

## 한국산 식물자원으로부터 신생혈관 억제제 검색 (I)

배기환,\* 유영제, 박진영, 안인파, 김영호, 강종성, 안병준

충남대학교 약학대학

## Screening of angiogenesis inhibitors from Korean plants (I)

KiHwan Bae,\* Young-Jae You, Jin-Young Park, Ren-Bo An,

Young-Ho Kim, Jong-Seong Kang and Byung-Zun Ahn

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

**Abstract** – Methanol extracts of 94 Korean plants were screened for angiogenesis inhibitors using the tube-like formation assay of HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) and evaluated for growth inhibitory activity on A549 cells, human lung cancer cells. Extracts of *Euphorbia sieboldiana*, *Adonis amurensis*, and *Anthriscus sylvestris* showed antiangiogenic and growth inhibitory activity at 50 µg/ml. *Aristolochia manshuriens* and *Styrax obassia* expressed antiangiogenic activity without growth inhibitory action.

**Key words** – angiogenesis, cytotoxicity, *Aristolochia manshuriens*, *Styrax obassia*

신혈관형성(angiogenesis)은 기존의 혈관으로부터 새로운 모세혈관이 생성하는 과정으로 상처 치료, 조직 치유, 생식, 배아발육 등의 다양한 생리과정에 관여한다.<sup>1)</sup> 또한 신혈관의 형성은 고탄양이 성장하는데 필요한 산소와 영양분을 공급하는 경로로서 결정적인 과정이며 암의 전이에도 필수적인 과정이다.<sup>2,3)</sup> 이 과정은 여러 단계를 거쳐 진행된다. 먼저 혈관형성 촉진인자에 의해 내피세포가 활성화되어 성장이 촉진되고, 내피세포가 이동하며 튜브를 형성한다.<sup>4)</sup>

신혈관의 형성의 억제는 1971년 Folkman이 항암제의 개발의 목표로 주장한 이후, 최근에 가장 활발하게 연구되고 있는 영역이다.<sup>5)</sup> 신혈관 형성은 정상적인 성인의 경우 거의 나타나지 않는 현상이므로 신생혈관 억제제는 전통적인 화학요법에 비해 정상 조직에는 독성을 나타내지 않고 새로운 혈관의 형성이 필요한 암조직을 선택적으로 공격할 수 있고 다양한 암에 적용할 수 있다는 장점이 있다.<sup>6)</sup>

지금까지 angiostatin,<sup>7)</sup> endostatin<sup>8)</sup> 등 강력한 내인성 신생혈관 억제제가 발견되었다. 그러나 내인성 신생혈관 억제제의 경우, 내인성 peptide로서 갖게 되는 다량 확보의 문제점 및 투여방법의 제한 등의 단

점들이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위한 방법의 일환으로 천연물로부터 혈관 형성 억제제를 찾기 위한 노력이 진행되어져 왔고, 활성이 우수한 fumagillin이 발견되었고 그 유도체들이 임상실험단계에 있다.<sup>9,10)</sup>

본 연구에서는 한국산 식물자원으로부터 신혈관 형성을 억제하는 물질을 찾기 위해, 96종의 식물을 대상으로 HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)의 tube-like formation assay를 이용하여 검색하였다. 동시에 암세포에 대한 독성을 관찰하기 위해 human lung cancer cell인 A549를 이용하여 세포 독성을 측정하였다.

### 재료 및 방법

**식물 시료용액의 조제** – 실험에 사용된 생약재료는 충남대학교 약학대학 생약표본실의 것을 사용하였다. 건조된 재료를 세절하여 이 중 5g을 취하여 10 ml의 methanol로 24시간 추출하여 농축하였고 96 well-plate의 최종 농도가 50 µg/ml가 되도록 하기 위해 50 mg/ml가 되도록 DMSO에 녹여 시료로 사용하였다.

