

권백(*Selaginella involvens*) 물 추출물의 혈관 형성억제 및 혈관내피세포 이주 억제 효과

고유진 · 박승희* · 이용희* · 박병철 · 허종현* · 민용득* · 김재기* · 김정애#

영남대학교 약학대학, *정산생명공학연구소

(Received December 27, 2006; Revised February 8, 2007)

Inhibitory Effects of Water Extract of *Selaginella involvens* on the Tube Formation and Invasion of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Yu Jin Ko, Seung Hee Park*, Yong-Hwa Lee*, Byung Chul Park, Jong Hyun Hur*,
Yong Deuk Min*, Jae Ki Kim* and Jung-Ae Kim#

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

*R&D Center, Jung San Biotechnology, Whasoung 445-964, Korea

Abstract — Among pteridophytes, *Selaginella involvens* Spring and *Equisetum arvense* L. are used in folk medicine in Eastern Asian countries including Korea. The water extracts from *Selaginella involvens* Spring (SW) and from *Equisetum arvense* L (EW) did not affect viability of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). However, SW dose-dependently inhibited tube formation and migration of HUVECs, whereas EW did not. These results suggest that the water extract from *Selaginella involvens* Spring may have anti-angiogenic activity.

Keywords □ pteridophytes, *Selaginella involvens* spring, *Equisetum arvense* L, angiogenesis, tube formation, migration

혈관신생(angiogenesis)이란 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 만들어지는 과정을 일컫는 것으로, 수정란 발생과정에서 배아가 발달될 때 이루어지는 혈관형성(vasculogenesis) 과정과는 달리 정상적인 성인의 몸에서는 거의 나타나지 않는다. 그러나, 여성 생식주기의 자궁내막이나 상처가 치유되는 과정에서 일어나는 혈관신생은 엄격히 조절되는 정상적인 생리현상인 반면,^{1,2)} 조절되지 않는 비정상적인 혈관신생은 악성 종양의 성장, 류마티스 관절염, 당뇨 등 여러 가지 만성 질환의 원인이 된다.³⁾

암세포가 비정상적인 지속적 성장을 하기 위해서는 영양분과 산소의 공급이 필요하며, 이를 위해서는 악성종양 내부로 끊임없는 신생혈관생성이 필요하다.⁴⁾ 암의 성장과정에서의 혈관신생은 암세포로부터 혈관내피세포 성장인자(VEGF)나 섬유아세포 성장인자(bFGF)와 같은 주요 인자의 방출에 의해 시작된다.^{5,6)}

이 인자들은 기존 혈관의 내피세포를 활성화시켜 내피세포의 증식과 이주 및 침윤을 유도하여 혈관 형성을 촉진시킨다.⁵⁾ 따라서, 혈관신생억제는 암의 성장과 전이의 진행과정을 막는 좋은 항암 치료법이다. 여러 가지 혈관신생 억제활성물질로 angiostatin, endostatin, restin, pigment epithelium-derived factor, canstatin 그리고 tumstatin 등이 알려져 있다.⁷⁾ 이외에도 천연 물질을 이용한 혈관신생억제 활성 물질을 개발하고자 하는 연구는 활발히 이루어지고 있으나 아직까지 그 성과가 미미한 실정이다.

고사리과에 속하는 권백(*Selaginella involvens* Spring)과 문형(*Equisetum arvense* L.)은 한국을 포함하여 동아시아에서 민간요법으로 사용되는 식물이다. 비록 이 약초들이 혈액순환을 좋게 하고 오래 복용하면 장수를 하며^{8,9)} 항암작용^{9,10)}이 있다고 알려져 있지만 정확한 약리 작용이 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 민간 요법으로 사용되어온 권백(*Selaginella involvens* Spring)과 문형(*Equisetum arvense* L.)의 물 추출물을 대상으로 정상세포인 혈관내피세포(HUVECs)를 이용하여 matrigel상에서의 혈관 형성과 혈관내피세포의 침윤 실험을 통해 혈관신생 억제 효과를 알아보고자 하였다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-810-2816 (팩스) 053-810-4654
(E-mail) jakim@yu.ac.kr

실험 방법

실험 세포 및 배양

제대정맥유래 혈관내피세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cell)는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, U.S.A.)으로부터 구입하여 사용하였으며 젤라틴으로 코팅된 T-175 플라스크에 계대하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양을 하였다. 2% 우태혈청, 섬유아세포 성장인자, 표피성장인자, 아스코르브산, 하이드로코티손, 혈관내피세포 성장인자, 젠타マイ신, 헤파린 등이 포함된 endothelial cell basal medium-2(EBM-2 medium) 배지는 CAMBREX사(San Diego, CA, U.S.A.) 제품을 구입하여 사용하였다. 모든 실험에서 제대정맥유래 혈관내피세포는 계대배양 2회에서 6회까지 이용하였다.

