

우르솔릭산의 혈관형성 억제활성

손경희 · 이옥희 · 이열남 · 정해영* · 이정준** · 김규원
부산대학교 분자생물학과, *약학과, **KIST 유전공학연구소 미생물화학연구소
(Received August 27, 1993)

Anti-angiogenic Activity of Ursolic Acid

Kyung-Hee Sohn, Ok-Hee Lee, Youl-Nam Lee, Hae-Young Chung*, Jung-Joon Lee**
and Kyu-Won Kim

*Department of Molecular Biology, *Department of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
and the Cancer Research Center, Seoul 110-799, Korea*

***Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejon 305-606, Korea*

Abstract—Angiogenesis refers to the formation of new capillary blood vessels, or neovascularization occurring under various physical conditions, such as development of the embryo, formation of corpus luteum, wound healing and pathological conditions including tumor growth and metastases, hemangiomas, diabetic retinopathy, rheumatoid arthritis. There are many evidences that angiogenesis is important for the progressive growth of solid tumors and also permits the shedding of metastatic tumors from the primary site. Thus, treatment of angiogenesis inhibitors might be a novel strategy for tumor growth inhibition. Normal vascular endothelial cells are in a state of differentiation and angiogenic endothelial cells migrate and proliferate, and they subsequently differentiate into vessel-forming quiescent phenotype cells. Therefore, it was speculated that a modifier of cell differentiation could also affect angiogenesis. In order to identify new antiangiogenic factors, the research was conducted to estimate the inhibitory activities of cell differentiation agents by means of chick embryo chorioallantoic membrane(CAM) assay. Hence, we have established the CAM assay for the screening of antiangiogenic agents. Using the CAM assay, we found that ursolic acid, a tumor cell differentiation-inducing agent, showed a markedly inhibitory effect on chick embryonic angiogenesis.

Keyword □ Ursolic acid, Antiangiogenesis, Chick embryo, CAM assay.

혈관형성(angiogenesis)은 다양한 생리적, 또는 병리적 현상들, 즉 배발생(embryonic development), 상처치유, 만성염증, 혈관종(hemangiomas), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis) 그리고 악성종양의 성장과 전이 등과 밀접한 관련이 있다.¹⁾ 혈관형성은 혈관내피세포의 이동과 증식, 혈관세포로의 분화로 이어지는 일련의 작용들을 포함하며, 이러한 혈관형성은 암의 성장과 전이에 중요한 선행과정이라고 알려져 있다.

^{2,3)} 즉, 암의 진행성 성장은 숙주조직들로부터의 혈관의 형성을 필요로 하므로, 종양으로부터 유래한 혈관형성 촉진인자들이 혈관내피세포를 자극하여, 종양덩어리로의 새로운 혈관형성을 유발시킨다. 그런 다음 악성종양 주변에 많이 형성된 혈관들에 의해 암세포의 전이도 용이하게 일어난다. 따라서 이러한 혈관형성의 억제는 암의 성장과 전이의 억제를 유도할 수 있으며, 혈관형성을 억제하는 인자들을 발견하는 것은 항암제의 개발을 위한 중요한 연구로 주목되고 있다.