**세포 배양** – HUVE 세포는 20% FBS (Fetal Bovine Serum), penicillin G-streptomycin, bFGF, heparin이 함유된 M199 배지를 사용했고 배양 플라스크

\*교신저자 : Fax 042-823-6566

Table I. Tube-like formation inhibition activity and cytotoxicity of plant methanol extracts

일 반 명	학 명	사용부위	효 과 <sup>1)</sup>	압성장율(%)
가마귀쪽나무	<i>Litsea japonica</i>	잎	-	64±24.9
갈매나무	<i>Rhamnus davurica</i>	줄기, 잎	-	99±17.1
개감수	<i>Euphorbia sieboldiana</i>	전초	+++	15±3.1
개구리발톱	<i>Semiaquilegia adoxoides</i>	가지, 잎	++	89±18.1
개대황	<i>Rumex longifolius</i>	뿌리	-	115±18.7
개비자나무	<i>Cephalotaxus koreana</i>	줄기, 잎	+	11±17.4
개시호	<i>Bupleurum longiradiatum</i>	전초	+++	52±5.7
거지덩굴	<i>Cayratia japonica</i>	전초	-	87±11.6
결명자	<i>Cassia tora</i>	뿌리	-	69±1.8
골풀	<i>Juncus effusus</i>	전초	-	82±13.1
관중	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	뿌리	-	100±29.1
구절초	<i>Chrysanthemum zawadskii</i>	전초	-	84±24.3
굴거리나무	<i>Daphniphyllum macropodum</i>	열매	-	74±13.8
굴피나무	<i>Platycarya strobilacea</i>	지상부	-	68±10.7
금마타리	<i>Patrinia saniculaefolia</i>	전초	++	78±18.7
금불초	<i>Inula britannica</i>	전초	-	37±4.4
기린초	<i>Sedum kamtschaticum</i>	전초	-	88±19.8
긴담배풀	<i>Carpesium divaricatum</i>	전초	-	38±12.3
꼭두서니	<i>Rubia akane</i>	지상부	-	17±5.2
나도하수오	<i>Pleuropterus cilinervis</i>	뿌리	-	107±11.9
노랑하늘타리	<i>Trichosanthes krikivii</i>	지상부	-	27±8.8
노루발	<i>Pyrola japonica</i>	전초	-	135±51.7
노루오줌	<i>Astilbe chinensis</i>	뿌리	-	40±17.9
녹나무	<i>Cinnamomum camphora</i>	열매	++	91±6.1
다래나무	<i>Actinidia arguta</i>	줄기	-	82±17.7
다릅나무	<i>Maackia amurensis</i>	줄기	-	79±2.4
닥나무	<i>Broussonetia kazinoki</i>	잎	-	98±13.1
달맞이꽃	<i>Oenothera odorata</i>	지상부	-	64±20.7
댕댕이덩굴	<i>Cocculus trilobus</i>	줄기	-	53±17.1
덤불오리나무	<i>Alnus fruticosa</i> var. <i>mendshurica</i>	가지, 잎	++	45±12
도깨비바늘	<i>Bidens bipinnata</i>	전초	-	91±15.7
도깨비부채	<i>Rodgersia podophylla</i>	뿌리	-	72±3.1
두충	<i>Eucommia ulmoides</i>	전초	+	88±3.2
들깨풀	<i>Mosla punctulata</i>	전초	-	67±3.8
등칫	<i>Aristolochia manshuriensis</i>	줄기	++++	83±7.2
딱지꽃	<i>Potentilla chinensis</i>	전초	-	86±2.5
딱총나무	<i>Sambucus williamsii</i>	가지, 잎	-	78±18.9
떡쑥	<i>Gnaphalium affine</i>	전초	-	93±11.2
퐁판지	<i>Helianthus tuberosus</i>	지상부	-	125±29.2
마가목	<i>Sorbus commixta</i>	줄기, 껍질	-	110±22.2
마름	<i>Trapa japonica</i>	전초	-	76±15.7

