

## 더덕추출물에 의한 bFGF-유도 시험관내 혈관신생의 억제

†소준노 · †김종화  
우석대학교 생명공학부, †식품영양 및 공학부  
(접수 : 2002. 11. 13., 게재승인 : 2003. 1. 22.)

### Effects of *Codonopsis lanceolata* Extracts on bFGF-induced Angiogenesis *in vitro*

June-No So† and Jong-Hwa Kim†

Division of Bioscience & Biotechnology, Woosuk University, Jeonbuk 565-701, Korea

†Division of Food Science and Nutrition, Woosuk University, Jeonbuk 565-701, Korea

(Received : 2002. 11. 13., Accepted : 2003. 1. 22.)

In this study, we examined the effects of the methanolic extract(CL-ex) of *Codonopsis lanceolata* on the angiogenesis stimulated with basic fibroblast growth factor(bFGF) *in vitro*, using porcine pulmonary arterial endothelial cells(PPAECs). In addition, we investigated the endothelial functions involved in angiogenesis, such as proliferation, migration and secretion of matrix metalloproteinases(MMPs), using human umbilical vein endothelial cells(HUVECs). CL-ex inhibited FGF-induced sprout formation *in vitro* at concentrations of 0.1-100 ug/ml. Although CL-ex did not affect the proliferation of endothelial cells, CL-ex strongly inhibited the FGF-induced migration of HUVECs at concentrations of 0.1-1 ug/ml; the degree of inhibition of endothelial cells by CL-ex was 49.4 % at 0.1 ug/ml and 71.9 % at 1.0 ug/ml. Moreover, CL-ex inhibited the secretion of MMPs from HUVECs stimulated with FGF. Therefore, the inhibitory effect of CL-ex on angiogenesis *in vitro* could be explained by the inhibition of endothelial cell migration. From these results, we suggest that *Codonopsis lanceolata* is a useful herb for the development of therapeutics or preventive food factors for angiogenesis related diseases, such as tumors.

**Key Words:** *Codonopsis lanceolata*, bFGF, angiogenesis, MMPs

### 서론

혈관내피세포는 많은 질병 상태의 진행은 물론 생체조직의 정상적인 생리기능의 유지에 밀접하게 관련되어 있으며, 체내에 들어오는 여러 가지 물질들이 가장 먼저 만나는 세포이기 때문에, 약효 성분이나 질병 유발물질을 검색에 매우 중요하게 다뤄지고 있다(1). 혈관내피세포는 혈관의 기능은 물론 새로운 혈관의 형성, 즉 혈관신생을 주도하는 주요 세포이기도 하다(2).

혈관신생은 암, rheumatoid arthritis, 만성 염증 등, 여러 가지 질환들의 발생과 진행을 결정하는 한 요인이다(3). 특히 암의 증식과 전이는 혈관신생을 억제함으로써 감소시킬 수 있다. 따라서 혈관신생을 억제하는 물질은 혈관신생에 관련된 여러 가지 질병 치료에 이용될 수 있다(4). 현재까지 혈관신생 억제 활성을 지닌 물질들이 알려져 있고, 이를 질병치료제로 개발하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이러한

물질들의 상당수는 식물에서 유래되며, 특히 식용으로 사용되는 식물류에도 다양하게 함유되어 있는 것으로 보고되고 있어 이 분야에 대한 연구가 경쟁적으로 이루어지고 있다(5).

초롱꽃과에 속하는 더덕은 다년생 초본으로 한국을 비롯한 동북아시아에 분포하고 있으며, 식용으로도 널리 사용되고 있다. 사삼으로도 불리는 더덕은 한방에서는 해소 및 거담 등 호흡기 질환의 치료는 물론 병후회복, 유즙부비 촉진 등 약용으로도 사용되어 왔다(6). 다양한 종류의 flavonoids 화합물이 더덕으로부터 추출되었고, 최근에는 codonopsin으로 명명된 새로운 종류의 saponin이 분리되었으며 암세포에 대한 세포독성을 보이는 것으로 보고되었다(7, 8). 또한 더덕 추출물은 체내 중성지방 축적 등을 억제하는 효과가 있으며, 더덕에는 면역세포를 활성화시키는 성분이 함유되어 있는 것으로 보고되었다(9-11). 이와 같이, 더덕의 약효 성분과 그 생리활성에 대한 연구들이 진행되어 왔지만, 인삼 등의 약재와 비교해 볼 때 그 연구의 범위는 매우 제한되어 있다.

