

신생혈관형성억제작용을 기반으로 한 항비만제제의 선별 및 작용기전

신진혁¹ · 이진희² · 강경완² · 황재호² · 한경호² · 신태선^{3,5} · 김민용^{4,5} · 김종덕^{1,5*}

¹생명화학공학과, ²생명산업공학과, ³해양기술학부 양식생물학전공, ⁴영양식품학전공, ⁵냉동공학과, ⁶전남대학교 항비만·건강연구소

Selection and Mechanism of Anti-Obesity Agents from Natural Products Based on Anti-Angiogenesis

Jin Hyuk SHIN¹, Jin Hee LEE², Kyeong Wan KANG², Jae Ho Hwang², Kyeong Ho HAN²,
Tai Sun SHIN^{3,5}, Min Yong KIM^{4,5}, and Jong Deog KIM^{1,5*}

¹Department of Biotechnology, ²Dept. of Culture Biotechnology, ³Food Science and Nutrition, ⁴Dept. of Refrigeration Eng., Chonnam National University, San 96-1, Dun-Duk Dong, Yosu, Chonnam, 550-749, Korea., ⁵Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yosu, Chonnam, 550-749, Korea.

Abstract Anti-angiogenic mechanism was examined for anti-obesity agents with the extract of *P.radix*, *P.semen*, *S.hebra* and *C.furctus* through anti-cell adhesion effect and western blot. Cell adhesion molecules, VCAM-1 was suppressed with the order of *P.radix* (0.2 ppm, 125%) > *P.semen* (0.5 ppm, 100%) > *S.hebra* (5.0 ppm, 114%) > *C.furctus* (5.0 ppm, 111.8%), ICAM-1 was inhibited by *P.radix* (0.25 ppm, 130%) > *P.semen* (0.5 ppm, 100%) > *S.hebra* (5.0 ppm, 138%) > *C.furctus* (5.0 ppm, 66.7%), E-Selectin was also suppressed *P.radix* (0.25 ppm, 100%) > *P.semen* (1.0 ppm, 128%) > *S.hebra* (5.0 ppm, 120%) > *C.furctus* (5.0 ppm, 100.7%). And signal molecules, VE-cadherin was suppressed by *P.radix* and *S.hebra*, β -catenin was inhibited by *P.radix*, and Akt was suppressed all these 4 kinds of natural products. These *P.radix*, *P.semen*, *S.hebra* and *C.furctus* were showed the possibility of anti-obesity agents based on anti-angiogenesis.

Keywords: Anti-angiogenesis, anti-obesity, cell adhesion molecule, signal molecule, natural products

서 론

비만은 '건강을 해칠 정도로 체내 지방이 과도하게 축적된 상태'로 정의할 수 있으며(1, 2), 고혈압, 동맥경화증, 관상동맥질환, 제2형 당뇨병, 지방간, 고지혈증, 퇴행성관절염, 일부 암질환 등 다양한 만성퇴행성 질환들의 원인(2)으로 작용하여 사망률과 이환율을 증가시킬 뿐 아니라 사회적, 정신적으로도 장애를 일으키는 원인인 것이 밝혀지면서 반드시 치료되어야 하는 '만성질환'이라는 인식이 확립되고 있다. 세계보건기구 (WHO)에 따르면, 현재 전 세계적으로 과체중 혹은 비만에 해당되는 사람들의 숫자

는 12억 명에 이르며 미국의 경우 2000년 현재 성인 인구의 약65%가 과체중에 해당된다고 한다(3, 4). 또한 미국의 경우 매년 약 30만 명이 비만과 관련된 질환으로 사망한다고 보고되고 있으며(5), 전 세계 당뇨병 환자의 80%, 심장 질환의 21%가 비만이 원인인 것으로 알려져 있다. 소아비만은 우리나라 성인인구의 비만 비율을 좌우하게 되는데 최근 3년 사이에 초등학교 비만 비율은 2배 정도 증가해, 선진국에서 문제가 되었던 '비만 문제'가 우리나라에서도 심각하게 대두되기 시작하였다(보건복지부, 2005). 현재까지의 비만 치료제의 기전은 식욕을 억제시키는 제제 (fenfluramine, sibutramine) 종류, 지방의 대사를 촉진 시키거나 lipogenesis를 억제하거나 대사활성을 증가시키는 제제 (ephedrine, orlistat)등을 들수 있다. 그러나 이런 약물들은 그 부작용 또한 많고 습관성의 문제도 대두되고 있다(6).

