

Inhibitory Effect of Chloroform Extract of Marine Algae *Hizikia Fusiformis* on Angiogenesis

Myeong-Eun Jegal^{1†}, Yu-Seon Han^{1†}, Shi-Young Park², Ji-Hyeok Lee³, Eui-Yeun Yi⁴ and Yung-Jin Kim^{1,4*}

¹Institute of Nanobio Convergence, Pusan National University, Busan 46241, Korea

²Korea Mouse Metabolic Phenotyping Center, Lee Gil Ya Cancer and Diabetes Institute, Gachon University, Incheon 21999, Korea

³Natural Products Research Division, Honam National Institute of Biological Resources, Mokpo 58762, Korea

⁴Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received April 29, 2024 / Revised June 10, 2024 / Accepted June 11, 2024

Angiogenesis is the process by which new blood vessels form from existing blood vessels. This phenomenon occurs during growth, healing, and menstrual cycle changes. Angiogenesis is a complex and multifaceted process that is important for the continued growth of primary tumors, metastasis promotion, the support of metastatic tumors, and cancer progression. Impaired angiogenesis can lead to cancer, autoimmune diseases, rheumatoid arthritis, cardiovascular disease, and delayed wound healing. Currently, there are only a handful of effective antiangiogenic drugs. Recent studies have shown that natural marine products exhibit antiangiogenic effects. In a previous study, we reported that the hexane extract of *H. fusiformis* (HFH) could inhibit the development of new blood vessels both *in vitro* and *in vivo*. The aim of this study was to describe the inhibitory effect of chloroform extracts of *H. fusiformis* on angiogenesis. To investigate how chloroform extract prevents blood vessel growth, we examined its effects on HUVEC, including cell migration, invasion, and tube formation. In a mouse Matrigel plug assay, *H. fusiformis* chloroform extract (HFC) also inhibited angiogenesis *in vivo*. Certain proteins associated with blood vessel growth were reduced after HFC treatment. These proteins include vascular endothelial growth factor (VEGF), mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal transduction kinase, and serine/threonine kinase 1 (AKT). These studies have shown that the chloroform extract of *H. fusiformis* can inhibit blood vessel growth both *in vitro* and *in vivo*.

Key words : Anti-angiogenesis, brown algae, *Hizikia fusiformis*, natural extracts, vascular endothelial growth factor (VEGF)

서 론

혈관신생은 기존 혈관에서 새로운 미세 혈관을 형성하고 확장시키는 것[8, 11, 19, 45]으로 조직의 치유, 상처의 회복 및 항상성을 유지하는 데 필수적이다[8, 9]. 혈관 신생 과정은 다양한 세포와 인자들의 상호작용에 의해 조절된다[8, 21]. 즉, 혈관신생 촉진인자와 혈관신생 억제인자 사이의 균형에 의해 엄격하게 조절되며[11, 45], 상향 조절된 혈관신생 단백질, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 섬유

아세포 성장 인자(FGF)는 암, 죽상동맥경화증, 당뇨병성 망막병증을 포함한 병리학적 상태에 중요하다[28]. 또한, 상처 치유 과정 중에는 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 혈소판 유래 성장 인자(PDGF) 및 혈관형성인자(angioproteins)와 같은 다양한 혈관신생 관련 인자들이 새로운 혈관의 형성에 기여한다[36]. 그러므로 혈관 미세환경 내의 양성 및 음성 혈관신생 인자들 사이의 균형을 유지하는 것이 혈관신생을 효과적으로 규제하는 데 매우 중요하다. 이러한 균형을 통하여 새로운 혈관의 형성을 적절하게 통제하고 병리적 상태로의 비정상적인 혈관신생 반응을 예방하게 된다. 따라서 혈관신생 관련 질환의 예방 및 치료를 위해 항혈관신생제가 집중적으로 연구되고 있으며[15], 현재 건강기능 식품 및 음료의 성분으로 사용하기 위한 천연 추출물 및 합성 약물에 대한 관심이 높아지고 있다[30].

해양 유래 천연물질은 다양한 화학적 다양성을 갖고 있으며, 독특한 생체기능적 특성으로 인해 오랫동안 약리

*Corresponding author

Tel : +82-50-510-2176, Fax : +82-51-513-9258

E-mail : yjinkim@pusan.ac.kr

[†]These authors contributed equally to this work.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

학적 연구의 후보물질로 연구되어 왔다[13]. 해조류의 2차 생산물에는 폴리페놀, 색소, 다당류 등 다양한 생리 활성 화합물이 풍부하며[18, 38, 44], 기능식품, 제약, 화장품 산업에서 큰 잠재력을 가지고 있다[18, 44]. 특히, 식용 갈조류 중 하나인 *Hizikia fusiformis* (*H. fusiformis*)에는 항산화, 항암, 항고혈압, 항균, 항염 특성을 지닌 생리활성 다당류가 풍부하다[18, 44]. 최근에는 암세포주를 이용하여 *H. fusiformis* 추출물과 항암효과에 대한 연구도 보고되었다[18].

본 연구실에서 *H. fusiformis* 핵산 추출물의 혈관신생 억제 효과를 *in vitro* 및 *in vivo*에서 확인하고 보고하였다[25]. 본 연구에서는 이전 연구를 확장하여 *H. fusiformis*의 클로로포름 추출물 또한 *in vitro* 및 *in vivo*에서 혈관신생을 억제함을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

재료

Endothelial basal medium (EGM-2; Cat. No: CC-3156), EGM-2 Endothelial SingleQuots™ Kit (Cat. No: CC-4176), 그리고 ReagentPack™ Subculture Reagents (Cat. No: CC-5034)는 Lonza (Basel, Switzerland)에서 구매하였다. Endothelial cell growth medium (EGM; Cat. No: C-22010)은 PromoCell (Heidelberg, Germany)에 구매하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) reagent는 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구매하였다. The Matrigel Matrix (Cat. No: 354234)와 standard Transwell® permeable supports (Cat. No: 3422)는 Corning (NY, USA)에서 구매하였다. Hemoglobin assay kit는 Sigma-Aldrich (MO, USA)를 통해 구매하였다. Pro-PREP lysis buffer는 iNtRON (Daejeon, Korea)에서 구매하였다. 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구매하였다. ERK, p-ERK, Akt, p-Akt, 그리고 GAPDH 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구매하였다. VEGF 항체는 Invitrogen (Waltham, MA, USA)에서 구매하였다.

