

芥菜에서 분리한 3-O--D-galactopyranosylglyceride의 혈관형성 저해효과

이현철 · 송호철 · 임진기 · 길재호¹ · 김성훈*

경희대학교 동서의학대학원 종양연구팀, 1: 경희대학교 스포츠의학과

Antiangiogenic Effect of 3--O-D-galactopyranosylglyceride Isolated from *Chrysanthemum Coronarium* L.

Hyun Cheol Lee, Ho Chul Song, Jin Ki Lim, Jae Ho Khil¹, Sung Hoon Kim*

Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University,
1: Department of Sports Medicine, College of Sports Science, Kyunghee University

3-O--D-galactopyranosylglyceride (GPG; fatty acids R1, R2 = myristic acid 11.62%, palmitic acid 61.90% and oleic acid 26.48%) was isolated from *Chrysanthemum coronarium* L that has been used for treating renal and cardiovascular diseases as one of vegetables or medicinal drug. However, little was known about the anti-angiogenic activity of GPG. Thus, anti-angiogenic effect of GPG was evaluated in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) *in vitro* and *in vivo*. GPG effectively inhibited bFGF-induced migration and invasion of HUVECs in a concentration-dependent manner, whereas it did not inhibit bFGF-induced proliferation and capillary-like tube formation of HUVECs. To examine the mechanism of anti-angiogenic activity of GPG, gelatin zymography was carried out. GPG downregulated the expression of matrix metalloproteinase-2 in a concentration-dependent manner. Furthermore, GPG significantly disrupted bFGF-induced neovascularization on the chick chorioallantoic membrane assay *in vivo*. These results suggest that 3-O--D-galactopyranosylglyceride may inhibit neovascularization by inhibiting angiogenic activity of endothelial cells via regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2).

Key words : 3-O--D-galactopyranosylglyceride, proliferation, migration, tube formation, CAM, MMP-2

서 론

암을 극복하기 위한 다양한 연구가 수행 되어 많은 항암제가 개발되었지만, 정상세포에 대한 부작용을 초래한다는 점에서 최근에는 부작용을 줄이면서 항암효과를 보이는 새로운 항암제 개발이 진행되는데, 혈관형성 저해제 개발도 이러한 목적의 연구이다¹⁾. 혈관신생은 여러 가지 인자에 의해 기존의 혈관으로부터 새로운 모세혈관이 생성되는 것으로 혈관형성의 정도는 종양의 성장과 전이, 재발과 예후와 많은 상관관계가 있는 것으로 보고되었다²⁾.

따라서 신생혈관의 생성을 억제함으로써 암에 대한 산소와

영양소 공급을 차단하여 암의 성장과 다른 장기로의 전이를 막기 위해 신생혈관 생성의 억제제가 치료목표로서 연구되고 있다³⁾. 이와 관련하여 최근 한의학에서도 다양한 약재와 처방을 이용하여 혈관의 신생을 억제하는 약물에 대한 실험적 연구가 활발히 이루어지고 있다^{4,5)}.

쑥갓은 우리가 일상에서 상용하는 야채의 일종으로, 한약 명으로는 <芥菜>라고 하는데, 본초학적으로 기미는 따뜻하고 맛이 매우며, 콩팥의 사기를 제거하고 구규를 통하게 하며, 열골과 머리의 풍을 치료하고, 기침을 멈추며, 속을 덥게하는 효능이 있다고 알려져 있다⁶⁾. 이에 대한 약리학적 연구로는 항박테리아⁷⁾, 항균⁸⁾ 및 항산화⁹⁾작용이 보고되었지만, 항암성 연구는 없는 실정이다. 이에 본 연구는 혈관형성작용을 스크리닝하는 가운데 쑥갓 (*Chrysanthemum coronarium* L.)으로부터 분리한 3-O-D-galactopyranosylglyceride (지방산 R1, R2 = myristic

* 교신저자 : 김성훈, 용인시 기흥읍 서천리 1 경희대학교 동서의학대학원
· E-mail : sungkim7@khu.ac.kr, · Tel : 031-201-2179
· 접수 : 2004/09/24 · 수정 : 2004/10/21 · 채택 : 2004/11/24

acid 11.62%, palmitic acid 61.90%, and oleic acid 26.48%)의 혈관 내피 세포가 관계하는 신 혈관 형성촉진 인자를 통해 유도되는 신 혈관 형성을 저해 하는 것을 확인하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

3-O-D-galactopyranosylglyceride (fatty acids R1, R2 = myristic acid 11.62%, palmitic acid 61.90% and oleic acid 26.48%)는 경희대학교 천연물 화학 실험실에서 제공 받았으며 유기용매 추출을 하였고 이 추출 후 정제물질을 GPG라 명명 하였다.