Table I. Continued

일 반 명	학 명	사용부위	효 과 <sup>1)</sup>	압성장율(%)
마삭줄	<i>Trachelospermum asiaticum</i>	지상부	-	80±13.4
마타리	<i>Patrinia scabiosaefolia</i>	뿌리	-	70±28.4
말오줌떼	<i>Euscaphis japonica</i>	지상부	-	90± 3.8
매발톱나무	<i>Berberis amurensis</i>	전초	-	99± 4.1
머귀나무	<i>Zanthoxylum coreanum</i>	지상부	++	94± 5
멸가치	<i>Adenocaulon himalaicum</i>	전초	-	87± 3.3
무릇	<i>Scilla scilloides</i>	전초	-	-1± 4
물매화	<i>Parnassia palustris</i>	전초	-	82± 9
락새	<i>Veratrum patulum</i>	뿌리	-	106±19.2
백목련	<i>Magnolia denudata</i>	열매	-	71±10.6
뱀무	<i>Geum japonicum</i>	전초	-	36± 3.3
복수초	<i>Adonis amurensis</i>	뿌리	++++	10± 3.2
부처꽃	<i>Lythrum anceps</i>	전초	-	59± 6.6
붉은서나물	<i>Erechtites hieracifolia</i>	전초	+	72± 7.6
붉은대극	<i>Euphorbia ebracteolata</i>	뿌리	++	46±12.9
비비추	<i>Hosta longipes</i>	뿌리	-	86± 6.9
비수리	<i>Lespedeza cuneata</i>	전초	-	102± 5.9
사상자	<i>Torilis japonica</i>	열매	-	93±11.6
사철나무	<i>Euonymus japonica</i>	열매	-	100± 7.9
사철쑥	<i>Artemisia capillaris</i>	전초	-	115± 4.2
산국	<i>Chrysanthemum boreale</i>	꽃	-	112±27.6
산수국	<i>Hydrangea serrata</i>	지상부	-	19± 1.6
상산	<i>Ruta graveolens</i>	가지, 잎	++	87±15.8
생강나무	<i>Lindera obtusiloba</i>	잎, 줄기	-	141±20.6
생이가래	<i>Salvinia natans</i>	전초	-	143±19
솔장다리	<i>Salsola collina</i>	전초	-	156±21.6
송장풀	<i>Leonurus macranthus</i>	전초	-	94± 3.3
수까치깨	<i>Corchoropsis psilocarpa</i>	지상부	-	99± 6.1
숙은노루오줌	<i>Alstilbe koreana</i>	지상부	++	89±13.2
애기똥풀	<i>Chelidonium majus</i>	지상부	-	101± 1.3
양지꽃	<i>Potentilla fragarioides</i>	전초	-	106±18.4
영경취	<i>Cirsium japonicum</i>	지상부	-	143± 8.3
여로	<i>Veratrum maackii</i>	지하부	++	63±16.8
여우오줌	<i>Carpesium macrocephalum</i>	잎	-	92± 2.8
예덕나무	<i>Mallotus japonica</i>	지상부	-	71±27.8
왕고들빼기	<i>Lactuca indica</i>	잎	-	94± 7.7
원추리	<i>Hemerocallis fulva</i>	지하부	-	86± 8.3
은방울꽃	<i>Convallaria keiskei</i>	전초	-	-16± 1.4
은조롱	<i>Cynanchum wilfordi</i>	지상부	-	84± 9.8
이고들빼기	<i>Youngia denticulata</i>	전초	-	102± 6
제주피막이풀	<i>Hydrocotyle japonica</i>	전초	+	90±11.1

Table I. Continued

일반명	학명	사용부위	효과 <sup>1)</sup>	암성장율(%)
전호	<i>Anthriscus sylvestris</i>	뿌리	++++	5 ± 1.1
죽단화	<i>Kerria japonica</i>	지상부	-	89 ± 9.8
지칭개	<i>Hemistepta lyrata</i>	전초	-	97 ± 15.2
진득찰	<i>Siegesbeckia glabrescens</i>	잎, 줄기	-	93 ± 10.2
짚신나물	<i>Agrimonia pilosa</i>	전초	++	78 ± 19.2
쪽동백	<i>Styrax obassia</i>	전초	+++	103 ± 8.4
참마	<i>Dioscorea japonica</i>	지상부	-	94 ± 9.4
참중나무	<i>Cedrela sinensis</i>	잎	-	73 ± 15.1
춧대승마	<i>Cimicifuga simplex</i>	뿌리	++	91 ± 31.5
층층나무	<i>Cornus controversa</i>	가지	++	88 ± 6.1
팔손이나무	<i>Fatsia japonica</i>	가지	++	107 ± 15.1
할미꽃	<i>Pulsatilla koreana</i>	전초	+	79 ± 10.1
황칠나무	<i>Dendropanax morbifera</i>	열매	-	98 ± 6
회양목	<i>Buxus microphylla</i>	잎, 줄기	-	92 ± 10.6

<sup>1)</sup> The symbols used for the effect are represented as follows: -:<20% inhibition occurred, +:20-40%, ++:40-60%, +++:60-80%, ++++: >80%.

