

과루인 에탄올 추출물의 혈관신생 억제효과

박신행* · 박현지

동의대학교 한의과대학 병리학교실

Inhibitory Effect of the Ethanolic Seed Extract of *Trichosanthes kirilowii* on Angiogenesis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Shin-Hyung Park*, Hyun-Ji Park

Department of Pathology, College of Korean Medicine, Dong-eui University

The seeds of *Trichosanthes kirilowii* (STK) used in traditional Oriental medicine for the treatment of dry cough and constipation have diverse pharmacological activities, including hypolipidemic, antioxidant, immunosuppressive, and anticancer effects. However, the effect of STK on angiogenesis has not been studied yet. In this study, we investigated whether the ethanolic extract of STK (ESTK) can regulate the migration and tube formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and explored the underlying mechanism. Results of transwell assay showed that ESTK treatment dose-dependently suppressed the migration of HUVECs. The conditioned medium collected from H1299 human lung cancer cells was used as a chemoattractant. Our observation suggests that ESTK would inhibit the recruitment of endothelial cells into tumors. In addition, ESTK treatment significantly reduced the tube formation of HUVECs. As a molecular mechanism, we found that vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced phosphorylation of VEGF receptor 2 (VEGFR2) was completely blocked by ESTK treatment. The expression of angiogenic factors, including VEGFA, fibroblast growth factor 2 (FGF2), angiopoietin, placental growth factor (PGF), platelet derived growth factor (PDGF), angiogenin, and tumor necrosis factor (TNF)- α , was commonly decreased by ESTK treatment in H1299 cells, indicating that ESTK would reduce the production of angiogenic factors from cancer cells. Taken together, our results clearly demonstrated that ESTK exhibited anti-angiogenic effects in HUVECs, which provides another possible mechanism underlying the anticancer activities of STK.

keywords : Seeds of *Trichosanthes kirilowii*, Angiogenesis, Cancer

서 론

암은 인류의 생명을 위협하는 가장 대표적인 질병으로서 2022년 미국에서만 190만명에 달하는 암발생자와 60만명에 육박하는 암사망자가 발생할 것으로 예측되고 있다¹⁾. 2019년 기준 우리나라의 암 발생자 수는 254,718명이었고²⁾, 암으로 인한 사망자 수는 81,203명으로 전체 사망자의 27%를 차지하였으며, 이는 모든 질병으로 인한 사망 중 1위에 해당하는 수치이다²⁾. 지난 수십년간 암을 극복하려는 다양한 전략과 치료제가 개발되어왔으나 우리나라의 암 발생자 수와 사망자 수는 꾸준히 증가하는 추세이다²⁾. 미국에서 암으로 인한 사망률은 1990년대를 기점으로 완만한 하향곡선을 그리고 있으나, 현재까지도 암은 질병으로 인한 사망 중 21%를 차지하여 심장질환에 이어 2위에 해당한다¹⁾. 이러한 구체적 수치들은 암을 예방하고 치료하기 위해 더 많은 연구와 노력이 필요함을 시사한다.

암의 전형적인 특징으로서 지속적인 증식신호, 무제한의 복제능력, 성장억제인자 회피, 세포사멸기작 회피, 주변조직 침윤 및 전이 활성화, 혈관신생 촉진 등을 들 수 있다³⁾. 특히 혈관신생 과정은 암세포에 더 많은 산소와 영양분을 전달함으로써 암의 성장을 돕는데 필수적이다³⁾. 혈관신생(angiogenesis)은 다양한 사이토카인이나 성장인자 등에 의해서 기존의 혈관내피세포가 이동 및 발아(sprouting)하여 맥관구조를 형성하는 과정으로서 보통 배아발생 단계에서 활발하게 나타나지만 성인에게는 월경주기에 따른 자궁내막 변화나 상처치유 등 특이한 상황을 제외하고는 억제되어 있다³⁾. 그러나 암의 발전과정에서 혈관신생은 매우 활성화된다³⁾. 종양 내 신생혈관들은 특징적으로 분지형성이 과도하여 서로 뒤엉키거나 뒤틀리고 확장되어 있으며, 혈관벽이 견고하지 않아 쉽게 누출되며, 미세출혈, 불규칙한 혈류 등의 특징을 보인다^{4,5)}. 혈관신생을 촉진하는 혈관신생 유도인자로서 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)와 섬유아세포성장인자(fibroblast growth factor, FGF) 등이 대표적이다⁶⁾. 이들은 각각

의 수용체를 통해 하위로 신호를 전달하여 궁극적으로 혈관내피세포의 분화, 증식, 이동 및 발아를 촉진하게 된다⁶⁾. 이러한 혈관신생 과정은 암세포의 전이와 증식을 촉진하여 암을 악화시키는 주요한 요인이 되므로 혈관신생을 억제하는 것이 유망한 항암전략으로 대두되었다⁶⁾. 대표적으로 bevacizumab과 같이 VEGF를 저해하는 항체치료제나 sunitinib, sorafenib과 같이 VEGF 수용체인 VEGFR2를 표적으로 하는 티로신키나제억제제(tyrosine kinase inhibitor)가 암 치료제로서 FDA 승인을 받은 바 있다⁶⁾.

