

홍삼수용성추출물이 혈관신생에 미치는 영향

노의준 · 유승훈 · 김규민 · 이상현 · 윤용갑*

원광대학교 한의과대학 방제학교실

Angiogenic Effects of Korea Red Ginseng Water Extract in the *In Vitro* and *In Vivo* Models

Euy Joon Rho, Seong Hun Ryu, Gyu Min Kim, Sang Hyun Lee, Young Gab Yun*

Department of Oriental Medical Prescription, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Angiogenesis is important for promoting cardiovascular disease, wound healing, and tissue regeneration. We here investigated the pharmacological effects of Korea red ginseng water extract (KRGW) on angiogenesis and its underlying signal mechanism. This study showed that KRGW increased *in vitro* proliferation, migration, and tube formation of human umbilical endothelial cells, as well as stimulated *in vivo* angiogenesis. KRGW-induced angiogenesis was accompanied by phosphorylation of ERK1/2, Akt, and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) as well as an increase in NO production. Inhibition of PI3K activity by wortmannin completely inhibited KRGW-induced angiogenesis and phosphorylation of Akt, ERK1/2, and eNOS, indicating that PI3K/Akt activation is an upstream event of KRGW-mediated angiogenic pathway. The MEK inhibitor PD98059 completely blocked KRGW-induced angiogenesis and ERK phosphorylation without affecting Akt and eNOS activation. However, the eNOS inhibitor NMA effectively inhibited tube formation, but partially blocked proliferation and migration as well as ERK phosphorylation without altering Akt and eNOS activation, revealing that eNOS/NO pathway is in part involved in ERK1/2 activation. This study first demonstrated the critical involvement of both ERK1/2 and eNOS activation in KRGW-induced angiogenesis, which lie on downstream of PI3K/Akt. Thus, these results indicate that KRGW requires activation of both the PI3K/Akt-dependent ERK1/2 and eNOS signal pathways and their cross-talk for its full angiogenic activity.

Key words : korean red ginseng water extract (KRGW), extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), angiogenesis, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt, nitric oxide synthase (NOS)

서 론

혈관신생은 기존에 존재하는 혈관내피로부터 새로운 혈관이 생성 되는 것을 의미하며, 상처치유, 배아발생, 만성 염증, 그리고 암의 진행과 전이를 포함하는 다양한 생리적 혹은 병리적으로 중요한 단계를 거쳐서 일어난다¹⁻³⁾. 혈관의 성장 과정은 동맥 경화, 심근경색, 뇌졸중 그리고 사지허혈 등과 같은 조직의 손상을 복구하는데 필요하며^{4,6)}, 치료 목적의 신혈관 생성을 위한 방법으로 제공되고 있다. 혈관신생은 조직의 복구 또는 재생되는 부위로 신진대사에 필요한 물질인 영양분, 다양한 성장인자, 그

리고 산소 등을 공급하는 중요한 역할을 하고, 조직에서 생성된 노폐물을 운반하는 통로이다^{7,8)}. 따라서 혈관신생을 촉진하는 basic fibroblast growth factor(bFGF), vascular endothelial growth factor(VEGF)와 같은 혈관신생 성장인자는 허혈성 질환^{9,10)}, 상처 치료, 조직의 재생¹¹⁾ 등에 사용되고 있다.

혈관신생의 다양한 신호전달체계에서 가장 중요한 세포내 표적분자는 ERK, PI3K/Akt 그리고 endothelial nitric oxide synthase(eNOS)로 알려져 있다. 혈관신생 신호전달계에서 이들 표적분자들은 각각의 하부 단계의 신호전달 인자들을 활성화시켜 혈관신생을 촉진하기도 하지만, 상호 신호교환 및 협동작용을 통하여 신호전달의 강도를 증가시키기도 한다. 이러한 신호전달계 활성화는 내피세포의 유전자 발현, 생존, 증식, 이동 그리고 관형성에 직접적으로 관련되어 있다.

* 교신저자 : 윤용갑, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : yunyg@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6834

· 접수 : 2009/02/19 · 수정 : 2009/03/20 · 채택 : 2009/04/10

人參은 2000년 이전부터 동아시아에서 중요한 약용 식물로 이용되어 왔으며, 현재 세계에서 가장 널리 사용되는 약용 식물 중의 하나이다¹²⁻¹⁴.

人參은 심혈관 질환, 류마티스 관절염, 그리고 진성 당뇨병 등을 포함하는 인체의 다양한 질병 치료를 위한 가장 탁월한 다양한 약리적 효과를 가지고 있다^{15,16}.

人參의 한의학적 효능은 大補元氣, 安神益智, 扶正祛邪, 止咳潤肺, 解熱, 生津止渴, 托瘡生肌 등이 있다¹⁷⁻²². 東醫寶鑑에 수록된 400여 處方중 人參이 배합된 處方이 736종이며 이중 人參이 主藥으로 사용된 處方은 245종이고, 人參이 혈관 신생에 관련된 處方, 즉 한의학적으로 生肌作用에 관한 處方으로는 托裏消毒 飲 외 16종이 있다²³. 이에 저자는 人參이 혈관 신생에 일정한 효과가 있는 것으로 추정하고 본 실험에 착수 하였다.

人參은 五加科(두릅나무과; Araliaceae)에 속한 다년생 本草의 根을 건조한 것으로 학명은(Panax ginseng C.A., Meyer)이며^{17,18} 우리나라에서는 제주도를 제외한 전국 전역과 만주 길림성, 흑룡강성 및 장백산맥일대 소련의 극동 연해주 지방의 시오대아린 산맥에서 자생하며 재배인삼은 재배 4~7년 후 가을에 채취하여 사용한다²¹.

人參의 주된 활성 성분은 triterpene glycoside로 잘 알려진 ginsenoside이며, 이들의 약리 효과에 대해서 광범위한 연구가 진행 중이다. 분명하지는 않으나 순수한 ginsenoside는 혈관신생과는 반대적인 효과²⁴를 통하여 상처 치유를 증가 시키고¹⁶, 암 성장을 억제한다²⁵는 보고들이 있다. 그러나 *in vitro*와 *in vivo* 조건에서 6년근 人參으로부터 제조한 紅蔘의 수용성 추출물의 혈관신생 효과와 이들의 작용 기전은 아직까지 명확하게 밝혀져 있지 않다.

이에 저자는 紅蔘의 수용성 추출물의 혈관신생효과와 작용 기전을 알아보기로 사람의 태줄 정맥에서 분리된 혈관내피세포들(human umbilical vein endothelial cells : HUVECs)의 이동성, 증식 그리고 관형성 능력을 관찰하고, 또한 신호전달 기전에 관여하는 다양한 세포내 표적분자의 활성화에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다. 저자는 본 연구에서 紅蔘 수용성 추출물은 다양한 혈관신생 인자들²⁶⁻²⁹을 통한 혈관신생과 관련이 되어있는 PI3K/Akt에 의존적인 ERK1/2와 eNOS의 인산화 과정을 통한 활성화와, 이로 인하여 일산화질소(nitric oxide, NO)의 생성이 증가 되어 *in vitro*와 *in vivo* 조건에서 혈관신생을 촉진하는 결과를 얻어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

紅蔘의 수용성 추출물은 6년생 人參으로 가공한 紅蔘 150 g을 80℃ 증류수 1,000 ml로 8시간씩 5회 추출한 후, vacuum evaporator를 이용하여 60℃에서 농축한 것을 KT&G 중앙연구소(대전, 한국)로부터 제공받았다. 사람의 재조합 VEGF와 TNF- α 그리고 VEGF 항체는 R&D 시스템(Minneapolis, MN, USA)제품을 사용하였다. Matrigel는 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, US

A), Transwell은 Corning Costar (Cambridge, CA, USA)제품을 사용하였다. 또한 phospho-specific ERK 항체(Thr-202/Tyr-204)와 ERK 항체는 Cell signaling (Beverly, MA, USA)제품을 사용하였다. PD98059, wortmannin 그리고 NG-monomethyl-L-arginine (NMA)는 Calbiochem으로부터 구입하였다 (San Diego, CA, USA). 그 외의 다른 시약들은 Sigma (St. Lorraine, MO, USA)제품을 사용하였다.