2. 방법

1) GPG의 추출법

썩갓 (100 Kg)을 추출 용기에 넣고 MeOH 1000 ml로 3회 환류 추출하여 얻어지는 용액을 다시 ethyl acetate (EtOAc) and n-butanol을 이용하여 분획을 하였으며 EtOAc층을 실리카 젤 크로마토 그래피 방법을 이용하여 확인한 후 FT-NMR spectrometer를 이용하여 구조를 확인하였다.

2) 세포 및 배양

사용된 세포는 HUVEC (human umbilical vein endothelial cell)이며 세포를 일차 배양하여 실험 하였다. HUVEC의 배지는 M199 media와 10% FBS, 3ng/ml bFGF, 10unit heparin 이 포함된 배지에서 배양 하여 사용하였다.

3) 세포독성 측정

Scudiero등¹⁰⁾이 개발한 방법 MTT 방법으로 세포독성을 측정하였다. HUVEC 세포를 20 % FBS가 첨가된 M199 배양액으로 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였다. 세포를 배양후 Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 배양 용기로부터 분리하고 5×10³ cells를 96 well plate에 분주하고 24 시간 후 배양 후 약제를 농도별로 계대 희석하여 Well 당 100 μl씩 분주하였다. 이를 24 시간 배양 한 후 MTT (5 mg/ml) 10 μl씩 넣고 4시간 동안 반응 시킨 후 ELISA reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 약제를 처리하지 않은 대조군을 100%로 하여 사멸률을 계산하였다.

4) Endothelial cell proliferation assay

일차 배양된 혈관내피세포를 (M199 media + 20% FBS + 3ng/ml + 10unit heparin) 배양 하여 0.1% gelatin으로 96well plate 표면에 처리 한 plate에 5 × 10³/well의 세포를 분주하고 12시간 후 GPG를 bFGF 10 ng/ml 포함된 배지와 포함되지 않은 배지에서 각각 약제를 농도별로 계대 희석하여 배양된 세포에 100 μl씩 분주하였다. 다시 48시간 배양 한 후 MTT를 넣고 2시간동안 반응 시킨 후 흡광도 450 nm에서 측정하였으며 약제를 처리하지 않은 대조군을 100%로 간주하여 사멸률을 계산하였다.

5) Migration assay

일차 배양 된 혈관내피세포를 M199 media + 20% FBS + 3

ng/ml + 10unit heparin에 5% CO₂, 37 °C 배양기에서 배양하였다. Polycarbonate membrane(pore size ; 12 μm)을 0.1% gelatin으로 표면 처리 한 후 boyden blind chemotaxis chamber의 아랫 칸에 혈관내피 세포 (1×10⁶/ml)를 50 μl씩 분주 하고 membrane의 거친면을 세포와 부착시킨 후 2 시간동안 배양 한 후 48 well boyden chamber의 위의칸에 bFGF 5 ng/ml이 포함된 배지에 약제를 농도별로 처리하였다. 양성 대조군으로 bFGF 5 ng/ml을 처리하였으며 음성대조군으로는 bFGF가 포함되지 않은 배지를 사용하였다. 다시 2시간동안 배양 시킨 후 membrane을 꺼내어 methanol로 고정 시킨 후 Diff Quic 용액으로 염색한 후 현미경으로 관찰 한 후 이동한 혈관내피세포를 세었다.

6) Tube Formation assay

24well plate에 matrigel을 표면 처리한 후 일차 배양된 혈관 내피세포를 2×10⁴/well 개의 세포를 분주하고 GPG를 bFGF 10 ng/ml 포함된 M199 media로 농도 희석 계대하여 처리 한 후 12 시간 배양 후 고정, Diff Quic 용액으로 염색한 후 현미경으로 관찰하였으며 사진을 다양한 필드에서 찍고 tube 가 완전히 형성된 것만을 측정하였다.

7) Cell adhesion assay

96 well palte에 0.1 % gelatin과 matrigel을 4 °C에서 12 시간 동안 plate를 도포하였다. PBS로 plate를 씻어낸 다음 1 % BSA 가 포함된 PBS를 사용하여 blocking 하였다. 다음으로 HUVEC 2×10⁴/well 과 여러 농도의 GPG를 섞어 도포 처리된 plate에 배양하였으며 XTT 방법을 이용해 adhesion된 세포를 측정하였다.