과루인(瓜蒌仁)은 박과에 속한 다년생 초질등본(草質藤本)인 *Trichosanthes kirilowii*의 종자로서 성질은 한(寒)하고, 미(味)는 감미고(甘微苦)하다. 폐, 위, 대장으로 귀경(歸經)하며, 윤폐화담(潤肺化痰), 활장통변(滑腸通便)하는 효능이 있어 전통적으로 마른 기침과 점조한 가래, 진액부족성 변비 등을 치료하는데 활용되어 왔다⁷⁾. 최근 연구에 따르면 과루인은 지질강하효과, 항산화효과, 면역억제 및 항염증효과 등 다양한 약리작용을 가지고 있다^{8,9)}. 흥미롭게도 과루인 에탄올 추출물이 대장암세포주의 아포토시스(apoptosis)을 유도함으로써 대장암의 증식과 전이를 억제함이 보고되어 있어 과루인이 항암작용을 가짐을 시사한다¹⁰⁾. 그러나 과루인의 항암작용에 대한 연구는 암세포 자체의 조절에만 초점이 맞춰져 있어 과루인이 혈관신생에 미치는 영향은 현재까지 연구된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 과루인 에탄올 추출물이 인체 제대정맥내피세포(human umbilical vein endothelial cell)인 HUVEC 세포주의 이동과 관 형성(tube formation)에 미치는 영향 및 그 기전을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료 제조

과루인은 (주)본초마루(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 먼저 분말로 곱게 파쇄한 과루인 50 g에 80% 에탄올 800 mL을 넣고 초음파세척기에서 20분간 sonication 하였다. Sonication 3회 반복 후

Shin-Hyung Park, Department of Pathology, College of Korean Medicine, Dong-eui University, 47227, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, Republic of Korea

E-mail : omdpark@deu.ac.kr · Tel : +82-51-890-3332

Received : 2022/08/12 · Revised : 2022/09/30 · Accepted : 2022/10/19

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2022.10.36.5.175

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

40°C 인큐베이터에서 120 rpm으로 교반시키며 48시간 동안 추출하였다. 추출액을 여과하여 모은 후 남은 과루인 분말에 다시 80% 에탄올 300 mL를 넣어 40°C 인큐베이터에서 2차 추출하였다. 2차 추출액은 여과 후 1차 추출액과 합쳐 감압농축 및 동결건조하였다. 최종적으로 2.69 g의 추출분말을 얻어 5.38%의 수율을 나타내었다. 추출분말을 dimethylsulfoxide (DMSO; Amresco, Solon, OH, USA)에 100 mg/mL로 녹인 후 사용하였으며, 이를 ESTK (ethanolic extract of the seeds of *Trichosanthes kirilowii*)라고 명명하였다.

2. 세포 배양

HUVEC 인체 제대정맥 내피세포는 부경대학교 김군도 교수님으로부터 분양받았고, H1299 인체 폐암세포주는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. HUVEC 세포주는 Vasculife® VEGF Endothelial Medium Complete Kit (Lifeline Cell Technology, Frederick, MD, USA)를 사용하여 배양하였다. H1299 세포는 RPMI-1640 (WelGene, Seoul, Korea) 90%에 fetal bovine serum (FBS; WelGene) 10%와 penicillin-streptomycin (WelGene) 1%를 첨가하여 배양하였다. 두 세포주 모두 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 2~3일에 한 번 주기로 계대배양하였다.

3. MTT assay

96 well plate에 HUVEC 세포를 1×10⁴개씩 분주하였다. 다음 날 ESTK를 농도별(0, 25, 50, 100 µg/mL)로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포배양액에 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT; Duchefa, Haarlem, The Netherlands)를 0.4 mg/mL이 되도록 첨가한 후 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 세포배양액을 제거하고, DMSO 100 µL를 주입하여 바닥에 형성된 formazin을 용해시켰다. 흡광도는 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

4. Transwell migration assay

24 well transwell (8.0 µm pore size; Corning, NY, USA) insert의 outer membrane을 0.1% gelatin (Sciencell, Carlsbad, CA, USA)으로 코팅하였다. 그 다음 HUVEC 세포를 serum이 포함되지 않은 배지에 현탁한 후 transwell의 insert에 5×10⁴개씩 분주하면서 ESTK를 농도별(0, 50, 100 µg/mL)로 처리하였다. Bottom chamber에는 유인인자(chemoattractant)로서 H1299 세포주로부터 모은 conditioned medium을 500 µL씩 분주하였다. 37°C 인큐베이터에서 24시간 배양한 후 insert를 꺼내 methanol로 5분간 고정하고, hematoxylin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)으로 30분간 염색하였다. 그 후 insert를 증류수로 수차례 세척하고 안쪽 면은 면봉으로 닦아냈다. Gelatin 상에 고정된 염색된 세포들을 이동한 세포로 간주하여 100배율의 광학 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하면서 계수하였다. H1299 세포의 conditioned medium은 아래와 같은 방식으로 준비하였다. H1299 세포를 100 π dish에 분주하고, 세포밀집도가 90%가 될 때까지 배양한 다음 세포배양액을 제거하고 serum이 포함되지 않은 RPMI-1640 배지 5 mL을 넣어주었다. 24시간 배양 후 세포배양액을 모아 여과하여 conditioned medium으로 사용하였다.