흔히 사용되고 있는 자원도 중요한 생리활성이 밝혀지거나 추가되면 그 부가가치가 크게 증대되는 물론, 신물질 개발원으로 중요하게 취급될 수 있다. 따라서 본 연구는 식용과 약용으로 널리 쓰이고 있는 더덕에 유용한 생리활성 성분이 함유되어 있는지의 여부를 밝히려는 시도로서, 혈관내피세포

† Corresponding Author : Division of Bioscience and Biotechnology, Woosuk University, Wanju-gun, Jeonbuk 565-701, Korea  
Tel : +82-63-290-1432, Fax : +82-63-290-1512  
E-mail : sojn@core.woosuk.ac.kr

의 배양계를 이용하여 혈관신생과 혈관내피세포 증식 및 이동 등에 대한 더덕추출물의 작용 여부를 시험하였다.

**재료 및 방법**

**재료 및 추출액의 제조**

실험에 사용된 더덕은 10년 생으로 전북 진안군 더덕조합에서 제공받아 사용하였다. 구입한 더덕은 물로 씻은 다음, 절편으로 만들어 동결 건조시켰다. 건조된 더덕(800 g)은 실온에서 메탄올 용매로 3회 반복하여 추출하였으며, 모아진 추출액은 여과하여 rotary evaporator로 농축하고 동결건조시켰다(11). 동결 건조된 시료를 메탄올에 용해시켜(stock soln; 0.1 g/ml) 실험에 사용하였다.

**세포배양**

인간땃줄정맥 내피세포(HUVECs)는 땃줄정맥을 collagenase로 처리하여 분리하였으며, 같은 방법으로 돼지 폐동맥으로부터 돼지폐동맥 내피세포(PPAECs)를 분리하였다(12). HUVECs와 PPAECs는 각각 20% FBS-첨가 M199배지(Sigma)와 10% FBS-첨가 DME배지(Sigma)를 사용하여 배양하였으며, 실험에는 계대 수가 3-5인 세포를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-incubator에서 배양하였다.

**DNA 합성능 측정**

혈관 내피 세포를 multi-well plate에서 subconfluent 상태로 배양한 후, 배지를 교환하면서 시료를 첨가하고 42시간 배양하였다. 그 후, 1 uCi의 <sup>3</sup>H-thymidine(6.7 Ci/mmol, Perkin Elmer)을 각 well에 첨가하였다. 20시간 후, 배지를 제거하고 세포를 PBS로 2회, 10% TCA로 1회 세척하였다. 0.2 M

NaOH 0.2ml로 세포를 녹인 다음 liquid scintillation counter로 방사능을 측정하였다.

