

## 식물 추출물의 혈관신생 억제 효능 검색

김준식 · 박병영 · 박은규 · 이희석 · 함종천 · 배기환<sup>1</sup> · 김민영\*  
(주)안지오랩, <sup>1</sup>충남대학교 약학대학

## Screening of Anti-angiogenic Activity from Plant Extracts

Joon-Sik Kim, Byoung-Young Park, Eun-Kyu Park, Hee-Suk Lee,  
Jong-Cheon Hahm, Ki-Hwan Bae<sup>1</sup>, and Min-Young Kim\*

AngioLab, Inc., Daejeon 302-735, Korea

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

**Abstract** – We examined anti-angiogenic effects of water extracts from 32 plant materials (20 Korean medicinal plants and 12 western herbs) using cell-based anti-angiogenic assay, HUVEC tube formation assay, and then we found that 7 plant extracts inhibited HUVEC tube formation strongly. The plant materials which showed anti-angiogenic effects are *Cinnamomi Ramulus*, *Atractylodis Rhizoma alba*, *Polygalae Radix*, *Myristicae Semen*, *Artemisiae Iwayomogii Herba*, leaves of *Rosmarinus officinalis*, and leaves of *Melissa officinalis*. We also investigated inhibitory effects of these anti-angiogenic herbal extracts on MMP (matrix metalloproteinase) activity which has important roles in angiogenesis. Among extracts tested in this study, water extract of *Melissa officinalis* showed the most potent anti-angiogenic and MMP inhibitory activity.

**Key words** – Angiogenesis, inhibitor, matrix metalloproteinase (MMP), HUVEC tube formation

혈관신생(angiogenesis)은 기존의 혈관에서 새로운 모세혈관이 생기는 것을 말한다. 혈관신생은 정상적인 조건에서는 매우 엄격하게 조절되고 있으며, 배아 발생, 조직 재구성, 상처 치료, 여성의 주기적인 생식기 변화에서만 일어난다.<sup>1)</sup> 그러나, 암의 전이와 성장, 안과 질환, 염증, 비만, 자궁 내막증, 세균 감염, 자가면역 질환 등 많은 질병에서 혈관신생이 비정상적으로 증가한다는 것이 알려져 있다.<sup>2)</sup>

혈관신생 초기 단계에 기존의 혈관이 확장된 후에 혈관의 투과성이 증가하며, 세포외 기질이 분해된다. 그 후에 혈관 내피세포가 이동하여 증식하면서 새로운 혈관을 구성하게 된다. 이러한 혈관신생 과정이 진행되는데 중요한 역할을 하는 두가지 인자 중 한 가지는 세포외 기질을 분해하는 MMP(matrix metalloproteinase)라는 단백질 분해효소이며, 다른 한 가지는 혈관내피세포의 증식을 유도하고 새로운 혈관 생성을 유도하는 VEGF(vascular endothelial growth factor)이다.<sup>3,4)</sup>

외국의 경우에 항암제 및 여러 질환의 치료제로 이용하기 위한 혈관신생 억제제 연구가 활발히 진행되고 있으며, 식

물 추출물에서 플라보노이드, 카테킨, 폴리페놀 등의 물질들이 혈관신생 억제활성을 가지고 있다는 연구 결과들이 발표되고 있다.<sup>5-7)</sup> 베트남 약용 식물 추출물에서 HUVEC 관형성 억제 활성을 스크리닝한 연구 결과가 발표되기도 하였으며, 국내 식물 자원의 경우에 동아(*Benincasa hisida*) 종자 추출물과 상항버섯(*Phellinus linteus*) 추출물의 혈관신생 억제 효과에 대해서 보고된 바가 있다.<sup>8-10)</sup>

본 연구에서는 국내에서 이용되고 있는 생약 재료 20종과 외국의 허브 식물 12종을 스크리닝하여 7종의 식물 추출물에서 혈관신생 억제 활성을 확인하였다. 또한, 혈관신생 활성이 우수한 것으로 확인한 7종의 식물 추출물에 대해서 MMP 활성 저해 여부를 조사하였다.