8) Gelatin zymography assay¹¹⁾

Gelatin 도포된 6 well plate에 HUVEC 세포를 5×10⁵/well cells 가 되도록 배양한 후 영양분이 첨가되지 않은 배지로 24시간 동안 숙성 시킨 다음 상층액을 모은 후 50 nM PMA를 처리한 시료를 양성 대조군으로 삼았으며 나머지 시료는 10 ng/ml의 bFGF를 섞어 만들었다. 그 다음 8 % 폴리 아크릴 아마이드 젤에 0.1 % gelatin을 첨가하고 전기 영동을 실시 하고 SDS 성분을 제거 한 다음 2가의 양성자가 포함된 완충용액으로 MMP 단백질을 36시간 동안 활성화 시키고 comassi-blue 용액을 사용하여 염색시킨 후 바로 수차례 발색시켜 MMP 활성을 이미지 분석기를 통해 촬영 하였다.

9) CAM assay

부화된 수정란을 37 °C 배양기에 2일간 보관한 후 껍질의 표면에 작은 흡집을 내어 알부민을 4 ml 제거 했다. 다시 3일 후 껍질의 2/5 가량을 제거 하여 눈으로 혈관 형성 과정을 관찰 할 수 있도록 만들었다. 시료는 100 ng 의 bFGF와 섞어 10 ul 씩 disk 점적을 한 다음 수정란에 형성된 피막위에 올려 놓는다. 시료를 처리하고 3일이 지난다음 혈관형성 모습을 이미지 분석한 다음 혈관 수를 blind test를 실시하여 측정하였다.

10) 통계처리

실험결과들은 Mean ± SD와 Mean ± SE로 나타내었고, 통계 처리는 student t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 하여 유의성 여부를 검증하였다.

실험결과

1. GPG의 세포독성

GPG를 HUVEC 세포주에 대해 세포독성을 검정한 결과 1.25-20 g/ml의 농도 범위 내에서 특이적인 세포 독성 효과를 나타 내지는 않았다. 따라서 독성이 없는 농도에서 나머지 실험을 수행하였다 (Fig 1).

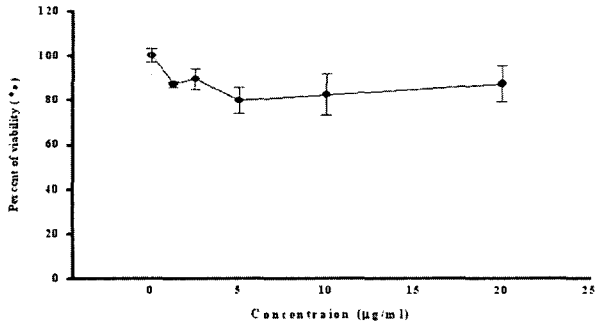


Fig. 1. Cytotoxicity of GPG on HUVEC.

2. 혈관내피세포의 증식 억제효과

신 혈관형성 과정은 여러 과정들이 연속 적으로 일어나는 다단계 반응이다. 먼저 알려진 성장 촉진 인자에 의한 내피세포의 증식을 GPG가 저해 할 수 있는 가능성에 대해 조사를 하였다. 성장인자로는 bFGF (5 ng/ml)을 사용했으며 GPG 5- 0.625 ug/ml 까지 성장인자와 함께 섞어 HUVEC에 처리 하였다. 그 결과 bFGF가 유도하는 혈관 내피 세포 증식에는 아무런 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

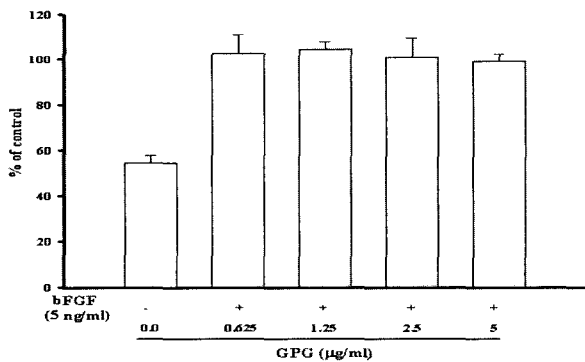


Fig. 2. GPG did not inhibit bFGF-induced proliferation on HUVEC.