5. Tube formation assay

6 well plate에 HUVEC 세포를 2×10⁵개씩 분주하고 안정화시킨 후 ESTK를 농도별(0, 50, 100 µg/mL)로 처리하여 24시간 배양하였다. 다음 날, 96 well plate에 growth factor reduced matrigel (Corning)을 50 µL 분주하여 굳힌 후 ESTK가 전처리된 HUVEC 세포를 0.25% trypsin-EDTA (WelGene) 처리로 떼어내 1.5×10⁴개씩 matrigel 위에 분주하였다. 37°C 인큐베이터에서 10시간 배양 후 tube formation 정도를 50배율의 현미경으로 관찰하였다.

6. 웨스턴블롯

6 well plate에 HUVEC 세포를 2×10⁵개씩 분주하고 안정화시킨 후 ESTK를 농도별(0, 50, 100 µg/mL)로 24시간 처리하였다. 하베스트 30분 전 VEGF (20 ng/mL)를 처리하여 VEGFR2를 활성화시켰다. 각 well의 세포배양액을 제거한 후 phosphate buffer saline (PBS, WelGene)로 2회 세척하고, protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)과 phosphatase inhibitor (1 mM Na₃VO₄, 100 mM NaF)가 첨가된 RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific)를 200 µL씩 분주하여 단백질을 분리하였다. Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)의 사용법에 따라 단백질을 정량하였고, 각 샘플당 20 µg의 단백질을 8% gel 상에 전기영동하였다. 이와 같이 분리된 단백질을 PVDF 멤브레인(Millipore Corporation, Bedford, MA)으로 transfer하고, 3% bovine serum albumin (BSA, GenDEPOT, TX, USA)으로 blocking 한 다음 1차 항체(1:1000 희석)와 4°C에서 overnight 반응시켰다. 다음 날 TBST (Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20)로 멤브레인을 수차례 세척하고 2차 항체(1:5000 희석)와 실온에서 1시간 반응시킨 후 다시 TBST로 수차례 세척하였다. 단백질 발현은 D-Plus ECL Femto System (Donginbio, Seoul, Korea)을 사용하여 확인하였다. Phosphorylated VEGFR2 및 total VEGFR2 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Goat anti-rabbit 2차 항체는 Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA)에서 구입하였고, goat anti-mouse 2차 항체는 Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA)에서 구입하였다.

7. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

6 well plate에 H1299 세포를 2×10⁵개씩 분주하여 안정화시킨 후 ESTK를 농도별(0, 50, 100 µg/mL)로 24시간 동안 처리하였다. 각 well의 세포배양액을 제거한 후 PBS로 2회 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. Microplate reader (Molecular Devices)로 RNA 정량 후 1 µg total RNA를 PrimeScript RT reagent kit (Takara, Japan)의 사용법에 따라 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 nuclease-free water에 1:50으로 희석하여 타겟유전자에 대한 primer 및 SYBR green (Enzynomics, Daejeon, Korea)과 혼합하여 CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 quantitative real-time PCR 분석을 시행하였다. 사용된 primer 서열과 annealing temperature는 Table 1과 같다.

Table 1. Primer sequence and annealing temperature

Gene	Sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)
VEGFA	F: AGG AGG AGG GCA GAA TCA TCA R: CTC GAT TGG ATG GCA GTA GCT	55
FGF2	F: GGC TAT GAA GGA AGA TGG AAG ATT R: TGC CAC ATA CCA ACT GGT GTA TTT	50
Angiopoietin	F: GGA ACA TGT GAT GGA AAA TTA TAC TCA R: GGG CCA TCT CCG ACT TCA T	55
Placental growth factor (PGF)	F: CTC ACA CTT TGC CAT TTG R: ACT CTG TAT GTG TCT CTT AG	55
Platelet derived growth factor (PDGF) A	F: GAG TGA GGA TTC TTT GGA CAC C R: CTT CTT CCT GAC GTA TTC CAC C	55
PDGFB	F: GCA CCG AGG TGT TCG AGA TC R: TTG GCT TCT TCC GCA CAA TC	55
Angiogenin	F: TTC CTG ACC CAG CAC TAT GAT G R: CGT CTC CTC ATG ATG CTT TCA C	53
TNF-α	F: CAC CAC GCT CTT CTG CCT GCT G R: GGG CTA CAG GCT TGT CAC TC	58
ACTB (β-actin)	F: TGC GTT ACA CCC TTT CTT GAC R: TCA CCT TCA CCG TTC CAG TTT	55

8. 통계 분석

모든 실험 결과는 평균(mean)±표준편차(SD)로 표시하였으며,

Student's t-test를 이용하여 $P < 0.05$ 인 것을 통계적으로 유의성 있다고 판단하였다.

결 과

1. HUVEC 세포의 증식에 영향을 미치지 않는 ESTK 농도 설정

먼저 HUVEC 세포의 증식에 영향을 미치지 않는 ESTK의 농도 조건을 설정하기 위하여 HUVEC 세포에 ESTK를 다양한 농도(0, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24시간 처리한 후 MTT assay를 시행하였다. 그 결과 ESTK 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서 세포생존율이 각각 $99.62 \pm 3.22\%$, $92.72 \pm 0.88\%$, $90.78 \pm 4.46\%$ 로 나타나 HUVEC 세포의 증식에 미치는 영향이 미미한 것으로 판단되었다(Fig. 1). 이에 ESTK 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 최고농도로 하여 이후 실험을 진행하였다.