### 재료 및 방법

**실험재료** – 실험에 사용한 생약 시료인 감초, 계지, 단삼, 맥문동, 박하, 백작약, 백출, 상백피, 상엽, 어성초, 원지, 육두구, 인동, 인진, 적작약, 지실, 진피, 창출, 홍화, 황기의 수침 추출물은 한국생명공학연구원 자생식물사업단 천연물뱅크에서 분양 받았다. 실험에 사용한 허브인 바질(basil, *Ocimum*

\*교신저자(E-mail) : angiolab@angio-lab.co.kr  
(FAX) : 042-520-5787

*basilicum*) 잎, 라벤더(lavender, *Lavendula angustifolia*) 꽃, 로베지(lovage, *Levisticum officinale*) 잎, 밀크씨슬(milk thistle, *Silybum marianum*) 씨, 오레가노(oregano, *Origanum vulgare*) 잎, 파슬리 (parsley, *Petroselinum crispum*) 잎, 로즈마리(rosemary, *Rosmarinus officinalis*) 잎, 세이지(sage, *Salvia officinalis*), 타임(thyme, *Thymus serpyllum*) 잎과 레몬밤(lemon balm, *Melissa officinalis*) 잎은 Mountain Rose Herbs (미국, 오레곤)에서 구입하였다.

**허브 추출물의 제조** - 건조 허브 식물을 파쇄하여 얻은 허브 분말 10 g을 증류수 100 ml에 현탁시킨 후 100°C에서 3시간 동안 가열하여 추출하였다. 추출액은 동결건조하여 허브의 수침 추출물을 얻었다.

**HUVEC 관형성 억제 실험** - 관형성 실험을 위하여 인간제대정맥내피세포(HUVEC, human umbilical vein endothelial cell)를 제왕절개로 얻은 탯줄에서 분리하였다. 분리한 세포를 배양한 후 Anti-Factor VIII 항체를 이용한 면역세포학 방법으로 HUVEC임을 확인하였다. HUVEC을 Matrigel에 배양한 후에 식물 수침 추출물을 물에 녹여 50 µg/ml의 농도로 처리하였다. 수침 추출물을 처리한 HUVEC을 37°C에서 8-16시간 동안 추가로 배양한 후 현미경으로 관형성 여부를 관찰하고 사진을 촬영하였다. 대조군의 경우에는 동일한 부피의 물을 처리하였다. 관형성 억제 정도는 다음의 기준에 따라 평가하여 점수로 환산하여 3번의 독립적인 실험 결과를 평균하여 HUVEC 관형성 억제 정도를 평가하였다.

점수	평가 기준
0.0	관형성이 전혀 억제되지 않음
0.5	일부분에서만 관형성이 끊어져 있음
1.0	모든 부분에서 관형성이 끊어져 있음
1.5	약간의 관형성이 존재하며, 대부분의 관형성이 끊어져 있음
2.0	관형성이 존재하나 모두 끊어져 있음
2.5	관형성이 전혀 이루어 지지 않음

**MMP 정제** - MMP-2 및 MMP-9 효소를 클로닝하여 Sf21 곤충 세포를 이용하여 정제하였다. MMP-2 cDNA (Genebank No. XM\_048244)를 pBlueBac4.5 transfer vector(미국, Invitrogen사)에 클로닝한 후에 Bac-N-Blue Transfection Kit(미국, Invitrogen사)를 이용하여 Sf21 곤충 세포를 transfection시켰다. Sf21 곤충 세포를 27°C에서 10% FBS가 포함된 TNM-FH 배지로 배양한 후에 harvest하여 1 ml 당 10<sup>7</sup> 세포로 희석하였다. 여기에 MMP-2 cDNA가 클로닝되어 있는 바이러스를 넣고 Sf21 곤충 세포를 72시간 동안 배양하고, 배지를 회수하였다. MMP-2 효소는 gelatin-

sepharose affinity column을 이용하여 회수한 배지로부터 정제하였다. MMP-9(Genebank No. XM\_009491)도 MMP-2와 동일한 방법으로 클로닝하여 발현시켰으며, SP-sepharose와 gelatin-sepharose affinity column을 이용하여 정제하였다.