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

현재까지 알려진 혈관형성 억제인자들로는 protamine, 종양괴사인자(tumor necrosis factor)와 같은 단백질들과 혈관이 없는 조직인 연골에서 유래한 인자들,⁵⁾ 지혈성 스테로이드(angiostatic steroids)라고 불리는 cortisone과 여러종류의 스테로이드 유도체들이 있으며, hydrocortisone의 경우는 heparin과 함께 처리하였을 때 항 혈관형성 효과를 나타내고,⁶⁾ 합성 progesterone 유도체인 medroxyprogesterone acetate(MPA)는 독자적으로 강력한 혈관형성 억제인자로 작용한다고 보고되었다.⁷⁾ 그외에도 항생제로서 herbi-mycin A와 eponemycin도 항암효과와 함께 항 혈관형성 효과를 가지고 있는 것으로 밝혀졌으며,^{8,9)} 또한 최근에는 악성세포를 정상세포로 분화 유도시키는 인자들이 혈관형성 내피세포들의 활성화와 분화를 변화시켜 혈관형성을 억제하는 효과가 있다고 보고되었다.¹⁰⁾ 왜냐하면 정상적인 혈관형성과정에서는 혈관 내피세포들이 활성화되어 이동하고 증식하여, 혈관을 형성할 수 있는 세포들로 분화하게 되며, 이러한 과정에서 여러가지 세포분화에 관여하는 인자들이 혈관형성에 영향을 미칠 수가 있기 때문이다. 특히 세포분화 유도인자로 알려져 있는 천연 혹은 합성 레티노이드(retinoids)와 비타민 D₃의 활성화 물질과 이의 합성 유도체들도 현저하게 혈관형성을 억제하는 것으로 밝혀졌다.^{2,10)} 그러나 이러한 억제인자들은 과도한 독성과 제한된 효능때문에 암치료제로 사용하는데 문제점을 가지고 있으므로, 독성이 적으면서 강력한 혈관형성억제제 들이 개발될 필요가 있다.

지금까지 항 혈관형성 연구에 널리 사용되고 있는 분석방법으로는 계배(chick embryo)의 융모요막(chorioallantoic membrane, CAM)을 이용한 융모요막 분석법(CAM assay)이 있다. CAM은 계배의 발생 3~4일째에 생성되는 배외막(extraembryonic membrane)으로서 모세혈관과 다른 혈관들을 뚜렷이 구별할 수 있어서 혈관이동과 형태형성(patterning)에 영향을 주는 인자를 연구하는데 적당한 모델로 사용될 수 있다.¹¹⁾ 따라서 본 연구에서는 CAM 분석법을 확립하고, 쥐의 F9 기형암종세포에서 분화효과가 있는 것으로 알려진 우르솔릭산(ursolic acid, UA)이 혈관형성 억제활성이 있는지를 검토하여, 항암제 및 항전이제로 개발하기 위한 기초 연구를 행하였다.

실험재료 및 방법

시약—Retinoic acid, protamine sulfate, cortisone acetate 및 ursolic acid는 Sigma사 제품을 사용했고, fat emulsion(10%)는 녹십자사 제품을 사용했으며, thermanox coverslip은 Nunc사에서 구입하여 사용하였다.

실험동물—아바에이카 수정란을 구입하여 90% 습도와 37°C를 유지한 부화기에서 배양하였다.

측정용 시약준비—Thermanox 15 mm coverslip을 UV로 3시간이상 소독한 후 에탄올에 녹인 여러농도의 ursolic acid를 5 μ l 떨어뜨려 말렸다.

CAM assay—수정된 종란을 37°C와 90% 습도가 유지되는 부화기에 넣어 3일간 배양한 후 종란의 볼록한 쪽에 작은 구멍을 뚫고 그 구멍을 통해 18게이지 바늘의 주사기를 찔러 넣어 약 2ml의 알부민을 뽑아내었다. 4일배가 되면 공기주머니가 있는 쪽을 iodine tincture로 소독하고 공기주머니 위쪽의 껍질을 수술용 칼로 잘라 핀셋으로 제거한 후 외피막(shell membrane)을 조심스럽게 벗겨내었다. 이렇게 창(window)을 낸 다음 유리테이프로 봉하여 부화기에 넣어 배양하였다. 4.5일배가 되면 CAM(융모요막)이 직경 3~5 mm가 되고 이때의 배를 CAM분석법에 사용하였다. 창 유리테이프를 떼어내고 ursolic acid가 도포된 thermanox coverslip을 4.5일배의 CAM표면에 도포된 면이 아래로 가도록 뒤집어 놓고 창 유리테이프로 봉하여 부화기에서 배양하였다. 이틀이 지난 후 유리테이프를 떼어내고 10% fat emulsion을 33게이지 주사기를 사용하여 6.5일배의 CAM에 주입하여 혈관이 잘 보이게 하였다. 직경 3 mm이상의 혈관형성이 억제된 부분이 있는 CAM을 혈관형성이 억제된 것으로 보고 계수하였고 사진을 찍었다.