Primary cell culture

인간 제대 정맥 내피 세포(HUVECs, Lonza, Heidelberg, Germany)를 2% Fetal Bovine Serum (FBS)이 함유된 EGM-2 Endothelial SingleQuots™ Kit (Lonza)가 보충된 Endothelial basal medium-2 (EGM-2, Lonza)에서 배양하였다. 몇몇 실험에서는 세포는 2% FBS, 0.004 ng/ml endothelial cell growth supplement, 0.1 ng/ml EGF (recombinant human), 1 ng/ml basic FGF (recombinant human), 90 µg/ml heparin, 1 µg/ml hydrocortisone이 포함된 Endothelial cell growth basal medium (EGM)을 이용하여 배양하였다. 모든 실험

에서 passage 2-9 사이의 세포를 사용하였고, 세포는 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다.

Chloroform extract of *Hizikia fusiformis*

본 연구에 사용한 *Hizikia fusiformis* 클로로포름 추출물은 국립호남권생물자원관 이지혁 박사로부터 제공받았으며, 분말 형태의 추출물을 DMSO에 녹여 사용하였다.

Cell cytotoxicity assay

HUVEC를 96-well plates (SPL Life Science, Gyeonggi-do, Korea)에 bFGF (25 ng/ml) 및 HFC (0.1-10 µg/ml)가 포함된 EGM-2 배지에 담아 각 well에 10,000개씩 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. MTT 시약 (Sigma-Aldrich)을 각 well에 직접 첨가하여 최종 농도가 0.5 mg/ml가 되도록 하였고, 4시간 후 배지를 제거하고 세포에 형성된 결정을 DMSO에 녹인 후 Synergy HTX Multi-Mode Reader (BIO-TEK, Vermont, USA)를 이용하여 흡광도를 540 nm 필터로 측정하였다. 각 샘플을 3회씩 분석하였다.

Cell proliferation assay

HUVEC를 24-well plate에 2×10⁴개 세포로 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양하였다. bFGF (25 ng/ml) 및 HFC (0.1-10 µg/ml)를 세포에 24시간 동안 처리하였다. MTT 시약(Sigma-Aldrich)을 최종 농도 0.5 mg/ml가 되도록 각 well에 직접 첨가하였고, 4시간 후 배지를 제거하고 세포에 형성된 formazan crystal을 DMSO에 녹인 후 540 nm 필터가 장착된 Synergy HTX Multi-Mode Reader (BIO-TEK)를 사용하여 formazan 용액의 흡광도를 측정하였다. 각 샘플을 3회 분석하였다.

Wound healing assay

HUVEC를 24-well plates (SPL)에 2×10⁵로 분주하고 24시간 배양하였다. 세포가 면적의 90-95% 정도 도달하면 P1250 피펫 팁을 사용하여 세포를 긁었고, bFGF (25 ng/ml) 및 HFC (0.25 µg/ml)가 보충된 EGM에서 18시간 동안 추가로 배양하였다. 이동 패턴은 위상차 현미경을 사용하여 관찰하고 사진을 찍었다. 상처 난 면적의 너비 변화는 40배율의 광학 현미경을 이용하여 18시간 동안 촬영하였다. 정량화하기 위해서 기준선을 넘어 이동한 세포의 수를 측정하였다.

Transwell assay

세포의 침습 능력은 24-well Transwell system (Corning)을 사용하여 결정하였다. Transwell membrane 윗부분을 1 mg/ml Matrigel (Corning) 10 µl/well로 코팅하였다. Transwell의 상부 구획에는 bFGF (25 ng/ml) 및 HFC (0.25

µg/ml)를 함유한 무혈청 배지 100 µl에 세포를 2×10⁴개 세포의 밀도로 넣어주었다. 하부 구획에는 모든 영양분이 있는 EGM-2를 넣어주었다. 세포를 5% CO₂, 37°C에서 12, 18, 24시간 동안 배양하였다. 시간마다 멤브레인을 메탄올로 고정하고 hematoxylin과 eosin-Y로 염색하였다. 막 상부 표면의 세포는 면봉으로 닦아 제거하였다. 40배율의 광학 현미경을 사용하여 단일 멤브레인에서 전체 세포수를 계수하여 세포 침윤을 결정하였다. 각 샘플은 두 번 분석하였으며 독립적인 실험을 3회 반복하였다.

In vitro tube formation assay

HUVEC (2×10⁴개)를 Matrigel (Corning)이 코팅된 96-well plate에 분주하고 bFGF (25 ng/ml) 및 HFC (0.25 µg/ml 및 5 µg/ml)로 처리하였다. 4시간 후, 위상차 현미경을 사용하여 세포 형태의 변화를 포착하고 40배율로 사진을 찍었다. 각 샘플은 두 번 분석하였으며 독립적인 실험은 3회 반복하였다.

In vivo mouse Matrigel plug assay

생체 내 혈관 신생에 대한 *H. fusiformis* 추출물의 효과를 평가하기 위해 이전에 보고된 바와 같이 생체 내 마우스 matrigel plug 분석을 수행하였다[47]. 간략하게, 9주령 C57BL/6 마우스에 bFGF (50 ng) 및 HFC (1.25 µg)가 포함되거나 포함되지 않은 heparin (10 U)을 포함하는 Matrigel 500 µl를 피하 주사하였다. 7일 후, 마우스 피부를 뒤로 당겨서 손상되지 않은 Matrigel plug를 노출시켰다. Matrigel plug 사진을 촬영하였고, 혈관 형성 정량을 매뉴얼에 따라 헤모글로빈 분석 키트(Sigma-Aldrich)를 사용하여 헤모글로빈 함량을 측정하였다.