**MMP 활성 측정** - MMP 효소 활성은 형광광도계를 이용하여 측정하였다. 정제된 MMP-2와 MMP-9을 37°C에서 2시간 동안 activation buffer(1 mM p-aminophenylmercuric acetate, 50 mM TrisHCl, pH 7.5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% Triton X-100)로 활성화시켰다. MMP-2 및 MMP-9의 인공 기질로 2, 4-dinitrophenyl-Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Arg-OH(미국, Calbiochem사)를 이용하였다. 대조군은 2 ml의 reaction buffer(50 mM Tricine, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl)에 10 nM의 MMP 효소와 1 mM 인공 기질을 섞은 후에 상온에서 5분간 형광 변화(Excitation: 280 nm, Emission: 360 nm)를 측정하여 기울기 변화를 측정하였다. 증류수에 녹인 식물 추출물을 증류수에 녹인 후 50 µg/ml로 처리한 후 상기의 방법으로 MMP 활성을 측정하였다. MMP 활성 저해도는 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{활성 저해도 (\%)} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{처리군의 MMP 활성}}{\text{대조군의 MMP 활성}} \right]$$

## 결과 및 고찰

혈관신생은 암을 비롯한 많은 질환과 관련이 있으며, 암의 전이 및 성장을 억제하기 위한 혈관신생 억제제의 개발이 다양한 물질을 대상으로 진행되고 있다. 지금까지 여러 종류의 식물 추출물이 혈관신생 억제 활성을 가지고 있다는 사실이 알려져 있다.<sup>8-10)</sup> 본 연구팀은 지금까지 혈관신생 억제 활성에 관해서 알려져 있지 않은 생약 및 허브 식물 중에서 혈관신생 억제제로 이용이 가능한 식물 추출물을 탐색하였다.

본 연구에 이용한 생약 시료 20종은 한국생명공학연구원 자생식물사업단 천연물뱅크에서 분양하는 생약 수침 추출물을 이용하였으며, 허브 시료 12종은 수입한 건조 시료를 직접 파쇄하여 추출한 수침 추출물을 이용하였다. 32종의 식물 수침 추출물은 각각 증류수에 녹인 후 50 µg/ml의 농도에서 HUVEC 관형성 억제 활성을 측정하여 그 결과를 Table I에 표시하였다.

32종의 수침 추출물 중에서 계지, 백출, 원지, 육두구, 인진, 로즈마리, 레몬밤의 7종은 다른 수침 추출물과 비교하여 HUVEC 관형성을 상대적으로 강하게 억제하였다(Fig. 1). 감초, 지실, 바질을 제외한 나머지 추출물도 어느 정도 HUVEC 관형성을 억제하는 효과를 나타내었지만, 감초, 지실, 바질은 전혀 HUVEC 관형성을 억제하지 못하였다.