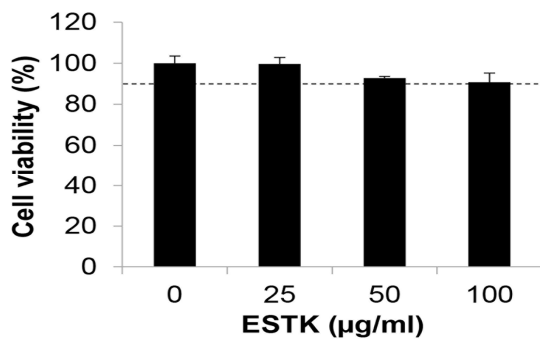


Fig. 1. Effect of ESTK on the cell viability of HUVECs. HUVECs were treated with various concentrations of ESTK (0, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. The cell viability was measured by MTT assay. The data are expressed as the means \pm SD of 3 independent experiments. The dotted line indicates the cell viability of 90%. HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; ESTK, ethanolic extract of the seeds of *Trichosanthes kirilowii*.

2. ESTK가 HUVEC 세포의 이동에 미치는 영향

혈관신생 과정에서 혈관내피세포의 이동은 필수적이다. 일반적으로 VEGF, FGF, angiopoietin과 같은 인자가 혈관내피세포를 혈관신생이 필요한 곳으로 유인한다⁶⁾. 암세포는 이러한 유인인자들을 활발히 분비함으로써 혈관내피세포들이 종양이 위치한 곳으로 이동하여 신생혈관을 형성할 수 있도록 한다¹¹⁾. 이에 ESTK가 HUVEC 세포의 이동에 미치는 영향을 조사하기 위해 transwell assay를 시행하였다. 먼저 HUVEC 세포가 transwell의 bottom chamber로 이동할 수 있도록 유인하는 인자로서 H1299 인체 폐암세포주의 conditioned media (CM)를 사용하였다. Upper chamber에는 HUVEC 세포를 분주하면서 ESTK를 농도별(0, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하여 24시간 동안 이동한 세포수를 확인하였다(Fig. 2A). 그 결과 ESTK를 처리하지 않은 대조군에서는 H1299 세포의 CM에 의해 HUVEC 세포가 활발히 이동하였으나, ESTK 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서는 대조군에 비해 각각 $75.34 \pm 4.92\%$, $16.04 \pm 0.69\%$ 로 이동능이 유의하게 감소하였다(Fig. 2B and 2C). 이러한 결과는 ESTK가 종양에서 분비되는 다양한 유인인자에 의해 혈관내피세포가 암으로 활발히 이동하는 것을 억제할 수 있음을 시사한다.

3. ESTK가 HUVEC 세포의 관 형성(tube formation)에 미치는 영향

ESTK가 혈관내피세포의 관 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 ESTK를 HUVEC 세포에 농도별(0, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리한 후 tube formation assay를 시행하였다. 그 결과 대조군에서는 견고한 관형 구조가 형성되었으나, ESTK를 처리한 군에서는 관형성이 농도의존적으로 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 3A). ESTK 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서 관 형성도는 대조군에 비해 각각 $26.63 \pm 11.11\%$, $22.22 \pm 7.41\%$ 로 유의하게 감소하였다(Fig. 3B). 이러한 결과는 ESTK가 혈관내피세포의 관 형성을 억제할 수 있음을 보여준다.

4. ESTK가 HUVEC 세포의 VEGFR2 인산화에 미치는 영향

VEGFR2는 VEGF와 결합하여 혈관신생을 매개하는 가장 주요한 수용체이다. VEGFR2는 혈관내피세포의 생존과 증식, 이동과 침윤, 그리고 관 형성에 이르기까지 거의 모든 과정에서 혈관신생을

촉진한다. 이에 VEGFR2는 암의 혈관신생을 억제하기 위한 핵심 표적이 되어왔다¹²⁾. VEGFR2는 여타 티로신키나제수용체(tyrosine kinase receptor)와 같이 리간드와 결합하면 이합체를 형성(dimerization)하면서 내부의 티로신키나제 활성을 유발하여 자가인산화 되는 동시에 하위로 신호를 전달한다¹³⁾. 이에 ESTK가 VEGF 처리로 유도한 VEGFR2 인산화를 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 웨스턴블롯을 시행하였다. 먼저 HUVEC 세포에 VEGF를 처리하자 대조군에 비해 VEGFR2의 인산화가 확연히 증가하는 것을 확인하였다. 이는 ESTK 전처리에 의해 농도의존적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 4A and 4B). 또한 ESTK는 total VEGF 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 이러한 결과는 ESTK가 VEGF에 의한 VEGFR2의 인산화를 억제시킴으로써 혈관내피세포의 이동과 관 형성을 억제함을 시사한다.