*Corresponding author

Tel: +82-61-659-3305, Fax: +82-61-659-3305
e-mail: pasteur@chonnam.ac.kr

비만을 해결하기 위해서 본 연구팀은 신생혈관형성 저해 작용을 있는 물질들로부터 항비만을 해결하려고하며 그 방법을 제시하려고 한다. 형성된 기존의 혈관총에서 새로운 혈관이 생성되는 일련의 과정을 신생혈관형성이라 하며(7), 암세포의 성장과 전이, 류머티즘 관절염 및 당뇨병 실명증, 비만 등의 여러 질병에서도 필수적으로 요구되는 것으로 알려져 있다(8-9). 신생혈관 촉진인자는 현재까지 20가지 이상이 알려졌으며, 그중 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 많은 종류의 종양세포에서 분비되며, 동시에 가장 강력한 혈관형성 촉진인자로 알려져 있다(10-12). 지방조직은 지방세포(adipocyte)와 혈관 내피세포(vascular endothelial cell)로 구성되어 있어 조직에 산소와 영양분을 공급하여 성장하게 한다. 지방조직의 맥관 구조는 신생혈관형성(angiogenesis)과 관련이 있는 것으로 나타났으며, 신생혈관은 기존의 혈관으로부터 생성되어 지방조직의 생성(adipogenesis)을 진행시키는 역할을 한다(13). Harvard 대학의 Folkman 등은 거대 지방조직은 angiogenesis inhibitor에 민감한 것을 발견하였고, 비만 조절제로서의 활용가능성을 예고했다(14). 이들은 ob/ob mice의 leptin이 결여된 쥐가 아주 짧은 시간에 지방조직을 거대하게 축적하고, 연속적으로 비만이 형성되는 것을 보고, 지방조직이 신생혈관형성의 의존형이라면 신생혈관형성저해제는 지방조직이 거대조직으로 발달되는 것을 조절할 수 있을 것으로 판단했다(15). 그래서 신생혈관형성저해 물질인 TNF-40, angiostatin, endostatin, Bay-129566, 그리고 thalidomide 등을 투여 했을 때 체중과 지방조직이 현저히 감소하는 것을 알았다. 이런 체중의 감소는 지방거대조직의 감소에 기인되는 것으로 판단하였다. 신생혈관형성억제물질은 내피세포의 증식을 억제하였고, apoptosis도 역시 증가시켰다(16). 이런 효과들은 adipocyte의 존재 하에서는 내피세포의 apoptosis를 경유하여 몸무게를 줄이는 leptin의 효과와 매우 유사하였다. Folkman의 그룹은 체중이 감소되는 과정 중에 기초대사율을 산소의 소모량으로부터 구하였는데 신생혈관형성억제 물질이 기초대사량을 증가 시키고, 에너지 기질이 탄수화물에서 지방산으로 이동되는 것을 알았고, 보통 성체 조직의 지방조직은 신생혈관형성억제 물질에 의하여 조절이 가능함을 제시하였다. 이러한 신생혈관형성억제 물질들은 지방조직의 혈관 질을 변화시켜 지방조직의 퇴화를 가져 오며, 이 결과들은 에너지 대사가 탄수화물에서 지방으로 이동되는 결과로부터 나오며, 이러한 변화가 체중을 줄이는 역할을 한다(17, 18). 즉, 신생혈관형성억제 물질은 지방조직의 저하로부터 체중을 줄일 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 최근 Nishimura(19) 등은 laser confocal microscopy 기술을 통하여 직접적으로 비만 조직에 있어 신생혈관의 형성과 지방세포의 분화는 직접적인 관련이 있는 것을 3차원 화상분석법으로 규명하였다. 지금까지는 adipocyte가 다양한 adipokine (VEGF, Leptin, TNF-a 및 IL-6)을 분비하여 신생혈관 형성을 주도하는 것으로 주장되어 왔다. 그러나, Nishimura 등은 VEGF가 지방조직에서 신생혈관의 형성을

주도하는 것으로 밝혔다. 따라서 신생혈관의 형성을 억제함으로써 비만세포의 분화 및 거대화를 막을 수 있는 이론이 확실한 것으로 나타났다. 신생혈관형성 저해제에 의한 체중의 감소는 방조직의 신생혈관형성을 억제함으로써 시작되는 것으로 보이며, 다음으로는 식욕감소가 따를 것이고, 연료의 이용에 이동이 일어나며, 에너지의 소비를 촉진하게 됨으로써 신생혈관 형성 저해제에 부터의 항비만 제제의 개발은 아주 혁명적이고, 매력적이고, 중요한 부분이라 할 수 있다. 뿐만 아니라 기존의 화학합성 제제는 심각한 부작용을 가지고 있으며 본 실험에서 positive control로서 사용한 기존제제를 ob mouse에 투여 하였을 때 털이 빠지는 현상이 나타났다(Fig. 1). 이에 비교하여 신생혈관형성억제제는 지방세포에 특이성을 가지고 작용함으로써 기존의 약물에 비교하여 독성과 부작용이 적다. 따라서 본 연구에서는 부작용이 적은 천연산물로부터 신생혈관의 형성을 억제하는 물질을 선별하고 이 물질들의 작용기전을 규명하고자한다.

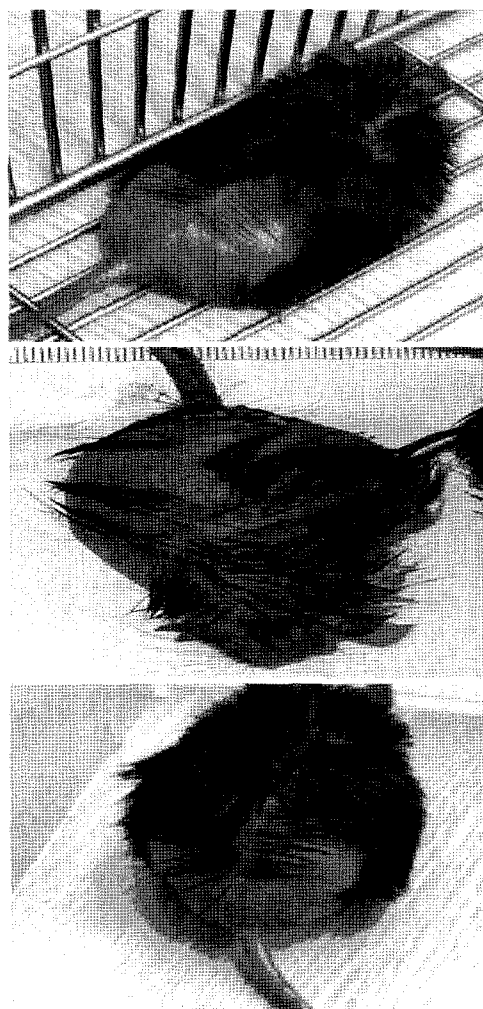


Fig. 1. Pictures of dehairs phenomenon of ob mouse with chemically synthesized anti-obesity drug from market.

재료 및 방법

시료의 추출

시료는 한약 건재당에서 구입한 각각의 재료 600 g에 3000 mL의 ethyl alcohol로 5시간 동안 환류, 추출한 후 증발농축기에서 농축하여 동결건조 한 후 시료로 사용하였다.

세포의 배양

HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells)를 Young Science (Seoul, Korea)에서 분양받아 EBM-2 배지 (Cambrex, Hopkinton, MA, USA)(20, 21)는 hydrocortisone, epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), ascorbic acid, heparin)에 2% fetal bovine serum (FBS)를 넣은 T75 플라스크를 사용하여, 37°C, 5%의 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 또한, 3T3-L1 preadipocyte를 DMEM/10% FBS 배지에서 배양하였으며, 아지방세포의 분화 유도는 아지방세포 (3T3-L1)를 배양 flask 바닥이 완전히 덮히도록 배양시킨 후 2일간 더 배양한 후에 유도배지 (MDI, 0.5 mM 3-isobuty-1-methylxanthine, 0.5 μM dexamethasone, 10 μg/mL insulin)를 넣어 배양하여 아지방세포가 지방세포가 되도록 분화를 유도한 후, 3일째 되는 날 정상적인 DMEM/10% FBS 배지로 교환하고 이후의 배양은 2일에 한 번씩 교환하면서 7-10일 동안 시료를 처리하여 아지방세포의 지방세포로의 분화 시킨 후 사용하였다.