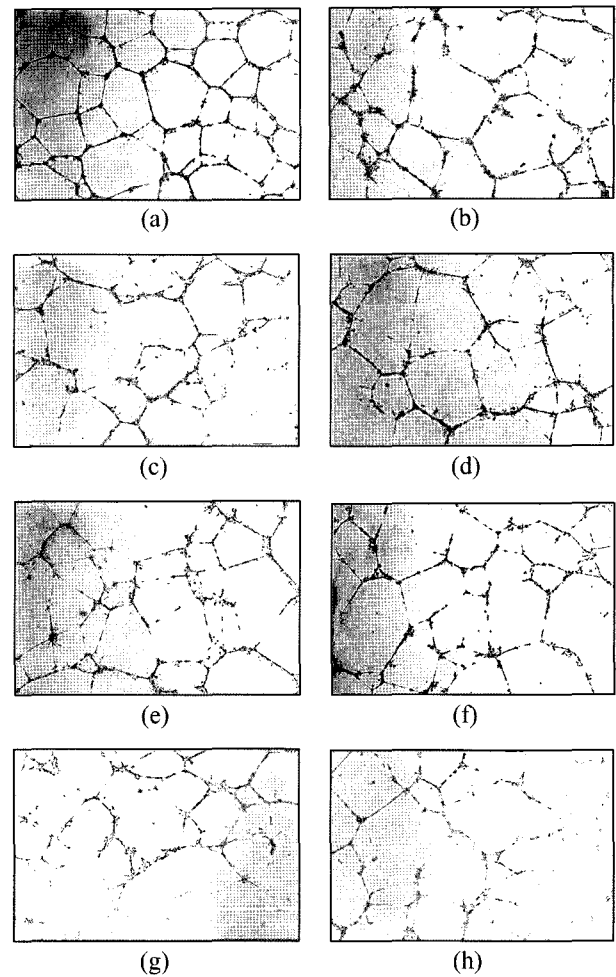
HUVEC 관형성에 대해 가장 강한 저해활성을 나타내는

**Table I.** Inhibitory effects of aqueous extracts of various plant resources on HUVEC tube formation

Plant resources	Inhibition (a.u.) <sup>a</sup>	Part used
감초 (Glycyrrhizae Radix)	0.00	root
계지 (Cinnamomi Ramulus)	1.30	bark
단삼 (Salviae Radix)	0.67	root
맥문동 (Liriopis Tuber)	0.33	tuber
박하 (Menthae Herba)	0.33	leaf
백작약 (Paeoniae Radix alba)	0.67	root
백출 (Atractylodis Rhizoma alba)	1.67	rhizome
상백피 (Mori Radicis Cortex)	0.67	cortex
상엽 (Mori Folium)	0.16	leaf
어성초 (Houttuyniae Herba)	0.67	aerial part
원지 (Polygalae Radix)	1.16	root
육두구 (Myristicae Semen)	1.00	seed
인동 (Lonicerae Folium)	0.83	leaf
인진 (Artemisiae Iwayomogii Herba)	1.33	aerial part
적작약 (Paeoniae Radix rubra)	0.83	root
지실 (Ponciri Fructus)	0.00	fruit
진피 (Aurantii Nobilis Pericarpium)	0.67	pericarp
창출 (Atractylodis Rhizoma)	0.50	rhizome
홍화 (Cartami Flos)	0.67	flower
황기 (Astragali Radix)	0.50	root
바질 (basil, <i>Ocimum basilicum</i> )	0.00	leaf
라벤더 (lavender, <i>Lavendula angustifolia</i> )	0.50	flower
로베지 (lovage, <i>Levisticum officinale</i> )	0.16	leaf
밀크씨슬 (milk thistle, <i>Silybum marianum</i> )	0.16	seed
오레가노 (oregano, <i>Origanum vulgare</i> )	0.33	leaf
파슬리 (parsley, <i>Petroselinum crispum</i> )	0.33	leaf
로즈마리 (rosemary, <i>Rosmarinus officinalis</i> )	1.50	leaf
세이지 (sage, <i>Salvia officinalis</i> )	0.83	whole body
타임 (thyme, <i>Thymus serpyllum</i> )	0.83	leaf
레몬밤 (lemon balm, <i>Melissa officinalis</i> )	1.50	leaf

<sup>a</sup>재료 및 방법에 기술한 평가 방법대로 HUVEC 관형성 억제 정도를 평가한 후에 3번의 실험결과를 평균하여 얻음.

7종의 시료를 대상으로 MMP 저해활성을 조사하였다. MMP 효소는 현재까지 20종 이상이 알려져 있으며 이 중에서 MMP-2와 MMP-9은 기저막의 주성분인 제IV형 콜라겐에 특이하게 작용한다.<sup>11,12)</sup> 따라서 이 효소들은 특히 암세포의 침윤과 전이에 있어서 가장 중요한 효소라 할 수 있다. 혈



**Fig. 1.** Inhibitory effects of seven aqueous extract on HUVEC tube formation.

(a) control, (b) *Cinnamomi Ramulus*, (c) *Atractylodis Rhizoma alba*, (d) *Polygalae Radix*, (e) *Myristicae Semen*, (f) *Artemisiae Iwayomogii Herba*, (g) *Rosmarinus officinalis*, (h) *Melissa officinalis*

관신생 과정에서 중요한 역할을 하는 MMP-2 및 MMP-9을 선택하여 이들에 대한 저해활성을 조사하였으며 그 결과를 Table II에 표시하였다.