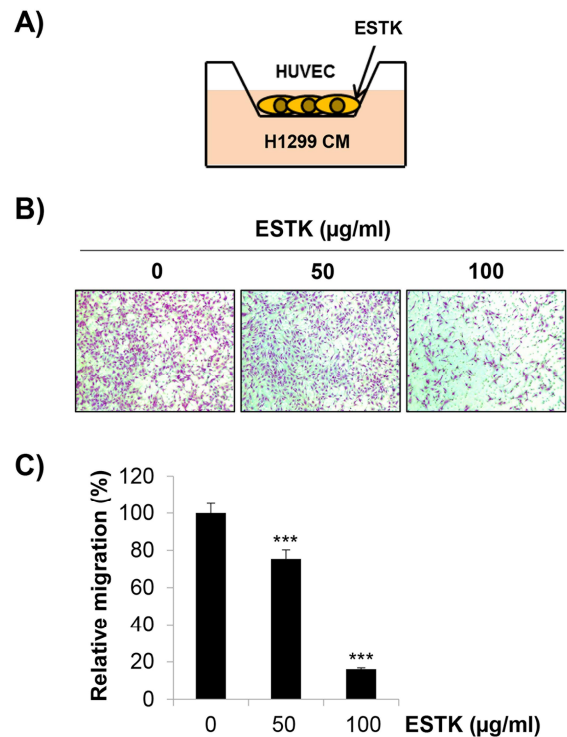


Fig. 2. Effects of ESTK on the migration of HUVECs. (A) Experimental scheme of transwell assay is shown. HUVECs suspended in serum free medium were seeded into the inserts of 24 well transwell plate and treated with ESTK (0, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. Conditioned media collected from H1299 human lung cancer cells were filled in the bottom chamber. (B) HUVECs that migrated through the intermembrane were stained and photographed under a microscope ($\times 100$ magnification). (C) The relative migration was evaluated by counting the migrated HUVECs. The data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. Significance was determined by the Student's t-test ($***P < 0.001$ versus untreated control). HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; ESTK, ethanolic extract of the seeds of *Trichosanthes kirilowii*; CM, conditioned media.

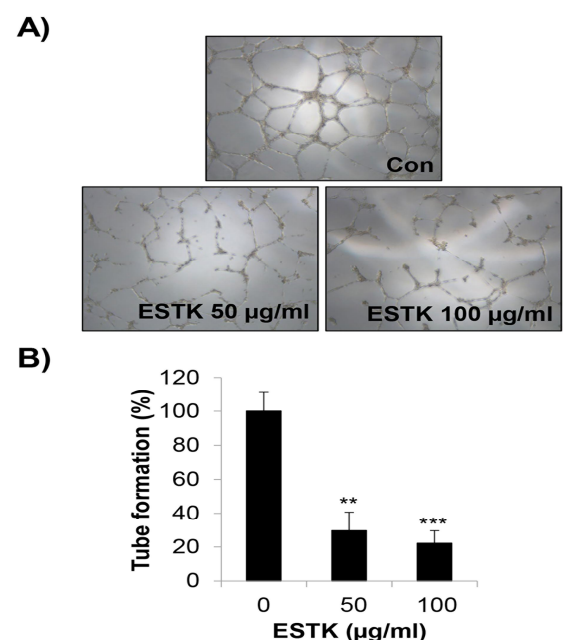


Fig. 3. Effects of ESTK on the tube formation of HUVECs. (A) HUVECs pretreated with ESTK (0, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h were seeded onto the matrigel-coated 96 well plate. After 10 h of incubation, the tube

formation was photographed under a microscope ($\times 50$ magnification). (B) The relative tube formation was evaluated by counting the number of branch sites/nodes. The data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. Significance was determined by the Student's t-test (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus untreated control). HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; ESTK, ethanolic extract of the seeds of *Trichosanthes kirilowii*.

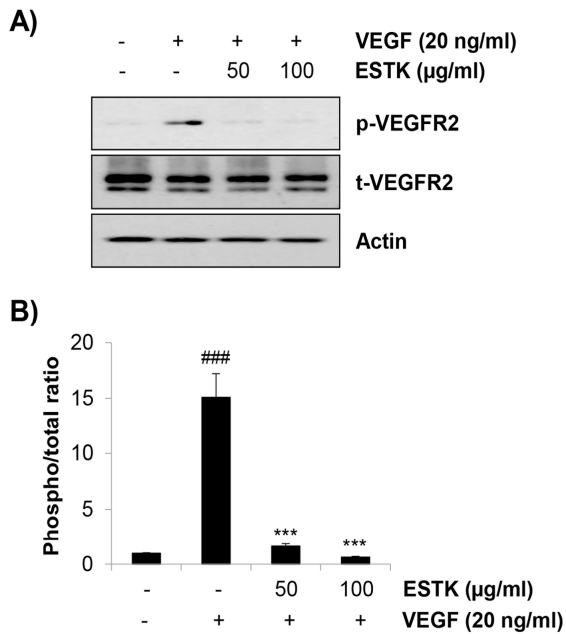


Fig. 4. Effects of ESTK on the phosphorylation of VEGFR2 in HUVECs. (A) HUVECs were treated with ESTK (0, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h and stimulated with VEGF (20 ng/ml) 30 min before harvest. The phosphorylation level and total expression of VEGFR2 were detected by Western blot analysis. Actin was used as an internal control. (B) The ratio of phosphorylated/total VEGFR2 was calculated using ImageJ software after normalization to actin. The data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. Significance was determined by the Student's t-test (### $P < 0.01$ versus untreated control, *** $P < 0.001$ versus VEGF-treated cells). HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; ESTK, ethanolic extract of the seeds of *Trichosanthes kirilowii*; VEGF, Vascular endothelial growth factor; VEGFR2, VEGF receptor 2.