3. 혈관내피세포의 분화억제 효과

다음으로 GPG가 혈관내피세포의 분화를 억제하는지를 알아보기 위하여 tube formation assay를 수행 하였다. 실험 방법에 관한 기술은 이미 기재하였으며 bFGF와 GPG의 처리 농도는 다른 실험들과 동일한 조건에서 수행 하였다. 그 결과 GPG는 bFGF가 유도하는 혈관 내피 세포의 분화에는 증식과 마찬가지로 아무런 영향을 주지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 위의 두 결과는 만약 GPG가 혈관 형성을 저해하는 기능을 수행 한다면 증식과 분화를 억제하는 기작이 아닌 다른 방법을 통하여 기능을 수행 할

가능성이 있기 때문에 다른 방법으로의 접근을 필요로 하게 되었다.

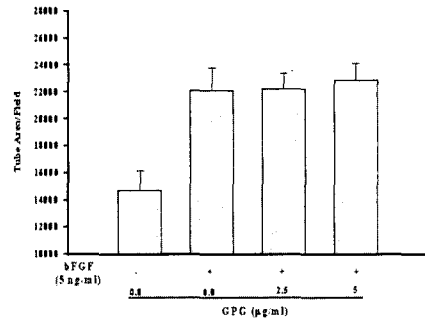
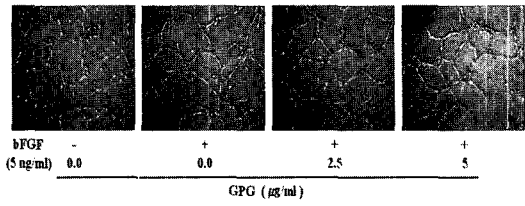


Fig. 3. GPG did not inhibit bFGF-induced tube formation on HUVEC.

4. 혈관 내피세포의 이동능 억제효과

다음으로 GPG가 혈관내피세포의 이동능을 억제하는지를 알아보기 위해 migration assay를 수행 하였다. 마찬가지로 실험에 관한 방법은 방법 및 재료 부분에 기술을 하였다. 다른 실험들과 동일하게 성장 인자의 농도와 GPG의 농도는 처리 되었다. 결과 GPG 5 ug/ml의 농도에서 음성대조군과 거의 비슷한 저해 효과를 보였으며 이 결과는 농도 의존적인 양상을 보여 주었다. 모든 실험은 3회 이상 반복한 결과이다 (Fig. 4). Membrane을 투과해서 이동한 세포의 모양을 사진으로 찍었다 (Fig. 4a). 사진을 바탕으로 직접 이동한 세포 수를 측정하여 그래프로 표시 하였다 (Fig. 4b).

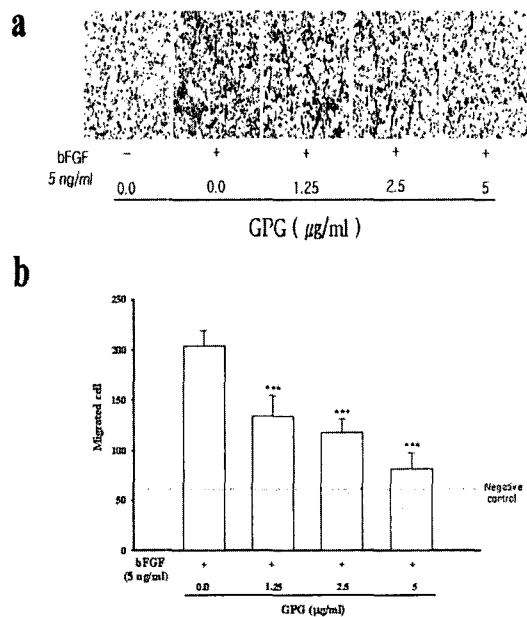


Fig. 4. Inhibitory effect of bFGF-induced migration assay by GPG on HUVEC.

5. 혈관 내피세포의 침윤과정 억제효과

다음으로 GPG가 혈관 내피 세포의 침윤과정을 저해 할 가능성에 대해 조사를 하였다 시료들의 처리 농도는 다른 실험과 동일하게 처리 되었으며 GPG 2.5 ug/ml의 실험군에서 음성 대조군과 비슷한 정도의 저해 효과를 관찰 되었다 (Fig. 5). 마찬가지로 농도 의존적인 경향을 보였으며 실험은 3 회 반복 수행 되었다.

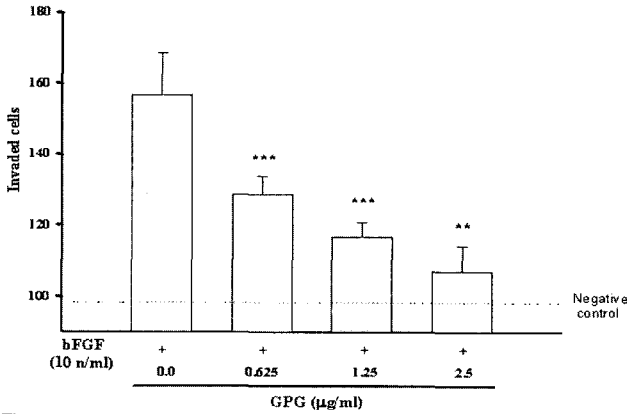


Fig. 5. Inhibitory effect of VEGF-induced invasion assay by GPG on HUVEC.