2. 세포 배양과 실험동물

HUVEC은 Jaffe 등³⁰의 논문에서 설명한 바와 같이 collagenase 처리하여 사람의 태줄 정맥에서 분리하였으며, 3-7번 계대배양하여 사용하였다. 이들 세포들은 20% FBS (fetal bovine serum), 100 units/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신, 3 ng/ml bFGF, 그리고 5 units/ml 헤파린을 첨가된 M199 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 5% CO₂/95% 공기 37℃ 조건으로 배양하였다. 수컷 ICR계 생쥐 (6-8 주령)와 Sprague-Dawley 계 흰쥐 (6-8 주령)는 Orient Co. (성남, 한국)에서 구입하여 표준화된 물과 사료를 먹여 키웠다.

3. 세포 증식 실험

HUVEC 증식에 미치는 人參 수용성 추출물과 VEGF의 효과를 알아보기 위해 MTT 실험이 사용되었다. 세포들은 24-plate의 well에 HUVEC를 2×10^4 cells/ml의 밀도로 배양하였다. 세포 증식은 人參과 VEGF 처리한 다음 48 시간 경과 후에 살아있는 세포들에 의한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide salt(MTT)의 흡수에 의한 색채 분석법에 의해 결정하였다. 간략하게 설명하면, MTT 용액 (0.5 mg/ml)을 세포에 첨가하고 37℃에서 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 tetrazolium ring이 절단되어 파란 formazan 결정체가 생성 되도록 배양한다. 2 시간 후 남은 MTT는 조심스럽게 제거하고 세포를 2-3 회 세척한 후 결정체는 isopropanol을 첨가하여 10분 동안 잘 용해시킨다. Plate를 낮은 회전수의 shaker에서 5분간 흔들어 준 뒤에 570 nm에서 용액의 흡광값을 측정하였다.

4. 세포 이동성 분석

세포의 이동성 분석은 Lee 등의 논문에서 밝힌 바와 같이 실행하였다²⁸. 간략하게 설명하면, HUVEC의 주화성 이동 능력은 지름 6.5 mm의 polycarbonate 필터(pore size: 8 μ m)를 갖는 Transwell을 사용하여 측정하였다. Transwell 필터 아랫면을 10 μ g의 젤라틴으로 코팅하였다. 紅蔘 수용성 추출물 또는 VEGF가 포함된 세포배양액을 아래쪽 well에 넣어 주었다. HUVEC을 트립신으로 처리 후 1% FBS를 포함한 M199배지에 1×10^6 cells/ml의 최종농도가 되게 현탁하였다. 혈관신생 신호전달 기전에 관여하는 세포내 표적분자들의 억제제는 세포를 Transwell에 넣기 전 실온에서 30분 전처리 하여 배양하였다. 세포 현탁액 100 μ l을 위쪽 well에 분주하였다. Transwell을 37℃에서 4시간 동안 배양한 후 위쪽 well의 세포를 고정 시키고 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였다. 세포의 이동성은 필터 위쪽 표면의 이동

하지 않은 세포는 면봉을 이용하여 조심스럽게 제거하고, 필터 아래쪽으로 이동한 세포의 수를 광학현미경(x 200)으로 세어 정량화 하였다. 하나의 필터에 대하여 10 군데의 영역으로 나누고 각각의 영역에 있는 세포를 세어 각각 정량화 하였다.

5. 관형성 능력 분석

관형성 능력 분석은 Lee 등의 논문에서 설명한 대로 실시하였다²⁸⁾. 성장인자가 없는 Matrigel(10 mg protein/ml) 250 μ l를 파이펫으로 24-well plate에 넣고 37°C에서 30분간 반응 시킨다. 1% FBS를 함유한 M199배지에서 6시간 동안 배양한 세포를 트립신으로 처리한 다음 M199 배지로 현탁하여, 2×10^5 cells/well의 밀도로 Matrigel 위에 넣어주고, 紅蓼의 수용성 추출물(1 mg/ml) 또는 VEGF(10 ng/ml)를 첨가하였다. Matrigel은 37°C에서 배양하고, 20시간이 지난 뒤에 사진을 찍어 관찰하였다(x 100).

6. Reverse transcriptase-polymerase 사슬반응(RT-PCR) 분석

RT-PCR 분석방법은 Kim 등의 논문에서 설명한 대로 실시하였다³¹⁾. HUVEC로부터 전체 RNA를 Trizol(Life Technology Inc. Rockville, MD)을 이용하여 분리하였다. RNA 3 μ g를 200 units의 역전사 효소와 500 ng의 oligo-dT primer를 이용하여 42°C에서 1시간동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 이때 사용한 완충용액의 조건은 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, and 1 mM dNTPs이었다. PCR은 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 2.5 units Taq DNA polymerase, 그리고 VEGF 또는 actin의 primer 0.1 μ M이 포함된 조건에서 수행하였다. 이와 같은 반응액을 PCR 기기(Beckman, USA)에 넣고 94°C에서 1분, 55°C에서 2분, 72°C에서 3분의 조건으로 30회 반복 반응을 수행하였다. 사용된 VEGF primer는 5'-GGCCTCCGAAACCATGAACCT TCT GCT-3'(sense), TCACCGC-3'(antisense)이고 actin은 대조군으로 사용하였다.

7. Aortic ring sprouting assay

Nicosia 등의 논문에서 설명한대로³²⁾, 6 주령의 Sprague-Dawley계 흰쥐에서 대동맥을 조심스럽게 분리하였다. 96-well plate에 60 μ l의 Matrigel로 코팅하고 젤 상태로 굳힌 다음, aortic ring을 그 위에 놓고 다시 20 μ l의 Matrigel을 도말한 뒤 다시 젤 상태로 굳혔다. 여기에 人參 수용성 추출물(1 mg/ml) 또는 VEGF (20 ng/ml)를 최종 부피 100 μ l의 human endothelial serum-free medium에 첨가하여 각 well에 분주하였다. 6일 경과 후 미세혈관이 자라난 것을 현미경상에서 사진을 찍어 분석하였다. 분석은 최저 값을 0으로 최고 값을 5로 선정하였으며, 6회 반복된 실험의 평균값을 사용하였다.

8. Intravital fluorescence microscopy

수컷 ICR계 생쥐(6-8 주령)를 1.5% isoflurane과 O₂/N₂O가 혼합된 흡입마취기를 이용하여 마취시키고 복강 쪽에 window를 이식하였다. 가장자리에 8개의 구멍(외경 19 mm, 내경 14 mm,

그리고 두께 0.7 mm)을 가진 원형 티타늄판을 피부와 복막 사이에 삽입하였다. 人參 수용성 추출물(2 mg/생쥐) 또는 VEGF(100 ng/생쥐)를 포함하나 성장인자는 제거된 Matrigel을 window 안쪽에 넣고, 원형 유리 cover slip를 덮고 원형 고리로 고정하였다. 4일 경과 후, 생쥐를 같은 방법으로 마취한 후 꼬리 정맥에 50 μ l의 FITC-dextran(25 mg/ml, MW 250,000)을 주입하였다. 이를 Zeiss Axiovert 200M 현미경 위에 놓고 100W 수은램프와 440-475 nm excitation 파장과 530-550 nm emission 파장을 갖고 있는 광원의 필터 세트를 이용하여 관찰하였다. 형광이미지는 다섯 군데의 임의적인 구역을 관찰하여 Metamorph 분석 프로그램을 이용하여 분석하였다. 분석은 최저값을 0으로 최고값을 5로 선정하였으며, 6회 반복된 실험의 평균값을 사용하였다.

9. Western blot 분석

HUVEC을 plate에서 긁어내어 RIPA buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% sodium dodecyl sulfate)로 용해시켰다. 세포질 용액은 4°C에서 13,000 g로 20분간 원심 분리한 후 상등액으로부터 얻었다. 세포질 용액(50 μ g 단백질)을 10% SDS-PAGE에서 전기영동하고, 단백질을 nitrocellulose membrane으로 옮겼다. Membrane을 5% 탈지 우유를 함유한 PBS-Tween으로 2회 세척하고, 여기에 표적 단백질에 대항하는 항체를 포함한 PBS-Tween을 넣고 2시간 반응시켰다. Membrane을 PBS-Tween 용액으로 두 번 세척한 후 1차 항체에 맞는 2차 항체를 넣고 상온에서 2시간 반응시켰다. Membrane을 PBS-Tween으로 네 번 세척한 후 ECL system을 이용하여 X-ray film에 감광하여 확인하였다³¹⁾.

