

새로운 혈관생성억제제인 KJ3가
동소이식 유방암 백서에서
신생혈관생성에 미치는 영향과 기전

연세대학교 대학원

의학과

변 창 규

새로운 혈관생성억제제인 KJ3가
동소이식 유방암 백서에서
신생혈관생성에 미치는 영향과 기전

지도 교수 지 훈 상

이 논문을 박사 학위 논문으로 제출함

2004년 6월 일

연세대학교 대학원

의학과

변 창 규

변창규의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 池勳商 인

심사위원 崔承勳 인

심사위원 楊宇翼 인

심사위원 崔勝皓 인

심사위원 羅善英 인

연세대학교 대학원

2004년 6월 일

감사의 글

1985년에 학교에 입학하여 외과 전공의 과정을 거쳐 외과전문의를 취득하고, 2001년에 연구강사를 마치면서 석사학위를 취득하고 국립경찰병원에 온지 벌써 3년이 넘었습니다. 학교를 떠나면서 마지막 학업을 끝내려고 대학원박사과정에 들어갔는데 학창시절처럼 어영부영 하는 중에 그래도 이렇게 감사의 글을 쓰게 되었습니다. 막상 학교 밖으로 나와서 이제는 나름대로 독립하였다고 생각은 들지만, 돌아보면 제 잘난 것은 하나도 없고 가족들과 은사님들의 덕인 것이 더 절실히 느껴집니다.

바쁘신 중에도 그저 어떻게든 박사를 만들어 주시려고 꼼꼼히 지도하고 챙겨주신 지훈상교수님, 최승훈교수님, 양우익교수님, 최승호교수님, 라선영교수님, 감사합니다.

의사로서 끊임없이 학문에 정진해야한다는 기본자세를 갖는다는 것은 당연하지만 재주가 없어 학문적인 장담은 할 수 없고, 지도해주신 선생님들이 학교에서 순수하게 학문을 대하듯이 그와 같은 자세로 의사로서, 공무원으로서 성심 성의껏 일해나갈 것만은 꼭 지켜나가겠습니다.

지훈상교수님, 최승훈교수님, 양우익교수님, 최승호교수님, 라선영교수님, 다시 한번 감사합니다.

그 동안 태어나서 지금까지 보살펴주신 아버지, 어머니, 그리고 사랑하는 아내 연호와 딸 윤수, 아들 선범이에게 이 논문을 바칩니다.

2004년 6월 가락동 58번지에서

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 재료	5
2. 실험방법	6
가. 혈관내피세포 생존 분석	6
나. 생체의 혈관내피세포 침습 검사	6
다. 생체의 모세관 형성 검사	7
라. 생체내 응모요막 검사	7
마. 동소이식 유방암 백서를 이용한 종양성장억제 검사	8
바. 백서 유방암 종피에서의 MMP-2와 MMP-9의 발현 측정	9
사. ELISA를 이용한 백서 VEGF의 측정	11
3. 통계 방법	11
III. 결 과	12
1. 세포독성을 보이지 않는 KJ3의 최적농도	12

2. 혈관내피세포 침습 억제 작용	13
3. 생체의 모세관 형성 억제 작용	14
4. 생체내 용모요막 검사에서의 신생혈관생성 억제작용	15
5. 동소이식 유방암 백서에서의 종양성장억제 효과	15
6. 백서 유방암 종피에서의 MMP-2와 MMP-9의 발현 정도	16
7. 백서 VEGF의 발현	18
IV. 고 찰	19
V. 결 론	25
참고문헌	26
Abstract	33

그림 차례

그림 1. KJ3의 농도와 BAEC의 생존률	12
그림 2. BAEC의 세포침습에 미치는 KJ3의 영향	13
그림 3. BAEC의 모세관 형성에 미치는 KJ3의 영향	14
그림 4. Zymography를 이용한 MMP-9와 MMP-2의 측정	17
그림 5. 각각의 약제로 처리한 백서 유방암의 VEGF 발현	18
그림 6. KJ3의 화학구조	21

표 차례

표 1. 용모요막의 신생혈관생성에 미치는 KJ3의 영향	15
표 2. 평균비교종양무게의 변화	16
표 3. 각 군에서의 MMP-9와 MMP-2의 발현	17