**In vitro angiogenesis assay**

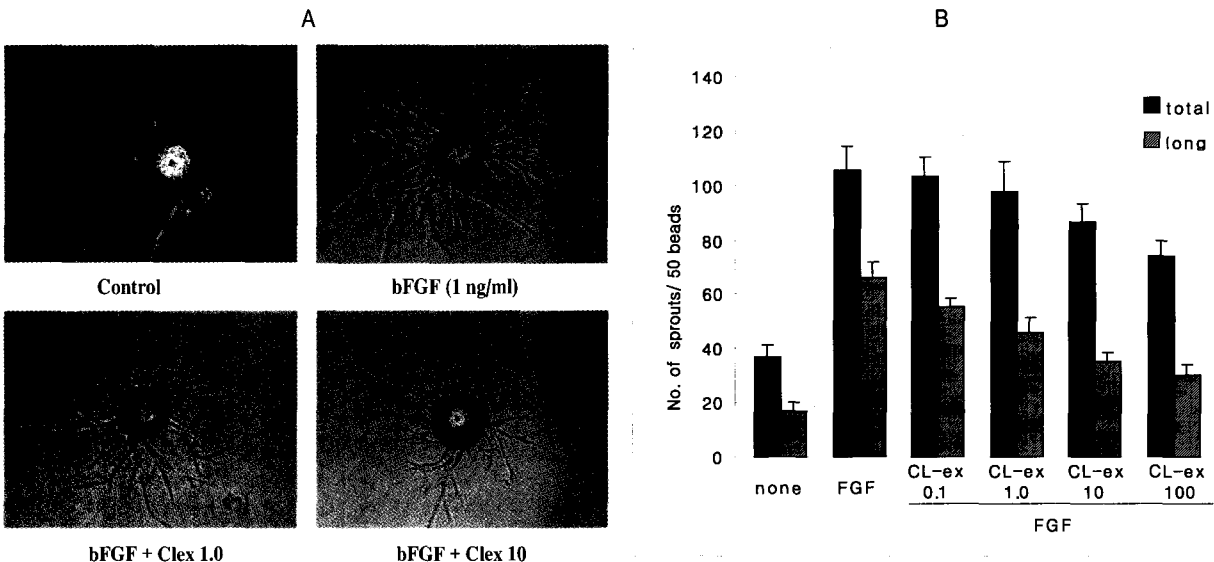
시험관 내 혈관신생은 fibrin gel을 이용한 PPAECs의 sprouting assay로 측정하였다(13). Microcarrier(MC) bead(직경 175 μm, Sigma)에 PPAECs를 confluent한 상태로 자라게 한 다음, 이 MC bead를 fibrin 용액(2.5 mg/ml, Sigma)에 넣고 thrombin(2.5 U/ml, Sigma)을 첨가하여 gel로 만들었다. 이때 시료도 같이 처리해주었으며 gel의 위를 2% FBS 첨가 DME 배지로 덮어주었다. 48시간 동안 배양하고 MC bead에서 fibrin gel 속으로 뻗어 나온 sprout를 관찰하고 그 수를 측정하였다.

**혈관내피세포의 migration assay**

HUVECs의 이동은 Boyden chamber(Neuroprobe Inc.)를 이용하여 측정하였다(14-15). 시료가 첨가된 1% FBS-첨가 M199배지를 chamber의 아래 well에 넣고 0.2% gelatin으로 coating된 polycarbonate membrane(8μm pore, Poretics Corp.)을 그 위에 놓은 후, upper chamber를 고정시켰다. HUVECs을 1% FBS-첨가 M199배지에 부유시켜 윗쪽 chamber의 각 well에 2 X 10<sup>5</sup>개의 세포를 넣고 6시간 배양하였다. Polycarbonate membrane은 윗면의 세포를 면봉으로 닦아낸 후, methanol로 고정하고 Diff-Quik 용액으로 염색하였다. 염색된 이동한 세포는 100배 시야의 현미경하에서 관찰하고 그 수를 세었다.

**Gelatin zymography**

혈관 내피 세포가 분비하는 MMPs의 활성은 gelatin zymography를 이용하여 확인하였다(14). MMPs 기질인 gelatin



**Figure 1.** Inhibition of *C. lanceolata* extract(CL-ex) on FGF-induced sprout formation of endothelial cells *in vitro*. Cells(PPAECs) grown on microcarrier beads were placed in fibrin gels containing vehicle, indicated amount of CL-ex(ug/ml), and/or FGF(1 ng/ml), and were incubated with daily supplementation with the same amount of this agent. A) Representative phase-contrast photographs of endothelial cell sprouts. Magnifications are 200X. B) Quantification of sprouting activities. The number of endothelial sprouts per 50 microcarrier beads was counted after 2-3 days. total; total number of sprouts, long; number of sprouts with length exceeding the diameter of the microcarrier beads(175 μm). Bar represent the mean + SD from three experiments. \*, p<0.05 versus control.