시료의 독성 검사

시료의 독성검사는 MTT법으로 행하였으며, HUVEC 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well 씩 분주하고 confluency에 도달하면 시료를 농도별로 첨가한 후 48시간 배양한 후, 5 ug/ml의 MTT (tetrazolium salt, 혹은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (23, 24)를 50 uL 첨가한 후 37°C incubator에서 4시간 반응시킨다. Formazan으로 전환이 안된 MTT를 포함한 배지를 제거하고 각 well에 200 uL의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 넣어 보라색의 formazan을 10분간 녹인 후 570 nm에서 흡광도 정량였다.

신생혈관형성억제 시험

신생혈관형성억제 시험(20)은 24 well-plate (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ)에 150 μL의 matrigel (Becton/Dikinson, Becton, NJ)을 넣어 고체화시킨 후 각 well당 2.5×10^4 개의 세포를 넣어 세포가 부착한 후 시료를 농도별로 투여하고 3시간 후 tube가 형성되

면 불규칙적으로 5면을 선택하여 digital camera (Nikon, coolpix 4500)를 이용하여 촬영하고 NIH program을 이용하여 형성된 tube의 길이를 측정하여 anti-angiogenesis 효과를 판단하였다.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 법에 의한 세포부착 활성 측정(21)

HUVECs을 96 well에 well당 5×10^3 개의 cell이 되도록 분주하여 2% FBS첨가한 EBM-2배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂-incubator에서 배양하여 최고조에 도달하도록 배양하였다. 추출물의 농도를 200, 100, 50 및 25 μg/well이 되게 첨가하고 20시간 배양한 후, PBS (phosphate buffered saline)로 세척 후 세포부착 인자를 유도하기 위하여 IL-1β (Endogen, Woburn, MA, U.S.A)를 5 ng/mL의 농도로 첨가하여 6시간 동안 반응시켰다. 배지 제거 후 1% paraformaldehyde를 첨가하고 실온에서 30분간 반응시켜 세포를 고정 시켰다. 30분뒤 PBS + 0.5% Tween 20으로 두 번 세척하고, 10% FBS로 1시간 동안 blocking 한 다음, 단일 클론 항체 (ICAM-1, VCAM-1 및 E-Selectin : BD Bioscience, Bedford, MA, U.S.A)를 10% FBS가 첨가된 PBS에 각각 2, 5, 5 μg/mL 씩 녹여 2시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 PBS + 0.5% Tween 20으로 세척하고, secondary anti-body (Donkey anti-mouse IgG-HRP : Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A)를 10% FBS의 PBS에 1000배 희석하여 실온에서 1시간동안 반응 시키고, 발색시약 (western blotting luminol reagent : Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A)을 첨가하고 1시간동안 반응 시킨 후 plate reader (UVM 340, ASYS, Austria)를 사용하여 405 nm에서 측정하였다.

작용기전 규명

신생혈관형성의 작용기전은 HUVEC를 사용하여 western blot(24, 25)으로 확인하였다.

Chemical 처리 및 VEGF 자극

HUVECs을 100 mm petri dish에 1×10^5 으로 접종하여 배양한 후 최고조에 도달하면 시료의 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하여 serum-free EBM-2배지로 세척하고 대조군 및 처리군을 serum을 첨가하지 않은 채 overnight 시킨 후 VEGF (BD Science, Bedford, MA, USA)를 50 ng/mL가 되게 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. phosphorylation을 방지하기위하여 세포를 용해시키기 전 7분간 vanadate (100 uM)과 hydrogenperoxide (200 uM)을 첨가하였다. 그 후 세포를 즉시 냉각시킨 PBS + 0.1 mM Na₃VO₄로 세척하고 냉각시킨 lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Triton

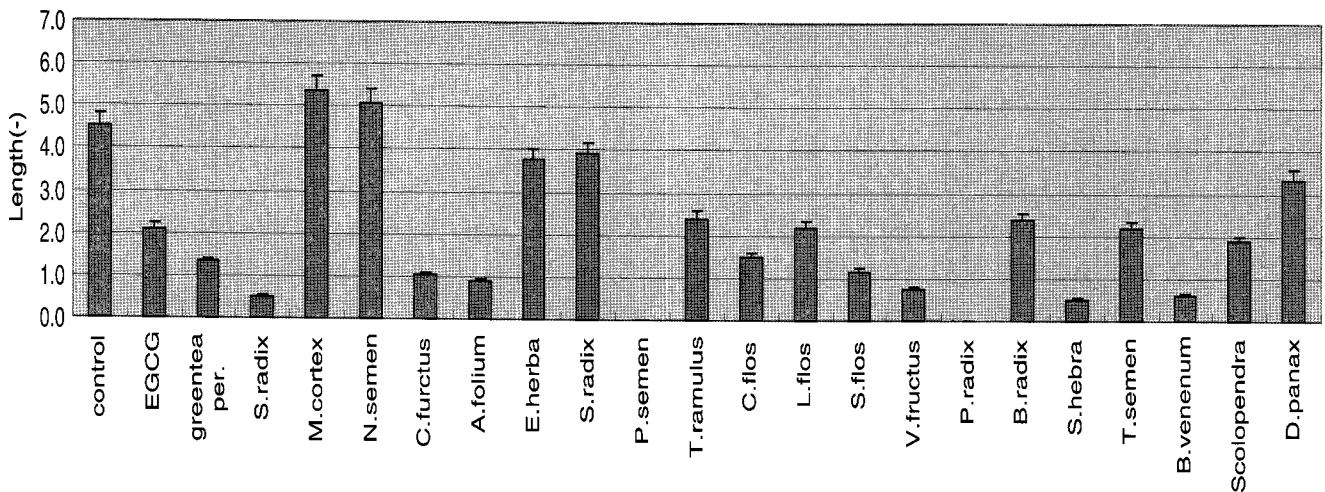


Fig. 2. Anti-angiogenesis effect of regional natural products.

X-100, 1 mM vanadate, 1 mM EDTA, 1 mM FGTA, 0.2 mM PMSF, 0.5% NP-40)를 첨가하고 20분간 4°C에서 반응 시키고, scrapper로써 세포를 회수하여 micro endpdrof tube로 옮겨서 4°C, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 단백질은 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, U.S.A)을 사용하여 농도를 구한 후 VE-Cadherin antibody (BD Bioscience, Bedford, MA, U.S.A)를 사용해 immunoprecipitation (IP)을 실시하였다.