10. 통계적 분석

모든 결과는 3개의 군으로 3회 다른 독립된 실험으로부터 얻어진 결과의 평균값 또는 대조군 값에 대한 백분율을 의미한다. 두 그룹의 통계학적 비교는 Student's t test를 사용하여 나타내었다.

결 과

1. 紅蓼 수용성 추출물이 HUVEC의 증식과 이동에 미치는 영향
혈관신생은 혈관내피세포의 증식과 이동 등과 같은 다양한 복잡한 단계를 거쳐서 이루어지는 생물학적 과정으로 다양한 인간질환의 병태기전과 밀접한 관련성이 있다. 紅蓼 수용성 추출물에 의한 혈관신생이 일어나는지 알아보기 위해 MTT 분석을 통해 HUVEC의 증식에 대한 紅蓼 수용성 추출물의 효과를 살펴 보았다. HUVEC을 5% FBS를 포함한 M199 배지에 紅蓼 수용성 추출물을 10-2000 μ g/ml의 농도로 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 紅蓼 수용성 추출물은 HUVEC의 증식을 농도 의존적으로 촉진하였으며, 1 mg/ml에서는 1.5배의 증가된 양상을 나타냈다(Fig. 1A). 紅蓼 수용성 추출물 1 mg/ml 농도에서의 세포 증식은 10 ng/ml 농도의 VEGF 보다 약간 더 증가된 것을 보여주었고 있다(Fig. 1B). 紅蓼 수용성 추출물에 의한 HUVEC의 이동성은

Transwell을 이용하여 측정하였다. 추출물에 의한 HUVEC의 이동성은 농도 의존적으로 증가 되었으며, 1 mg/ml의 농도에서 거의 최고 효과를 나타내었다(Fig. 1C). 紅蓼 수용성 추출물 1 mg/ml 농도에서의 이동 능력은 대조군에 비해서 1.6배 증가 되었으며, VEGF 적정 농도인 10 ng/ml에서 보다 약간 높은 세포 이동 능력을 나타내었다(Fig. 1D).

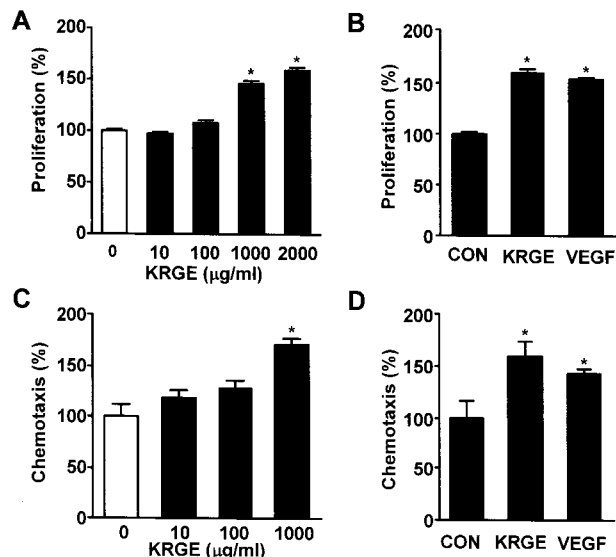


Fig. 1. KRGE induces proliferation and migration in HUVECs. (A) Effect of KRGE on proliferation of HUVECs. Various concentrations (10, 100, 1000 or 2000 µg/ml) of KRGE were added to HUVECs. Cell proliferation was determined 48 h after KRGE treatment using a colorimetric assay based on the uptake of MTT assay. (B) The comparison of the effects of KRGE (1000 µg/ml) and VEGF (10 ng/ml) on HUVEC proliferation. (C) Chemotactic motility of HUVECs by different doses of KRGE. HUVECs were placed in the upper chamber and M199 (1% FBS) with various concentrations (10, 100 or 1000 µg/ml) of KRGE was placed in the lower wells of chemotaxis chamber. After 5 h-incubation, cell migration was determined by counting the cells that migrated to the lower side of the filter with optical microscope. (D) The comparison of the effects of KRGE and VEGF on the chemotactic motility of HUVECs. M199 with 1000 µg/ml or 10 ng/ml VEGF was placed in the lower wells. All data are expressed as percentage ± SE from three different experiments. *, p<0.01 vs. control.

2. 紅蓼 수용성 추출물이 HUVEC의 관형성에 미치는 영향

혈관신생의 마지막 과정은 혈관내피세포가 증식과 이동을 거쳐 혈관생성이 요구되는 조직이나 기관에 정착한 혈관내피세포가 관(tube)을 만드는 단계이다. 따라서 다음, 실험으로 紅蓼 수용성 추출물이 HUVEC의 관형성에 미치는 효능을 2차원적 Matrigel을 이용하여 조사하였다. 혈관신생 성장인자가 제거된 Matrigel에서는 HUVEC의 관형성은 불안정하고 좁은 관모양의 구조를 이루었다. 하지만 紅蓼 수용성 추출물은 최소 10 µg/ml에서 관형성을 촉진하고, 높은 농도에서는 길고 강건한 관모양의 구조를 형성하였으며, 이러한 것은 대조군에 비하여 많은 수의 세포가 유기적 형태를 이루고 있었다(Fig. 2A). 관형성 정도를 이미지 분석 프로그램을 이용하여 분석하였을 때, 紅蓼 수용성 추출물에 의한 관형성은 농도 의존적으로 증가하였으며, 1 mg/ml의 농도에서 최고 활성을 나타내었다(Fig. 2B). 이러한 결과들은 紅蓼 수용성 추출물이 *in vitro*, 즉 사람의 혈관내피세포 배양 조건에서 혈관신생의 활성을 나타내고 있음을 시사하고 있다.

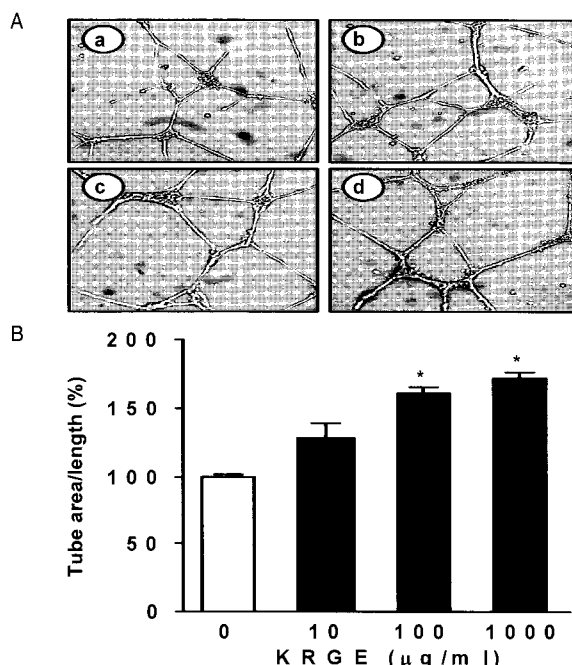


Fig. 2. KRGE induces tube formation of HUVECs. (A) Effect of KRGE on tube formation of HUVECs. HUVECs were plated on Matrigel-coated wells at a density of 2×10^5 cells/well with various concentrations of KRGE. After 20 h, photographs were taken (x100). a: 0 µg/ml, b: 10 µg/ml, c: 100 µg/ml, d: 1000 µg/ml. (B) The area covered by the tube network was quantitated using Image-Pro Plus software. Results are expressed as percentage ± SE from three different experiments with triplicate. *, p<0.01 vs. control.

3. 紅蓼 수용성 추출물이 ex vivo와 in vivo 에서 혈관신생에 미치는 영향

혈관신생의 정도에 대하여 *in vitro* 조건에서 내피세포의 증식, 이동 그리고 관형성의 분석만으로는 충분히 평가되기 어렵다. 따라서 다음 실험으로 *ex vivo*와 *in vivo* 조건에서 紅蓼 수용성 추출물의 의한 혈관신생 조절에 관해서 조사하였다. *Ex vivo* 조건의 혈관신생 실험은 흰쥐의 대동맥 고리(aortic ring)를 Matrigel 위에서 紅蓼 추출물과 함께 배양한 후 미세혈관의 생성 정도를 측정하였다. 대동맥 고리에 紅蓼 수용성 추출물을 처리하였을 때 紅蓼 수용성 추출물 1 mg/ml를 처리한 군은 대조군과 비해서 미세혈관의 부정근들이 자라는 것이 약 13배 정도 증가하였다(Fig. 3A). 이러한 효과는 VEGF 적정 농도인 10 ng/ml과 비슷한 효과를 나타내었다(Fig. 3B). 紅蓼 수용성 추출물의 혈관신생 촉진 효능을 *intravital* 현미경을 이용하여 *in vivo* 조건인 동물 모델에서도 측정한 결과 紅蓼 추출물이 혈관신생을 효과적으로 증가시킴을 관찰하였다. 紅蓼 수용성 추출물을 투약한 결과 대조군에 비해서 새로운 혈관의 형성이 의미 있게 증가하였다(Fig. 3C). 이것 또한 VEGF의 효과와 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 3D). 이와 같은 결과들은 紅蓼 수용성 추출물은 *in vivo* 조건에서도 혈관신생을 증가 시킨다는 것을 반영하는 것이다.