6. 혈관 내피 세포의 기질에 관한 부착성 저해 효과

이동과 침윤과정을 저해 하는 결과로 미루어 볼때 두 가지 가능성을 제시 할 수 있게 되었다. 첫 번째로 GPG는 혈관 내피 세포와 기질간의 부착을 저해 할 수 있고 다른 하나는 기질을 분해 하는 분해 효소 단백질과의 연관성 이다. 우리는 이에 두가지 가능성에 대해 조사해 보았다. 먼저 GPG가 기질과 세포간의 부착을 저해하는지에 관한 연구를 수행 하였다. 실험 방법은 이미 기제를 하였으며 실험 결과는 이동과 침윤에 영향을 주었던 GPG의 농도에서 세포와 기질간의 결합을 저해하지 않는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 기질은 이동과 침윤에 사용되었던 gelatin과 matrigel 두 가지에 대해 수행 되었다.

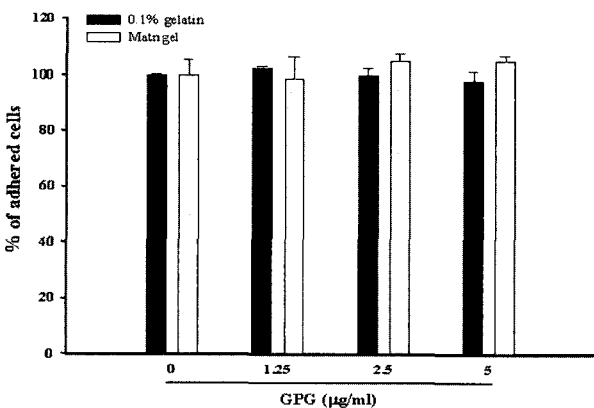


Fig. 6. Effect of GPG on adhesion of HUVECs to gelatin-Matrigel.

7. 혈관 내피 세포에서 발현되는 기질 분해 단백질의 활성 저해 효과

이미 우리는 혈관 내피 세포의 이동과 침윤과정을 저해한

GPG의 효과가 세포와 기질간의 부착성을 저해 하는 것이 아니라 라는 것을 확인 하였다. 다음으로 직접적인 부착을 저해 하는 것이 아니라면 이동과 침윤과정이 일어날 때 혈관 내피 세포가 만들어 내는 기질 분해 단백질의 활성에 GPG가 어떤 영향을 주는 지 확인을 해 보았다. 그 결과 이동과 침윤 과정에서 영향을 주었던 GPG의 농도인 5 ug/ml에서 이미 잘 알려진 기질 분해 단백질인 MMP-2의 활성을 저해 함을 확인 할 수있었다 (Fig. 7).

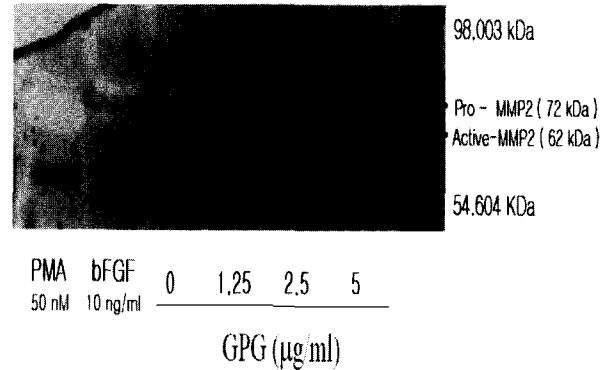


Fig. 7. Effect of GPG on MMP-2 activity of HUVECs

8. CAM assay를 통한 in vivo에서의 혈관형성 저해 효과

마지막으로 GPG가 in vitro 뿐만 아니라 in vivo에서 혈관 형성을 저해 할 수 있는지 CAM assay 모델을 이용해 실험을 수행 하였다. 실험 방법 부분에 자세한 실험 내용은 기제를 하였으며 GPG 500 ug/egg 의 농도에서 완벽한 신 혈관 형성 저해 효과를 확인 할수 있었다 (Fig. 8). 이미지 분석을 통해 혈관 형성을 저해 하는 것을 확인을 하였고 (Fig. 8a), 직접적으로 생성된 혈관 수를 측정하여 정량화 하였다 (Fig. 8b).