IP는 500 µl의 IP buffer (0.2 mM sodium vanadate 첨가)를 넣고 단백질 50 µg과 10 µl의 적절한 antibody를 첨가하고 total양을 1 mL이 되도록 H₂O를 첨가하여 vortex한 후 4°C에서 12 시간동안 반응시켰다. 반응 후 20 µl의 Protein A/G-agarose (Amersham Science, Uppsia, Sweden)를 첨가한 후 4°C에서 30분간 반응, 반응 후 14,000 rpm에서 3분간 4°C에서 원심분리하여 상등액을 제거한 후 IP washing buffer 500 µl를 사용하여 세척 후 원심분리 하였다. 상등액을 제거하고 50 µl의 4 × Laemmli sample loading buffer를 첨가하여 95°C에서 5분간 끓인 후 sample을 7.5% SDS-PAGE gel로 전기영동후에 0.2 um nitrocellulose membrane (Bio-Rad Lab. Hercules, CA, USA)막으로 전이시켰다.

Protein 확인

Ponceau-S (Markham, Ontario, Canada) 시약으로 단백질을 확인하고 5%-NFDM (non-fat dry milk)로 실온에서 1시간 동안 blocking을 실시한 후 VEGFR2, PI3K, β-catenin, VE-cadherin (BD Bioscience, Bedford, MA, U.S.A)등의 primary antibodies를 각각 처리한 후, secondary antibody인 donkey goat HRP를 1:7000의 비율로 반응시킨 후 형광물질인 ECL (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruze, CA, U.S.A)을 이용해 film에 감광시키고 현상하였다. stripping은 50°C에서 5분간 행한 후 blocking을 실시하였다.

결과 및 고찰

신생혈관 형성 억제효과

다양한 천연산물의 추출물을 10 ppm으로 하여 신생혈관 형성억제 작용을 대조군과 positive control로서의 EGCG와 비교하였을 때, EGCG보다 신생혈관 형성억제능력이 나은 천연산물을 선별할 수 있었으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

전남지역에서 비교적 쉽게 구할 수 있는 천연산물을 사용하였으며, 녹차과피 (greentea per.)는 여수, 순천, 보성에서, 황금 (*S.radix*)은 여수에서, 상백피 (*M.cortex*)는 무안에서, 연자육 (*N.semen*)은 목포에서, 산수유 (*C.furctus*)는 산동에서, 애엽 (*A.folium*)은 거문도에서, 음양곽 (*E.herba*)은 약산에서, 상기생 (*T.ramulus*)은 지리산에서, 황칠 (*D.panax*)은 해남에서, 그리고 고삼 (*S.radix*), 파고지 (*P.semen*), 홍화 (*C.flos*), 금은화 (*L.flos*), 괴화 (*S.flos*), 전호 (*P.radix*), 시호 (*B.radix*), 회침 (*S.hebra*), 백자인 (*T.semen*), 지네 (*Scolopendra*)등은 주산지가 전남은 아니나 그 효과를 기대할 수 있는 물질이어서 선택한 천연산물들이다. 이 중 신생혈관형성억제제로 널리 알려져 있는 EGCG보다도 제어 효과가 나은 것을 선별하여 사용하였으며, 녹차과피, 황금, 산수유, 애엽, 파고지, 홍화, 괴화, 전호, 회침등이 좋은 효과를 나타내고 있으며, 이 천연산물들 중에서 효과가 가장 좋다고 판단되는 전호, 파고지, 회침 및 산수유를 중심으로 그 기전을 밝히고자 하였다.

독성시험

독성시험은 HUVEC를 사용하여 MTT방법으로 측정하였으며, 전호는 0.3 ppm에서 약간의 독성을 나타내었고, 파고지는 10 ppm까지는 독성을 나타내지 않았고, 회침 및 산수유는 25 ppm까지 독성을 나타내지 않았고, 독성을 나타내지 않는 범위에서 실험을 수행하였으며, 그 결

과를 Fig. 3에 나타내었다.

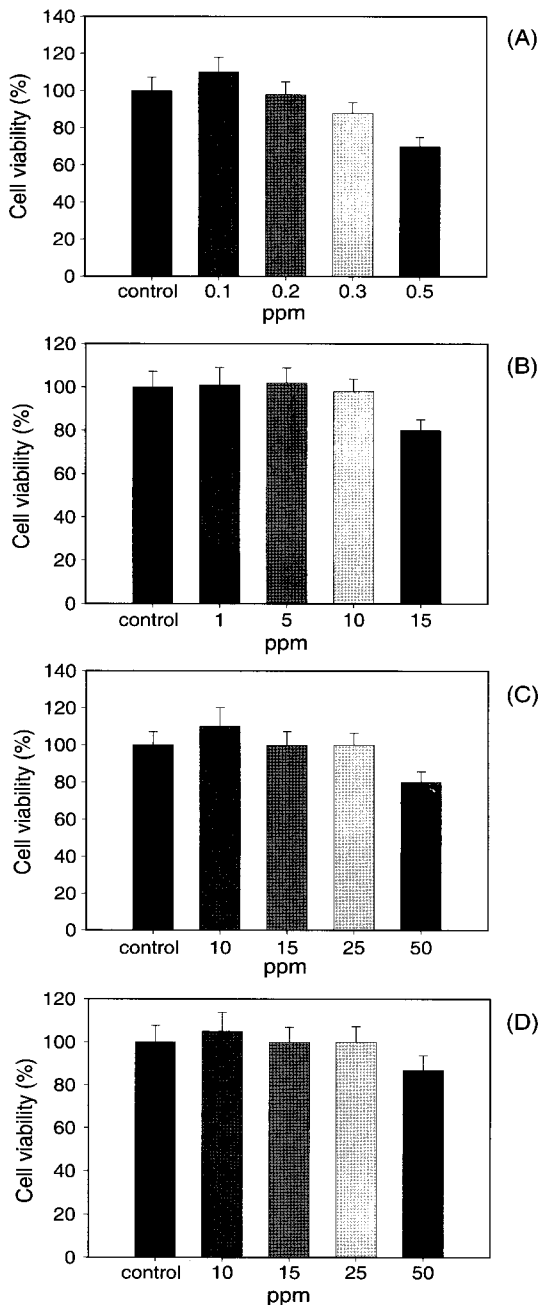


Fig. 3. Cytotoxic effect against HUVECs of *P.radix* (A), *P.semen* (B), *S.hebra* (C) and *C.furctus* (D).