4. 紅蓼이 혈관내피세포에서 VEGF의 발현에 미치는 영향

Tumor necrosis factor-α(TNF-α), transforming growth factor-β(TGF-β), interleukin-1β(IL-1β), prostaglandins, 그리고 endothelins을 포함한 혈관신생 촉진 인자들은 혈관내피세포의

증식, 이동 및 관형성을 직접적으로 촉진하는 것이 아니고, 다양한 세포를 자극하여 혈관신생에 있어서 중요한 역할을 담당하는 VEGF의 발현을 증가시키고, 이로 인하여 혈관신생이 증가된다고 보고되고 있다³³. 紅蓼 수용성 추출물에 의한 혈관신생 효과가 VEGF의 발현과 관련되어 있는지 알아보려고 HUVEC에 紅蓼 수용성 추출물을 처리하고 VEGF의 발현을 RT-PCR 방법으로 조사하였다. Fig. 4A에서처럼, TNF- α 를 처리한 HUVEC에서 VEGF mRNA의 발현이 증가된 반면, 紅蓼 수용성 추출물을 처리한 HUVEC에서는 VEGF mRNA의 발현에 영향을 미치지 못하였다. RT-PCR의 결과를 다시 확인하고자, HUVEC의 배양액에 VEGF 혹은 紅蓼 수용성 추출물과 VEGF-중화 항체를 처리하고 세포의 증식을 조사하였다. 그 결과 VEGF에 의해서 증가된 혈관내피세포의 증식은 VEGF 중화 항체에 의하여 효과적으로 억제되었으나, 紅蓼 수용성 추출물에 의한 혈관내피세포의 증식은 VEGF 중화 항체에 의해 별다른 영향을 받지 않았다(Fig. 4B). 이와 같은 결과들은 紅蓼 수용성 추출물에 의한 혈관신생 증가는 VEGF의 발현에 의하여 유도되는 것이 아니라는 것을 의미하며, 紅蓼 수용성 추출물이 혈관내피세포에서 직접적으로 작용하여 혈관신생에 관련된 신호전달 체계를 활성화 시키는 혈관신생 물질임을 시사하는 것이다.

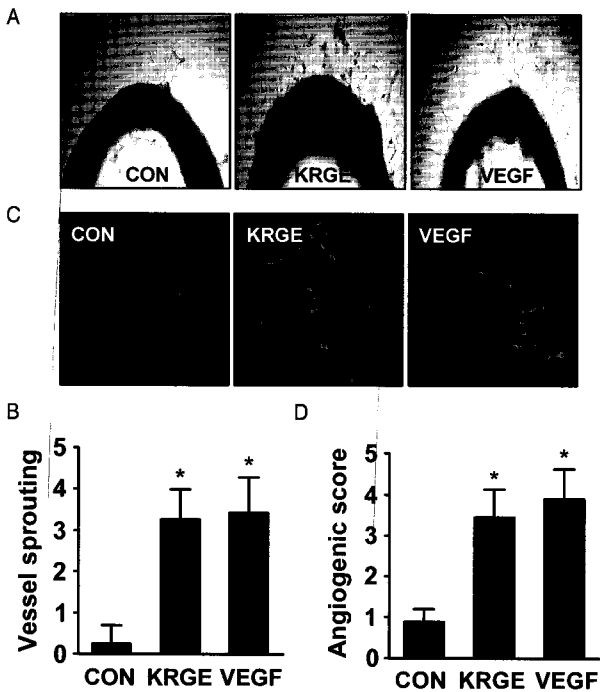


Fig. 3. Identification of KRGE-induced angiogenesis by rat aortic ring sprouting assay and the intravital fluorescence microscopy assay. (A) Photomicrographs showing that sprouted vessels from rat aortic organ culture (x100). (B) The comparison of the effects of KRGE (1000 µg/ml) and VEGF (20 ng/ml) on rat aortic ring assay. The assay was scored from 0 (least positive) to 5 (most positive) in a double-blind manner. Each data point was determined in sextuplet. (C) The *in vivo* angiogenic activity of KRGE was assessed by FITC-dextran using an intravital microscope. After 4 days, photographs were taken (x50). (D) The comparison of the effects of KRGE (2000 µg/ml) and VEGF (100 ng/ml) on intravital microscope. Four mice were used as a group, and the experiment was repeated twice. The assay was scored from 0 (least positive) to 5 (most positive) in a double-blind manner. Results are expressed as percentage \pm SE from three different experiments with triplicate. *, $p < 0.01$ vs. control.

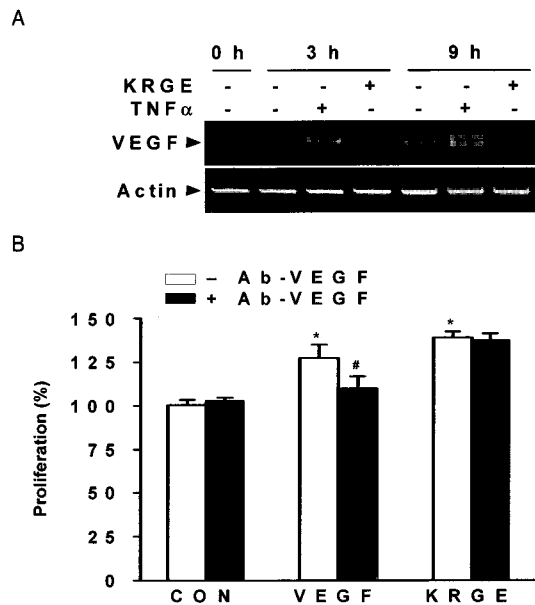


Fig. 4. KRGE directly induces angiogenesis. (A) The effect of KRGE on the level of VEGF mRNA in HUVECs. HUVECs were incubated with or without TNF- α (10 ng/ml) or KRGE (1000 µg/ml) for indicated time periods. Total RNA was isolated, and RT-PCR was performed as described under Material and Methods. (B) Anti-VEGF neutralizing antibody had no blocking effect on KRGE-induced HUVEC proliferation. Cells were incubated with or without VEGF (10 ng/ml) or KRGE (1000 µg/ml) in the presence of 1 µg/ml VEGF-neutralizing antibody for 1 hr, and allowed to proliferate for 48 hr. Data are expressed as percentage \pm SE from three different experiments with triplicate. *, $p < 0.01$ vs. control; #, $p < 0.01$ vs. VEGF.

5. 紅蓼 수용성 추출물이 혈관내피세포에서 ERK, Akt, 및 eNOS에 미치는 영향

혈관신생 인자들에 의한 내피세포의 증식, 이동 또는 형태 변화는 다양한 신호전달 경로의 활성화를 통하여 유도된다. 이러한 신호전달 경로의 중요한 매개인자는 ERK, Akt, 그리고 eNOS 등의 인산화이다²⁶⁻²⁹. 다음 실험으로 紅蓼 수용성 추출물이 ERK, Akt, 및 eNOS의 인산화 조절에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 각각의 인산화 형태를 인지하는 특이적인 항체를 이용한 Western blot을 실시하였다. HUVEC에 紅蓼 수용성 추출물을 처리하면 ERK1/2의 인산화가 농도와 시간 의존적인 증가양상을 나타내었고(Fig. 5A) 紅蓼 수용성 추출물 처리 후 30분 뒤에 가장 큰 활성을 나타내었으며 이후로는 감소하였다(data not shown). 또한 紅蓼 수용성 추출물 처리에 의해 Akt와 eNOS의 인산화는 시간 의존적으로 증가하였다(Fig. 5B). VEGF를 포함한 중요한 혈관신생 인자는 Akt 의존적인 eNOS의 활성을 증가시키고 이를 통하여 혈관신생을 증가시키는 NO의 생성을 촉진한다. 다음의 실험으로 nitric oxide synthase(NOS) 억제제인 NMA를 처리한 것과 처리하지 않은 것에 紅蓼 수용성 추출물을 투여한 다음 HUVEC에서 NO의 생성을 확인하였다. NO의 생성 확인은 형광물질인 DAF-FM을 이용하여 형광강도의 차이를 현미경을 이용하여 측정하였다. 紅蓼 수용성 추출물을 처리한 군에서는 NO의 생성이 대조군에 비하여 증가하였고 NMA를 같이 처리한 군에서는 NO의 생성이 감소하였다(Fig. 5C). 이러한 결과들은 紅蓼 수용성 추출물과 연관된 혈관신생의 과정에 Akt, ERK 그리고 eNOS의 활성화가 관련되어 있음을 시사한다.