는 0.3% gelatine으로 코팅 후 사용하였다. A549는 10% FBS (Fetal Bovine Serum), penicillin G-streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하였다.

**Tube-like Formation Assay** - 얼음 속에 보관된 matrigel을 저온으로 유지한 96-well plate의 각 well에 50  $\mu$ l씩 넣고 37°C에서 30분 이상 polymerization시켰다. 세포는 trypsin-EDTA를 37°C에서 2-3분간 처리하여 배양 플라스크로부터 분리하고 원심분리(15000 rpm, 5-7분)하여 상등액을 제거하고 배지로 현탁하여 세포의 농도를  $1.2 \times 10^6$  cells/ml로 만들었다. 96-well plate의 각 well에 180  $\mu$ l씩 세포 현탁액을 넣고 시료는 M199 배지로 100배 희석 후 각 well에 20  $\mu$ l씩 넣어 최종 농도가 50  $\mu$ g/ml가 되도록 하였다. 37°C의 5% CO<sub>2</sub>가 포함되어 있는 배양기에서 8-12시간 배양 후 위상차 현미경으로 각 well을 관찰하고 기록을 위해 사진 촬영하였다.<sup>11)</sup>

**세포 독성 검색법** - 암세포는 trypsin-EDTA를 37°C에서 5-7분간 처리하여 배양 플라스크로부터 분리하고 원심분리(15,000 rpm, 5-7분)하여 상등액을 제거하고 배지로 현탁하여 세포의 농도를  $4.0 \times 10^5$  cells/ml로 만들었다. 96-well plate의 각 well에 180  $\mu$ l씩 세포 현탁액을 넣고 37°C의 5% CO<sub>2</sub>가 포함되어 있는 배양기에서 24시간 배양 후 시료는 RPMI 1640 배지로 100배 희석 후 각 well에 20  $\mu$ l씩 넣어 최종농도가 50  $\mu$ g/ml가 되도록 하였다. 37°C의 5%

CO<sub>2</sub>가 포함되어 있는 배양기에서 48시간 배양 후 SRB법으로 암세포 저해 작용을 검색하였다. 세포 현탁액을 위 방법과 동일하게 24시간 배양 후 SRB법을 실시하여 T<sub>2</sub> 값으로 하였다.

**SRB법** - 세포 배양액에 50% trichloroacetic acid를 50  $\mu$ l씩 넣고 4°C에서 1시간 반응시켜 세포를 부착시킨 후 상수로 충분히 세척하였다. 건조 후 0.4% SRB (in 1% acetic acid)를 100  $\mu$ l씩 넣은 후 실온에서 30분 반응시켜 세포를 염색시키고 과량의 SRB는 1% acetic acid로 세척하였다. 건조 후 10 mM Tris base(pH 10.2) 100  $\mu$ l씩을 넣은 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>12)</sup>

## 결과 및 고찰

HUVE 세포를 이용한 tube-like formation assay의 결과는 음성 대조군으로 하였을 때에 대한 상대적인 저해율을 5단계 (-: <20%, +: 20-40%, ++: 40-60%, +++: 60-80%, ++++: >80%)로 나누어 표기하였고, 세포 독성 검색의 결과는 음성 대조군에 대한 세포의 성장율을 계산하였다(Table I).

실험 결과로부터 활성이 있는 식물을 다음의 세가지 군으로 나누어 볼 수 있었다. 첫째는 튜브형성을 억제(저해율 > 40%)하는 동시에 비교적 강한 세포 성장 저해효과(세포성장율 < 60%)를 나타내는 식물

군으로 개감수, 개시호, 덩불오리나무, 붉은대극, 복수초, 전호가 이 군에 해당된다. 이 중 개감수, 복수초, 전호가 강한 튜브형성 저해효과(저해율 > 60%)와 동시에 강한 세포성장 저해효과(세포성장율 < 20%)를 나타냈다. 둘째는 튜브형성을 억제(저해율 > 40%)하지만 세포독성을 나타내지는 않는(세포성장율 > 80%) 식물군으로 개구리발톱, 녹나무, 등취, 머귀나무, 상산, 숙은노루오줌, 쪽동백, 좃대승마, 층층나무, 팔손이나마 등이다. 특히, 등취과 쪽동백은 세포성장은 저해 하지 않았으나 강한 튜브형성 저해 효과(저해율 > 60%)를 나타냈다. 셋째는 튜브형성을 억제하지는 않지만(저해율 < 40%) 세포성장 저해효과(세포성장율 < 40%)를 나타내는 군이다. 개비자나무, 금발초, 긴담배풀, 꼭두서니, 노랑하늘타리, 노루오줌, 무릇, 뱀무, 산수국, 은방울꽃 등 10종의 식물이 세포성장 저해효과를 나타냈으며 은방울꽃과 무릇이 가장 강한 세포독성을 나타내었다.

