

한약재의 신생혈관생성 억제 활성화에 관한 연구

전원경* · 이태희** · 윤유식* · 김연옥* · 성현제*

ABSTRACT

Studies on Angiogenesis Inhibition Activity of Traditional Herb Extract

Jeon Won-Kyung · Lee Tae-Hee, PhD** · Yoon Yoo-Sik, PhD* · Kim Yeon-Ok*
and Sung Hyun-Jea, OMD**

Angiogenesis, the formation of new blood vessels, is considered to be involved in many pathological symptoms such as diabetic retinopathy, arthritis, inflammation and solid tumour. In particular, it is thought that angiogenesis is critical for development and growth of solid tumour. Recent study shows that there is a highly significant association of microvessel density with overall survival and relapse-free survival in patients with breast tumour. In this study, the inhibition effect of angiogenesis of traditional herbs used for the treatment of cancer was examined. It was found out that the extract of *Agaricus blazei* by boiling water is a possible inhibitor of angiogenesis. It inhibited normal developmental angiogenesis in the chorioallantoic membrane of chick embryos and also inhibited capillary-like tube formation by endothelial cells on matrigel in *vitro*. These results suggest that *Agaricus blazei* can be a potent angiogenesis inhibitor.

*) 한국한의학연구원 연구부 KIOM

**) 원자력병원 세포생물실 Korea Cancer Center Hospital

[Key words] angiogenesis, *Agaricus blazei*, chorioallantoic membrane, endothelial cell, matrigel.

I. 서 론

신생혈관생성(angiogenesis)은 새로운 혈관을 만들기 위한 기본적인 과정으로 생식, 발생, 상처회복에 관여하며 짧은 기간 내에 작동하고 종료시 완전히 억제된다. 그러나 신생혈관생성의 조절이 지속적으로 안될 시에 질병이 생기는데 주요 질병으로는 모세혈관이 관절에 침입하여 연골조직을 파괴하는 관절염과 망막에 혈관이 생겨 유리체에 침입함으로써 출혈을 일으키고 결국은 실명하게 되는 등 이외에도 많은 질병이 알려져 있다. 특히 종양의 성장과 전이에도 신생혈관생성은 중요한 역할을 하고 있다.¹⁾ 종양은 크기가 1mm³ 정도까지는 스스로 성장할 수 있으나 더 성장하기 위해서는 외부에서 영양분을 필요로 하는데 이때 계속적으로 모세혈관의 성장을 자극하는 것이다. 새로운 모세혈관이 생성되면 종양사이에 혈관을 끼워 넣음으로써 통로를 제공하여 산소와 영양분이 공급되면서 종양은 성장할 수 있고 혈관을 따라 다른 장기로 전이될 수 있다. 종양에서 신생혈관생성의 임상적인 의의는 모세혈관밀도와 혈관생성인자를 정량하여 암의 진단, 전이, 재발의 위험을 예측할 수 있다. 따라서 신생혈관생성을 억제하는 약물을 이용하여 종양에 공급되는 영양분을 차단하여 종양의 성장과 전이를 치료하는 것으로 새로운 개념의 항암제이다. 국외에서는 신생혈관생성 억제제를 개발하기 위한 연구를 진행하여 *in vitro*, *in vivo*에서 효능이 검증되었고 현재 임상실험 중에 있는 약재들은 angiostatin, TNP-40, interleukin-12, interferon- α 등 약 10여종이 넘게 보고되고 있으며 미국 NCI에서는 신생혈관생성 억제제를 이용한 암 치료가 앞으로 2~5년 내에 가능하다고 예측하고 있다.²⁾ 최근 생약에서 분리한 성분의 신생혈관생성 억제에 대한 실험 보고가 있었는데 자초(*Lithospermum erythrorhizon*)의 주성분인 shikonin이 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.³⁾ 국내에서 생약에 대한 신생혈관생성에 관련된 연구는 *Aloe vera*의 dichloromethane 추출물에서 신생혈관생성 활성을 보고한 바 있을 뿐이며 신생혈관생성 억제에 관한 연구는 초기단계에 있다고 할 수 있다.⁴⁾ 따라서 본 연구는 새로운 항암 연구를 시도하여 한약으로부터 신생혈관생성 억제능을 가지는 약재를 선별함으로써 보다 새로운 각도에서 항암제를 개발하기 위해 시도되었다. 본 연구에서는 항암 활성이 뛰어나 한방 및 민간에서 많이 사용하고 있는 한약재 중에서 상황 버섯과 운지 버섯 및 아가리쿠스 버섯을 대상으로 신생