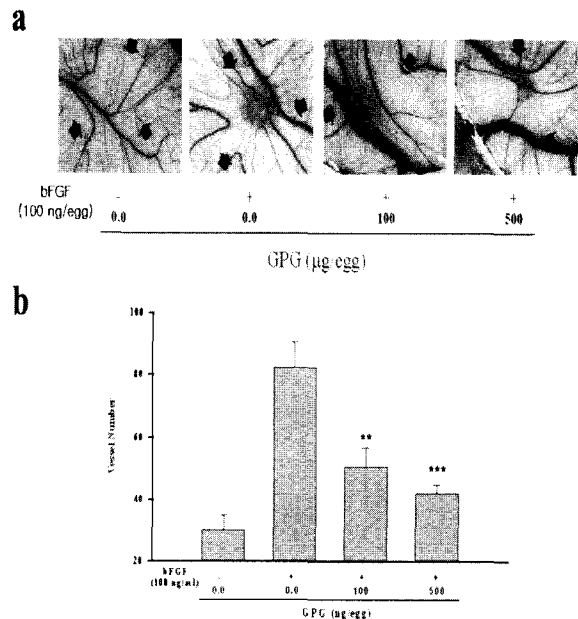


Fig. 8. Effect of GPG on bFGF-induced neovascularization in the CAM assay.

고찰

현대의 식품 섭취목적은 전통적인 식품으로부터 영양분의 공급 뿐 아니라 식품이 가지는 생리 조절기능을 이용하여 건강을 유지하는 방향으로 발전하고 있다. 실제로 여러 보고 들에 의하면 식이 섭취에 의해 암을 포함한 여러 질병을 예방 할 수 있다는 사실들이 많이 보고 되고 있다. 또한 인류의 난치 병중 하나인 암을 극복하기 위한 많은 연구가 시행되고 있고 암을 치료하는 항암제의 개발이 화학요법이 아니라 생약을 중심으로 수행되기 시작하고 있으며, 또한 항암 효과가 알려진 천연물의 성분을 분석해 암을 치료하려는 움직임이 일고 있다¹²⁾.

썩갓은 국화과에 속하는 일년생 내지 이년초로서 영양분이 풍부하고 향기가 독특하여 유럽과 아시아에 걸쳐 광범위하게 사용되어 왔다. 썩갓의 생리 활성 및 성분에 관한 연구로는 항균 및 세포 독성에 관한 보고가 있고 항암치료에 이용되는 야채로 알려져 있지만 그 구성성분에 관한 연구는 아직 미흡한 부분이다. 지금까지 밝혀진 주요 성분으로는 15가지의 essential oil, quercetin, quercetagetin과 luteolin, polyacetylene, cumambrin A, dehydrocumambrin A chlorogenic 유도체들과 곤충섭취 저해 활성을 가지는 호르몬 화합물이 몇 개 보고 되어있음을 뿐이다. 최근 밝혀진 Sesquiterpene lactone은 주로 쓴 맛을 내는 성분인데 국화과 식물들은 많이 포함하고 있고 오래동안 민간 치료약으로 애용 되어 왔으며 또한 광범위한 활성을 나타내는 것으로 보고 되었다¹³⁻¹⁵⁾. 이들 화합물 군의 생리 활성으로는 anti-microbial activity, anti inflammatory activity, cytotoxic and anti tumor activity 등이 알려져 있으나 생리 활성을 보이는 정확한 성분과 중요기전에 대해서 접근해 보려고 하였다. 생리활성 중에서도 많은 연구자들이 정진하고 있는 연구 분야인 암 치료의 접근을 하였는데, 본 연구는 썩갓 (*Chrysanthemum coronarium* L.)에서 분리한 성분인 3-O-D- galactopyranosylglyceride의 혈관형성효과를 연구하였다.

신 혈관 형성 과정은 이미 존재하는 기존 혈관에서 새로운 혈관이 형성되는 과정을 이야기 하는 것으로 암 세포가 성장을 할 때 영양분을 공급받기 위해 반듯이 일어나는 일련의 과정을 말하는 것으로 여러 가지 복합적인 과정이 일어난다. 먼저 혈관 내피 세포와 암 세포에서 세포 밖 기질의 분해 효소인 MMP 종류가 분비가 일어나게 되고 다음 혈관 내피 세포의 이동이 일어난다. 내피 세포가 이동을 하고 난 후 다시 분화가 일어나 혈관을 형성하게 되고 그 주변을 세포 밖 기질이 둘러 만들어 지게 되면서 새로운 혈관이 형성 되는 것이다¹⁶⁻¹⁷⁾. 그러므로 암을 연구하는 많은 연구자들은 암을 정복하기 위해 신 혈관 형성 과정을 여러 단계에서 저해 하는 연구를 수행 하고 있다.