국문요약

새로운 혈관생성억제제인 KJ3가 동소이식 유방암 백서에서 신생혈관생성에 미치는 영향과 기전

새로운 혈관이 생기는 신생혈관생성은 종양의 성장과 전이에 중요한 기전으로, 이의 차단은 종양치료에 하나의 새로운 전략이 될 수 있다. 본 연구에서는 *Embellisia chlamydospora* KF208에서 추출한 KJ3의 신생혈관생성 억제작용을 생체의 및 생체내 검사를 통하여 검증하였고, 작용 기전을 알아보기 위하여 실험동물의 유방암에서 matrix-metalloproteinase(MMP)-2와 MMP-9, vascular endothelial growth factor(VEGF)의 발현을 측정하였다. 세포독성을 보이지 않는 KJ3의 최적농도를 구하기 위한 혈관내피세포 생존 분석은 trypan blue exclusion 방법을 이용하였다. 생체의 혈관내피세포의 신생혈관생성 억제작용을 검사하기 위하여 혈관내피세포 침습 및 생체의 모세관 형성 검사를 시행하였다. 생체내에서의 영향은 chick embryo의 용모요막을 이용하여 검사하였다. 백서에서 KJ3의 신생혈관생성 억제작용을 검사하기 위하여 C3H/HeJ 백서에서 FM3A 유방암을 이용하였다. 7주령의 암컷 C3H/HeJ 백서를 네 군(n=24)으로 나누어 FM3A 종양조직을 피하조직에 주입한 후, 생리식염수와 KJ3, fumagillin과 betulinic acid를 미리 FACS를 이용하여 구한 FM3A의 LD₅₀의 1/3 씩을 복강내로 0, 2, 4, 6 일째에 주입하고, 종괴의 크기와 백서의 무게를 측정하였다. 실험 7일째 백서를 희생하여 종괴를 얻은 후, zymography를 이용하여 MMP-2와 MMP-9의 활성을, ELISA를 이용하여 VEGF의 발현을 알아보았다. 혈관내피세포 생존 분석에서 KJ3 농도가 20 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서는 생존세포의 수가 95% 이상이었다. 생체의 혈관내피세포 침습 검사 결과 bFGF 30 ng/ml

에 의하여 유도되는 세포침습은 KJ3의 용량에 비례하여 억제되었다. 생체의 모세관 형성 검사에서도 bFGF 30 ng/ml 투여에 의하여 유도되는 모세관 형성이 KJ3 10 μ g/ml 투여에 의하여 억제되었다. 용모요막 검사에서 대조군은 10%의 억제율을 보인 반면 계란 1개당 KJ3 10, 100, 200 μ g이 투여된 군들에서는 각각 47, 64, 86%의 억제율을 보였다. C3H/HeJ 백서에 주입한 FM3A 종피에서는 양성대조군으로 사용한 fumagillin과 betulinic acid 투여군에서와 같이 KJ3 투여군에서도 종피 증식억제를 보였는데, 음성대조군과 비교시 종피주입 후 2, 4, 6일 모두 통계적으로 유의있는 감소를 보였다 ($p < 0.05$). MMP-2는 각 군 모두 발현이 없었으나, MMP-9는 대조군보다 KJ3, fumagillin, betulinic acid 투여군에서 유의있게 증가하였다 ($p < 0.05$). ELISA를 이용한 mouse VEGF 측정결과 KJ3와 betulinic acid 투여군은 대조군에 비하여 유의있게 감소한 VEGF의 발현을 보였으나 ($p < 0.05$), fumagillin 은 대조군과 비슷한 발현을 보였다. 결론으로, KJ3는 혈관내피세포의 침습과 모세관 형성을 억제하고, 용모요막의 혈관생성을 억제하며, 동소이식 유방암백서에서 종양의 성장 및 VEGF의 발현을 억제시켜 혈관생성억제제로서 종양치료에 사용 될 수 있는 가능성을 제시하였고, 종양의 MMP-9의 발현을 증가시켜 종양의 침습과 전이과정에도 관여할 수 있을 것으로 사료된다.