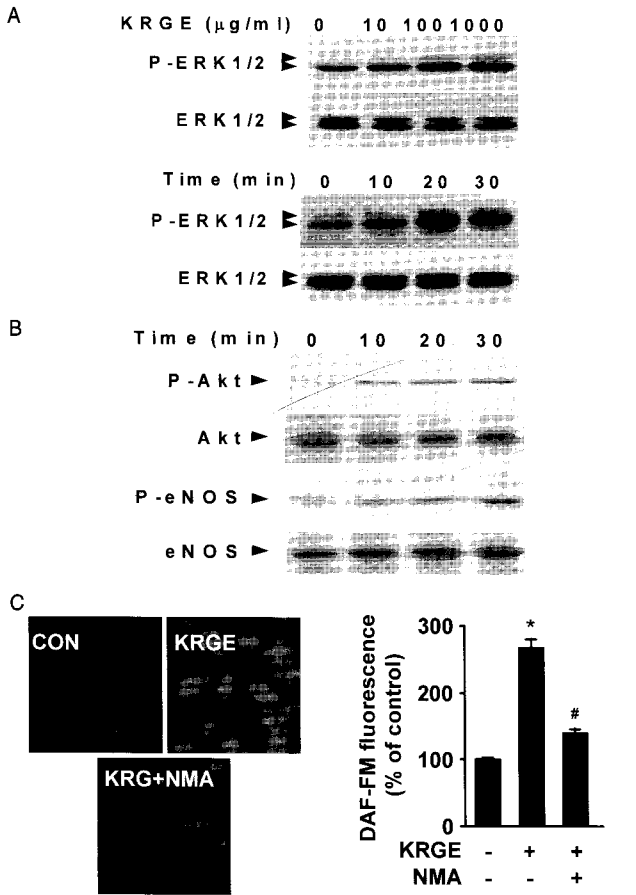


Fig. 5. KRG E induces ERK1/2 activation in HUVECs. (A) Dose-dependent ERK activation. HUVECs were stimulated with various concentrations (10, 100, 1000 or 2000 μg/ml) of KRG E for 10 min. (B) Time courses of KRG E-induced ERK1/2 activation. HUVECs were stimulated with 1000 μg/ml KRG E for the indicated time periods. ERK1/2 activation was determined by Western blot analysis using anti-phospho-specific ERK1/2 antibody (P-ERK1 and P-ERK2). The membrane was stripped and re-probed with antibodies against ERK1/2.

6. 紅蔘 수용성 추출물에 의해 유도된 혈관 신생의 기전

혈관신생 인자인 VEGF 혹은 bFGF 등에 의한 혈관신생은 MEK에 의한 ERK의 활성화, PI3K에 의한 Akt 활성화, 그리고 eNOSdp 의한 NO의 생성 증가에 의하여 조절된다고 알려져 있다²⁷⁻²⁹. 따라서 紅蔘 수용성 추출물과 연관된 혈관신생의 신호전달 기전에서 ERK, Akt, 및 eNOS의 역할과 상호작용의 기능적인 연관성을 알아보려고 PI3K의 억제제 wortmannin, NOS 억제제 NMA, 또는 MEK 억제제 PD98059가 紅蔘 수용성 추출물에 의한 신호전달 경로에 미치는 영향을 알아보았다. 紅蔘 수용성 추출물에 의해서 증가된 ERK의 인산화가 wortmannin 또는 PD98059에 의해서 완벽하게 억제되었으나 NMA에 의해서는 부분적으로만 억제되었다(Fig. 6A). 紅蔘 수용성 추출물에 의한 Akt 그리고 eNOS의 인산화는 wortmannin에 의해서 대조군 수준으로 감소하였으나, NMA나 PD98059에 의해서는 영향을 없었다(Fig. 6A). 이러한 결과들은 ERK1/2의 인산화는 직접적으로 PI3K/Akt의 활성화에 의한 MEK 활성을 통해서 조절되며, 부분적으로는 eNOS/NO에 의해서 조절된다는 것을 추측할 수 있다. 더 나아가 약리적 억제제인 wortmannin, NMA 및 PD98059를 이용하여 紅蔘 수용성 추출물에 의한 HUVEC의 혈관신생 진행

과 ERK, Akt 및 eNOS의 기능적 연관 관계를 조사하였다. 紅蔘 수용성 추출물에 의한 내피세포의 증식과 이동은 wortmannin, PD98059에 의해서 완벽하게 억제되었으나, NMA에 의해서는 부분적으로 억제 되었다(Fig. 6A, B와 C). 그러나 紅蔘 수용성 추출물에 의해 유도된 관형성은 3가지 억제제 각각에 의해서 완벽하게 억제되었다. 이러한 연구결과는 紅蔘 수용성 추출물에 의해 유도된 혈관신생 과정은 혈관신생 과정에서 중요한 신호전달 물질로 알려진 PI3K/Akt 의존적인 ERK와 eNOS의 활성을 필요로 한다는 것을 의미한다.

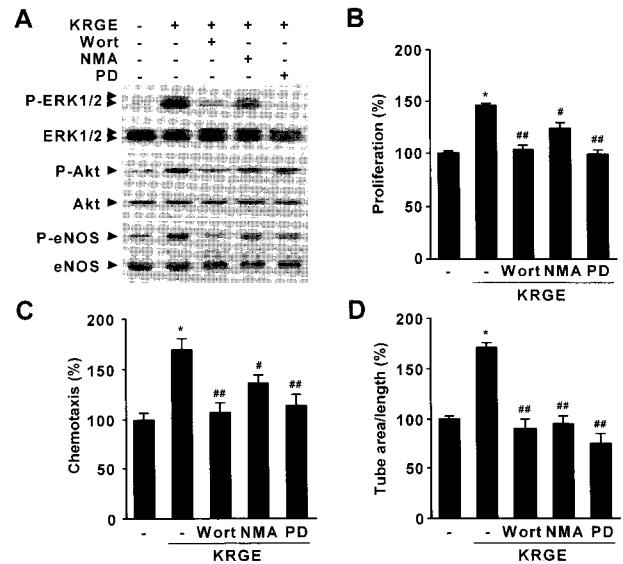


Fig. 6. KRG E induces angiogenesis through the activation of PI3K/Akt/eNOS/ ERK1/2 in HUVECs. (A) The effects of various signaling blockers on KRG E-induced ERK1/2 activation. HUVECs were pretreated for 30 min with or without 50 nM wortmannin (Wort), 1 mM NMA, or 10 M PD98059 (PD) prior to treatment with 1000 μg/ml KRG E for ERK1/2 activation. (B) KRG E-induced HUVEC proliferation, (C) migration, and (D) tube formation of HUVECs was determined in the absence and presence of wortmannin, NMA, or PD98059. Results are expressed as percentage ± SE from three different experiments with triplicate. *, p<0.01 vs. control; #, p<0.05 vs. KRG E; ##<0.01 vs. KRG E.

고찰

人蔘의 기원은 강장, 면역조절, 항암, 순응, 그리고 노화방지 등과 같은 광범위한 의학 효과의 전통적인 동양의 약용 식물로 사용 되어왔다. 人蔘에서 주된 활성을 갖는 성분은 ginsenosides이며, 현재 40 여종의 분리 되었으며 이들은 각각의 다른 약리 효과를 나타내고 있다³⁴⁻³⁷. 人蔘에는 Rg3, Rg5, 그리고 Rh2와 같은 고농도의 ginsenosides가 있어 더 높은 약리 효과를 나타낸다는 보고들이 있다³⁸.