조직학적 연구—6.5일배의 표면에 4% paraformaldehyde를 적당량 떨어 뜨려 4°C에서 1시간 동안 둔 다음 CAM을 떼어내어 formaldehyde에 담가 놓는다. Thermanox coverslip아래에 위치한 고정된 CAM을 잘라 파라핀 육면체를 만든 후, 파라핀 절편을 제작하여 hematoxylin/eosin으로 염색해서 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

CAM 분석법의 확립—계배의 융모요막(chorioallan-

toic membrane, CAM)은 발생 이틀째에 원장미부(tailgut)에서 용모막 강(chorion cavity)으로 뺏어나간 작은 계실(diverticulum)로 부터 비롯된다. 이 계실 즉 요막의 바깥쪽은 혈관이 많은 중배엽층(vascularized mesodermal layer)이고 안쪽은 내배엽층으로 구성되어 있다. 발생 4일째에 요막의 바깥에 위치한 중배엽층은 외피막(shell membrane) 아래에 놓인 용모막(chorion membrane)과 융합하게 되고 용모막과 융합한 요막을 CAM이라고 명명한다.

혈관의 형성과 분화는 이 CAM의 발생과 밀접한 연관이 있다. 모세혈관의 성장은 발생 11일째까지 계속되고 이때 혈관내피세포의 증식은 멈춘다. 또한 CAM도 거의 완전한 확장이 이루어져서 fat emulsion을 주사하면 Fig. 1과 같이 흰색 배경의 CAM이 관찰되고, 그위의 혈관들이 뚜렷하게 나타나 보인다. 즉 4일배(Fig. 1의 4b)에서부터 CAM이 보이기 시작하여 6일배(Fig. 1의 6b)부터는 뚜렷하게 관찰할 수 있었다.

우선 혈관형성 억제활성을 가지는 것으로 알려져

있는 retinoic acid, protamine sulfate 그리고 cortisone acetate/heparin을 이용하여 CAM분석법을 확립하고, 새로운 혈관형성 억제제의 검색이 가능한지를 먼저 조사하였다. Retinoic acid와 protamine sulfate는 각각 0.1 $\mu\text{g}/\text{egg}$ 와 50 $\mu\text{g}/\text{egg}$ 를 처리하였을 때 혈관형성을 억제하였고, cortisone acetate(50 $\mu\text{g}/\text{egg}$)는 heparin(50 $\mu\text{g}/\text{egg}$)과 함께 처리했을 시 혈관형성 억제작용을 나타내었다(Fig. 2). 이렇게 확립한 CAM 분석법에 의해 여러가지 생약추출물들을 검색한 결과, ursolic acid가 강력한 혈관형성 억제작용이 있음을 다음과 같이 확인하였다.

Ursolic acid의 혈관형성 억제활성—Ursolic acid는 항염증 효과를 가지는 생약인 비파엽(*Eriobotrya japonica* LINDLEY)에 함유된 성분으로 그 구조는 Fig. 3과 같다. 이 ursolic acid가 배발생과정 중의 혈관형성에 어떤 효과를 가지는지를 조사하기 위하여 4.5 일배의 CAM위에 여러가지 농도의 ursolic acid가 도포된 thermanox coverslip을 처리하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 ursolic acid가 도포된 coverslip을 처