혈관생성 억제 실험 및 혈관형성 억제 실험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

실험재료

상황 버섯 (*Phellium linteus*), 운지 버섯 (*Coriolus versicolor*), 아가리쿠스 버섯 (*Agaricus blazei*)의 원산지는 각각 강원도, 충주, 부여이며 보관번호는 98-05-31, 98-05-49, 98-05-41로 1998년 5월에 경동 시장 대덕학의원에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 이용한 시료는 열수 추출을 하였는데 각각의 시료 20 g에 증류수 500 ml을 넣고 24시간 동안 실온에 방치한 후 30분 동안 끓였다. 추출액은 8,000 g에서 15분간 원심분리하여 상층액만 취하였다. 이 추출액을 rotatory vacuum evaporator (Buchi RE 121, Switzerland)로 60°C 수욕상에서 감압 농축한 후 동결 건조기를 이용하여 완전히 동결건조하였다. 동결건조상태가 된 시료를 증류수에 완전히 녹여 membrane filter (0.45 μm)로 여과한 것을 분석에 사용하였다.⁵⁾

세포독성 측정

성장속도가 빠르고 비교적 항암제 감수성이 예민한 SNU-1 (human gastric carcinoma) 세포주를 한국세포주은행에서 분양받았다. 10% fetal bovine serum을 포함한 RPMI 1640 (GIBCO, USA) 배지를 이용하여 37°C, 10% CO² 배양기에서 세포배양하였다. 세포독성의 측정은 MTT (3- 4, 5-Dimethylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) 검색법을 이용하였는데 먼저 단일 세포 부유액을 준비하여 적정세포수를 결정한 다음 세포를 접종하고 여기에 농도별로 검체를 투여 한 후 배양하였다. 배양 종료시 2 mg/ml MTT(Sigma) 50 μl 를 가한 후 37°C 배양기에 4시간 동안 방치하였다. 450 g에서 5분간 원심분리하고 30 μl 여액을 남기고 흡입한 후 DMSO (Sigma) 용액을 150 μl 씩 각 well에 가해 MTT 를 잘 녹여내어 균일하게 만든 다음 ELISA reader (Molecular Divices, E max)로 540 nm 파장에서 흡광도값을 측정하였다.^{6,7)} 50% 억제농도 (IC₅₀)는 생존율이 50%가 되도록 하는 약물의 농도로 정의하였으며 IC₅₀ 값을 세포독성의 지표로 사용하였다. Soft MAX pro version 2.2.1 (Molecular Divices, E max. Inc) 프로그램을 이용하여 IC₅₀ 값을 계산하였다.

Bovine Capillary Endothelial(BCE) 세포 분리

BCE 세포의 분리와 배양은 Folkman과 Gospodarowicz 방법을 응용하여 사용하였다.^{8,9)} 소의 부신을 베타딘으로 충분히 소독한 다음 PBS (Phosphate buffered saline, GIBCO)를 이용하여 소독액이 완전히 제거될 때까지 세척하였다. 멸균된 petri dish에 10% calf serum이 포함된 DMEM (GIBCO, USA) 배지를 넣고 부신을 반으로 자른 다음 세절하였다. 세절된 부신을 50 ml tube에 옮겨서 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액은 제거하였다. 여기에 collagenase 용액을 충분히 넣고 37°C에서 1시간동안 배양한 후 3000 rpm에서 2분 동안 원심분리를 하고 상층액은 제거하였다. 10% DMEM 배지를 적당량 넣고 잘 혼합하여 6 well plate에 분주하고 bFGF (R&D Inc.)를 각 well당 3 ng/ml 농도로 넣어준 다음 37°C, 10% CO₂ 배양기에서 배양하였다. BCE 세포를 분리하여 새로운 plate에 옮겨서 37°C, 10% CO₂ 배양기에서 배양하여 사용하였다.