이 첨가된 SDS-PAGE running gel에 시료를 넣고 전기영동하였다. 그 후, 1% Triton X-100완충액에서 처리한 다음, 반응용 완충용액(0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.02 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij-35)에서 16시간 반응 시켰다. 반응 후, 0.5% Coomassie blue R250염색액으로 3시간 염색하고 10% acetic acid와 30% 메탄올로 처리하여 탈색시켰다.

**통계처리**

유의성은 Student-Newman-Keuls test에 의한 1-way ANOVA를 사용하여 검사하였다. 통계적 유의성은 p < 0.05를 기준으로 하였다.

**결과 및 고찰**

**시험관내 혈관신생 억제 효과**

더덕추출물에 혈관신생을 억제하는 활성이 있는지의 여부를 알아 보기 위해 시험관 내에서 MC bead를 이용하여 PPAECs의 sprout formation assay를 하였다. 이 방법은 생체 내 혈관신생과 상관성 높다고 알려져 있으며, 혈관신생 억제 물질이나 조절물질을 탐색하고 특성을 규명하는데 중요하게 사용되고 있다(15). 먼저 본 실험에서는 암 조직 등과 같은 질병 조직에서 혈관신생을 촉진하는 성장인자로 잘 알려진 FGF(1 ng/ml)로 시험관 내 혈관신생을 증가시킨 다음(16,17), 더덕추출물의 처리에 의해 혈관신생이 감소하는지의 여부를 측정하였다. FGF에 의해 크게 증가된 sprouts의 형성은 더덕추출물의 첨가에 의해 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 1). MC-bead로부터 뻗어 나온 sprouts의 전체 밀도는 10 ug/ml 이상의 고농도의 더덕추출물에 의해서만 약간 감소하나, 굵고 길게 뻗은 sprouts(long)는 저농도에서도 현저히 감소되었다. 혈관신생 의존적인 질병의 진행은 충분한 혈액의 공급을

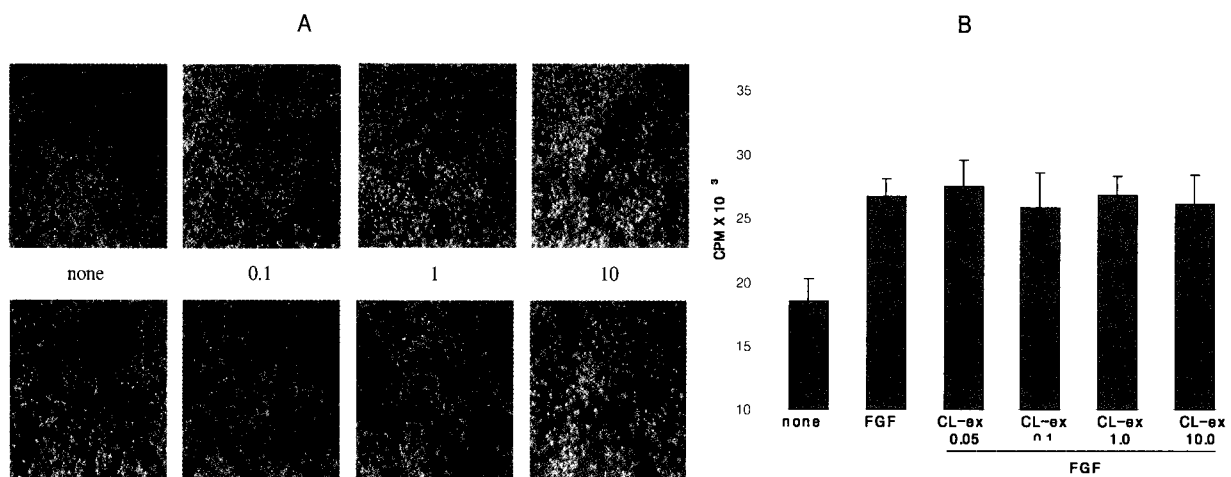
필요로 하기 때문에(3), 이 결과는 특히 혈관신생에 의존적인 암과 같은 질병의 진행을 저지시키는데 유효할 것이라는 점을 시사한다. 이어서 이와 같은 더덕추출물의 혈관신생 억제 효과가 혈관신생 과정의 어느 단계에 작용하여 나타나는 것인지를 알아보고자, 혈관신생의 전제 조건이 되는 혈관내피세포의 증식과 이동 및 MMPs 분비 등에 대한 더덕추출물의 효과를 조사하였다.