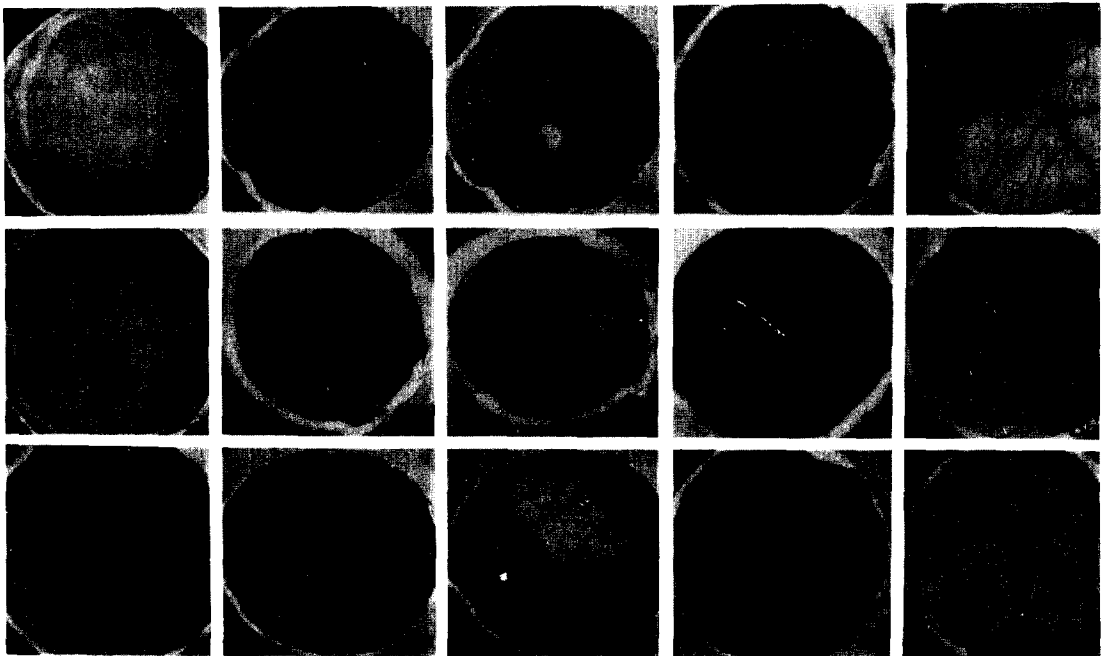


Fig. 1—Photographs of developing chick embryo. (1) The 1-day-old embryo; (2) The 2-day-old embryo; (3) The 3-day-old embryo (4a,4b) The 4-day-old embryo; (5a, 5b) The 5-day-old embryo; (6a, 6b) The 6-day-old embryo; (7a, 7b) The 7-day-old embryo; (8a, 8b) The 8-day-old embryo; (9a, 9b) The 9-day-old embryo. (a) Normal chick embryo; (b) The CAM (white color) was visualized after injecting with 10% fat emulsion. Magnification(x2.7).

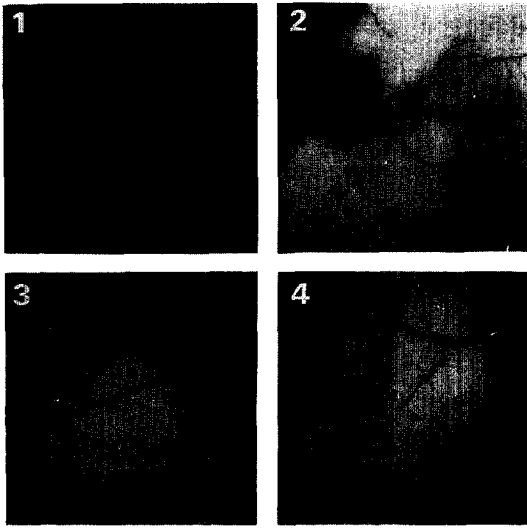


Fig. 2—Effects of retinoic acid, protamine sulfate and cortisone acetate plus heparin on embryonic angiogenesis in CAM 2 days after sample implantation. 10% fat emulsion (about 1 ml) was injected into chorioallantois to make the vascular network clear. (1) control; (2) retinoic acid(0.1 $\mu\text{g}/\text{egg}$); (3) protamine sulfate(50 $\mu\text{g}/\text{egg}$); (4) cortisone acetate (50 $\mu\text{g}/\text{egg}$) plus heparin (50 $\mu\text{g}/\text{egg}$). Control CAM treated with empty coverslips show no disturbance of angiogenesis (1). In the CAMs implanted with coverslips loaded retinoic acid, protamine sulfate, cortisone acetate plus heparin, there is an avascular zone(surrounded with arrows). Magnification(x6).