Western blot analysis

HUVEC에 배지에서 24시간 동안 HFC (0.25 µg/ml 및 5 µg/ml)가 포함되거나 포함되지 않은 bFGF (25 ng/ml)를 처리하였다. 1 mM sodium orthovanadate가 함유된 Proprep Protein Extraction Solution (iNtRON)을 첨가하여 전체 단백질을 얻었다. 동일한 양(30 µg)의 샘플을 10% SDS polyacrylamide gel에서 분리하고 membrane으로 옮긴 다음 1차 항체 및 2차 항체를 순차적으로 붙였다. 1× blocking solution을 이용하여 1차 항체(VEGF, FGFR (1:500), total ERK, phospho-ERK, total Akt, phospho-Akt 및 GAPDH (1:1,000))를 희석하여 사용하였다.

Ethics approval and consent to participate

본 연구에 사용된 동물 프로토콜은 가천대학교 이길여 암당뇨병연구소 동물관리 및 이용센터 산하 기관동물관리 및 이용위원회(IACUC)에서 승인되었다(승인번호: LCDI-2021-0038).

Statistical analysis

데이터는 평균±표준 편차(SD)로 표시하였다. 그룹(세포 독성, 침윤, 관 형성 및 Matrigel plug) 간의 통계적 비교는 일원 분산 분석(ANOVA)에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트와 증식 및 이동에 대한 양방향 ANOVA를 사용하여 수행하였다. **p*≤0.05, ***p*≤0.01, ****p*≤0.001, *****p*<0.0001은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었으며, 통계 분석은 Prism 9.1.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 사용하여 수행하였다.

결 과

***H. fusiformis* 추출물(HFC)의 HUVEC 생존율에 대한 영향 조사**

인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)에 *H. fusiformis*의 chloroform 추출물(HFC)을 다양한 농도 0.1-10 µg/ml로 처리하고 MTT assay로 세포 독성 및 증식 속도 변화를 분석하였다. 세포 독성을 확인하기 위해서 HFC를 12시간 동안 처리하였고, Fig. 1A와 같이 HUVEC의 생존율에 영

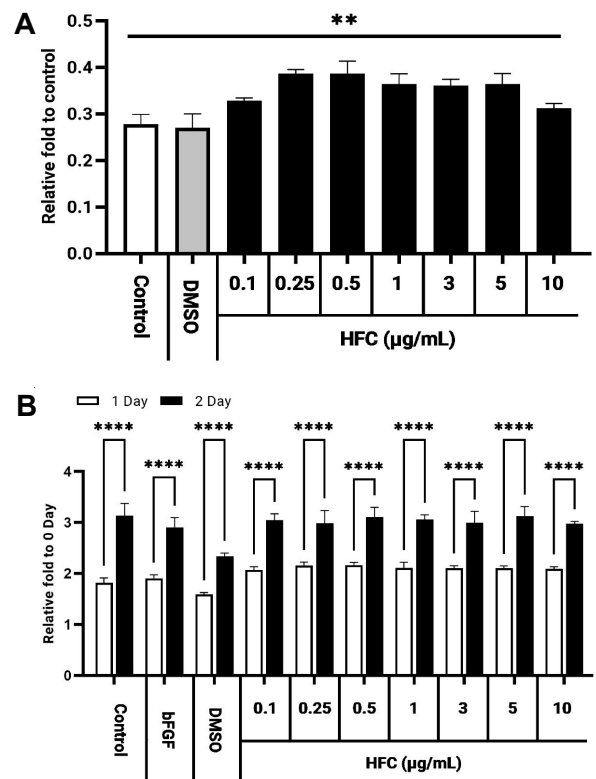


Fig. 1. Effect of *H. fusiformis* extract (HFC) on HUVEC cytotoxicity and proliferation rate. (A) The cytotoxic effects of HFC on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were assessed using the MTT assay (**p*; control vs. HFC 10 mg/ml). (B) The effect of HFC treatment on the proliferation rate of HUVECs was examined using the MTT assay (*****p*; 1 day vs 2 day).

향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 마찬가지로, 24시간 동안 HFC로 처리하여도 HUVEC의 증식 속도에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 1B). 따라서, 이후 진행되는 실험에서는 HUVEC의 증식과 생존에 영향을 주지 않는 농도(0.25, 5 µg/ml)의 HFC를 사용하였다.

HFC에 의한 HUVEC의 이동과 침윤 억제

혈관신생에서 내피 세포 이동 및 침윤은 중요한 단계이다[10, 32]. 따라서, HUVEC의 이동성 확인을 위해 Wound-healing assay를 이용하였고, 세포의 침윤성은 Transwell assay로 조사하였다. 세포의 이동성을 18시간 동안 조사한 결과 bFGF 그룹에 비해서 HFC 처리한 그룹에서 HUVEC의 이동이 현저히 감소하였다(Fig. 2A). bFGF를 처리한 경우 세포가 이동한 면적이 70% 이상이었지만, HFC 처리 시 세포의 이동 면적은 대조군과 유사하게 13~30%로 감소하였다(Fig. 2B).

또한, HFC는 12-24시간 동안 control, bFGF 그룹과 비교하여 HUVEC의 침윤을 억제하는 효과를 보였다(Fig. 3A).