In vivo 신생혈관생성 억제 실험

유정란을 (주)풀무원에서 구입하여 37°C 배양기에서 3일 동안 배양한 다음 무균적으로 petri dish에 옮겨서 다시 3일간 배양을 하였다. 시료는 thermonox (Nunc, Inc.)에 10 μ l씩 점적하여 완전히 건조하여 준비하였다. 유정란 배양 6일째에는 chorioallantoic membrane (CAM)의 지름이 10 mm정도 생성되는데 여기에 준비한 시료를 올려 놓고 37°C 배양기에서 2일 동안 배양하였다. 배양 종료시 혈관형태 관찰을 위해 인트라리포즈를 주사기를 이용하여 CAM에 주입한 다음 시료 주위에 혈관생성이 억제되었는지를 육안으로 판독하고 근접 촬영을 하였다.¹¹⁾

In vitro 혈관형성(capillary-like tube formation) 억제 실험

Matrigel (Becton Dickinson, USA)을 4°C에서 녹인 후 DMEM (GIBCO, USA) 배지를 이용하여 10배 희석한 다음 얼음 위에 방치하고 24 well plate에 well 당 250 μ l씩 분주한 다음 37°C 배양기에서 60분간 배양시켰다. BCE 세포를 matrigel로 미리 도포하여 준비한 24 well plate에 well 당 8×10^4 개씩 접종한 후 농도별로 검체를 투여하여 18 시간 동안 37°C에서 배양한 후 혈관 형성 억제정도를 현미경으로 관찰하고 사진촬영을 하였다.¹⁰⁾

III. 결과 및 고찰

세포독성효과

SNU-1 세포주에 대한 추출물의 IC₅₀ 값은 Table 1.과 같았고 각각의 IC₅₀ 값을 비교했을 때 IC₅₀ 값이 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상으로 측정된 추출물에 대해서는 세포독성이 없거나 미약한 것으로 간주하였다.¹²⁾ 검색결과 모두 IC₅₀ 값이 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상으로 세포독성 효과가 없는 것으로 나타나서 암세포에 대한 직접적인 항암 활성은 없는 것으로 간주하였다.

In vivo 신생혈관생성 억제능 측정

CAM assay는 신생혈관생성 억제능을 측정하는 검색법으로 결과 판정은 육안으로 하였는데 시료를 처리한 thermonox가 놓인 부분과 그 주위에 생성된 혈관의 분포정도를 관찰하여 신생혈관생성 억제능을 판독하였다. 혈관생성이 정상적으로 이루어진 경우는 -, thermonox 부분만이 늘려서 혈관생성이 억제되고 thermonox 주위도 혈관생성 억제정도를 정하기 어려운 경우는 \pm , thermonox 부분과 thermonox 주위에도 혈관생성이 억제된 경우를 +로 판정하였다. CAM assay를 이용하여 상황 버섯, 운지 버섯, 아가리쿠스 버섯의 열수 추출물에 대한 결과는 Table 2와 같았다. 아가리쿠스 버섯이 39%로 혈관생성억제 효과가 가장 강하게 측정되었고 다음은 운지 버섯이 23%, 상황 버섯이 14%로 측정되어 혈관생성 억제능이 약하거나 거의 없는 것으로 측정되었다. 사진 촬영한 결과는 Fig. 1.에서 보는 바와 같이 A는 대조군 유정란으로 증류수만을 처리한 thermonox 주위의 혈관생성이 정상적으로 이루어진 반면 B는 아가리쿠스 버섯의 열수 추출물 50 $\mu\text{g/egg}$ 을 처리한 thermonox로 주위의 혈관생성이 억제되어 혈관의 분포정도가 없는 부분이 관찰되었다. 본 결과는 실험에 사용된 유정란의 수가 적고 실험 종료시에 각 군에 대한 유정란의 생존율이 높지 않은 이유로 대조군과 실험군의 수가 일치하지는 않았으나 신생혈관생성 억제능의 경향을 알 수 있는 것으로 사료된다. 본 실험은 결과 판정에 주관적인 점이 있어 유정란의 수를 많이 하여 실험을 해야하는 단점이 있으나 신생혈관생성 억제측정을 육안으로 할 수 있다는 용이한 장점도 있어 신생혈관생성 억제능을 검색에는 적절한 방법이라고 할 수 있다.