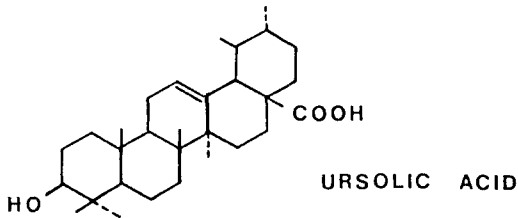


Fig. 3—Structure of ursolic acid.

리하였을 경우 혈관형성이 억제되었다. 그 결과 Fig. 4와 같이 ursolic acid가 도포된 coverslip을 처리하였을 경우 혈관형성이 억제되었다. CAM에서 혈관형성을 억제하는 ursolic acid의 최소량은 2 μg (4 nmol)/egg

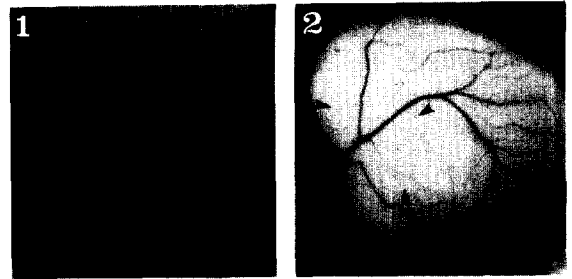


Fig. 4—Effects of ursolic acid on embryonic angiogenesis in CAM 2 days after sample implantation. (1) control; (2) ursolic acid (5 $\mu\text{g}/\text{egg}$). The CAM treated with ursolic acid has an avascular zone(surrounded with arrows). Magnification(x6).

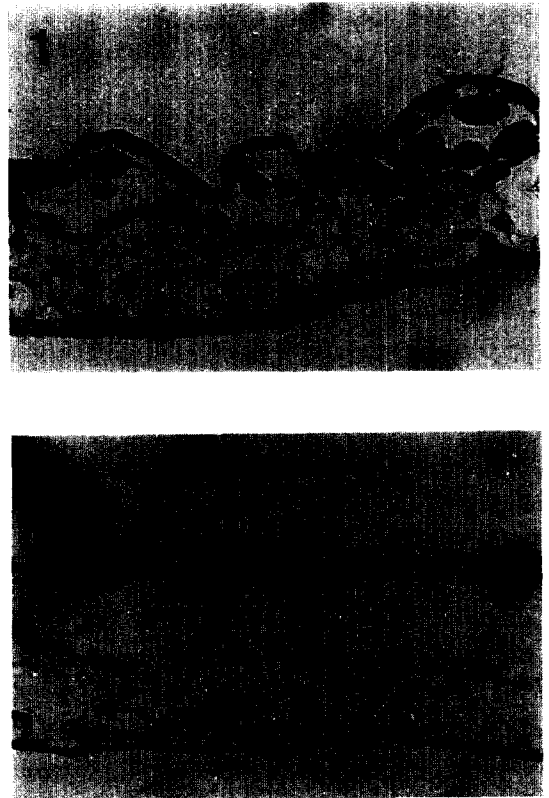


Fig. 5—Histological sections of the 6.5-day chick CAM. Tissue specimens were fixed in formalin, embedded in paraffin, cut with microtome, and stained with hematoxylin and eosin. (1) Normal CAM; (2) Ursolic acid-treated CAM. Magnification(x400).