5. ESTK가 암세포의 혈관신생 촉진인자 발현에 미치는 영향

마지막으로 혈관내피세포의 이동과 관 형성을 촉진하는 다양한 인자들의 암세포 내 발현을 ESTK가 조절할 수 있는지 확인하였다. 암세포에서 분비되는 혈관신생 촉진인자로서 VEGF, FGF, angiopoietin, PGF, PDGF, angiogenin, TNF- α 등이 알려져 있다¹⁴. VEGF는 VEGFR2를 통해 혈관신생을 촉진하는 가장 대표적인 인자로서 혈관신생 억제를 위한 항체치료제의 주요 타겟이 되어 왔다⁶. FGF2는 FGF 수용체를 통해 혈관내피세포의 증식과 이동을 촉진하며, VEGF나 angiopoietin과 같은 인자들을 분비시킴으로써 간접적으로 혈관신생을 돕는다¹⁵. Angiopoietin은 혈관내피세포의 액틴 리모델링을 통해 이동을 촉진하고, pericyte를 활성화시키는 사이토카인을 분비시킨다¹⁶. PGF는 VEGF family의 하나로서 VEGFR1과 결합하여 혈관내피세포의 이동을 촉진하고, VEGFA가 VEGFR2와 결합하도록 유도하며, 내피세포, pericyte 등 혈관신생을 일으키는 기질세포들을 유인하는 역할을 한다¹⁷. PDGF는 각종 암에서 높게 발현되며, 종양조직을 구성하는 암세포와 혈관내피세포 및 기질세포의 성장과 전이에 작용하여 암의 불량한 예후와 연관되어 있다¹⁸. Angiogenin과 TNF- α 역시 혈관내피세포의 성장, 이동, 침윤 및 관 형성을 촉진하며, 암세포에서는 혈관신생 촉진인자의 분비를 유도한다고 알려져 있다^{19,20}. 이에 H1299 인체 폐암 세포주에 ESTK를 농도별(0, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 24시간 처리한 후 상기한 촉진인자들의 mRNA 발현이 조절되는지 여부를 real-time PCR로 확인하였다. 그 결과 Fig. 5에 나타난 바와 같이 ESTK가 H1299 세포에서 VEGFA, FGF2, angiopoietin, PGF, PDGFA, PDGFB, angiogenin, TNF- α 의 mRNA 발현을 농도의존적으로 억제함을 알 수 있었다 (Fig. 5A-H). 박¹⁰의 연구에서도 과루인 에탄올 추출물이 저산소환경에서 암세포의 Hif-1 α 와 VEGF의 발현을 감소시킨다고 보고하여 본 연구결과와 일치하는 부분이라고 할 수 있다. 따라서 상기한 결과는 ESTK가 암세포에서 분비되는 혈관신생 촉진인자들을 억제함으로써 궁극적으로 혈관신생을 저해할 수 있음을 시사한다.

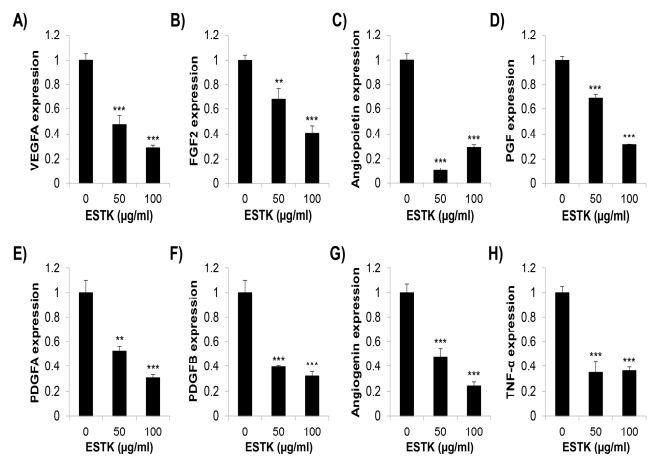


Fig. 5. Effects of ESTK on the mRNA expression of angiogenic factors in H1299 cells. H1299 human lung cancer cells were treated with ESTK (0, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h. The mRNA expression of angiogenic factors, including VEGFA (A), FGF2 (B), angiopoietin (C), PGF (D), PDGFA (E), PDGFB (F), angiogenin (G), TNF- α (H), was detected by real-time PCR. ESTK, ethanolic extract of the seeds of *Trichosanthes kirilowii*; VEGFA, Vascular endothelial growth factor A; FGF2, fibroblast growth factor 2; PGF, placental growth factor; PDGF, platelet derived growth factor; TNF- α , tumor necrosis factor.

고찰

본 연구는 한의학적으로 윤패거담(潤肺祛痰) 작용을 가지면서⁷⁾ 항암작용이 밝혀진¹⁰⁾ 과루인의 혈관신생 조절작용에 대한 연구이다. 담음(痰飲)은 암의 주요한 한의학적 병기(病機)로서 체내에 들어온 수액(水液)이 정상적으로 운화(運化)되지 못하고 국소에 머물러 쌓여 있는 병리산물을 뜻한다²¹. 임상에서 오랜 시간 경과해도 사라지지 않는 종물은 모두 담음으로 보고 치료하는데, 현대 약리학적인 연구에서도 화담산결(化痰散結) 작용이 있는 반하, 행인 등의 한약재가 항암작용을 가진 것으로 보고되어 있다^{22,23}. 특히 암세포가 분비하는 다양한 혈관신생 촉진인자에 의해 혈관내피세포가 비정상적으로 증식하고 발아하여 종양 국소의 혈류 및 체액순환부전을 일으키고 이를 통해 종양 덩어리가 지속적으로 성장한다는 점에서 암의 혈관신생작용은 담음 및 어혈(瘀血)의 병기와 밀접하게 연관되어 있다고 봐야할 것이다. 이에 본 연구에서는 대표적 거담제인 과루인의 에탄올추출물(ESTK)이 혈관신생과정을 조절할 수 있는지 조사하였다.