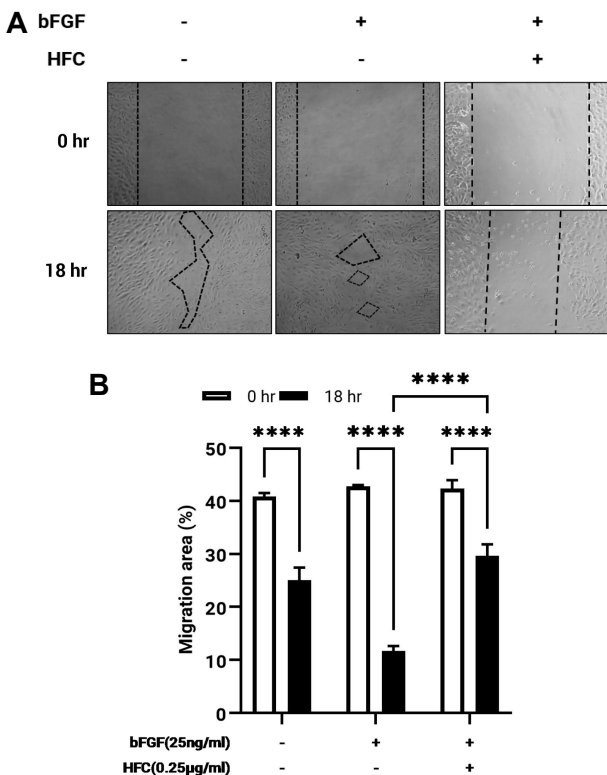


Fig. 2. HFC-Mediated suppression of HUVEC migration (A) The migratory ability of HUVECs was confirmed by a wound healing assay. (B) Phase contrast microscopy ($\times 40$) was used to capture and quantify the migrating regions. Each experiment was performed independently three times ($****p$; 0 hr vs 18 hr (all groups); 18 hr; bFGF vs bFGF + HFC).

12 시간 동안 HFC를 처리한 경우에는, 침윤된 세포의 수가 HFC를 처리하지 않은 그룹(control)과 유사하였지만 (Fig. 3B, 왼쪽), 18 시간 동안 처리 시, bFGF 처리에 비해 침윤성이 약 60%로 감소하였다(Fig. 3B, 중앙 패널). 24 시간 동안 HFC를 처리한 경우, bFGF 처리에 비해 약 53% 억제하였다(Fig. 3B, 오른쪽 패널). 이러한 결과는 HFC 추출물이 HUVEC의 이동과 침윤을 강력하게 억제한다는 것을 시사한다.

HFC에 의한 HUVEC 혈관 네트워크 형성 억제

혈관 신생의 과정에서 내피 세포가 모세혈관과 유사한 네트워크로 분화되는 것은 매우 중요한 단계이다[32]. 따라서, HUVEC을 이용한 tube formation assay를 이용하여 혈관 네트워크 형성에 대한 HFC 효과를 조사하였다. Control 그룹은 혈관과 유사한 네트워크를 형성하였다. 그러나 HFC 처리 시, 네트워크 파손, 작고 약한 튜브 네트워크가 형성되었다(Fig. 4A). HFC 처리 후 마스터 접합부(master junction), 노드(nodes), 메시 수(mesh number) 및 전체 메시 면적(meshes area)이 감소하였다(Fig. 4A, 4B). 이러한 결과는 HFC가 HUVEC의 혈관 네트워크 형성을 억제한다는 것을 보여준다.

HFC에 의한 HUVEC의 ERK 및 Akt 활성화 억제

VEGF와 그 수용체(VEGFR)는 내피 세포에 특이적으로 작용하고 이들의 증식과 이동을 조절하여 혈관 신생과 관련된 기본 단계를 나타낸다[1, 27]. FGF와 그 수용체(FGFR)는 혈관신생 동안 내피 세포의 증식, 이동 및 분화를 조절한다[27]. 따라서 HUVEC에서 VEGF 및 FGFR 발현에 대한 HFC의 영향을 분석하였다. 그 결과는 HFC 농도가 증가함에 따라 VEGF 및 FGFR의 발현을 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 4C). VEGF 활성화는 ERK 및 Akt 신호 전달 경로에 의해 매개되므로[46], 다음으로 ERK 및 Akt 활성화를 조사하였다. 그 결과 HFC 처리 시, ERK와 Akt의 인산화가 HFC 농도 의존적으로 억제됨을 관찰하였다(Fig. 4C). 이러한 결과는 HFC가 ERK 및 Akt 인산화를 억제하여 HUVEC에서 VEGF 및 FGFR의 발현을 억제함을 시사한다.

HFC에 의한 생체 내 혈관 신생 억제

In vivo 상태에서 혈관신생에 대한 HFC의 효과를 조사하기 위해 생체 내 혈관 신생의 확립된 모델인 마우스 matrigel plug assay를 수행하였다. bFGF를 함유한 matrigel을 HFC와 함께 마우스에 피하 이식하였다. Fig. 5A에서 볼 수 있듯이, bFGF를 포함하는 matrigel plug는 Matrigel plug 단독(공백)에 비해 적혈구로 풍부하게 채워져 있어 matrigel 내부에 기능성 혈관 구조가 형성되었음을 보여준다. 그러나 HFC는 bFGF에 의해 유발된 혈관신생을 크게

억제하였다. 또한, matrigel plug의 헤모글로빈 함량은 HFC 처리 시 크게 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 5B). 이러한 결과는 HFC가 *in vivo*에서도 강력한 혈관신생 억제활성을 가지고 있음을 나타낸다.

고 찰

본 연구에서는 *H. fusiformis*의 클로로포름 추출물(HFC)에 의한 혈관 신생 억제효과를 *in vitro*와 *in vivo*에서 조사하였다. 실험 결과에 의하면, 이 추출물이 *in vitro*에서 인간 혈관 내피세포(HUVEC)의 이동, 침입, 그리고 혈관 신생을 억제하는 효과를 보였다. 아울러, 마우스 모델을 이용한 실험을 통하여 HFC에 의한 혈관 신생 억제 효과를 *in vivo*에서도 확인하였다.