**혈관내피세포 증식에 대한 효과**

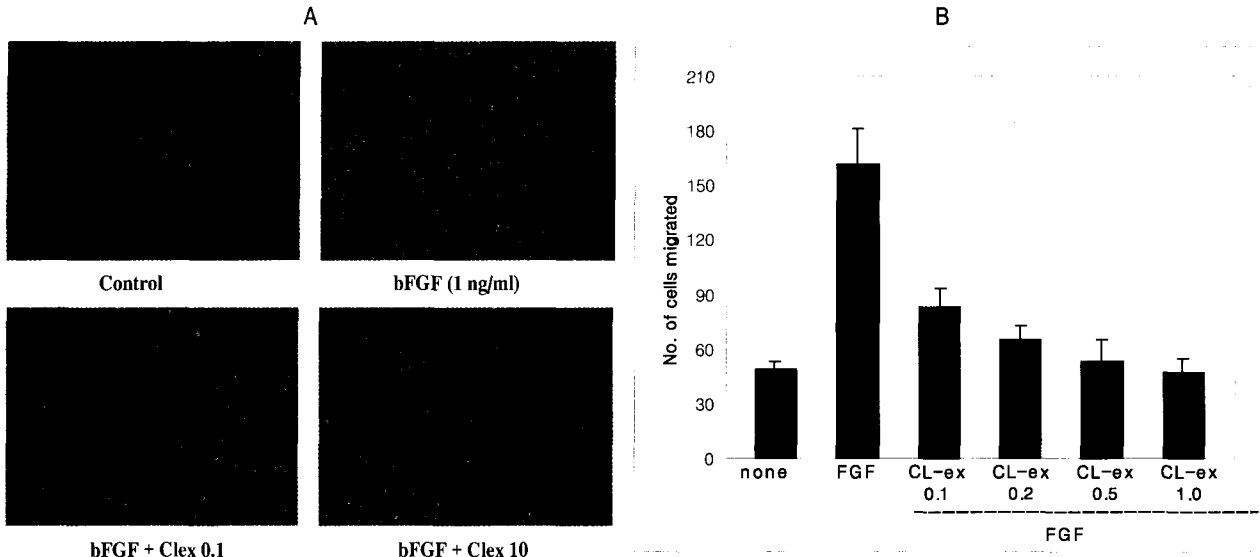
더덕추출물의 혈관신생 억제작용이 혈관내피세포의 증식과 관련되어 있는지의 여부를 알아보기 위해, 더덕추출물을 배양 중인 혈관내피세포에 처리하고 세포의 형태적인 변화와 세포의 DNA 합성능을 측정하였다. Fig. 2A에서 보여지는 바와 같이, FGF에 의한 세포밀도의 증가는 있었지만, FGF 존재 하에서나(1 ng/ml), 또는 FGF가 없는 상태에서나, 더덕추출물에 의한 세포의 밀도 변화는 거의 없었으며, 내피세포의 형태에도 변화가 없었다. 이 결과는 더덕추출물이 세포 증식에 작용하지 않는다는 사실은 물론 세포에 대한 독성 또한 없다는 점도 보여주는 것이다. 세포의 증식에 대한 더덕추출물의 효과를 분명하게 하기 위해서 <sup>3</sup>H-thymidine의 세포 내 유입량을 측정한 결과(Fig. 2B), 더덕추출물은 저농도에서나 고농도에서나 FGF에 의해 증가된 내피세포의 DNA 합성능을 감소시키지 못했다. 이러한 결과들은 앞서 보았던 더덕추출물의 혈관신생 억제효과가 혈관내피세포의 증식과는 관련이 거의 없음을 보여주는 것이다.