본 연구의 주된 연구결과 및 시사점은 아래와 같다. 첫째, ESTK는 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 HUVEC 인체 혈관내피세포주의 이동을 농도의존적으로 억제하였다. H1299 인체 폐암세포주의 conditioned media를 유인인자로 사용했으므로 위 결과는 혈관내피세포가 종양 국소로 활발히 이동하는 것을 ESTK가 저해할 수 있음을 시사한다. 둘째, ESTK는 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 HUVEC 세포의 관 형성을 농도의존적으로 감소시켰다. 셋째, ESTK는 VEGF로 유도한 VEGFR2의 인산화를 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 농도의존적으로 저해하여 혈관내피세포의 이동 및 관 형성 억제에 VEGFR2 신호전달경로 저해에 의한 것임을 알 수 있었다. 마지막으로 ESTK는 H1299 세포에서 VEGFA를 포함한 다양한 혈관신생 촉진인자의 발현을 감소시켰다. 이는 ESTK가 혈관내피세포 자체의 혈관신생능을 조절할 뿐만 아니라 혈관신생을 유도하는 암세포의 분비능을 조절함으로써 혈관내피세포와 암세포 간의 상호작용을 효과적으로 저해할 수 있음을 시사하는 것이다. 따라서 본 연구의 의의는 과루인 추출물의 항암작용을 암세포 사멸작용이 아닌 종양 미세환경 조절 관점에서 최초로 밝혔다는 점이다.

기존 연구에서 *Trichosanthes kirilowii*의 뿌리에 해당하는 과루근(瓜蒌根)의 혈관신생 억제작용이 보고된 바 있다²⁴. 해당 연구에서 과루근 열수추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서부터 HUVEC 세포의 성장을 억제하였으며, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서부터 HUVEC 세포의 관 형성을 억제하였다. 본 연구에서 사용된 과루인 추출물(ESTK) 역시 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 HUVEC 세포의 이동과 관 형성을 억제하여 과루근 추출물과 비슷한 정도의 혈관신생 저해작용을 가지는 것으로 사료된다. 다만 ESTK는 과루인 에탄올추출물로서 과루근 열수추출물과 추출용매가 달라 성분함량이 다를 것으로 예상되어 직접적인 비교는 불가하다. 향후 *Trichosanthes kirilowii*의 과실(瓜

蓼實)이나 잎 등 다른 부위의 추출물이 혈관신생에 미치는 영향을 연구할 필요가 있다.

본 연구의 상기한 시사점에도 불구하고 추후 연구가 필요한 부분이 있는데, 첫째는 ESTK의 어떤 성분이 혈관신생을 억제하는 데 핵심적인 역할을 했는지 구체적으로 밝히는 것이다. 대한민국 약전에는 과루인의 지표성분을 특정하지 않았으나, 중국약전에서는 3,29-Dibenzoyl-karounitiriol을 HPLC 함량기준으로 설정하고 있으며, 기존 연구에서도 과루인의 지표성분으로서 3,29-Dibenzoyl-karounitiriol을 제안하고 있다^{10,25}). 또한 과루인 에탄올 추출물에 포함된 성분으로서 3,29-Dibenzoyl-karounitiriol 외에 cucurbitacin B, gallic acid, caffeic acid 등이 보고되어 있다^{10,26}). 박¹⁰의 연구에 따르면 과루인 에탄올 추출물은 저산소 환경에서 암세포의 Hif-1 α 와 VEGF의 발현을 감소시켰다. 또 다른 연구에서도 isoaurone을 포함한 과루인의 성분 4가지가 Hif-1 α 와 NF- κ B의 활성을 억제하였고, 저산소 환경에서 VEGF 분비를 억제하였다²⁷). 이러한 연구결과는 본 연구에서 밝힌 ESTK의 혈관신생 억제작용과 밀접하게 연관되어 있으므로 향후 혈관신생조절과 관련된 과루인의 특정 성분을 밝히는 연구가 필요하다. 이외에도 trichosanthrin, trichokirin, α -kirilowin, β -kirilowin, trichoanguin과 같은 과루인의 성분들은 리보솜 불활성화 단백질(ribosome-inactivating protein)로 알려져 있는데, 리보솜 불활성화 단백질은 단백질 합성을 저해함으로써 항암작용을 가진다²⁸). 특히 과루근(瓜蒌根)에 포함된 리보솜 불활성화 단백질인 trichosanthrin의 혈관신생 억제작용이 보고되어 있으므로 과루인의 다양한 리보솜 불활성화 단백질들이 혈관신생을 조절할 가능성도 탐색해보아야 한다²⁹). 또한 ESTK가 혈관내피세포와 암세포 간 상호작용을 구체적으로 어떻게 조절할 수 있는지 공배양(co-culture) 방식을 통해 조사할 필요가 있다. 암세포 내에서 ESTK에 의해 발현이 억제된 다양한 혈관신생 촉진인자 중 실제로 어떤 인자가 혈관내피세포의 혈관신생작용을 조절할 수 있는지 밝힌다면 향후 ESTK를 활용하고 개발하는 데 일조할 것이다.