한의학에서 生肌作用은 새로운 육아조직을 형성한다는 용어로서 혈관신생과 깊은 연관성이 있다. 紅蔘이 주약으로 포함된 生肌作用에 관련된 東醫寶鑑 처방은 內托散, 內托千金散, 十宣散, 托裏黃芪湯, 加味十全湯, 聖愈湯, 托裏消毒散, 托裏和中湯, 五味子湯, 人蔘黃芪湯, 止痛當歸湯, 內固清心散, 牡丹散, 十六味流氣飲, 五香白朮散, 托裏散 등이 있으며³⁹⁻⁴⁴, 方藥合編에도 補氣生血湯, 滋腎保元湯 등의 처방이 수록되어 있다⁴⁵. 그러므로 人蔘

은 새로운 육아 조직 형성의 촉진이나 혈관신생에 밀접한 연관성이 있는 것으로 추정되어 본 실험에 착수 하였다.

人蔘은 가공방법에 따라 크게 紅蔘과 白蔘으로 분류된다. 원래 紅蔘의 가공은 장기보존의 목적에서 유래되었다. 한방생약의 전통적 제약기술인 수침법에 대한 과학적 해명연구의 진보에 따라 수침 생약으로서 紅蔘과 白蔘의 차별성이 점차 밝혀지고 있다. 紅蔘은 水蔘(수분 약 75%)이나 白蔘(수삼을 그대로 건조: 수분 약 12%)과는 다르게 일정한 온도조건하에서 수증기로 찌서 건조 가공한 것이다. 紅蔘과 白蔘은 공통성분도 있지만 紅蔘은 수증기로 人蔘을 찌 때 열처리가 가해짐으로 제조과정 중 화학성분의 변화가 일어나 水蔘이나 白蔘에 존재하지 않는 일부 새로운 약효성분들이 생성된다(Table 1). 예를 들어 백삼의 경우에는 24종의 ginsenoside가 포함되어 있으나, 홍삼의 경우에는 32종의 ginsenoside 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 韓藥材로서의 紅蔘과 白蔘은 그 사용 방법에 공통점이 많지만 효력은 紅蔘이 白蔘보다 우수한 것으로 인식되고 있다. 人蔘은 예로부터 補氣, 慈陰, 益血, 生津 등 허증을 치료하는 이른바 強壯, 強心, 健胃, 鎮靜 등을 목적으로 사용되어 왔다. 이들의 효능은 紅蔘과 白蔘간에 엄격히 구별되는 것은 아니지만, 虛를 補하는 효능은 白蔘보다 紅蔘이 강한 것으로 인식되고 있다. 따라서 紅蔘은 노화억제효과와 관련된 항산화 활성을 비롯해서 혈액순환개선 효과, 항암활성 증대 효과, 암발생 억제, 동물성장 발육 증진 등의 우수한 약리적 효능이 있는 것으로 보고 되고있다.

Table 1. 紅蔘과 白蔘의 사포닌 성분비교

공통함유 ginsenosides(18종)	백삼특유 ginsenosides(6종)	홍삼 ginsenosides(14종)
ginsenoside-Ro,	malonylginsenoside-Rb1	ginsenoside-Rh2
ginsenoside-Ra1	malonylginsenoside-Rb2	ginsenoside-Rf2
ginsenoside-Ra2	malonylginsenoside-Rc	ginsenoside-Rs1
ginsenoside-Ra3	malonylginsenoside-Rd	ginsenoside-Rs2
ginsenoside-Rb1	koryoginsenoside-R1	ginsenoside-Rs3
ginsenoside-Rb2	koryoginsenoside-R2	ginsenoside-Rs4
ginsenoside-Rb3		20(S)-ginsenoside-Rg3
ginsenoside-Rc		20(R)-ginsenoside-Rg2
ginsenoside-Rd		20(R)-ginsenoside-Rh1
ginsenoside-Re		notoginsenoside-R4
ginsenoside-Rf		ginsenoside-Rh4
ginsenoside-Rg1		ginsenoside-Rg5
ginsenoside-Rg2		ginsenoside-Rg6
ginsenoside-Rg3		ginsenoside-F4
ginsenoside-Rh1		
quinquenoside-R1		
notoginsenoside-R1		
20-gluco-ginsenoside-Rf		

人蔘을 가공하여 제조한 紅蔘의 전체 추출물은 심장혈관 질환과 류마티스 관절염 그리고 진성 당뇨병^{15,16)}을 포함한 다양한 질병 치료를 위한 복합적인 약리 효능을 가지고 있다. 특히 최근에는 紅蔘의 추출물 혹은 효능성분들이 혈관신생에 대하여 상반된 효능(혈관신생 촉진 및 억제 효능)이 있음이 보고된 바 있다^{15,16)}. 따라서 혈관신생에 대한 紅蔘의 효능이 아직까지 명백하게 밝혀져 있지는 못하다. 본 실험에서는 HUVEC의 배양 조건에서 紅蔘 수용성 추출물의 혈관신생 효과에 대해서 알아보고자 하였다.

본 연구는 6년생 人蔘으로 제조한 紅蔘의 수용성 추출물을 이용하여 *in vitro*와 *in vivo* 조건에서 혈관신생에 미치는 효과 및

신호전달 기전을 연구한 것이다. 그 결과 紅蔘 수용성 추출물은 *in vitro* 조건에서 VEGF mRNA 발현의 영향 없이 혈관내피세포를 직접적인 자극하여 혈관신생을 유도하였다. 또한 紅蔘 수용성 추출물에 의해 유도된 혈관신생은 ERK1/2, Akt 그리고 eNOS의 인산화뿐만 아니라 혈관내피세포에서 NO의 생성 증가를 수반하였다(Fig. 7). PI3K 억제제 wortmannin, MEK 억제제 PD98059, 그리고 eNOS 억제제 NMA와 같은 약리학적 특이성을 갖는 억제제들은 紅蔘 수용성 추출물의 혈관신생 활성을 억제하였다. 이와 같은 결과들은 Akt, ERK1/2, 그리고 eNOS의 활성은 紅蔘 수용성 추출물에 의해 유도된 혈관신생에서 기능적으로 중요한 역할을 하고 있음을 암시한다.

紅蔘 수용성 추출물은 혈관내피세포에서의 증식, 이동, 및 관형성을 촉진하였으며 *in vivo* 조건에서 혈관신생 유도하였다(Fig. 1 & 2). 혈관신생은 허혈성 질환, 조직 재생, 상처 치유, 그리고 심혈관 질환에 있어서 중요한 역할을 하고 있으며,^{10,46,47)} 이는 혈관신생 유도인자 혹은 촉진제들이 몇몇 질환의 치료약물로서 사용될 수 있음을 의미한다. 본 연구 결과들은 紅蔘 수용성 추출물이 혈관신생과 관련된 몇몇 질환의 새로운 약물 치료제로서 사용이 가능함을 시사하고 있다.

혈관신생은 다양한 신호전달체계 사이에서, 특히 ERK와 PI3K/Akt 신호전달 기전과 관련되어, 상호교환 및 협동을 필요로 한다. PI3K의 활성화 그 하부 단계의 eNOS는 혈관신생에 매우 중요한 단계로 알려져 있으며^{48,49)}, PI3K/Akt는 내피세포의 이동에서 ERK1/2의 상위 신호전달체계에 있다는 보고가 있다⁴⁶⁾. 이러한 신호전달 경로는 내피세포의 유전자 발현, 생존, 증식, 이동 그리고 관형성에 관련되어 있다^{50,51)}. Akt는 Bad, procaspase-9, IKK, 그리고 forkhead를 포함한 많은 단백질을 인산화 시키지만 특히 eNOS의 Ser1177의 인산화를 촉진하여 세포내의 NO의 양을 증가 시킨다. 본 연구의 결과들로부터 紅蔘 수용성 추출물이 ERK1/2, Akt, 그리고 eNOS의 인산화 의존적인 활성 증가를 통하여 NO의 양을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). PI3K 억제제인 wortmannin을 처리하면 紅蔘 수용성 추출물에 의해 유도된 Akt, ERK1/2, 그리고 eNOS의 인산화를 완벽하게 억제하였고, MEK 억제제인 PD98059를 처리하면 Akt와 eNOS의 인산화에는 아무런 영향 없이 단지 ERK1/2 인산화만을 억제하였다(Fig. 6). 이와 같은 결과들은 PI3K/Akt가 상위 신호전달체계에 있으며 MEK/ERK1/2와 eNOS의 모두를 활성화 시킨다는 것을 암시하고 있다. NMA에 의한 eNOS 활성억제는 ERK1/2 인산화를 부분적으로 억제하였고, eNOS에 의한 NO 생성은 아마도 cGMP-dependent protein kinase (PKG)에 의해서 ERK1/2 인산화를 조절하는 것으로 보인다. NO는 soluble guanylate cyclase를 활성화 시켜서 세포내 cGMP 농도를 증가 시킨다. 결과적으로 PKG가 활성화 되고 PKG 활성은 p38의 활성을 통하여 ERK1/2를 활성화 시킨다⁵²⁾. 이러한 결과들로부터 紅蔘 수용성 추출물은 주된 신호전달 물질인 PI3K/Akt, MEK/ERK1/2, 그리고 eNOS/NO들 사이의 연속적인 활성화 상호관계를 통하여 PI3K/Akt 의존적인 MEK/ERK1/2 그리고 eNOS/NO 신호전달 경로를 활성화 시킨다는 것을 확인할 수 있다(Fig. 7).