ELISA법에 의한 세포부착 억제작용

세포부착억제작용은 신생혈관의 형성에 중요한 역할을 하기 때문에 세포부착억제 작용의 정도를 ELISA 방법으로 살펴보았다. 각 각의 천연산물에 대하여 cell adhesion 분자인 VCAM-1, ICAM-1 및 E-selectin,들에 대하여 그 저해 작용을 Fig. 4, Fig. 5 및 Fig. 6에 나타내었다. 먼저 VCAM-1

에 대하여 살펴보면, 전호는 0.2 ppm의 농도에서 완벽하게 VCAM-1을 저해 시켰으며, 파고지는 1.0 ppm의 농도에서, 희침 및 산수유는 5.0 ppm에서 control 보다 낮은 완벽한 저해를 보였다. 농도 상으로 보면, 전호 (0.2 ppm, 125%) > 파고지 (0.5 ppm, 100%) > 희침 (5.0 ppm, 114%) > 산수유 (5.0 ppm, 111.8%)의 순으로 저해의 강도가 높은 것으로 나타났다.

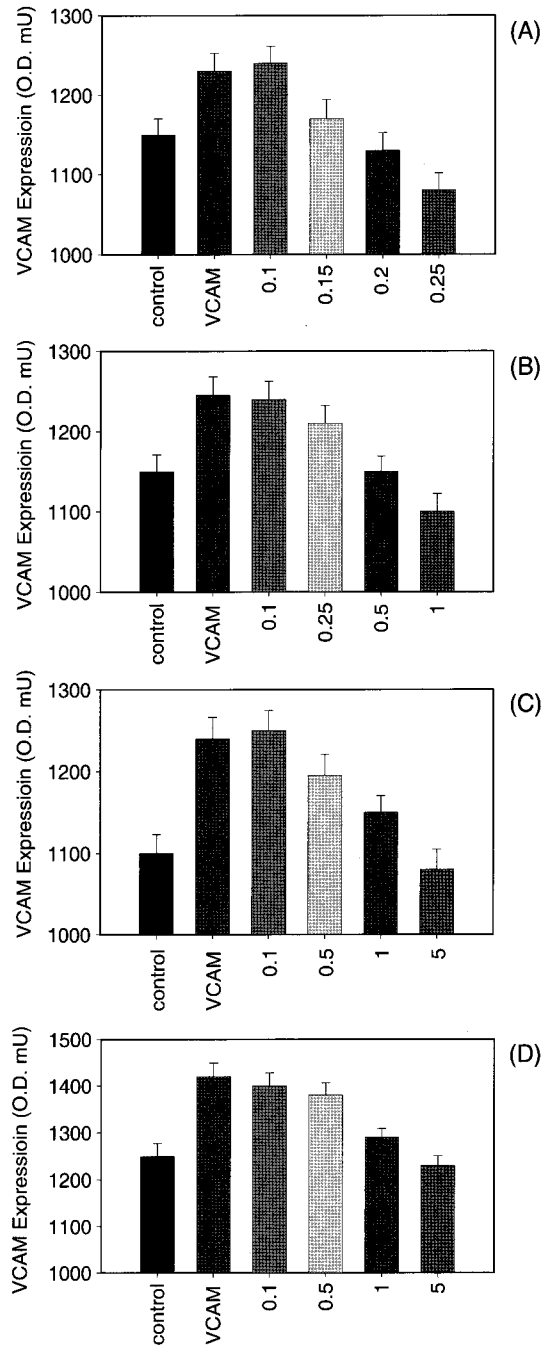


Fig. 4. Inhibition of endothelial cell adhesion molecules VCAM-1 expression by different dose of *P.radix* (A), *P.semen* (B), *S.hebra* (C) and *C.furctus* (D).

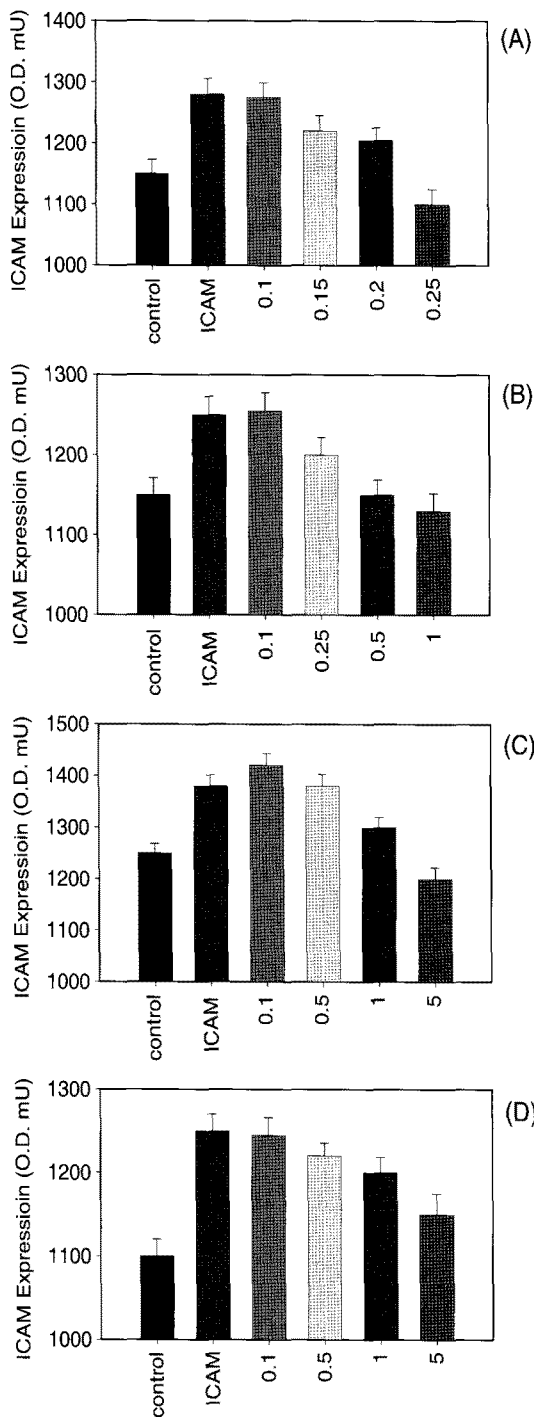


Fig. 5. Inhibition of endothelial cell adhesion molecules ICAM-1 expression by different dose of *P. radix* (A), *P. semen* (B), *S. hebra* (C) and *C. furctus* (D).