이었고 혈관형성을 절반 억제하는 량(ID_{50})은 $5 \mu\text{g}(11 \text{ nmol})/\text{egg}$ 였다. Ursolic acid의 양을 증가하여 $100 \mu\text{g}/\text{egg}$ 로 처리하였을 경우, 혈관형성이 완전히 억제되었고 이 경우 CAM은 이보다 적은 양을 처리했을 때보다 크기가 작거나 남아있는 혈관도 상당히 적었다. 그러나 위에서 사용한 $2\sim 100 \mu\text{g}/\text{egg}$ 농도에서는 혈전을 형성하지 않았고 출혈도 관찰되지 않았다. 그리고 혈관형성이 억제된 CAM의 면적은 혈관형성이 억제된 빈도와 비례하는 경향을 보였다.

CAM의 조직학적 연구—CAM상의 모세혈관의 구조는 CAM을 잘라서 조직화학적 방법으로 염색한 다음, 광학현미경으로 Fig. 5와 같이 관찰하였다. 즉 *thermanox coverslip*만을 처리한 CAM은 혈관형성이 방해되지 않고 정상적으로 발달한 반면, *ursolic acid*를 처리한 CAM의 경우 혈관형성이 상당히 억제되어 정상적인 모세혈관을 형성하지 못하였고 넓은 혈관형성 억제대가 관찰되었다.

고 찰

이 연구는 혈관형성 억제인자를 스크리닝 하기 위해서 먼저 계배의 CAM분석법을 확립하였고(Fig. 1,2), 이를 이용하여 여러 생약추출물을 검색한 결과 *ursolic acid*가 강력한 혈관형성 억제활성이 있음을 발견하였다. 이때 항 혈관형성 활성을 가진다고 이미 알려져 있는 혈관형성 억제인자들을 대조군으로 함께 조사하였다. Fig. 2에서 보여지는 것처럼 레티노익산(*retinoic acid*)과 *protamine sulfate*는 단독 처리 시 혈관형성 억제효과를 나타내었고, *cortisone acetate*는 *heparin*과 함께 처리 시 혈관형성을 억제하였으며, 이 결과들은 이미 보고된 것들과 일치하였다.^{6,10,12,13)}

이러한 결과들을 근거로 하여 *ursolic acid*의 효과를 조사해 본 결과, Fig. 4에서 볼 수 있듯이 계배의 CAM에서 강력한 혈관형성 억제효과를 보여주었고, 그 효과를 나타내는 *ursolic acid*의 농도는 $4 \text{ nmol}/\text{egg}$ 이며, ID_{50} 은 $11 \text{ nmol}/\text{egg}$ 였다. 한편, Fig. 5에서 볼 수 있듯이 *ursolic acid*를 처리한 CAM 조직을 잘라 절편을 만들어 염색해 본 결과, *ursolic acid* 처리에 의해 혈관형성이 거의 일어나지 않았음을 다시 확인할 수 있었다. 이러한 결과로서 *ursolic acid*가 혈관형성 억제인자로서 작용할 수 있으며, 그 기작은 앞으로

연구하여야 할 과제라고 생각된다.

혈관형성 억제제들의 작용기작으로는 다음과 같이 몇가지로 나누어 생각해 볼 수 있다. 일반적으로 혈관내피세포가 새로운 혈관을 형성하기 위하여 이동할 때 세포외기질을 분해하며, 이러한 단계에서 여러가지 분해효소들이 관여한다고 알려져 있다. 특히 *collagenase*들이 많은 역할을 하는 것으로 보고되어 있고 따라서 *collagenase*억제자인 CDI, PF4, *minocycline* 등이 항 혈관형성능을 가진다는 사실이 알려져 있다.^{4, 14,15)} 그러므로 혈관형성 억제인자들이 이러한 세포외기질을 분해하는 분해효소들의 작용을 억제함으로써 새로운 혈관형성에 억제작용을 나타낸다고 볼 수 있다. 그리고 혈관내피세포들의 증식을 억제하거나, 혈관형성과정에서 필수적으로 일어나는 분화과정의 차단등도 생각해 볼 수 있다. 그외의 기작으로는 *protamine*인 경우 이 약물이 *heparin*에 강한 친화력을 가지고 있으므로, 다른 혈관형성 자극인자들(*heparin-binding growth factors*)과 경쟁적으로 *heparin*에 결합하여 혈관 내피세포를 자극하는 것을 방해하는 것도 가능할 것으로 생각이 된다.