최근 항암 효과가 이미 알려진 여러 식물체에서 특이적 물질을 분리 해 그 물질들이 지닌 신 혈관 형성 저해 효과에 관한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 이에 썩갓은 심혈관질환에 유효했다는 보고¹⁸⁾가 있었으나 혈관형성과 관련된 유효 물질에 관한 연구는 수행 되지 않았다. 그러므로 본 연구는 썩갓에서 분리한 GPG가 지닌 신 혈관 형성 저해 효과에 관한 연구를 *in vitro*

와 *in vivo* 모델을 이용하여 확인 하였다.

특이한 사실을 GPG는 혈관 내피 세포의 증식과 분화 과정에서는 아무런 영향을 주지 않았다 (Fig. 2,3). 증식과 분화과정은 신 혈관 형성 과정의 뒤쪽 부분에 해당하는 과정이다. 즉 혈관 내피 세포가 주변의 세포 밖 기질들을 분해 시키고 이동하기 시작하여 새로운 틀을 형성했을 때 증식과 분화가 일어난다. 증식의 대표적인 내부 신호는 MAPK 계통의 ERK 기전을 말할 수 있는데 ERK 단백질은 증식을 조절하는 대표적 신호 기전으로 인산화를 통해 그 신호를 하위 단계로 전달한다. 또한 다른 여러 가지 MAPK 계통의 단백질 등이 신호를 담당하기도 한다. 분화 과정 또한 MAPK 신호로 영향을 받기 때문에 동시에 MAPK의 인산화 과정을 확인하는 것이 중요하다. 앞에서 실험한 결과는 표면적으로 증식과 분화에는 아무런 영향을 주지 않았기 때문에 GPG는 아마 혈관 내피 세포의 증식에 관여하는 기작인 MAPK의 인산화 과정에는 영향을 주지 않는다는 것을 제시해 줄 뿐만 아니라 분화과정에 관여하는 신호 전달 과정에도 별다른 영향을 주지 않는다고 생각 할 수 있다.

그러므로 좀더 다른 접근을 생각해 보기로 하였는데 그것이 신 혈관 형성 과정의 초기 단계인 혈관 내피 세포의 이동과 세포 밖 기질의 분해 활성이다. 여러 측면에서 살펴보았을 때 증식과 분화가 신 혈관 형성에 중요한 과정인지 아님 이동과 침윤이 중요한 과정인지에 대해서는 세계의 여러 연구자들의 아직도 논박을 계속 하고 있는 실정이다. 그러나 이동과 침윤이 일어나고 난 이후 다른 단계의 과정들이 진행 될 수 있으므로 아마 신 혈관 형성 과정은 초기 단계의 과정이 중요한 과정이라 말할 수 있다. 본 연구에서 GPG는 세포 이동과 침윤은 농도 의존적인 경향으로 저해를 하였다 (Fig. 4, 5). 결국 신 혈관 형성 과정의 후반 단계에는 별다른 영향이 없었으나 초기 단계를 저해 함으로써 앞으로 일어나야할 후반 과정을 초기에 진압하는 것으로 추정할 수 있다.

그러나 문제점이 없는 것이 아니다. 위의 결과로 미루어 볼 때 두 가지 관점에서 생각해 볼 수 있다. 그 첫 번째는 혈관 내피 세포가 기질과의 부착을 저해 할 가능성 이다. 혈관 내피 세포는 세포 밖의 기질 성분들과 확고한 결합을 이루면서 단단한 혈관을 형성한다. 기질 성분들과의 결합을 형성하지 못하면 혈관을 유지 할 수 없게 된다. 본 실험에 따르면 GPG는 혈관 내피 세포와 기질 성분들과의 결합에는 아무런 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 이 실험을 통해 하나의 경우는 아니라는 것을 직접적으로 증명하는 것이다. 남아있는 다른 가능성은 기질 분해 단백질인 MMP와 GPG의 연관관계 이다. MMP는 이미 잘 알려진 기질 분해 효소로써¹⁹⁾ 그 기능을 저해함으로써 혈관 형성 과정에 영향을 준다는 보고 들이 많이 되어 있다. 기대 했던 대로 GPG는 MMP-2의 활성을 저해 시키는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 7). 물론 MMP-2의 유전자 발현 단계에서 어떤 영향을 주는 것인지 아님 MMP의 antagonist인 TIMP와의 결합을 막는 것인지 확인해야 하는 것이 숙제로 남아 있기는 하다. 다시 말하자면 GPG가 혈관 내피 세포로 직접 들어가 핵에서 MMP의 발현을 조절하는 것인지 아니면 단백질이 만들어 질 때 전사후 과