혈관신생 관련 단백질의 과발현으로 인한 질병을 치료하기 위해 여러 혈관 신생 억제 화합물 및 약물이 확인 및 개발되고 있다[1, 14, 22, 27, 46]. 그러나 상당한 부작용으로 인해 bevacizumab, sunitinib, sorafenib, pazopanib 등 제한된 수의 약물만 식품의약품(FDA)에서 승인되었다[24, 34]. 최근 연구에서는 강력한 혈관 신생 억제특성을 지닌 천연물이 확인되었으며, 합성 약물에 비해 장점이 있기 때문에[26, 37], 치료 효과가 있는 암, 심혈관 질환, 다발성 경화증 등의 질병에 대한 약물로 개발되었다. 천

연약물의 가용성과 독특한 구조적 특성은 합성 약물에 비해 탁월한 이점을 제공한다[2]. 흥미롭게도 해양 화합물은 다양한 진화 이력이나 바다 특유의 환경적특성으로 인해 육상 화합물과 구조적 특성이 다르며[43] 항염, 항암 [17, 31, 38], 항감염 효과가 있는 것으로 보고되고 있다 [38, 43].

갈조류에는 phlorotannin, fucoxanthin, fucoidan, sterols 과 같은 여러 생리활성 2차 대사산물이 함유되어 있어 항산화, 항암, 항고혈압, 항균, 항염 활성을 나타낸다[18, 44]. 해조류의 종류에 따라 phytosterol 함량이 달라질 수 있으며 생물학적 특성이 다르게 나타날 수 있다[35, 40]. 식용 갈조류인 *H. fusiformis*의 항산화 및 항암 특성은 이전에 보고되었으며[18, 44], 암의 성장과 전이 억제효과를 보였다[18].

본 연구의 목적은 *in vitro* 및 *in vivo* 혈관 신생 분석을 사용하여 *H. fusiformis* 추출물(HFC)의 혈관 신생 억제효과를 확인하는 것이고, 본 연구의 결과로써 *H. fusiformis*의 HFC 추출물이 *in vitro* 및 *in vivo* 혈관 신생을 억제한다는 것을 확인하였다. HFC는 HUVEC의 이동, 침입 및 관형성을 강력하게 억제하였다. 더욱이, HFC는 Matrigel 분석에서 네오마이क्र로 혈관의 형성을 현저하게 억제하였다(Fig. 5).

중양은 혈관 신생 과정에서 여러 혈관신생 관련 분자들

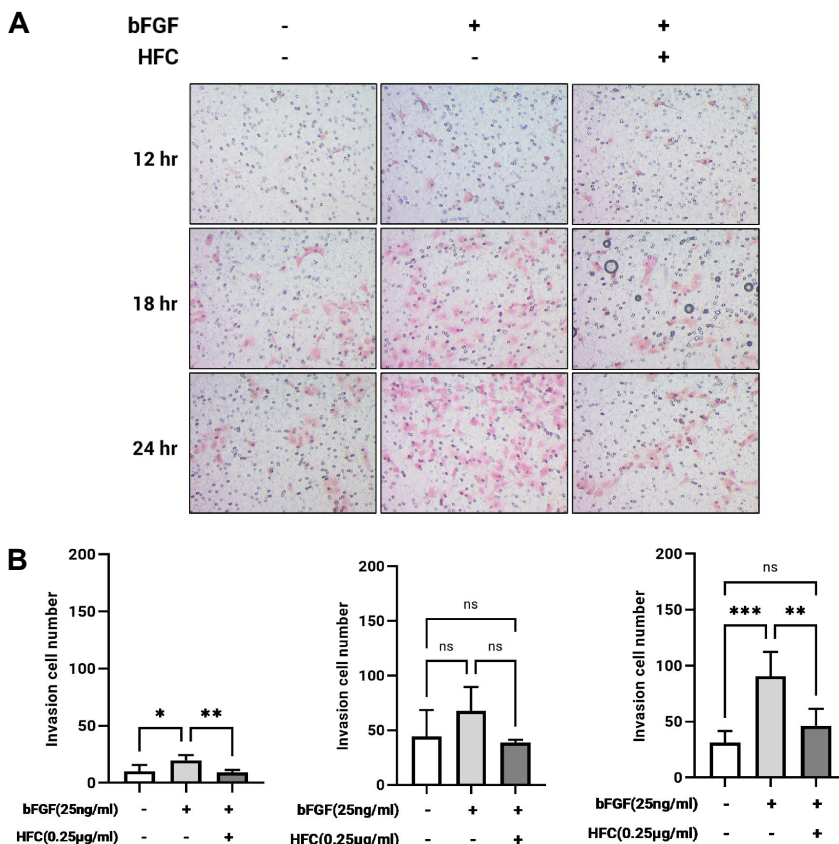


Fig. 3. Inhibition of HUVEC invasion by HFC (A) The transwell system was used to assess the invasive ability of HUVECs and phase contrast microscopy ($\times 40$) was used to visualize the results of invading cells. (B) Quantification of invading cells observed by phase contrast microscopy was performed. Three independent experiments were performed (**p*; control vs bFGF; control vs bFGF/HFC; bFGF vs HFC).