결 론

과루인 에탄올추출물(ESTK)의 혈관신생 조절작용에 대한 연구 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. ESTK는 HUVEC 인체 혈관내피세포의 이동과 관 형성을 농도의존적으로 억제하였으며, 이는 VEGFR2의 인산화 억제를 통해 매개되었다. 또한 ESTK는 H1299 인체 폐암세포주에서 혈관신생 촉진인자들의 발현을 감소시켰다. 이러한 결과는 ESTK의 양방향 작용을 의미하는 것으로서 ESTK가 종양미세환경 내 혈관내피세포와 암세포를 동시에 조절하여 효과적으로 혈관신생을 저해할 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 우수신진연구(No. NRF-2021R1C1C100506211)의 사업비로 수행되었음.

References

- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(1):7-33.
- Statistics Korea. Available from: http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=2770
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
- Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36:321-31.
- Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15:102-11.
- Prager GW, Poettler M. Angiogenesis in cancer. *Basic mechanisms and therapeutic advances.* *Hamostaseologie.* 2012;32(2):105-14.
- The Jointly Published Textbook Compilation Committee of Oriental College of Medicine Nationwide Department. *Herbology.* Seoul: Younglim press; 2004.
- Hou Z, Zhu L, Meng R, Wang B. Hypolipidemic and antioxidant activities of *Trichosanthes kirilowii* maxim seed oil and flavonoids in mice fed with a high-fat diet. *J Food Biochem.* 2020;44(8):e13272.
- Hu Z, Zhou H, Zhao J, Sun J, Li M, Sun X. Microwave-assisted extraction, characterization and immunomodulatory activity on RAW264.7 cells of polysaccharides from *Trichosanthes kirilowii* Maxim seeds. *Int J Biol Macromol.* 2020;164:2861-72.
- Park SM, Jeon SK, Kim OH, Ahn JY, Kim CH, Park SD, Lee JH. Anti-tumor effects of the ethanolic extract of *Trichosanthes kirilowii* seeds in colorectal cancer. *Chin Med.* 2019;14:43.
- Maj E, Papiernik D, Wietrzyk J. Antiangiogenic cancer treatment: the great discovery and greater complexity (Review). *Int J Oncol.* 2016;49:1773-84.
- Kendall RL, Wang G, DiSalvo J, Thomas KA. Specificity of vascular endothelial cell growth factor receptor ligand binding domains. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 201:326-30.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:359-71.
- Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res.* 2007;100(6):782-94.
- Katoh M. FGFR inhibitors: Effects on cancer cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis (Review). *Int J Mol Med.* 2016;38(1):3-15.
- Parmar D, Apte M. Angiopoietin inhibitors: A review on targeting tumor angiogenesis. *Eur J Pharmacol.* 2021;899:174021.
- Nguyen QD, De Falco S, Behar-Cohen F, Lam WC, Li X, Reichhart N, Ricci F, Pluim J, Li WW. Placental growth factor and its potential role in diabetic retinopathy and other ocular neovascular diseases. *Acta Ophthalmol.* 2018;96(1):e1-e9.
- Ostman A. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(4):275-86.
- Gao X, Xu Z. Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008;40(7):619-24.
- Ogami K, Yamaguchi R, Imoto S, Tamada Y, Araki H, Print C, Miyano S. Computational gene network analysis reveals TNF-induced angiogenesis. *BMC Syst Biol.* 2012;6 Suppl 2(Suppl 2):S12.
- LI X, Zhao A, Yang J, Qian J, Chen L. Study on Role of Mucin 5AC in Malignant Tumors Based on Theory of "Body Fluid" and "Phlegm and Retained Fluid". *Liaoning J Trad Chin Med.* 2020;8:51-4.
- Li Y, Li D, Chen J, Wang S. A polysaccharide from *Pinellia ternata* inhibits cell proliferation and metastasis in human cholangiocarcinoma cells by targeting of Cdc42 and 67kDa Laminin Receptor (LR). *Int J Biol Macromol.* 2016;93(Pt A):520-5.
- Hosny S, Sahyon H, Youssef M, Negm A. *Prunus Armeniaca* L. Seed Extract and Its Amygdalin Containing Fraction Induced Mitochondrial-Mediated Apoptosis and Autophagy in Liver Carcinogenesis. *Anticancer Agents Med Chem.* 2021;21(5):621-9.

24. Kim DW, Lee JH, Yoo HS, Cho JH, Lee YW, Son CH, Cho CK. Effects of *Trichosanthes kirilowii* Extract against Angiogenesis and Various Tumor Cells' Growth. *Korean J Orient Int Med.* 2008;29(2):490-9.
25. Hwang WK. Identification for TLC pattern analysis of the crude drugs (II). Ministry of Food and Drug Safety. 2013. p28
26. Zhoh CK, Uhm TY, Kim JC. Antioxidative Effectiveness of *Trichosanthes Kirilowii* Maximowicz Extracts, *J Korean Ind Eng Chem*, Vol18, No. 6, 2007, 625-9.
27. Dat NT, Jin X, Hong YS, Lee JJ. An isoaurone and other constituents from *Trichosanthes kirilowii* seeds inhibit hypoxia-inducible factor-1 and nuclear factor-kappaB. *J Nat Prod.* 2010;73(6):1167-9.
28. Ye X, Ng CC, Wong JH, Ng TB, Chan GH, Guan S, et al. Ribosome-inactivating Proteins from Root Tubers and Seeds of *Trichosanthes kirilowii* and Other *Trichosanthes* Species. *Protein Pept Lett.* 2016;23(8):699-706.
29. He D, Jin J, Zheng Y, Bruce IC, Tam S, Ma X. Anti-angiogenesis effect of trichosanthin and the underlying mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;430(2):735-40.