**혈관내피세포 이동에 대한 효과**

혈관내피세포의 이동에 대한 더덕추출물의 작용을 보기 위해, 혈관신생을 촉진하는 성장인자의 하나인 bFGF과 더덕추출물을 같이 처리하여 bFGF에 의해 유도된 혈관내피세포의



**Figure 2.** Effects of *C. lanceolata* extract (CL-ex) on the proliferation of endothelial cells. A) Phase-contrast photographs of endothelial cell monolayer. Magnification are 100X. In the presence of FGF(1ng/ml)(top) and in the absence of FGF(bottom), cells(HUVECs) were cultured with various concentration of CL-ex(0.1, 1 and 10 ug/ml) for 72 hours. B) <sup>3</sup>H-thymidine uptake of HUVECs. Cells were incubated in the presence of FGF and various concentrations of CL-ex(0.05, 0.1, 1.0, and 10 ug/ml) for 48 hours. Before 20 hours of termination, <sup>3</sup>H-TdR(1 uCi) are added. Column and bars represent mean + SD of the results of three cultures.



**Figure 3.** Inhibition of *C. lanceolata* extract (CL-ex) on FGF-induced endothelial cell migration. A modified Boyden chamber was used to examine migratory activity of HUVECs. HUVECs were grown to confluence on the NC membrane, and the FGF(1 ng/ml) and/or various concentrations of CL-ex(0.1-1.0 ug/ml) were added in the bottom well of the chamber. The cells were incubated for 24 hours to examine migratory activity of endothelial cells.

A) Representative photographs of cells migrated. The cells were stained with Diff-Quick solution. Magnification are 100 X.

B) Quantification of migratory activities. Data are the mean + SD from three experiments. \*, p<0.05 versus control.

이동에 변화가 있는지의 여부를 조사하였다. Fig. 3에서와 같이 bFGF는 내피세포의 이동을 크게 증가시켰으며, 더덕추출물은 농도의존적으로 bFGF에 의한 내피세포의 이동을 bFGF-무처리군 수준으로 억제하였다. 따라서 더덕추출물에 의한 시험관내 혈관신생 억제 효과는 더덕추출물이 혈관내피세포의 이동을 차단함으로써 나타난 것이라 추정된다.

**혈관내피세포가 분비하는 MMPs에 미치는 효과**

혈관 내피 세포의 이동은 세포 자체가 생산하여 분비하는 MMPs가 혈관 주변의 세포외 기질을 분해함으로써 새로운 혈관의 형성으로 이어진다(18,19). MMPs는 정상적인 세포의 이동은 물론, 암세포가 전이되고 조직 내로 침투하는 데에도 관여하는 중요한 단백질 분해효소이다(20). 혈관내피세포의 주요 MMP인 MMP-2와 MMP-9의 분비에 미치는 더덕추출물의 영향은 Fig. 4에서 보는 바와 같다. bFGF는 혈관내피세포의 MMP-2와 MMP-9 분비를 크게 증가시켰으며, 이와 같이 증가된 MMPs의 양은 더덕추출물의 처리에 의해 감소됨을 볼 수 있었다. 그 정도는 10 ug/ml의 추출물이 처리되었을 때, MMP-2와 MMP-9 모두 50% 이하로 감소함을 볼 수 있었다. 이와 같은 결과는 혈관신생과 혈관내피세포의 이동을 억제한 더덕추출물의 효과가 부분적으로는 더덕추출물에 의한 혈관내피세포의 MMPs 분비의 감소에 기인된 것임을 시사한다.

**요 약**

더덕의 메탄올 추출물(CL-ex)이 혈관신생에 영향을 주는지의 여부를 알아보기 위하여, 인간태반 정맥내피세포와 돼지 폐동맥내피세포를 이용하여 실험하였다. 실험 결과, 더덕

추출물은 FGF에 의해 유도된 시험관 내 혈관신생을 억제하였다. 또한 더덕추출물은 내피세포의 DNA 합성에는 영향을 주지 않았으나, FGF에 의해 증가된 내피세포의 이동을 농도의존적으로 강하게 억제하였고, MMPs의 분비 역시 감소시켰다. 이러한 결과에 의하면, 더덕에 함유된 혈관신생 억제 물질은 혈관내피세포의 이동 과정에 작용하여 그 효과를 나타내는 것이라 추정된다. 따라서 더덕은 그 발생과 진행이 혈관신생에 의존하고 있는 것으로 알려진 암 등의 질병 예방과 치료를 위한 유용한 식물자원으로 개발될 수 있음을 시사한다.