ICAM-1의 저해 정도를 보면, 전호는 0.25 ppm의 농도에서 완벽하게 ICAM-1을 저해 시켰으며, 파고지는 0.5 ppm의 농도에서, 회침은 5.0 ppm에서 control 보다 낮은 완벽한 저해를 보였다. 그러나, 산수유는 5.0 ppm에서 66.7%의 저해율을 보여 다른 천연산물에 비교하여 제어 정도가 낮

은 것으로 나타났다. 농도 상으로 보면, 전호 (0.25 ppm, 130%) > 파고지 (0.5 ppm, 100%) > 회침 (5.0 ppm, 138%) > 산수유 (5.0 ppm, 66.7%)의 순으로 저해의 강도가 높은 것으로 나타났다.

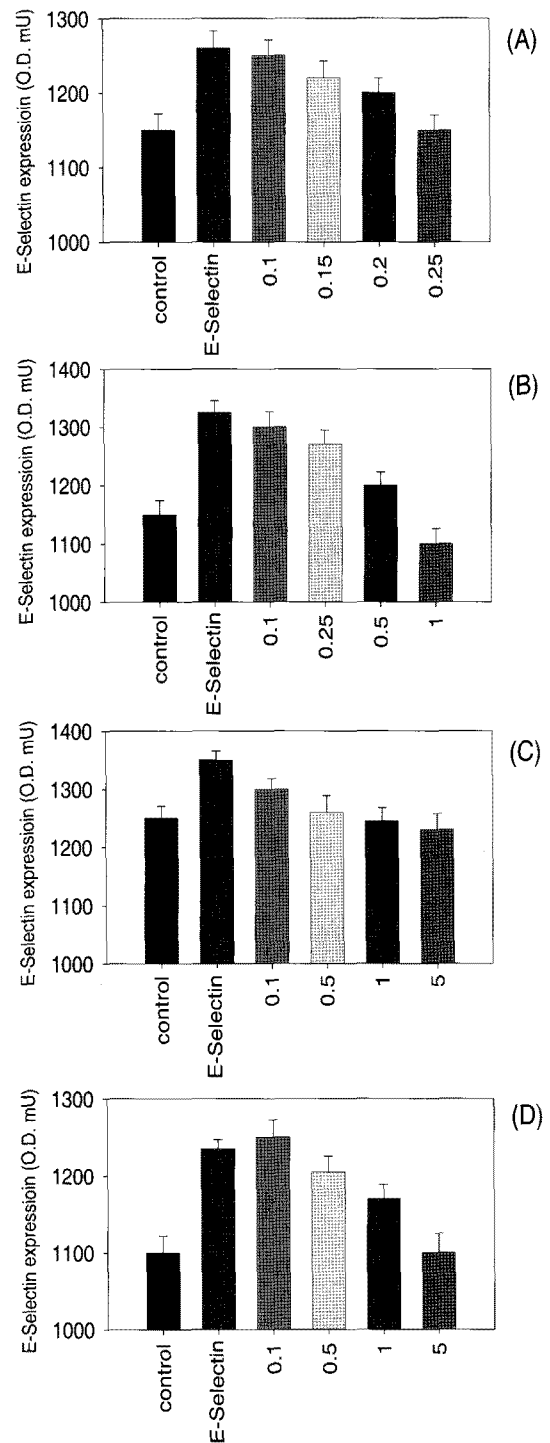


Fig. 6. Inhibition of endothelial cell adhesion molecules E-Selectin expression by different dose of *P. radix* (A), *P. semen* (B), *S. hebra* (C) and *C. furctus* (D).

그리고 E-Selectin의 저해 정도는, 전호는 0.25 ppm의 농도에서 완벽하게 E-Selectin을 저해시켰으며, 파고지는 1.0 ppm의 농도에서, 회침 및 산수유는 5.0 ppm에서 control 보다 낮은 완벽한 저해를 보였다. 농도 상으로 보면, 전호 (0.25 ppm, 100%) > 파고지 (1.0 ppm, 128%) > 회침 (5.0 ppm, 120%) > 산수유 (5.0 ppm, 100.7%)의 순으로 저해의 강도가 높은 것으로 나타났다.

전반적으로 낮은 농도에서 세포부착인자의 발현을 억제함으로써 항비만제제의 개발에 가능성을 보였다.

작용기전 규명

선별된 4종류의 천연산물인 전호, 파고지, 회침 및 산수유의 추출물로써 신생혈관의 형성을 억제하는 기전을 알기위하여 western blot을 VEGFR2, PI3K, β -catenin, VE-cadherin 등의 신호전달 분자의 항체를 이용하여 제어 과정을 살펴보았다.

전호 (*Anthrisci Radix*)의 신호전달억제

PI3K-antibody로써 I.P.를 행하고, VE-cadherin, β -catenin 및 Akt로써 blotting한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 전호 추출물은 VE-cadherin과 β -catenin의 신호전달을 억제하고 있으며, 그 하위 신호전달분자인 Akt도 억제함을 보이고 있어 신생혈관 형성 억제제로써 기대 할 수 있었다.

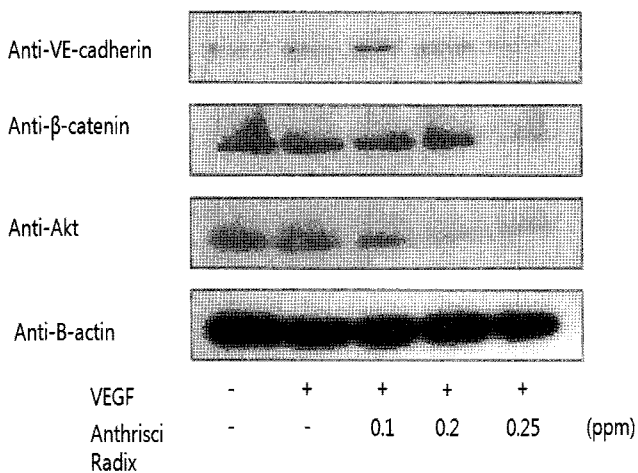


Fig. 7. Western blot analysis of signal molecules of VE-cadherin, β -catenin, and Akt with *Anthrisci Radix* extract, IP with PI3K.

파고지 (*Psoraleae Semen*)의 신호전달억제

VE-cadherin antibody로써 I.P.를 행하고, β -catenin 및 Akt 로써 blotting한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 파고지는 β -catenin의 신호는 억제하지 않는 것으로 보이나, 그 하위그룹의 Akt의 신호전달을 억제하는 것으로 나타났다.