권백 및 문형 물 추출물 제조법

건조된 권백을 경동시장에서 구입하여 전초 100 g을 잘게 썰어서 10배량의 증류수 1000 mL에 넣고 100°C에서 4시간 환류 냉각 추출하였다. 이 추출액을 뜨거울 때 여과하여 여액을 회전감압농축기에서 45°C로 감압 농축하여 검체 농도를 100 g/100 mL로 하였다. 마찬가지로 문형 전초를 경기도 화성시에서 채집하여 물에 씻어 그늘에서 건조한 후 이 건조된 전초 100 g을 잘게 썰어서 10 배량의 증류수 1000 mL에 넣고 100°C에서 4시간 환류 냉각 추출하였다. 이 추출액을 뜨거울 때 여과하여 여액을 회전감압농축기에서 45°C로 감압 농축하여 검체 농도를 100 g/100 mL로 하였다.

세포 생존율의 측정

혈관내피세포(HUVECs)를 96 well-plate에 배양하였다. 물 추출물 처리 48시간 후, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) 5 mg/mL 용액을 각 well에 처리한 후 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 배지를 제거한 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 넣어 형성된 formazan 크리스탈을 녹여서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈관 형성 실험

48 well-plate에 100 μL matrigel(BD Biosciences, San Diego, CA, U.S.A.)로 코팅하여 37°C에서 30분간 젤화 시켰다. 굳은 matrigel 위에 EBM-2 배지로 혼합한 혈관내피세포를 well당 5 × 10⁴개의 세포 농도로 계대 배양을 하였다. 권백(*Selaginella involvens* Spring)과 문형(*Equisetum arvense* L.) 물 추출물을 농도별로 처리하여 37°C에서 14시간 동안 배양한 후 관 형성 정도를 현미경(TE2000-U, NiKON, Japan)으로 촬영하였다.

세포 침윤의 측정

세포 침윤 측정은 24 well-plate의 chamber하나당 5 × 10⁴개의

세포를 이용하였다. Transwell(Corning Costar, Cambridge, MA, U.S.A.)의 inserts 윗부분과 아랫부분을 각각 40 μL의 matrigel(1.5 mg/ml)과 40 μL의 type I collagen(0.5 mg/ml)으로 코팅하였다. Transwell의 chamber에는 여러 가지 성장 인자들과 5% 우태 혈청이 포함된 EBM-2 배지를 넣은 후 inserts를 각 chamber에 삽입하였다. Matrigel로 코팅된 inserts 위에 세포를 계대하여 권백(*Selaginella involvens* Spring)과 문형(*Equisetum arvense* L.) 물 추출물을 농도별로 처리하고 37°C에서 24시간 배양하였다. Transwell의 insert막의 아래 표면으로 전이된 세포를 메탄올로 고정시키고 hematoxylin과 eosin으로 염색한 후 세포가 침윤된 막을 조심스럽게 뜯어낸 후 glass slide위에 올려 놓고 현미경(TMS, Nikon, Japan)으로 촬영을 하였다.