**감 사**

본 논문은 2002년 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

**REFERENCES**

1. Pugsley, M. K. and R. Tabrizchi (2000), The vascular system; An overview of structure and function, *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **44**, 333-340.
2. Folkman, J. and M. Klagsberg (1987), Angiogenic factors, *Science* **235**, 442-447.
3. Folkman, J. (1995), Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nature Med.* **1**, 27-31.
4. Griffioen, A. W. and G. Molema (2000), Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation, *Pharmacol. Rev.* **52**, 237-268.
5. Colic, M. and K. Pavelic (2000), Molecular mechanism of anticancer activity of natural dietetic products, *J. Mol. Med.* **78**, 333-336.
6. Shin, S. W. and E. J. Choi (1995), Production of essential oils by cell culture of *Codonopsis lanceolata*, *Kor. J. Pharmacogn.* **26**, 164-167.

7. Whang, W. K., K. Y. Park, S. H. Chung, I. S. Oh, and I. H. Kim (1994), Flavonoids from *Codonopsis lanceolata* leaves, *Kor. J. Pharmacogn.* **26**, 204-208.
8. Lee, K. T., J. Choi, W. T. Jung, J. H. Nam, H. J. Jung, and H. J. Park (2002), Structure of a new echinocystic acid bisdesmoside isolated from *Codonopsis lanceolata* roots and the cytotoxic activity of prosapogenins, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4190-4193.
9. Kim, S. Y., H. S. Kim, I. S. Su, H. S. Yi, H. S. Kim, and S. Y. Chung (1993), Effects of the feeding *Platycodon grandiflorum* and *Codonopsis lanceolata* on the lipid components of serum and liver in rats, *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **22**, 517-523.
10. Han, E. G., I. S. Sung, H. G. Moon, and S. Y. Choi (1998), Effect of *Codonopsis lanceolata* water extract on the levels of lipid in rats fed high fat diet, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 940-944.
11. Suh, J. S. and J. S. Eun (1998), Isolation of active components on immunocytes from *Codonopsis lanceolata*, *Kor. J. Nutr.* **31**, 1076-1081.
12. Kwak, H. J., J. N. So, S. J. Lee, I. Kim, and G. Y. Koh (1999), Angiotensin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells, *FEBS Lett.* **448**, 249-253.
13. Nehls, V. and D. Drenkhahn (1995), A novel, microcarrier-based invitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis, *Microvascular Res.* **50**, 311-322.
14. Qian, X., T. N. Wang, V. L. Rothman, R. F. Nicosia, and G. P. Tuszynski (1997), Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells, *Exp. Cell Res.* **235**, 403-412.
15. Kim, I., H. G. Kim, S. O. Moon, S. W. Chae, J. N. So, K. N. Koh, B. C. Ahn, and G. Y. Koh (2000), Angiotensin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion, *Circ. Res.* **86**, 952-959.
16. Friesel, R. E. and T. Maciag (1995), Molecular mechanism of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction, *FASEB J.* **9**, 919-925.
17. Paterson-Wingterter, P., K. E. Elliott, J. I. Clark, and A. G. Farr (2000), Fibroblast growth factor-2 selectively stimulates angiogenesis of small vessels in arterial tree, *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* **20**, 1250-1256.
18. Isaji, M., H. Miyata, Y. Ajisawa, Y. Takehana, and N. Yoshimura (1997), Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo, *Br. J. Pharmacol.* **122**, 1061-1066.
19. Nguyen, M., J. Arkell, and C. J. Jackson (2001), Human endothelial gelatinases and angiogenesis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 960-970.
20. Cox, G. and K. J. O'Byrne (2001), Matrix metalloproteinases and cancer, *Anticancer Res.* **21**, 4207-4219.