263.
  - 30) Mohammed SI, Knapp DW, Bostwick DG, Foster RS, Khan KN, Masferrer JL, Woerner BM, Snyder PW, Koki AT. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder. *Cancer Res* 1999; 59: 5647-5550.
  - 31) Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddì V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterol* 2001; 121: 1339-1347.
  - 32) Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, Mitchell JA. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002; 21: 93-101.
  - 33) Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1999; 59: 991-994.
  - 34) Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat Res* 2001; 480-481: 243-268.
  - 35) Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 95-114.
  - 36) Charalambous MP, Maihofner C, Bhambra U, Lightfoot T, Gooderham NJ; Colorectal Cancer Study Group. Upregulation of cyclooxygenase-2 is accompanied by increased expression of nuclear factor- $\kappa$ B and I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  in human colorectal cancer epithelial cells. *Br J Cancer* 2003; 88: 1598-1604.
  - 37) Chun KS, Cha HH, Shin JW, Na HK, Park KK, Chung WY, Surh YJ. Nitric oxide induces expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through activation of NF- $\kappa$ B. *Carcinogenesis* 2004; 25: 445-454.
  - 38) Chun KS, Keum YS, Han SS, Song YS, Kim SH, Surh YJ. Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF- $\kappa$ B activation. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1515-1524.
  - 39) Baldwin AS Jr. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-683.
  - 40) Karin M. The beginning of the end: I $\kappa$ B kinase (IKK) and NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 27339-27342.
  - 41) Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853-6866.
  - 42) Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem* 2002; 277: 18649-18657.

- 43) Subbaramaiah K, Cole PA, Dannenberg AJ. Retinoids and carnosol suppress cyclooxygenase-2 transcription by CREB-binding protein/p300-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res* 2002; 62: 2522-2530.
- 44) Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T. Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J Biol Chem* 1995; 270: 24965-24971.
- 45) Kim Y, Fischer SM. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in mouse skin carcinoma cells. Regulatory role of CCAAT/enhancer-binding proteins in the differential expression of cyclooxygenase-2 in normal and neoplastic tissues. *J Biol Chem* 1998; 273: 27686-27694.
- 46) Surh YJ. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res* 1999; 428: 305-327.
- 47) Kaput J, Rodriguez RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics* 2004; 16: 166-177.
- 48) Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB. Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor- $\kappa$ B, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Cancer Res* 2002; 62: 4945-4954.
- 49) Murakami A, Matsumoto K, Koshimizu K, Ohigashi H. Effects of selected food factors with chemopreventive properties on combined lipopolysaccharide and interferon-gamma-induced I $\kappa$ B degradation in RAW264.7 macrophages. *Cancer Lett* 2003; 195: 17-25.
- 50) Kundu JK, Na HK, Chun KS, Kim YK, Lee SJ, Lee SS, Lee OS, Sim YC, Surh YJ. Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 expression by epigallocatechin gallate in mouse skin and cultured human mammary epithelial cells. *J Nutr* 2003; 133: 3805S-3810S.
- 51) Nomura M, Ma W, Chen N, Bode AM, Dong Z. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced NF- $\kappa$ B activation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate and theaflavins. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1885-1890.
- 52) Morse D, Pischke SE, Zhou Z, Davis RJ, Flavell RA, Loop T, Otterbein SL, Otterbein LE, Choi AM. Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *J Biol Chem* 2003; 278: 36993-36998.
- 53) Li Volti G, Seta F, Schwartzman ML, Nasjletti A, Abraham NG. Heme oxygenase attenuates angiotensin II-mediated increase in cyclooxygenase-2 activity in human femoral endothelial cells. *Hypertension* 2003; 41: 715-719.
- 54) Botros FT, Laniado-Schwartzman M, Abraham NG. Regulation of cyclooxygenase- and cytochrome p450-derived eicosanoids by heme oxygenase in the rat kidney. *Hypertension* 2002; 39: 639-644.
- 55) Alcaraz MJ, Habib A, Creminon C, Vicente AM, Lebre M, Levy-Toledano S, Maclouf J. Heme oxygenase-1 induction by nitric oxide in RAW 264.7 macrophages is upregulated by a cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1526: 13-16.

## 죽염 처리 청국장의 기능성 증진

부산대학교 식품영양학과

김수옥 · 박수영 · 이숙희 · 박건영

### Increased Functional Properties of Chungkukjang Prepared with Bamboo Salt

Su-Ok Kim, Su-Young Park, Sook-Hee Rhee and Kun-Young Park

Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

In order to investigate the effect of variety of salt on the functional properties of chungkukjang preparation, we prepared chungkukjangs with various kinds and contents of salt (purified salt: hanju salt, chunil salt and bamboo salt). The antioxidative effect, antimutagenicity, cancer cell growth inhibitory effect and fibrinolytic activity of the chungkukjangs were carried out by DPPH free radical method, Ames test, MTT assay and fibrin plate method, respectively. Chungkukjang prepared with the different kinds of salt had high effects on hydrogen-donating activity and on the inhibition of mutagenicity compared to one prepared without salt. In particular, chungkukjang prepared with 2% bamboo salt (1×) had the highest effects. The chungkukjangs prepared with 2% bamboo salt (1×) inhibited significantly the growth of HT-29 human colon carcinoma cells. However, the chungkukjang prepared with various kinds of salt and various concentrations of bamboo salt (2, 4, 7%) resulted in no differences among samples in AGS human gastric adenocarcinoma cells. The fibrinolytic activity was higher in bamboo salt (1×) added chungkukjang than others and the fibrinolytic activity of the bamboo salt added chungkukjang increased with the increased levels of bamboo salt.

**Key Words:** Chungkukjang, Bamboo salt, Antioxidation, Antimutagenicity, Fibrinolytic activity

### 서 론

청국장은 한국인의 식생활에서 중요한 전통적인 대두 발효식품으로 제조기간이 짧고 풍미가 특이하며 영양학적으로도 단백질과 지방 함량이

높은 고영양식품이다. 최근 보고에 의하면 청국장은 발효과정 중 점질성 물질 등 각종 생리활성 물질을 생성하며,<sup>1)</sup> 생리 활성 중에는 혈중 콜레스테롤 감소기능, 항돌연변이성, 항암성, 항산화성, 혈전 용해기능 등이 알려져 있다.<sup>2)</sup> 청국장과 유사한 일본의 전통 발효식품인 낫또(natto)에서