In vitro 혈관형성 억제능 측정

Matrigel assay는 matrigel과 BCE 세포를 이용하여 혈관형성(capillary-like tube formation)을 유도할 수 있는데 이를 억제하는 검체를 첨가하여 혈관형성 억제능을 측정하는 방법으로 신생혈관생성 억제 실험을 한 결과 억제능이 측정된 아가리쿠스 버섯과 운지 버섯의 열수 추출물에 대한 혈관형성 억제능 결과는 Fig. 2와 같았다. A는 PBS만 처리한 경우 BCE 세포는 혈관형성을 정상적으로 하였고 반면 B는 아가리쿠스 버섯의 열수 추출물을 0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 well의 경우 BCE 세포의 혈관 형성이 억제되었으며 운지 버섯 열수 추출물의 경우는 0.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 well에서 혈관형성이 억제되는 것을 관찰하였다. 결과의 판정은 현미경으로 관찰하여 대조군과 비슷한 혈관형성이 이루어지지 않은 농도를 억제능이 있는 것으로 정하였다.

아가리쿠스 버섯은 이미 고형암 동물실험에서 항암력이 뛰어난 버섯으로 보고된 바 있어 본 실험 결과와 유관하다고 사료되며 지속적인 실험이 필요하겠다.^{13,14)} 국내에서는 한약을 이용한 신생혈관생성 억제 활성화에 관한 연구가 진행되고 있으나 초기단계에 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 한약으로부터 신생혈관생성 억제능을 가지는 약재를 선별함으로써 보다 새로운 각도에서 항암제를 개발할 수 있는 방향을 제시해 주고 있다. 본 실험에서 아가리쿠스 버섯의 신생혈관생성 억제 효과가 측정됨으로써 향후 항암 치료제로 개발가능성을 제시해 주고 있다.

Table 1. IC₅₀ values of traditional herbal extracts for SNU-1 cell determined by MTT assay

Traditional herbs	IC ₅₀ * ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
<i>Phellinus linteus</i>	> 100
<i>Agaricus blazei</i>	> 100
<i>Coriolus versicolor</i>	> 100

*IC₅₀: 50% inhibition of cell growth.

Table 2. Angiogenic inhibition of traditional herbal extracts by CAM assay

Traditional herbs	No. of eggs	No. of CAM			%		
		-	±	+	-	±	+
control	11	9	2	0	82	18	0
<i>Phellium linteus</i>	14	11	1	2	79	7	14
<i>Coriolus versicolor</i>	17	9	4	4	53	24	23
<i>Agaricus blazei</i>	31	12	7	12	39	23	39