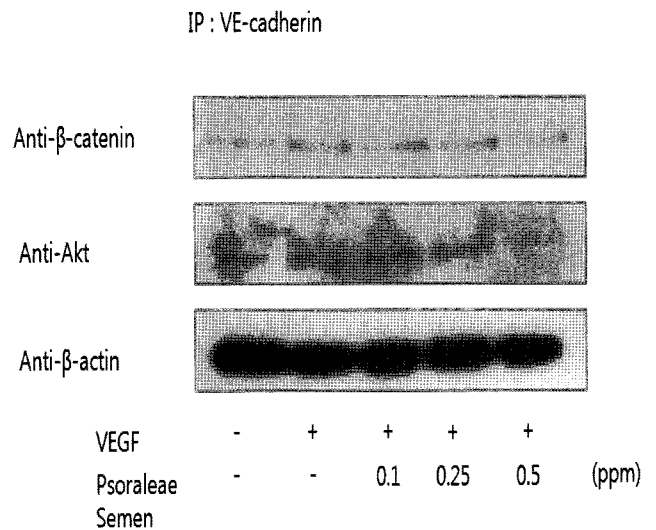


Fig. 8. Western blot analysis of signal molecules of β -catenin, and Akt with *Psoraleae Semen* extract, IP with VE-cadherin.

회침 (*Siegesbeckiae Herba*)의 신호전달억제

PI3K-antibody로써 I.P.를 행하고, VE-cadherin 및 Akt 로써 blotting한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 회침은 western blot 상에서 신호전달을 확실하게 제어 하는 것으로 나타났으며, VE-Cadherin과 하위 그룹의 Akt를 농도증가에 따라 확실하게 제어됨을 보였다.

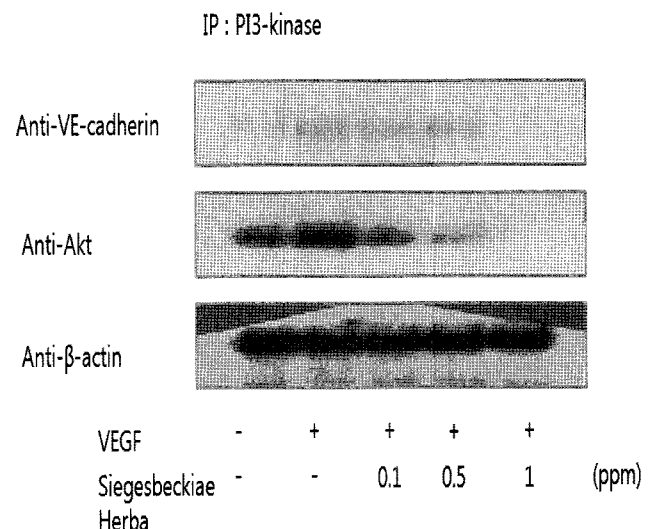


Fig. 9. Western blot analysis of signal molecules of VE-cadherin, and Akt with *Siegesbeckiae Herba* extract, IP with PI3K.

산수유 (*Corni Fructus*)의 신호전달억제

PI3K-antibody로써 I.P.를 행하고, Akt 로써 blotting한 결과를 Fig. 10에 나타내었다.

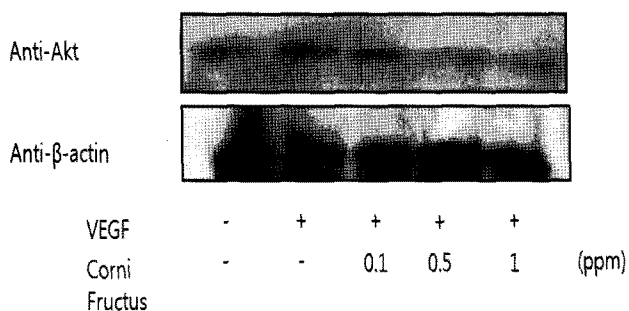


Fig. 10. Western blot analysis of signal molecules of Akt with Corni Fructus extract, IP with PI3K.

산수유는 하위그룹의 Akt의 신호전달을 억제하는 것으로 나타났다.

따라서 4종류의 선택된 천연산물은 세포표면의 신호전달분자 그리고 그 하위 그룹의 Akt를 억제함으로써 Fig. 11에 나타낸 바와 같이 NF-kB의 활성을 차단함으로써 신생혈관의 형성을 억제하는 것으로 판단된다.

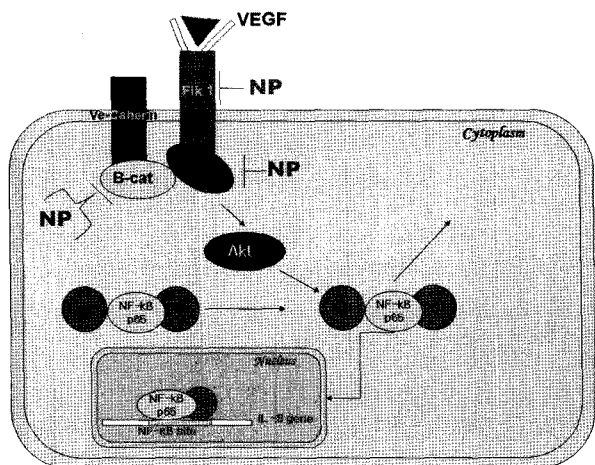


Fig. 11. Supposed signal way from VEGFR-2, β -catenin, PI3-K through Akt to NF-kB, Akt was interrupted, angiogenesis could not occurred causing not activated NF-kB.

요 약

선별한 신생혈관형성억제제는 EGCG보다도 제어 효과가 나은 천연산물들 중에서 전호, 파고지, 희침 및 산수유를 중심으로 그 기전을 밝히고자 하였다.

세포독성은 전호는 0.3 ppm에서 약간의 독성을 나타내었고, 파고지는 10 ppm까지는 독성을 나타내지 않았으며, 희침 및 산수유는 25 ppm까지 독성을 나타내지 않았다. 세포부착억제작용은 신생혈관의 형성에 중요한 역할을 하기 때문에 cell adhesion 분자인 VCAM-1, ICAM-1 및 E-selectin들에 대하여 세포부착억제 작용의 정도를 ELISA 법으로 살펴보았다. VCAM-1에 대한 천연산물의

작용은 전호 (0.2 ppm, 125%)>파고지 (0.5 ppm, 100%)>희침 (5.0 ppm, 114%)> 산수유 (5.0 ppm, 111.8%)의 순으로 저해의 강도가 높으며, ICAM-1은 전호 (0.25 ppm, 130%)>파고지 (0.5 ppm, 100%)>희침 (5.0 ppm, 138%)>산수유 (5.0 ppm, 66.7%)의 순으로 저해되는 것으로 나타났고, 그리고 E-Selectin은 전호 (0.25 ppm, 100%)> 파고지 (1.0 ppm, 128%)>희침 (5.0 ppm, 120%)>산수유 (5.0 ppm, 100.7%)의 순으로 저해되는 것으로 나타났다.