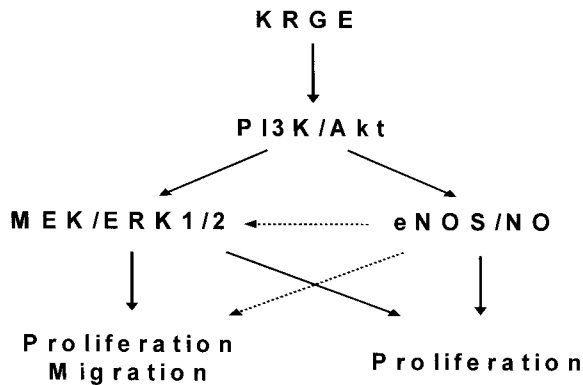


Fig. 7. Summary of KRG E-induced angiogenesis signaling pathway in HUVECs

ERK1/2와 eNOS의 활성화는 실질적으로 *in vitro*와 *in vivo* 조건에서 혈관신생에 깊이 관련되어 있다. 본 연구 결과에서는 혈관내피세포에서 紅蔘 수용성 추출물에 의한 세포증식, 이동, 관형성이 증가되었으며, 이는 PI3K와 MEK의 활성화 억제에 의하여 완벽하게 억제되었다. NOS저해제인 NMA에 의해서는 紅蔘 수용성 추출물에 의해 유도되는 세포 증식과 이동이 부분적으로 억제되었으나 관형성은 완벽하게 억제되었다(Fig. 6). 이러한 결과들은 PI3K/Akt 의존적인 MEK1/2의 활성이 紅蔘 수용성 추출물을 처리한 HUVEC에서 증식, 이동 및 관형성을 위한 신호전달 경로에 중요한 역할을 하고 있음을 강력하게 시사하고 있다. 더욱이 PI3K/Akt에 의한 eNOS/NO 경로의 활성화는 관형성에 매우 중요한 역할을 하고 부분적으로는 紅蔘 수용성 추출물이 처리된 혈관내피세포에서 증식과 이동에 관여하고 있다. 모세혈관과 같은 관형성의 과정은 *in vitro* 조건의 혈관신생에서 마지막 단계인 것으로 잘 알려져 있다. 또한 다양한 성장인자에 의한 혈관신생의 중간물질 중 NO는 매우 강력한 성장인자이며⁵³⁾, cGMP 의존적인 과정에서 모세관 형태분화를 증진한다⁵⁴⁾. 이러한 결과들은 紅蔘 수용성 추출물이 PI3K/Akt 의존적인 ERK1/2와 eNOS 신호전달을 상호교류 함으로써 이루어진다고 할 수 있다.

분명하지는 않으나 人蔘으로부터 분리한 순수한 ginsenosid e인 Rg1과 Rb1은 각각 혈관신생을 촉진하거나 억제하는 것과 같은 혈관신생의 반대되는 효과를 나타낸다고 보고된 바가 있다²⁴⁾. eNOS/NO 경로의 활성을 통하여 혈관신생 활성을 타나내는 Rg1과 혈관신생 초기 단계인 내피세포의 이동을 억제하는 Rb1 등이 약리학적 억제제를 사용하여 밝혀졌다. 그러나 본 연구에서는 紅蔘 수용성 추출물이 MEK/ERK1/2와 eNOS/NO 경로 모두의 활성을 유도하였으며, 紅蔘 수용성 추출물에 의한 혈관신생에서 eNOS 활성 보다는 ERK1/2의 활성이 중요하다는 것을 확인하였다. 이 밖에도 Sengupta²⁴⁾ 등이 밝힌 바와 같이 생쥐 모델에서는 Rb1보다 Rg1의 혼합비율이 더 많은 경우에는 혈관신생이 유도되었으나 Rb1이 더 많은 경우에는 억제되는 현상이 나타났다. 이러한 것은 천연물 혹은 紅蔘 수용성 추출물을 포함한 성분 중 한방제제의 혈관형성 증진인자와 억제인자의 비율이 혈관신생의 능력을 좌우할 수 있다는 점을 제시한다. 본 연구의 결과를 기초로 하여 볼 때 紅蔘 수용성 추출물의 성분 중에는 혈관형성의 증

진을 유도하는 인자들이 많이 존재하고 이를 통해 심혈관 질환 및 혈관 신생에 있어 紅蔘 수용성 추출물은 유용한 치료제로서 사용될 가능성을 보여주고 있다.

본 실험에서는 紅蔘 수용성 추출물은 PI3K/Akt 의존적인 ERK1/2와 eNOS의 활성을 통해 혈관신생을 유도하고 배양된 혈관내피세포 및 *in vivo* 조건에서 신호전달을 상호 교류한다는 것을 알아내었다. 또한 紅蔘 수용성 추출물이 심혈관 질환, 허혈성 질환, 조직 재생, 및 상처치유에 있어서 새로운 천연물 유래 치료제로서의 가능성을 제시하였다.

결론

紅蔘 수용성 추출물이 인간 태줄의 정맥으로부터 분리한 혈관내피세포 (HUVECs)의 이동, 증식 그리고 관형성 등의 조절을 통한 혈관신생 효능과 이러한 효능과 관련된 세포내 신호전달 경로에 대해서 *in vitro*와 *in vivo* 조건에서 다음과 같은 연구결과를 얻었다.

紅蔘 수용성 추출물이 혈관내피세포의 증식, 이동 그리고 관형성을 효과적으로 유도하였다. 紅蔘 수용성 추출물이 *ex vivo* 및 *in vivo* 조건에서 혈관신생을 유의성 있게 증가 시켰다. 紅蔘 수용성 추출물이 혈관내피세포에서 VEGF의 발현에 영향이 없이 혈관신생을 유도하였다. 혈관내피세포에서 紅蔘 수용성 추출물은 ERK, Akt 그리고 eNOS를 활성화 시켰다. 紅蔘 수용성 추출물에 의해 유도된 혈관신생은 PI3K/Akt 의존적인 MEK/ERK와 eNOS/NO 신호전달 기전을 통하여 이루어진다.

이와 같은 결과는 紅蔘 수용성 추출물이 혈관의 기능을 향상시키고 혈관신생을 촉진하는 한편, 그 작용기전은 PI3K/Akt의 활성화를 통한 MEK/ERK와 eNOS/NO의 활성화에 의존함을 증명하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27-31, 1995.
2. Jackson, J.R., Seed, M.P., Kircher, C.H., Willoughby, D.A. and Winkler, J.D. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 11: 457-465, 1997.
3. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, 1997.
4. Emanuelli, C. and Madeddu, P. Changing the logic of therapeutic angiogenesis for ischemic disease. *Trends Mol Med* 11: 207-216, 2005.
5. Khurana, R., Simons, M., Martin, J.F. and Zachary, I.C. Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal. *Circulation* 112: 1813-1824, 2005.
6. Timar, J., Dome, B., Fazekas, K., Janovics, A. and Paku, S. Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. *Pathol Oncol Res* 7: 85-94, 2001.