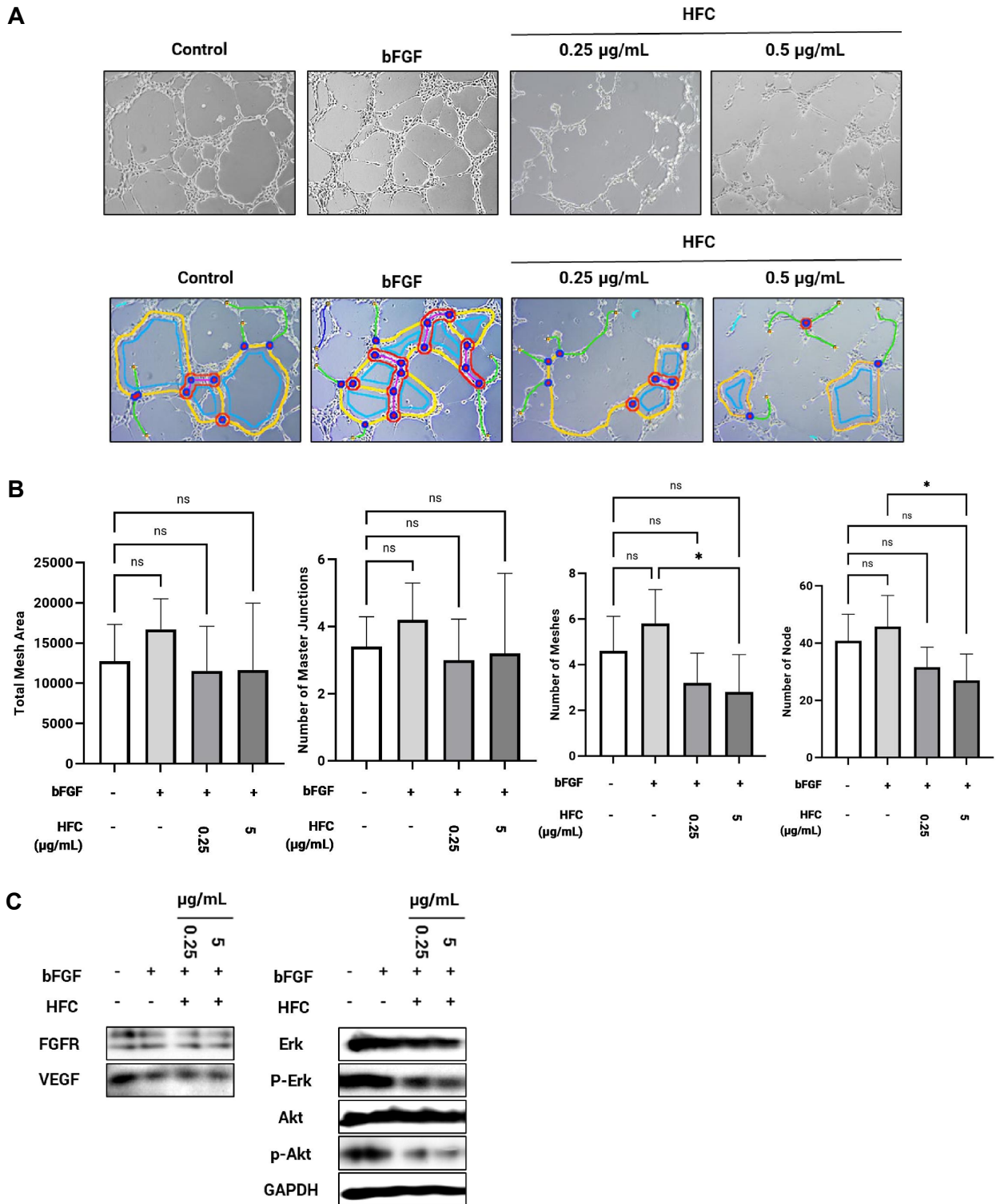


Fig. 4. Inhibition of HUVEC vascular network formation by HFC. (A) HFC inhibited tube formation by HUVECs (top image). After HFC (0.25, 5 mg/ml) was added and incubated for 4 hr, changes in cell morphology were observed and documented using phase contrast microscopy ($\times 40$). The results obtained using the Angiogenesis Analyzer plugin for Image J are shown in the image below, where the mesh structure is shown in light blue, master junctions are shown as red circles, and branches are shown in green. (B) Quantification of the number of master junctions, nodes, mesh area, and total mesh area was performed using Image J ($*p$; control vs bFGF, HFC; bFGF vs HFC). (C) Western blot analysis was used to identify angiogenesis-related molecules.

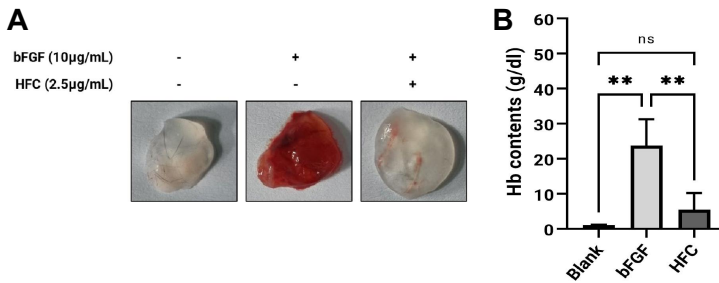


Fig. 5. Inhibition of *in vivo* angiogenesis by HFC (A) A photomicrograph ($\times 40$) of the vascularization within the Matrigel plug is shown. (B) The hemoglobin content of the plugs was quantified, and each value represents the mean and standard deviation (SD) (** $p < 0.005$, bFGF vs blank, HFC).

생성한다[12, 23]. VEGF, FGF 및 그 수용체는 혈관 신생을 위한 잠재적 자극제로 널리 알려져 있다[3, 16, 19, 20, 28, 32, 33]. 그리고 *H. fusiformis*에서 분리된 fucoidan은 VEGF/VEGFR을 억제하고[4], 항암 효과가 있는 것으로 보고되어 있다[5, 42]. 따라서 혈관 신생 관련인자의 발현에 대한 HFC의 영향을 분석한 결과, Fig. 4C에서 보는 바와 같이 HFC는 주요 혈관신생 분자(VEGF)의 발현을 용량 의존적으로 하향 조절하였다.

ERK 및 Akt는 혈관 신생 조절에 중심 역할을 하는 다중 단위 전사 인자이다[41]. 따라서 western blot 분석을 통해 HFC가 ERK 및 Akt 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과, Akt의 단백질 발현은 HFC 처리 후에도 변하지 않았으나, ERK의 발현은 HFC 치료에 의해 하향 조절되었다. 또한, ERK와 Akt의 인산화는 용량 의존적으로 억제되었다(Fig. 4C).

H. fusiformis 추출물인 HFC는 항산화 효과가 없는 것으로 보고되었지만[7], 본 연구에서는 HFC는 강력한 혈관신생 억제활성을 보였다. 일반적으로 항산화 효과가 있는 물질은 혈관신생 억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[6, 29, 39]. 따라서 HFC는 기존의 항산화 물질과 다른 혈관신생 억제기전을 가지고 있을 수 있다.