Western blot으로부터, 전호 추출물은 VE-cadherin과 β -catenin의 신호전달을 억제하였으며, 그 하위 신호전달분자인 Akt도 억제하는 것으로 나타났고, 파고지는 β -catenin의 신호는 억제하지 않는 것으로 보이나, 그 하위그룹의 Akt의 신호전달을 억제하는 것으로 나타났다. 그리고, 희침은 VE-Cadherin과 하위 그룹의 Akt를 농도의 증가에 따라 확실한 제어를 보이고 있음을 알 수 있었고, 산수유는 하위그룹의 Akt의 신호전달을 억제하는 것으로 나타났다. 4종류의 선택된 천연산물은 세포표면의 신호전달분자 그리고 그 하위 그룹의 Akt를 억제함으로써 NF-kB의 활성을 차단함으로써 신생혈관의 형성을 억제하는 것으로 판단된다.

따라서 4종류의 천연산물 전호, 파고지, 희침 및 산수유는 전반적으로 낮은 농도에서 세포부착인자의 발현을 억제하였고, 신호전달 분자들을 억제함으로써 신생혈관 형성 억제에 따른 항비만제제로서 충분한 가능성을 보였다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술재단의 지역 혁신인력양성사업(200807213219)으로 수행된 연구 결과의 일부로서 이에 감사합니다.

접수 : 2009년 3월 2일, 게재승인 : 2009년 4월 20일

REFERENCES

- Ruth E. Ley, Fredrik Bäckhed, Peter Turnbaugh, Catherine A. Lozupone, Robin D. Knight, and Jeffrey I. Gordon (2005), Obesity alters gut microbial ecology, *PNAS.*, **102**(31), 11070-11075.
- Garrow, J. S. (1988), Obesity and related diseases. *Edinburgh, Churchill Livingstone.*
- World Health organization (1997), Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity, 3-5.
- Flegal, K. M., M. D. Carroll, C. L. Ogden, and C. L. Johnson (2002), Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA.* **288**, 1723-1727.

5. Allison, D. B., K. R. Fontaine, J. E. Manson, J. Stevens, and T. B. Vanltallie (1999), Annual Deaths Attributable to Obesity in the United States. *JAMA*. **282**, 1530-1538.
6. Bray, G. A. (2001), Drug treatment of obesity. *Rev. Endocr. Metad. Disord.* **2**, 403-418.
7. Yamanaka, M., T. Nomura, and M. Kametaka (1977), Influence of intestinal microbes on heat production in germ-free, gnotobiotic and conventional mice, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **23**, 221-229.
8. Folkman, J. R. Cotran (1976), Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int. Rev. Exp. Path.* **16**, 207-248.
9. Folkman, J., M. Klagsbrun (1987), Angiogenic factors. *Science* **235**, 442-447.
10. Fox, S. B., K. C. Gatter, and A. L. Harris (1996), Tumor angiogenesis. *J. Pathol.* **179**, 232-237.
11. Leung, D. W., G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel, and N. Ferrara (1989), Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309.
12. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth (1997), The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **18**, 4-25.
13. Crandall, D. L., G. J. Hausman, and J. G. Karl (1997), A review oh the microcirculation of adipose tissue : anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* **4**, 211-232.
14. Poissonnet, C. M., A. R. Burdi, and F. L. Bookstein (1983), Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum. Dev.* **8**, 1-11.
15. Friedman, J. M., R. L. Leibel, D. S. Siegel, J. Walsh, and N. Bahary (1991), Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics.* **11**, 1054-1062.
16. Halaas, J. L., C. Boozer, J. Blair-west, N. Fidahusein, D. A. Denton, and J. M. Fridman (1997), *Proc Nat'l Acad Sci U.S.A.* **94**, 8878-8883.
17. Cohen, B., D. Barkan, and Y. Levy (2001), Leptin induces angiopoietin-2 expression in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **276**, 7697-7700.
18. Rupnick, M. A., D. Panigraphy, and C. Y. Zhang (2002), Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Nat'l Acad Sci. U.S.A.* **99**, 10730-10735.
19. Nishimura, S., I. Manabe, M. Nagasaki, Y. Hosoya, H. Yamashita, H. Fujita, M. Ohsugi, K. Tobe, T. Kadowaki, R. Nagai, and S. Sugiura (2007), Adipogenesis in Obesity Requires Close Interplay Between Differentiating Adipocytes, Stromal Cells, and Blood Vessels, *DIABETES*, **56**, 1517-1526.
20. KIM, J. D., L. Liu, W. Guo, and M. Meydani (2006), Chemical structure of flavonolsids in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion, *J. Nutrition. Biochem.* **17**, 165-176.
21. LIM, J. K., H. J. SEO, E. O. KIM, M. Meydani, and J. D. KIM (2006), Identification of Anti-angiogenic and Anti-cell adhesion Materials from Enterobacteria of the *Trachurus japonicus*, *J. Microbiol. Biotech.* **16**, 1544-1553.
22. Banks, R. E., A. J. H. Gearing, I. K. Hemingway, D. R. Norfolk, T. J. Perren, and P. J. Selby (1993), Circulating intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br. J. Cancer* **68**, 122-124.
23. Hyodo, I., K. Jinno, M. Tanimizu, Y. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Akiyama, K. Mandai, and S. Moriwaki (1993), Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **55**, 775-779.
24. SONG, M. G., H. J. SEO, J. H. Moon, K. H. Park, and J. D. KIM (2007), Anti-angiogenic and Anti-cell Adhesion Effects and Their Mechanism with the Extract of *Camella jaonia* leaf, *Korean Journal of Biotechnology and Bioprocess Engineering* **22**, 249-254.
25. HEO, I. D., H. J. SEO, and J. D. KIM (2007), Anti-Angiogenic and Anti-Cell Adhesion Effect of the *Camellia japonica* Flower Extract, *Journal of Life Science* **17**, 1152-1156.