다른 조직에는 독성을 나타내지 않고 암세포의 신생혈관형성을 차단할 수 있는 선택적인 활성을 갖고 있는 것이 이상적인 신생혈관형성 억제제일 것이다. 한편 신생혈관형성 억제제와 기존의 화학요법제를 병용투여함으로써 신생혈관형성을 억제하는 연구도 활발하게 진행되고 있다. 따라서 본 연구자들은 위의 식물 중 선택적인 튜브형성 저해작용을 나타내는 식물들, 그리고 암세포에 대한 세포독성을 나타내고 튜브형성을 억제하는 식물들로부터 활성성분을 분리, 화학구조를 규명하고 있다.

## 사 사

본 연구는 1999년도 한국학술진흥재단 연구비(과제번호 1999-042-F6104)에 의하여 수행되었기에 감사의 말씀을 드립니다.

## 인용문헌

- Dietrich, H. P. (1998) Natural Products as Angiogenesis Inhibitors. *Planta Medica* 64: 686-695.
- Seki, N., Kodama, J., Hongo, A., Miyagi, M., Yoshinouchi, M. and Kudo, T. (2000) Vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor expression are implicated in the angiogenesis of endometrial cancer. *European Journal of Cancer* 36: 68-73.
- Foortan, S. S., Ke, Y., Jones, A. S. and Helliwell, T. R. (2000) Basic fibroblast growth factor and angiogenesis in squamous carcinoma of the tongue. *Oral Oncology* 36: 437-443.
- Bohle, A. S. and Kalthoff, H. (1999) Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbeck's Arch. Surg.* 384: 133-138.
- Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis therapeutic implications. *New Eng. J. Med.* 18: 1182-1186.
- Juergen, M., Giulio, F. D. and Arturo P. G. (2000) Antiangiogenic therapy: preclinical premise and promise. *Molecular Medicine Today* 6: 188-189.
- Cao, Y. (1999) Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer. *Haematologica* 84(7): 643-650.
- Kruger, E. A., Duray, P. H., Tsokos, M. G., Venzon, D. J., Libutti, S. K., Diwon, S. C., Rudek, M. A., Pluda, J. and Allegra, C. (2000) Endostatin inhibits microvessel formation in ex vivo rat aortic ring angiogenesis assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268(1): 183-191.
- Sasaki, A., Alcalde, R. E., Nishiyama, A., Lim, D. D., Mese, H., Akedo, H. and Matsumura, T. (1998) Angiogenesis inhibitor TNP-470 inhibits human breast cancer osteolytic bone metastasis in nude mice through the reduction of bone resorption. *Cancer Research* 58(3): 462-467.
- Beecken, W. D., Fernandez, A., Panigrahy, D., Achilles, E. G., Kisker, O., Flynn, E., Joussem, A. M., Folkman, J., Shing, Y. (2000) Efficacy of antiangiogenic therapy with TNP-470 in superficial and invasive bladder cancer models in mice. *Urology* 56(3): 521-526.
- D'Amore, P. A. and Shima, D. T. (1996) Tumor-angiogenesis: a physiological process or genetically determined? *Cancer Metastasis Review* 15: 205-212.
- Soeda, S., Kozako, T., Iwata, K., Shimeno, H. (2000) Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1497: 127-134.
- Miranda, C. L., Stevens, J. F., Helmrich, A., Henderson, M. C., Rodriguez, R. J., Yang, Y. H., Deinzer, M. L., Barnes, D. W. and Buhler D. R. (1999) Anti-proliferative and Cytotoxic Effects of Prenylated Flavonoids from Hops (*Humulus lupulus*) in Human Cancer Cell Lines. *Food Chem. Toxicol.* 37: 271-285.
- 이정준, 이정형 (1998) 혈관신생 저해물질의 개발 동향. *생물산업*. 11: 30-35.

(2000년 7월 14일 접수)