실험 결과 및 고찰

권백 및 문형 물 추출물의 혈관내피세포 생존율에 미치는 영향 혈관내피세포(HUVECs)의 세포 생존율에 미치는 영향을 측정

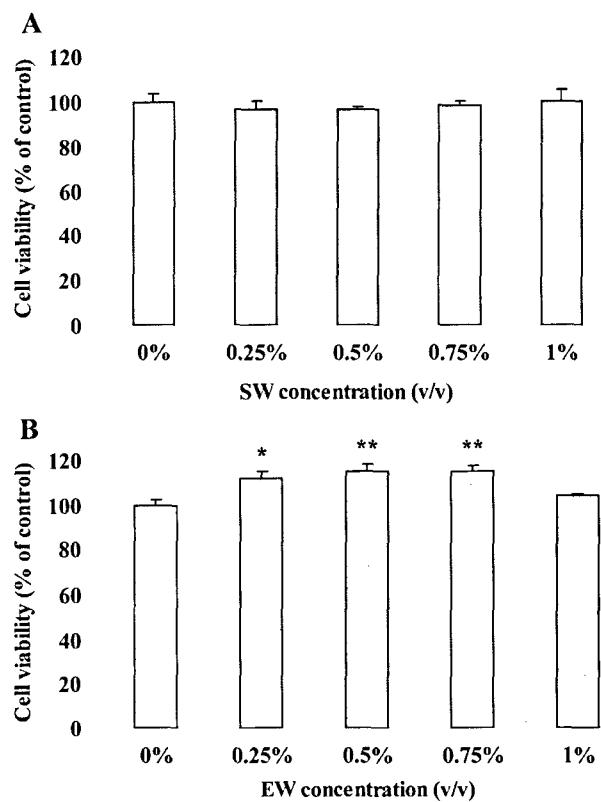


Fig. 1 – Effects of *Selaginella involvens* Spring (SW) and *Equisetum arvense* L. (EW) on the viability of HUVECs. Cells were treated with each concentration of water extract from *Selaginella involvens* Spring (A) and *Equisetum arvense* L. (B) for 48 hr at 37°C. Cell viability was measured by MTT assay. Values are mean±S.D. *P<0.05 and **P<0.01 compared to drug-untreated control.

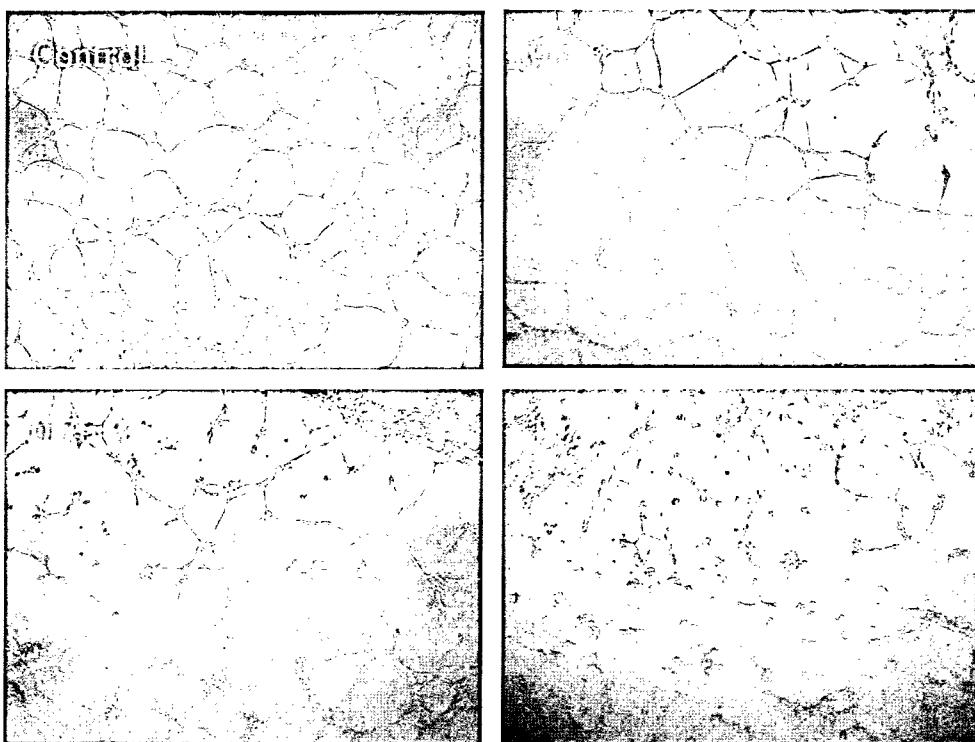


Fig. 2 – Inhibitory effect of *Selaginella involvens* Spring (SW) on tube formation of HUVECs. A 48 well plate was coated with 100 μ l of matrigel basement membrane matrix per well and polymerized at 37°C for 30 min. Cells were plated on top of matrigel and treated with various concentrations of water extract of *Selaginella involvens* Spring (SW) for 14 hr at 37°C.