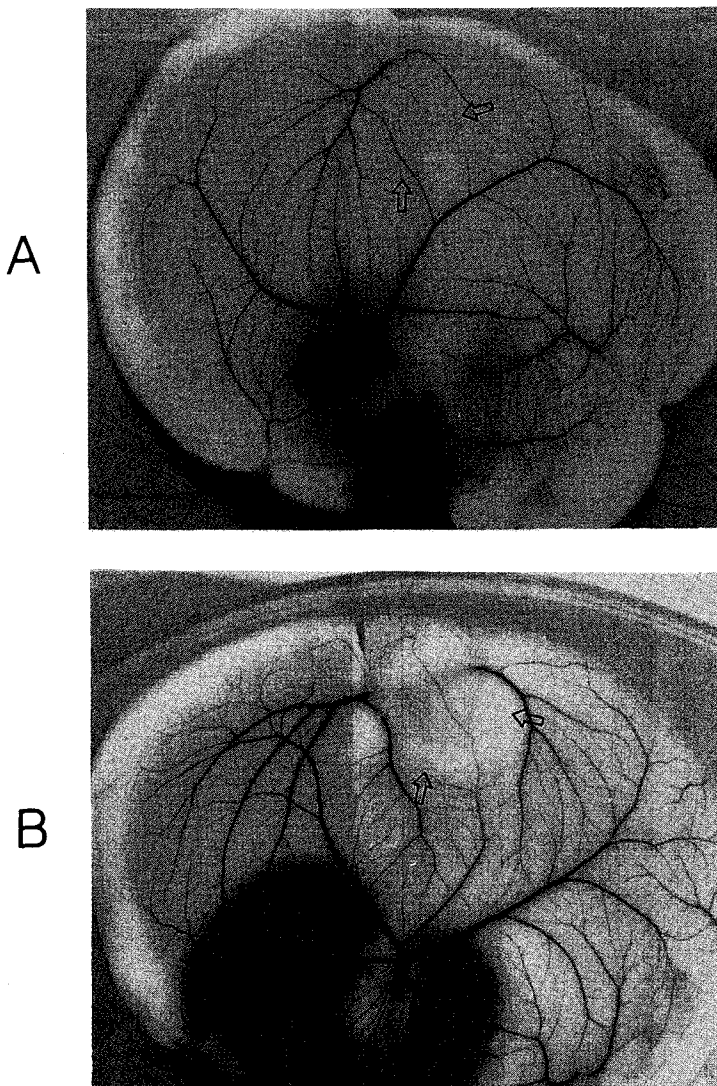


Fig. 1. Photographs of CAM after two day-treatment with *Agaricus blazei* extract. Blood vessels were made visible by injection of 10% fat emulsion. Arrows indicate changes in vascular pattern. Control had no effect on the vascular pattern. (A) control : treated with d · H₂O , (B) treated with 50 µg/egg water extract of *Agaricus blazei*.