50 µg/ml의 농도에서 레몬밤 추출물이 MMP-2 및 MMP-9를 각각 77%와 70% 억제하여 MMP 효소에 대한 가장 높은 저해 활성을 나타내었다. 레몬밤 추출물 이외에도 계지와 로즈마리 추출물이 MMP-2와 MMP-9를 50% 이상 억제하였다. 육두구의 경우에는 다른 추출물과 비교하여 상대적으로 약한 저해 활성을 나타내었다.

본 연구를 통해 최종적으로 선택된 7종 시료인 계지, 백출, 원지, 육두구, 인진, 로즈마리, 레몬밤은 혈관신생 억제 활성이나 MMP 활성 저해효과에 관하여 이전의 문헌에서는 전혀 알려진 바가 없다.

**Table II.** Inhibitory effects of aqueous extracts of various plant resources on HUVEC tube formation

Plant resources	Inhibition (%) <sup>a,b</sup>	
	MMP-2	MMP-9
계지 (Cinnamomi Ramulus)	67.7±1.5%	62.9±1.8%
백출 (Atractylodis Rhizoma alba)	44.1±0.8%	29.0±0.2%
원지 (Polygalae Radix)	38.6±2.1%	30.7±3.9%
육두구 (Myristicae Semen)	4.3±8.5%	10.4±2.5%
인진 (Artemisiae Iwayomogii Herba)	n.d. <sup>c</sup>	n.d. <sup>c</sup>
로즈마리 (Rosemary)	61.4±0.2%	56.9±0.1%
레몬밤 (Lemon balm)	76.7±1.6%	69.9±6.9%

<sup>a</sup>재료 및 방법에 기술한 방법대로 MMP 활성 저해 정도를 평가한 후에 2번의 실험결과를 평균하여 얻음.

<sup>b</sup>표시된 값은 mean±S.D.를 의미함.

<sup>c</sup>수침 추출물의 높은 형광으로 인하여 측정 불가

로즈마리(*Rosmarinus officinalis*)의 항암 효과에 대해서는 이미 보고되었다.<sup>13,14</sup> 로즈마리 잎의 메탄올 추출물과 그 주 성분인 carnosol과 ursolic acid는 피부암을 억제하며, 이 중에서 carnosol은 B16/F10 mouse melanoma cell에서 MMP-9의 발현을 억제한다고 알려져 있다.<sup>14,15</sup> 그러나 로즈마리 추출물이 MMP 효소의 활성 자체에 대한 저해 여부에 관하여 알려진 바가 없다. 본 연구 결과에 따르면 로즈마리 추출물은 이미 생성된 MMP-2와 MMP-9에 대하여도 효소 활성을 억제하는 것을 알 수 있다.

레몬밤(*Melissa officinalis*)는 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 초본으로 서양에서는 오래 전부터 우울증, 신경성 두통, 기억력 저하, 신경통, 발열 등의 병에 널리 쓰여왔으며 그 외에도 진정작용, 항균작용, 항바이러스작용, 항산화 작용 및 항호르몬작용이 있다고 알려져 있고, 현재 레몬밤 건조 추출물은 혈액순환 개선제 성분으로 사용되고 있다.<sup>16,17</sup> 레몬밤에는 많은 flavonoid와 terpenoid acid, volatile oil, 알코올 및 페놀 화합물의 배당체 및 rosmarinic acid가 함유되어 있으며 그중 rosmarinic acid가 3%이상 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>18</sup> 최근에 발표된 연구 결과에 따르면 rosmarinic acid는 세포내 reactive oxygen species(ROS)의 양을 감소시켜 ROS에 의한 VEGF 발현 및 IL-8 분비를 억제하여 결과적으로 혈관신생을 억제한다고 알려져 있다.<sup>19</sup> 이러한 사실은 레몬밤에 함유되어있는 rosmarinic acid가 혈관신생을 저해하는 유효 성분 중 하나라는 사실을 뒷받침한다.