본 연구에서 검색한 *ursolic acid*의 항 혈관형성 기작은 부분적으로 혈관내피세포의 증식을 억제함으로써 혈관형성을 억제하는 가능성을 생각해 볼 수 있고, 또한 *ursolic acid*가 암세포 분화작용이 있음이 본 연구실에서 이미 조사된 바 있으므로 정상 혈관세포로의 분화를 비정상적으로 변화시킴으로써 혈관형성을 차단할 가능성도 있다. 따라서 앞으로 *ursolic acid*의 항 혈관형성 작용기작과 이의 약제개발이 흥미있는 과제가 되리라 추측이 된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술처의 지원에 의해 이루어졌음을 감사드립니다.

문 헌

- 1) Folkman, J., and Klagsbrun, M.: Angiogenic factors. *Science* **235**, 442-447 (1987).
- 2) Oikawa, T., Hirofani, K., Ogasawara, H., Katayama, T., Nakamura, O., Iwaguchi, T., and Hiragum A.:

- Inhibition of angiogenesis by vitamin D₃ analogues. *Eur. J. Pharmacology* **178**, 247-250 (1990).
- 3) Liotta, L.A., Steeg, P.S., and Stetler-Stevenson, W. G.: Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* **64**, 327-336 (1991).
 - 4) Moses, M.A., Sudhalter, J., and Langer, R.: Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* **248**, 1408-1410 (1990).
 - 5) Lee, A., and Langer, R.: Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* **221**, 1185-1187 (1983).
 - 6) Crum, R., Szabo, S., and Folkman, J.: A new class of steroid inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science* **230**, 1375-1378 (1985).
 - 7) Oikawa, T., Hiragun, A., Yoshida, Y., Ashino-Fuse, H., Tominaga, T., and Iwaguchi, T.: Angiogenic activity of rat mammary carcinomas induced by 7, 12-dimethylbenz[α]anthracene and its inhibition by medroxyprogesterone acetate: possible involvement of antiangiogenic action of medroxyprogesterone acetate in its tumor growth inhibition. *Cancer Lett.* **43**, 85-92 (1988).
 - 8) Oikawa, T., Hirotsu, K., Shimamura, M., Ashino-Fuse, H., and Iwaguchi, T.: Powerful antiangiogenic activity of herbimycin A (named angiostatic antibiotic). *J. Antibiotics* **42**, 1202-1204 (1989).
 - 9) Oikawa, T., Hasegawa, M., Shimamura, M., Ashino-Fuse, H., Murota, S.I., and Morita, I.: Eponemycin, a novel antibiotic, is a highly powerful angiogenesis inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **181**, 1070-1076 (1991).
 - 10) Oikawa, T., Hirotsu, K., Nakamura, O., Shudo, K., Hiragun, A., and Iwaguchi, T.: A highly potent antiangiogenic activity of retinoids. *Cancer Lett.* **48**, 157-162 (1989).
 - 11) Tanaka, N.G., Sakamoto, N., Tohgo, A., Nishiyama, Y., and Ogawa, H.: Inhibitory effects of antiangiogenic agents on neovascularization. *Exp. Pathol.* **30**, 143-150 (1986).
 - 12) Taylor, S., and Folkman, J.: Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* **297**, 307-312 (1982).
 - 13) Folkman, J., Langer, R., Linhardt, R.J., Haudenschild, C., and Taylor, S.: Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* **221**, 719-725 (1983).
 - 14) Maione, T.E., Gray, G.S., Petro, J., Hunt, A.J., Donner, A.L., Bauer, S.I., Carson, H.F., and Sharpe, R.J.: Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* **247**, 77-79 (1990).
 - 15) Tamargo, R.J., Bok, R.A., and Brem, H.: Angiogenesis inhibition by minocycline. *Cancer Res.* **51**, 672-675 (1991).