7. Griffith, L.G. and Naughton, G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science* 295: 1009-1014, 2002.
8. Smith, M.K., Peters, M.C., Richardson, T.P., Garbern, J.C. and Mooney, D.J. Locally enhanced angiogenesis promotes transplanted cell survival. *Tissue Eng* 10: 63-71, 2004.
9. Nomi, M., Atala, A., Coppi, P.D. and Soker, S. Principals of neovascularization for tissue engineering. *Mol Aspects Med* 23: 463-483, 2002.
10. Simons, M. and Ware, J.A. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2: 863-871, 2003.
11. Zisch, A.H., Lutolf, M.P., Ehrbar, M., Raeber, G.P., Rizzi, S.C., Davies, N., Schmokel, H., Bezuidenhout, D., Djonov, V., Zilla, P. and Hubbell, J.A. Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB J* 17: 2260-2262, 2003.
12. Attele, A.S., Wu, J.A. and Yuan, C.S. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol* 58: 1685-1693, 1999.
13. Shibata, S. Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. *J Korean Med Sci* 16: S28-37, 2001.
14. Tachikawa, E., Kudo, K., Harada, K., Kashimoto, T., Miyate, Y., Kakizaki, A. and Takahashi, E. Effects of ginseng saponins on responses induced by various receptor stimuli. *Eur J Pharmacol* 369: 23-32, 1999.
15. Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H., Nishino, H., Duc, N. M., Kasai, R. and Yamasaki, K. Anti-tumor-promoting activity of ginsenoside-R2 from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. (I). *Biol Pharm Bull* 21: 834-838, 1998.
16. Morisaki, N., Watanabe, S., Tezuka, M., Zenibayashi, M., Shiina, R., Koyama, N., Kanzaki, T. and Saito, Y. Mechanism of angiogenic effects of saponin from ginseng *Radix rubra* in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol* 115: 1188-1193, 1995.
17. 강병수외. *本草學*. 서울, 영림사, p 531, 532, 1991.
18. 신민교. *臨床本草學*. 서울, 영림출판사, p 166, 1989.
19. 신민교외. *漢藥臨床應用*. 서울, 정보사 pp 308-311, 1986.
20. 김정수. *本草學*. 서울, 진명출판사, p 300, 1975.
21. 신길구. *申氏本草學*. 서울, 수문사, pp 2-8, 1982.
22. 신천호. *問答式本草學*. 서울, 영신문화사, p 343, 344, 1992.
23. 趙大衍. *東醫寶鑑에 收錄된 紅蔘이 主藥으로 配伍된 方劑의 活用범위, 病証, 主治, 病理 및 構成內容 調査*. 원광대학교대학원 2002.
24. Sengupta, S., Toh, S.A., Sellers, L.A., Skepper, J.N., Koolwijk, P., Leung, H.W., Yeung, H.W., Wong, R.N., Sasisekharan, R. and Fan, T.P. Modulating angiogenesis: the yin and the yang in ginseng. *Circulation* 110: 1219-1225, 2004.
25. Sato, K., Mochizuki, M., Saiki, I., Yoo, Y.C., Samukawa, K. and Azuma, I. Inhibition of tumor angiogenesis and metastasis by a saponin of *Panax ginseng*, ginsenoside-Rb2. *Biol Pharm Bull* 17: 635-639, 1994.
26. Groskopf, J.C., Syu, L.J., Saltiel, A.R. and Linzer, D.I. Proliferin induces endothelial cell chemotaxis through a G protein-coupled, mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 138: 2835-2840, 1997.
27. Kuzuya, M., Satake, S., Ramos, M.A., Kanda, S., Koike, T., Yoshino, K., Ikeda, S. and Iguchi, A. Induction of apoptotic cell death in vascular endothelial cells cultured in three-dimensional collagen lattice. *Exp Cell Res* 248: 498-508, 1999.
28. Lee, O.H., Kim, Y.M., Lee, Y.M., Moon, E.J., Lee, D.J., Kim, J.H., Kim, K.W. and Kwon, Y.G. Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 743-750, 1999.
29. Yu, Y. and Sato, J.D. MAP kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and p70 S6 kinase mediate the mitogenic response of human endothelial cells to vascular endothelial growth factor. *J Cell Physiol* 178: 235-246, 1999.
30. Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. and Minick, C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-2756, 1973.
31. Kim, Y.M., Hwang, S., Kim, Y.M., Pyun, B.J., Kim, T.Y., Lee, S.T., Gho, Y.S. and Kwon, Y.G. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem* 277: 27872-27879, 2002.
32. Nicosia, R.F. and Ottinetti, A. Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *In Vitro Cell Dev Biol* 26: 119-128, 1990.
33. Bussolino, F., Mantovani, A. and Persico, G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci* 22: 251-256, 1997.
34. Cheng, Y., Shen, L.H. and Zhang, J.T. Anti-amnestic and anti-aging effects of ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action. *Acta Pharmacol Sin* 26: 143-149, 2005.
35. Jung, J.D., Park, H.W., Hahn, Y., Hur, C.G., In, D.S., Chung, H.J., Liu, J.R. and Choi, D.W. Discovery of genes for ginsenoside biosynthesis by analysis of ginseng

- expressed sequence tags. *Plant Cell Rep* 22: 224-230, 2003.
36. Kaiser, M., Younge, B., Bjornsson, J., Goronzy, J.J. and Weyand, C.M. Formation of new vasa vasorum in vasculitis. Production of angiogenic cytokines by multinucleated giant cells. *Am J Pathol* 155: 765-774, 1999.
 37. Nam, M.H., Kim, S.I., Liu, J.R., Yang, D.C., Lim, Y.P., Kwon, K.H., Yoo, J.S. and Park, Y.M. Proteomic analysis of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 815: 147-155, 2005.
 38. Yun, T.K., Lee, Y.S., Lee, Y.H., Kim, S.I. and Yun, H.Y. Anticarcinogenic effect of *Panax ginseng* C.A. Meyer and identification of active compounds. *J Korean Med Sci* 16: S6-18, 2001.
 39. 龔信. 古今醫鑑. 江西, 江西科學技術出版社, p 399, 1990.
 40. 朱震亨. 丹溪心法. 서울, 杏林書院, p 392, 1965.
 41. 李梴. 醫學入門. 서울, 法仁文化社, p 670, 674, 686, 724, 2006.
 42. 陳柱杓. 金元四大家 醫學全書(上). 서울, 法仁文化社, p 793, 855, 2007.
 43. 龔延賢. 萬病回春. 서울, 醫聖堂, p 58, 703, 1993.
 44. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 法仁文化社, p 1415, 1417, 1418, 1425, 1426, 1434, 1435, 1436, 1439, 1454, 1455, 2002.
 45. 黃度淵. 方藥合編. 서울, 南山堂, p 224, 255, 2001.
 46. Roy, H., Bhardwaj, S. and Yla-Herttuala, S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 580: 2879-2887, 2006.
 47. Wiegand, K.A., Capitosti, S.M., Anderson, C.R., Price, R.J., Blackman, B.R., Brown, M.L. and Botchwey, E.A. Small molecule inducers of angiogenesis for tissue engineering. *Tissue Eng* 12: 1903-1913, 2006.
 48. Goetze, S., Bungenstock, A., Czupalla, C., Eilers, F., Stawowy, P., Kintscher, U., Spencer-Hansch, C., Graf, K., Nummer, B., Law, R.E. Leptin induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPARgamma-ligands. *Hypertension* 40: 748-754, 2002.
 49. Qiao, M., Shapiro, P., Kumar, R. and Passaniti, A. Insulin-like growth factor-1 regulates endogenous RUNX2 activity in endothelial cells through a phosphatidylinositol 3-kinase/ERK-dependent and Akt-independent signaling pathway. *J Biol Chem* 279: 42709-42718, 2004.
 50. Reddy, K.B., Nabha, S.M. and Atanaskova, N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 22: 395-403, 2003.
 51. Zachary, I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* 31: 1171-1177, 2003.
 52. Li, Z., Zhang, G., Feil, R., Han, J. and Du, X. Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin alphaIIb beta3. *Blood* 107: 965-972, 2006.
 53. Babaei, S., Teichert-Kuliszewska, K., Monge, J.C., Mohamed, F., Bendeck, M.P. and Stewart, D.J. Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 82: 1007-1015, 1998.
 54. Bussolati, B., Dunk, C., Grohman, M., Kontos, C.D., Mason, J. and Ahmed, A. Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am J Pathol* 159: 993-1008, 2001.