결론적으로, HFC는 VEGF, FGFR 및 ERK, Akt 활성화 신호전달 경로를 억제함으로써 혈관 신생 억제효과를 보이는 것으로 설명할 수 있다. HFC는 혈관신생 관련 질환을 치료하는 유망한 후보 물질이며, HFC로부터 대한 혈관신생 억제활성을 갖는 단일 화합물을 분리하고, 분리된 화합물의 혈관신생 억제기전을 이해하는 데에 초점을 맞춘 추가 연구가 필요할 것이다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 2년 학술연구비지원 (2023-2025)에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Ansari, M. J., Bokov, D., Markov, A., Jalil, A. T., Shalaby, M. N., Suksatan, W., Chupradit, S., Al-Ghamdi, H. S., Shomali, N. and Zamani, A. 2022. Cancer combination therapies by angiogenesis inhibitors; a comprehensive review. *Cell Commun. Signal.* **20**, 1-23.
2. Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M. and Supuran, C. T. 2021. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 200-216.
3. Carmeliet, P. and Jain, R. K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249-257.
4. Chen, H., Cong, Q., Du, Z., Liao, W., Zhang, L., Yao, Y. and Ding, K. 2016. Sulfated fucoidan FP08S2 inhibits lung cancer cell growth *in vivo* by disrupting angiogenesis via targeting VEGFR2/VEGF and blocking VEGFR2/Erk/VEGF signaling. *Cancer Lett.* **382**, 44-52.
5. Chen, X., Sun, L., Wei, X., Lu, H., Tan, Y., Sun, Z. and Jiang, J. 2021. Antitumor effect and molecular mechanism of fucoidan in NSCLC. *BMC Complement. Med.* **21**, 1-11.
6. Costa, R., Azevedo, D., Barata, P., Soares, R., Guido, L. F. and Carvalho, D. O. 2021. Antiangiogenic and antioxidant *in vitro* properties of hydroethanolic extract from acai (*Euterpe oleracea*) dietary powder supplement. *Molecules* **26**, 2011.
7. Cui, Y. R., Kim, H., Je, J., Wang, L., Oh, J., Jia, L. and Jeon, Y. 2019. Protective effects of antioxidant active fractions derived from the edible seaweed *Hizikia fusiformis* in oxidatively stressed human dermal fibroblasts. *Korean J Fish Aquat Sci.* **52**, 35-42.
8. Dudley, A. C. and Griffioen, A. W. 2023. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis* **26**, 313-347.
9. Folkman, J. 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 273-286.
10. Fonseca, C. G., Barbacena, P. and Franco, C. A. 2020. Endothelial cells on the move: dynamics in vascular morphogenesis and disease. *Vasc. Biol.* **2**, H29.
11. Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T. and Carmeliet, P. 2009. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev. Cell.* **16**, 167-179.
12. Gupta, M. K. and Qin, R. 2003. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol.* **9**, 1144.
13. Han, N., Li, J. and Li, X. 2022. Natural marine products:

- Anti-colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. *Mar. Drugs*. **20**, 349.
14. Huang, D., Lan, H., Liu, F., Wang, S., Chen, X., Jin, K. and Mou, X. 2015. Anti-angiogenesis or pro-angiogenesis for cancer treatment: focus on drug distribution. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 8369.
 15. Hwang, J., Lee, S., Han, K., Seo, H. and Kim, J. 2013. Anti-angiogenesis and anti-adipogenesis effects of *Anthriscus radix* extract. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **18**, 164-172.
 16. Karamysheva, A. F. 2008. Mechanisms of angiogenesis. *Biochem. (Mosc.)*. **73**, 751-762.
 17. Khalifa, S. A., Elias, N., Farag, M. A., Chen, L., Saeed, A., Hegazy, M. F., Moustafa, M. S., Abd El-Wahed, A., Al-Mousawi, S. M. and Musharraf, S. G. 2019. Marine natural products: A source of novel anticancer drugs. *Mar. Drugs*. **17**, 491.
 18. Kim, E., Lee, J., Heo, S. and Jeon, Y. 2021. Saringosterol acetate isolated from *Hizikia fusiforme*, an edible brown alga, suppressed hepatocellular carcinoma growth and metastasis in a zebrafish xenograft model. *Chem. Biol. Interact.* **335**, 109362.
 19. Lamalice, L., Le Boeuf, F. and Huot, J. 2007. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ. Res.* **100**, 782-794.
 20. Liekens, S., De Clercq, E. and Neyts, J. 2001. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 253-270.
 21. Liu, Z., Chen, H., Zheng, L., Sun, L. and Shi, L. 2023. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **8**, 198.
 22. Lopes-Coelho, F., Martins, F., Pereira, S. A. and Serpa, J. 2021. Anti-angiogenic therapy: current challenges and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3765.
 23. Lugano, R., Ramachandran, M. and Dimberg, A. 2020. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 1745-1770.
 24. Meadows, K. L. and Hurwitz, H. I. 2012. Anti-VEGF therapies in the clinic. *Cold Spring Harb. perspect. med.* **2**, a006577.
 25. Jegal, M. E., Han, Y. S., Park, S. Y., Lee, J. H., Yi, E. Y. and Kim, Y. J. 2023. *Hizikia Fusiformis* hexane extract decreases angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *J. Life Sci.* **33**, 703-712.
 26. Newman, D. J. and Cragg, G. M. 2020. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **83**, 770-803.
 27. Niu, G. and Chen, X. 2010. Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy. *Curr. Drug Targets.* **11**, 1000-1017.
 28. Pandya, N. M., Dhalla, N. S. and Santani, D. D. 2006. Angiogenesis-a new target for future therapy. *Vascul. Pharmacol.* **44**, 265-274.
 29. Radomska-Leśniewska, D. M., Bałan, B. J. and Skopiński, P. 2017. Angiogenesis modulation by exogenous antioxidants. *Cent. Eur. J. Immunol.* **42**, 370-376.
 30. Rashidi, B., Malekzadeh, M., Goodarzi, M., Masoudifar, A. and Mirzaei, H. 2017. Green tea and its anti-angiogenesis effects. *Biomed. Pharmacother.* **89**, 949-956.
 31. Ren, X., Xie, X., Chen, B., Liu, L., Jiang, C. and Qian, Q. 2021. Marine natural products: a potential source of anti-hepatocellular carcinoma drugs. *J. Med. Chem.* **64**, 7879-7899.
 32. Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674.
 33. Senger, D. R. and Davis, G. E. 2011. Angiogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a005090.
 34. Sennino, B. and McDonald, D. M. 2012. Controlling escape from angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* **12**, 699-709.
 35. Shahzad, N., Khan, W., MD, S., Ali, A., Saluja, S. S., Sharma, S., Al-Allaf, F. A., Abduljaleel, Z., Ibrahim, I. A. A., Abdel-Wahab, A. F., Afify, M. A. and Al-Ghamdi, S. S. 2017. Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. *Biomed. Pharmacother.* **88**, 786-794.
 36. Shi, Z., Yao, C., Shui, Y., Li, S. and Yan, H. 2023. Research progress on the mechanism of angiogenesis in wound repair and regeneration. *Front. Physiol.* **14**, 1284981.
 37. Shinde, P., Banerjee, P. and Mandhare, A. 2019. Marine natural products as source of new drugs: A patent review (2015-2018). *Expert Opin. Ther. Pat.* **29**, 283-309.
 38. Simmons, T. L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P. and Gerwick, W. H. 2005. Marine natural products as anti-cancer drugs. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 333-342.
 39. Smeriglio, A., Denaro, M., D'Angelo, V., Germanò, M. P. and Trombetta, D. 2020. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-angiogenic properties of citrus lumia juice. *Front. pharmacol.* **11**, 593506.
 40. Sohn, S., Rathinapriya, P., Balaji, S., Jaya Balan, D., Sweetha, T. K., Durgadevi, R., Alagulakshmi, S., Singaraj, P. and Pandian, S. 2021. Phytosterols in seaweeds: an overview on biosynthesis to biomedical applications. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12691.
 41. Song, M. and Finley, S. D. 2020. ERK and Akt exhibit distinct signaling responses following stimulation by pro-angiogenic factors. *Cell Commun. Signal.* **18**, 114.
 42. Van Weelden, G., Bobiński, M., Okła, K., Van Weelden, W. J., Romano, A. and Pijnenborg, J. M. 2019. Fucoidan structure and activity in relation to anti-cancer mechanisms. *Mar. Drugs.* **17**, 32.
 43. Villa, F. A. and Gerwick, L. 2010. Marine natural product drug discovery: Leads for treatment of inflammation, cancer, infections, and neurological disorders. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **32**, 228-237.
 44. Wang, L., Oh, J. Y., Jayawardena, T. U., Jeon, Y. and Ryu, B. 2020. Anti-inflammatory and anti-melanogenesis activities of sulfated polysaccharides isolated from *Hizikia fusiforme*. *Int. J. Biol. Macromol.* **142**, 545-550.
 45. Wang, W. Y., Lin, D., Jarman, E. H., Polacheck, W. J. and Baker, B. M. 2020. Functional angiogenesis requires microenvironmental cues balancing endothelial cell migra-

- tion and proliferation. *Lab on a Chip* **20**, 1153-1166.
46. Wang, Y., Wu, H. and Deng, R. 2021. Angiogenesis as a potential treatment strategy for rheumatoid arthritis. *Eur. J. Pharmacol.* **910**, 174500.
47. Yi, E. Y., Park, S. Y., Song, H. S., Son, M. J., Yi, K., Yoo, S. and Kim, Y. J. 2006. KR-31831, a new synthetic anti-ischemic agent, inhibits *in vivo* and *in vitro* angiogenesis. *Exp. Mol. Med.* **38**, 502-508.

초록 : *Hizikia fusiformis* 클로로포름 추출물의 *in vitro* 및 *in vivo* 혈관신생 억제 연구

제갈명은^{1*} · 한유선^{1*} · 박시영² · 이지혁³ · 이의연⁴ · 김영진^{1,4*}

(¹부산대학교 나노바이오융합연구소, ²가천대학교 암·당뇨연구원, ³국립호남권생물자원관, ⁴부산대학교 분자생물학과)

혈관신생은 기존 혈관에서 새로운 혈관을 형성하는 과정이며, 이 현상은 성장, 치유, 월경주기의 변화 중에 발생한다. 종양의 경우, 혈관신생은 원발성 종양의 지속적인 성장, 전이 촉진, 전이성 종양 성장 지원 및 암 진행에 중요한 복잡하고 다면적인 과정이다. 혈관신생 장애는 암 발병, 자가면역 질환, 류마티스 관절염, 심혈관 질환 및 상처 치유 지연을 초래할 수 있다. 현재 유효한 혈관신생 억제약물은 제한된 수에 불과하다. 최근 연구에 따르면 해양 천연물이 혈관신생 억제효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 이전 연구에서 *Hizikia fusiformis*의 핵산 추출물(HFC)이 *in vitro* 및 *in vivo*에서 혈관 신생 억제효과를 확인하고 보고하였다. 본 연구의 목적은 *H. fusiformis*의 클로로포름 추출물(HFC)의 혈관신생 억제 효과를 확인하는 것이다. HFC가 세포 이동, 침입 및 관 형성을 포함하여 HUVEC 세포에 미치는 영향을 조사하였고, 또한 마우스 Matrigel 겔 플러그 분석을 통해 생체 내 혈관 신생 억제 효과도 조사하였다. 또한 HFC 처리 후 혈관신생에 중요한 인자인 VEGF, FGFR의 발현이 억제되고, Erk, Akt의 활성이 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 해양갈조류 톳(*H. fusiformis*)의 클로로포름 추출물이 *in vitro* 및 *in vivo* 혈관 신생을 억제함을 보여준다.