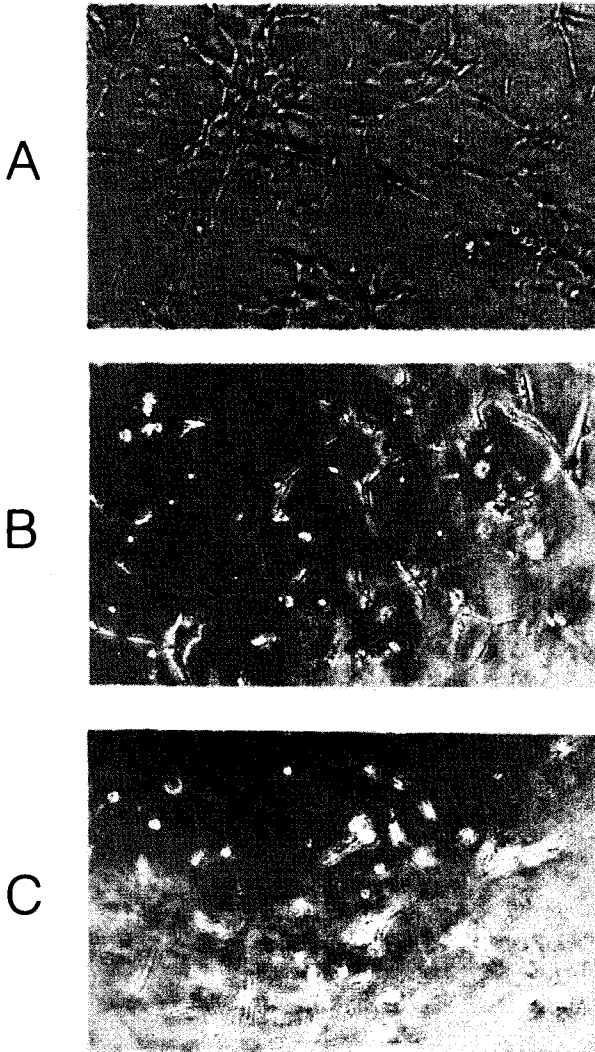


Fig. 2. Effect of *Agaricus brazei*, *Coriolus versicolor* on capillary-like tube formation by BCE cells in 24 well plates precoated with matrigel and cultured with DMEM containing 10% CS in presence of vehicle. (A) control: treated with PBS (B) treated with 0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ water extract of *Agaricus brazei*, and (C) treated with 0.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ water extract of *Coriolus versicolor*

참 고 문 헌

1. Folkman, J. 『in biologic therapy of cancer(Devita, V., Hellman. S., and Rosenberg, S. A., eds)』. Philadelphia. J. B. Lippincott Co, 1991: 743-753.
2. Folkman, J. 「Clinical applications of research on angiogenesis」. The New England J. of Medicine』 1995; vol. 333 No. 26: 1757-1763.
3. Lee, M. J., Yoon, S. H., Lee, S. K., Chung, M. H., Park, Y. I., et al. 「In vivo angiogenic activity of dichloromethane extracts of Aloe vera gel」. 『Arch. Pharm. Res』. 1995; vol. 18 No. 5: 332-335.
4. Tomotyki, H., Yusuke, K., Kenji T., Fujio, S., Masaharu, T. 「Shikonin, an ingredient of Lithospermum erythrorhizon, inhibits angiogenesis in vivo and in vitro」. 『Anticancer Res』 1998; vol. 18: 783-790.
5. Nagai, T., Yamada, H. 「In vivo anti-influenza virus activity of kampo(japanese herval) medicine"Sho-seiryu-to" and its mode of action」. 『Int. J. Immunopharmac』 1994; vol. 16 No. 8: 605-613.
6. Rubinstein, L. V., Shemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., et al. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data general with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines」. 『J. Natl. Cancer Inst』 1990; 82: 1113.
7. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assesment of chemosensitivity testing」. 『Cancer Res』 1987; 47: 9368.
8. Forkman, J. Haudenschild, C. C., Zetter, B. R. 「Long-term culture of capillary endothelial cells」. 『Proc. Natl. Acad. Sci. USA』 1979; 76: 5217-5221.
9. Gospodarowicz, D., Abraham, J. A., Schilling, J. 「Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived follicule stellate cells」. 『Proc. Natl. Acad. Sci. USA』 1989; 86: 7311-7315.
10. Nguyen M, Strubel NA. Bishoff J. 「A role for sialyl Lewis-X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis」. 『Nature(Lod.)』 1993; 365: 267-269.
11. Taylor, S. Folkman, J. 「Protamine is an inhibitor of angiogenesis」. 『Natur

- e』 1982; 297: 307-312.
12. Satoshi, T. Takao, N. Hisao, E. Hideo, A. Kunihiro, N. Toru, O. 「Studies on cytotoxic activity of animal and plant crude drugs」. 『Natural medicines』 1996; 50: 145-157.
 13. Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T, Shimura K, Ito H et al. 「Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of Agaricus blazei fruiting bodies」. 『Carbohydr Res』 1989; 186: 267-273.
 14. Ito H, Shimura K, Itoh H, Kawade M. 「Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex(ATOM) prepared from Agaricus blazei(Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice」. 『Anticancer Res』 1997; 17: 277-284.