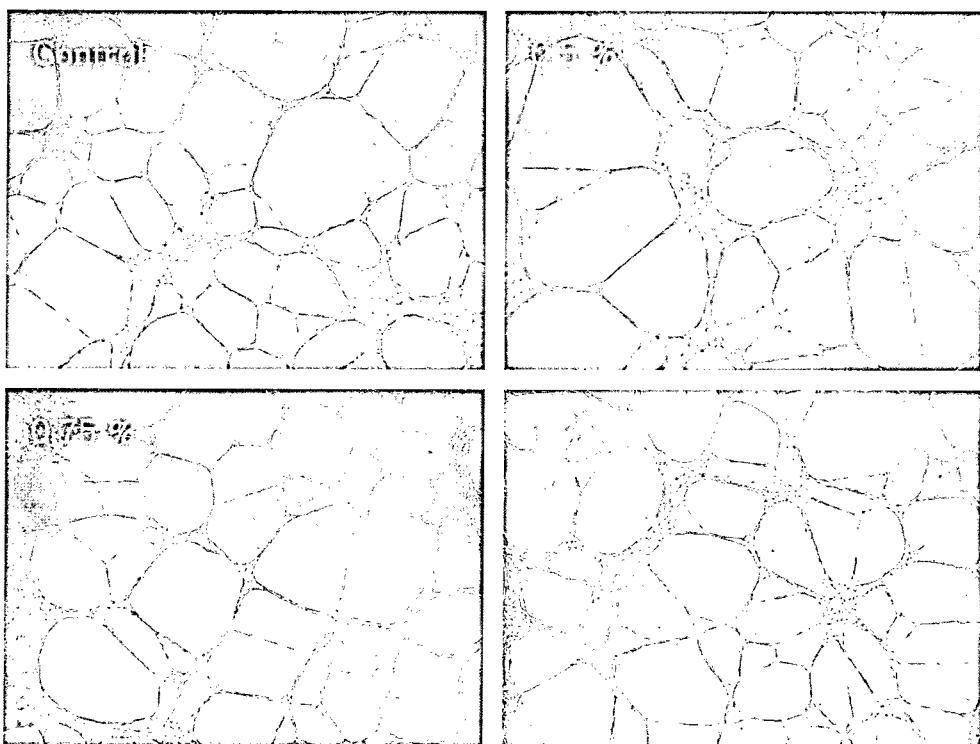


Fig. 3 – Effect of *Equisetum arvense* L. (EW) on tube formation of HUVECs. A 48 well plate was coated with 100 μ l of matrigel basement membrane matrix per well and polymerized at 37°C for 30 min. Cells were plated on top of matrigel and treated with various concentrations of water extract of *Equisetum arvense* L. (EW) for 14 hr at 37°C.