본 연구에서 최종적으로 선별된 계지, 백출, 원지, 육두구, 인진, 로즈마리, 레몬밤은 강한 혈관신생 억제 활성을 나타내고 있을 뿐만 아니라, 계지, 백출, 원지, 로즈마리, 레몬밤은 MMP-2 및 MMP-9에 대해서도 강한 저해 활성을 나타내고 있다. 현재 선별된 이들 시료로부터 활성물질의 분리 및 구조 규명 연구가 진행되고 있다.

## 사 사

이 연구는 보건복지부 제품화 연구 신약개발사업(과제번호 A040159)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Folkman, J. and Cotran, R. (1976) Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **16**: 207-248.
- Timar, J., Dome, B., Fazekas, K., Janovics, A. and Paku, S. (2001) Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. *Pathol. Oncol. Res.*, **7**: 85-94.
- Mignatti, P. and Rifkin, D. B. (1996) Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein*, **49**: 117-137.
- Veikkola, T. and Alitalo, K. (1999) VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol.*, **9**: 211-220.
- Fotsis, T., Pepper, M. S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R. and Schweigerer, L. (1997) Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. *Cancer Res.*, **57**: 2916-2921.
- Jung, Y. D. and Ellis, L. M. (2001) Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *Int. J. Exp. Pathol.*, **82**: 309-316.
- McCarty, M. F. (1998) Polyphenol-mediated inhibition of AP-1 transactivating activity may slow cancer growth by impeding angiogenesis and tumor invasiveness. *Med. Hypotheses*, **50**: 511-514.
- Nam, N.-H., Kim, H.-M., Bae, K.-H. and Ahn, B.-Z. (2003) Inhibitory effects of Vietnamese medicinal plants on tube-like formation of human umbilical venous cells. *Phytother. Res.*, **17**: 107-111.
- Lee, K.-H., Choi, H.-R. and Kim, C.-H. (2005) Anti-angiogenic effect of the seed extract of *Benincasa hispida* Cogniaux. *J. Ethnopharmacol.*, **97**: 509-513.
- Song, Y. S., Kim, S.-H., Sa, J.-H., Jin, C., Lim, C.-J. and Park, E.-H. (2003) Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *J. Ethnopharmacol.*, **88**: 113-116.
- Murphy, G., Ward, R., Hembry, R. M., Reynolds, J. J., Kuhn, K. and Tryggvason, K. (1989) Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. A metalloproteinase resembling tumour type IV collagenase. *Biochem. J.*, **258**: 463-472.
- Stetler-Stevenson, W. G., Krutzsch, H. C., Wachter, M. P., Margulies, I. M. and Liotta, L. A. (1989) The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organo-

- mercurial activation. *J. Biol. Chem.*, **264**: 1353-1356.
13. Singletary, K. W. and Nelshoppen, J. M., (1991) Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary tumorigenesis and of *in vivo* formation of mammary DMBA-DNA adducts by rosemary extract. *Cancer Lett.*, **60**: 169-175.
  14. Huang, M. T., Ho, C. T., Wang, Z. Y., Ferraro, T., Lou, YR., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J. D. and Conney, A. H. (1994) Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res.*, **54**: 701-708.
  15. Huang, S. C., Ho, C. T., Lin-Shiau, S. Y. and Lin, J. K. (2005) Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappa B and c-Jun. *Biochem. Pharmacol.*, **69**: 221-232.
  16. Sweetman, S. C. (2002) Martindale: the complete drug reference 33<sup>rd</sup>, 1632. Pharmaceutical Press, London.
  17. Fleming, T. *et al.* (2000) PDR for herbal medicines 2<sup>nd</sup>, 461-463. Medical Economics Company, Inc., Montvale.
  18. Lamaison, J. L., Petitjean-Freytet, C. and Carnat, A. (1990) Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic derivatives and antioxidant activity of Apiaceae, Boraginaceae and Lamiceae medicinals. *Ann. Pharm. Fr.*, **48**: 103-108.
  19. Huang, S. S. and Zheng, R. L. (2005) Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action *in vitro*. *Cancer Lett.*, in press.

(2006년 9월 1일 접수)