정의 변화를 통해 분해 단백질의 활성을 저해 하는 것 인지 알수가 없다. 또한 이미 알려진 MMP의 inhibitor인 TIMP와 GPG가 어떤 상관관계를 보일 수 있다. 위와 같은 경우에 대해서는 아직 더욱 연구를 해야 할 부분이다. 다만 본 연구를 토대로 살펴볼 때 이를 결국 GPG는 어떠한 기작인지 확인해 보아야 하지만 아마도 MMP-2의 활성을 저해 함으로써 신 혈관 형성과정을 저해 한다고 생각 할 수 있으나, 앞으로 활성물질의 분리와 이와 관련된 분자생물학적 신호전달 기전의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 보건복지부한방치료기술 중점공동연구과제 연구비(01-PJ9-PG1-01C005-004) 및 Biogreen 21 project의 지원으로 수행되었기에 감사드립니다.

참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사, 218, 1991.
2. Folkman, J., and Siegel, Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 267, pp.10931-10934, 1992.
3. Hanahan, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science.* 277, pp.48-50, 1997.
4. Lee JH, Shim BS, Ahn KS, Choi SH. Anti-metastatic effects of Xuefuzhuyutang. *Journal of Korean Oriental Oncology* 5:61-75, 1999.
5. Ata, N; Oku, T; Hattori, M; Fujii, H; Nakajima, M; Saiki, I. : Inhibition by galloylglucose(GG6-10) of tumor invasion through extracellular matrix and gelatinase-mediated degradation of type IV collagens by metastatic tumor cells. *Oncology Research*, 8, pp.503-511, 1996.
6. 허준, 동의보감, 납산당, 716, 1966.
7. Urzua A, Mendoza L. Antibacterial activity of fresh flower heads of *Chrysanthemum coronarium*. *Fitoterapia. Sep;* 74(6):606-8, 2003.
8. Alvarez-Castellanos PP, Bishop CD, Pascual-Villalobos MJ. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry.* May;57(1):99-102, 2001.
9. Takenaka M, Nagata T, Yoshida M. Stability and bioavailability of antioxidants in garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). *Biosci Biotechnol Biochem.* Dec;64(12):2689-91, 2000.
10. Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., and Boyd, M.R. : Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, *Cancer Res.*, 48, pp.4827-4833, 1988.
11. Ata, N; Oku, T; Hattori, M; Fujii, H; Nakajima, M; Saiki, I. : Inhibition by galloylglucose(GG6-10) of tumor invasion through extracellular matrix and gelatinase-mediated degradation of type IV collagens by metastatic tumor cells. *Oncology Research*, 8, pp.503-511, 1996.
12. Turner F, Smith G, Sachse C, Lightfoot T, Garner RC, Wolf CR, Forman D, Bishop DT, Barrett JH. Vegetable, fruit and meat consumption and potential risk modifying genes in relation to colorectal cancer. *Int J Cancer.* Nov 1;112(2):259-64, 2004.
13. El-Masry, S., Abou-Dania, A. H. A., Darwish, F. A., Abou-Karum, M. A., Grenz, M., and Bohlmann F., Sesquiterpene lactones from *Chrysanthemum coronarium*. *Phytochemistry.* 23, pp. 2953-2954, 1984.
14. Sanz, J. F., Falco, E., and Marco, J. A., New acetylenes from *Chrysanthemum coronarium* L. *Liebigs. Ann Chem.* pp. 303-305, 1990.
15. Alvarez-Castellanos, P. P., Bishop, C. D., and Pascual-Villalobos, M. J., Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry.* 57, pp.99-102, 2001.
16. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 24;88(2):277-85, 1997.
17. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 21;79(2):315-28, 1994.
18. Gins VK, Kolesnikov MP, Kononkov PF, Trishin ME, Gins MS. Oxyanthraquinones and flavonoids from garland chrysanthemum. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* May-Jun;36(3):344-53, 2000.
19. Cornelius L. A., Nehring L. C, Roby J. D, Parks W. C. and Welgus H. G.. Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors and migration. *J Invest Dermatol.* 105, pp. 170-176, 1995.