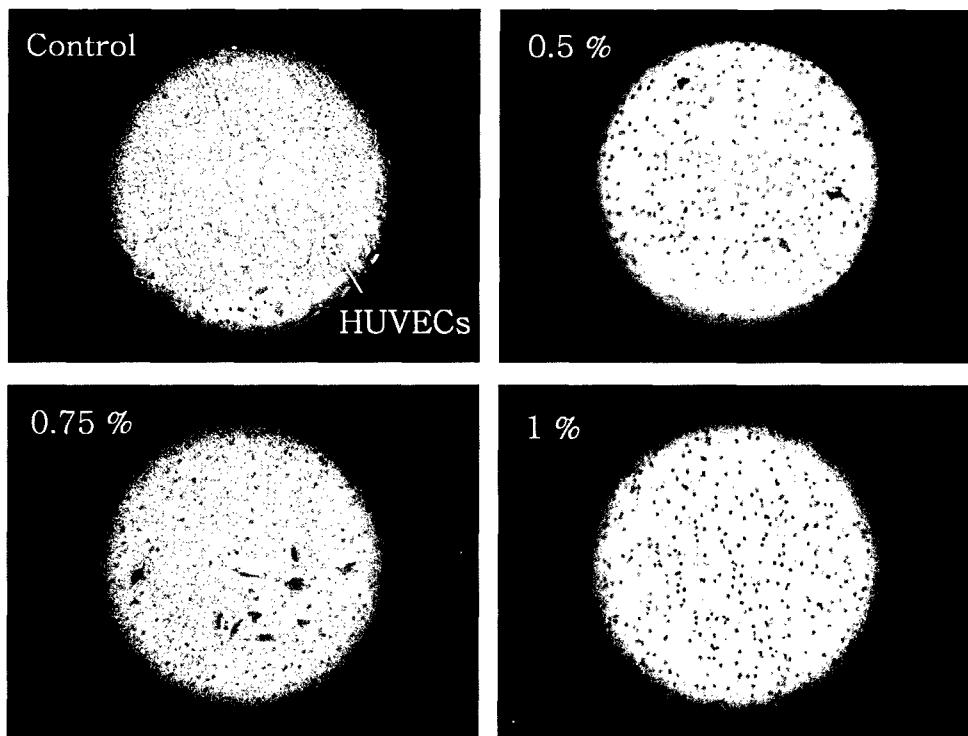


Fig. 4 – Inhibitory effect of water extract from *Selaginella involvens* Spring (SW) on HUVEC invasion assay. The upper and lower parts of transwell chambers were coated with 40 μ l of matrigel (1.5 mg/ml) and 40 μ l of type I collagen (0.5 mg/ml), respectively. The medium in the lower chamber transwell contained 5% fetal bovine serum with supplement in EBM-2 medium. Cells suspended in serum- and supplement-free medium were plated on the matrigel-coated chambers in the presence of various concentrations of *Selaginella involvens* Spring (SW) for 24 hr at 37°C.

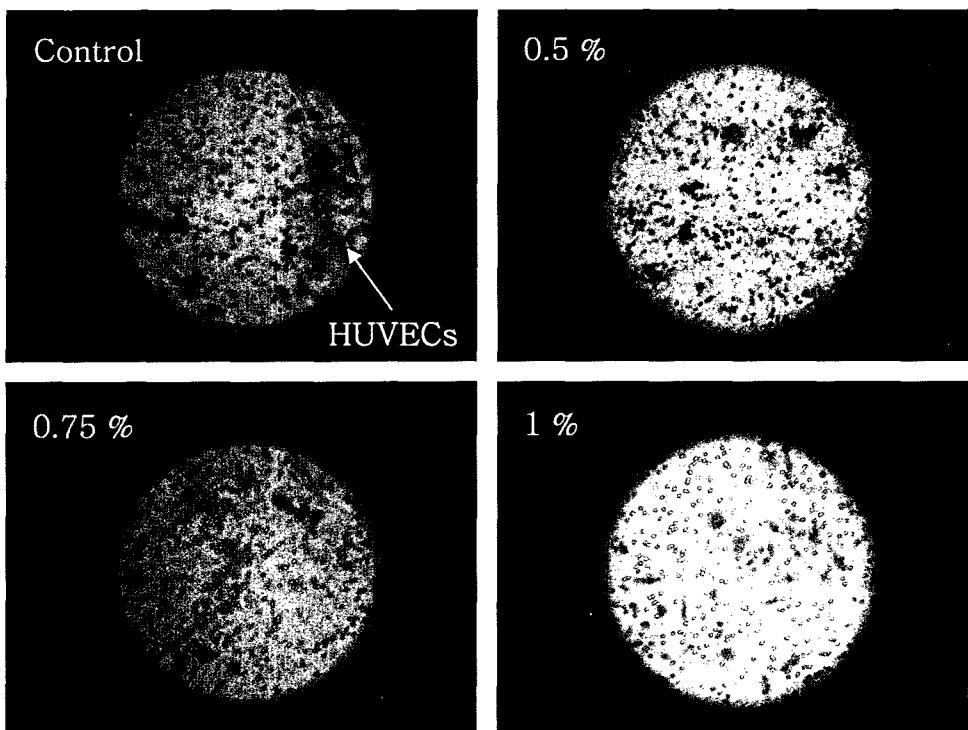


Fig. 5 – Effect of water extract from *Equisetum arvense* L. (EW) on HUVEC invasion assay. Cells were treated with various concentrations of *Equisetum arvense* L. (EW) for 24 hr at 37°C. Treatment with various concentrations of EW did not affect HUVEC migration.

한 결과는 Fig. 1과 같다. 권백 물 추출물을 % 농도별(v/v)로 증가시켜 주었을 때 1%(v/v) 농도까지 세포 생존율에 큰 영향이 없었다(Fig. 1A). 반면, 문형 물 추출물의 경우, 0.75%(v/v) 농도 까지 세포의 생존율이 증가하는 경향을 보여 문형 물 추출물이 혈관내피세포의 증식을 어느 정도 촉진하는 작용이 있는 것 같았지만, 1%(v/v) 농도에서는 세포의 생존율이 물 추출물을 처리하지 않은 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1B).

혈관내피세포에서 관 형성(tube formation)의 측정

세포 침윤 실험과 동일하게 권백과 문형의 물 추출물을 % 농도별로 처리하여 혈관내피세포의 관 형성 정도를 측정하였다. 물 추출물을 처리하지 않은 대조군에서는 관 형성이 잘 이루어짐을 볼 수 있으나 권백 물 추출물을 처리한 그룹에서는 농도 의존적으로 관 형성이 억제 되었다(Fig. 2). 한편, 문형 물 추출물의 경우 농도 증가에 상관없이 모두 대조군과 유사한 정도로 관이 형성 되어 문형 물 추출물은 관 형성에 큰 영향이 없음을 알 수 있었다(Fig. 3).

혈관내피세포 침윤에 미치는 영향

권백과 문형의 물 추출물을 % 농도별로 처리한 후 혈관내피세포의 침윤 정도를 측정해 보았다. 추출물을 처리하지 않은 대조군은 아래 chamber transwell에 첨가한 배지에 함유되어 있는 혈관내피 성장인자, 섬유세포 성장인자 등의 영향으로 상당한 세포의 침윤이 일어나는 것에 비해 권백 물 추출물을 처리한 그룹에서는 세포의 침윤 정도가 현저히 줄어들었다(Fig. 4). 그러나 문형 물 추출물의 경우 대조군과 비교하여 세포의 침윤 정도에 변화가 없었다(Fig. 5).

결 론

본 연구에서는 한국에서 민간요법으로 사용 되고 있는 고사리과에 속하는 권백(*Selaginella involvens* Spring)과 문형(*Equisetum arvense* L.)의 물 추출물을 이용하여 혈관 신생 과정인 혈관내피세포의 증식, 혈관 형성, 침윤에 미치는 효과를 알아보았다. 권백의 물 추출물은 혈관내피세포에서 농도 의존적으로 혈관의 형성과 이주 및 침윤을 억제하는 것을 볼 수 있었다. 반면 문형 물 추출물의 경우 혈관 형성과 침윤에 어떤 영향도 없음을 알 수 있었다. 이 결과는 권백 물 추출물이 혈관신생 억제 효능 물질로서 유용함을 시사한다.

감사의 말씀

이 논문은 2005년 정부(교육인적자원부)의 지원으로 한국학술

진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(KRF-2005-204-E00119).

문 헌

- 1) Rosenblatt, M. I. and Azar, D. T. : Anti-angiogenic therapy: Prospects for treatment of ocular tumors. *Semin. Ophthalmol.* **21**, 151 (2006).
- 2) Mousa, S. A., Mohamed, S., Wexler, E. J. and Kerr, J. S. : Antiangiogenesis and anticancer efficacy of TA138, a novel alphavbeta3 antagonist. *Anticancer Res.* **25**, 197 (2005).
- 3) Lin, C. M., Chang, H., Chen, Y. H., Li, S. Y., Wu, I. H. and Chiu, J. H. : Protective role of wogonin against lipopolysaccharide-induced angiogenesis via VEGFR-2, not VEGFR-1. *Int. Immunopharmacol.* **6**, 1690 (2006).
- 4) Kawaguchi, T., Yamashita, Y., Kanamori, M., Endersby, R., Bankiewicz, K. S., Baker, S. J., Bergers, G. and Pieper, R. O. : The PTEN/Akt pathway dictates the direct alphaVbeta3-dependent growth-inhibitory action of an active fragment of tumstatin in glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* **66**, 11331 (2006).
- 5) Yamakawa, S., Asai, T., Uchida, T., Matsukawa, M., Akizawa, T. and Oku, N. : (-)-Epigallocatechin gallate inhibits membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP, and tumor angiogenesis. *Cancer Lett.* **210**, 47 (2004).
- 6) Ali, N., Yoshizumi, M., Yano, S., Sone, S., Ohnishi, H., Ishizawa, K., Kanematsu, Y., Tsuchiya, K. and Tamaki, T. : The novel Src kinase inhibitor M475271 inhibits VEGF-induced vascular endothelial-cadherin and beta-catenin phosphorylation but increases their association. *J. Pharmacol. Sci.* **102**, 112 (2006).
- 7) Cao, J. G., Peng, S. P., Sun, L., Li, H., Wang, L. and Deng, H. W. : Vascular basement membrane-derived multifunctional peptide, a novel inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)* **38**, 514 (2006).
- 8) 허준. 동의보감.
- 9) Gayathri, V., Asha, V. V. and Subramoniam, A. : Preliminary studies on the immunomodulatory and antioxidant properties of *Selaginella* species. *Indian J. Pharmacol.* **37**, 381 (2005).
- 10) Yang, S. F., Chu, S. C., Liu, S. J., Chen, Y. C., Chang, Y. Z. and Hsieh, Y. S. : Antimetastatic activities of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) on lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Ethnopharmacol.* In Press (2006).