핵심 단어 : KJ3, 신생혈관생성억제, 유방암

새로운 혈관생성억제제인 **KJ3**가 동소이식 유방암 백서에서
신생혈관생성에 미치는 영향과 기전

< 지도교수 지훈상 >
연세대학교 대학원 의학과
변창규

I. 서 론

종양에서의 신생혈관생성(angiogenesis: growth of new capillary blood vessels)은 1971년 Judah Folkman^{1,2}이 그 기본개념 및 악성종양 치료에서의 가능성을 제시한 이후로 지난 30년간 실험실에서 광범위하게, 심층적인 연구가 진행되어온 주제이다. 70년대 당시 종양의 신생혈관생성에 대한 전통적인 생각은 (1) 괴사된 종양세포에 대한 숙주의 염증반응, (2) 종양에 해로운 숙주의 반응, 또는 (3) 퇴행하지 않은 이미 형성된 혈관이라는 것이었다³.

그러나, 현재 신생혈관생성에 대한 연구는 종양의 성장은 신생혈관생성에 의지(angiogenesis-dependent)한다는 가설에서 출발하여, 여러 신생혈관 유도인자들과 억제인자들을 발견하였고, 분자생물학적 방법과 유전학적 방법을 통해 그 역할이 확립되기에 이르렀으며, 이제 여러 가지 새로이 개발된 신생혈관생성 억제제가 임상에 적용되는 단계에 들어섰다.

악성종양의 치료에서 신생혈관생성이 중요한 이유는 첫째, 체내에서 종양이 발생할 경우 종양세포들이 새로운 혈관을 만들지 못하면 2 - 3mm 크기 이상으로는 커지지 않고 계속 같은 상태(dormant state)를 유지하나, 종

양세포에서 생성되는 유도인자(endogenous angiogenesis promoter)에 의하여 신생혈관이 생기게 되면 활발히 증식하고 전이를 하게 되므로 이 과정을 막는 것은 종양에 의한 숙주의 파괴를 막는데 결정적인 역할을 할 수 있을 것이라는 점이다^{1,4-6}. 둘째, 종양세포를 목표로 한 기존의 항암제치료는 종양세포들의 유전자적 불안정성에 의하여 약제내성이 빈번하게 생기나, 혈관내피세포를 목표로 한 항-신생혈관생성 치료(anti-angiogenic treatment)는 혈관내피세포의 유전적 변이가 거의 없어 약제내성이 생기는 경우가 없을 것^{7,8}이라는 점이다.

여러 가지 신생혈관생성을 억제하는 화학물질과 단백질들이 개발되었으며⁹⁻¹⁵, 새로운 신생혈관생성 억제제의 구조를 발견하는 것은 이에 대한 연구 뿐 아니라 더 새로운 신생혈관생성 억제제의 개발에도 중요한 참고가 된다.

최근 구조에 따른 미생물 대사산물에 대한 신생혈관생성 억제작용을 검사하여 새로운 물질을 찾게 되었으며, *Embellisia chlamydospora* KF208의 배양 추출물인 KJ3를 얻게 되었다. 본 연구자는 이 물질의 생물학적 특성 및 *in vitro*, *in vivo*에서의 신생혈관생성 억제작용을 알아보고, 이미 신생혈관생성 억제작용이 잘 알려진 fumagillin, betulinic acid와 비교하여 각 약제들을 투여한 백서의 유방암에서 matrix metalloproteinase(MMP)-2, MMP-9 및 vascular endothelial growth factor(VEGF)의 발현을 분석하여, 이 물질이 종양에 대한 새로운 항-신생혈관생성 전략(anti-angiogenic strategy)이 될 수 있는 가능성을 검증하고자 한다.

II. 대상 및 방법

1. 재료

사용약제: 본 연구에서 사용한 약제 중 KJ3와 betulinic acid는 세종대학교 생명공학과와 권호정 교수로부터 공여 받았으며, fumagillin은 Sigma 사(St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다.

시약 및 재료: Basic fibroblast growth factor (bFGF)는 Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA)에서 입수하였고, 배양액은 Life Technology (Grand Island, NY, USA), Matrigel은 Collaborative Biomedical Products (Bedford, MA, USA), Transwell chamber system는 Corning Costar (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였다.

세포주: 4 - 8회 배양된 bovine aortic endothelial cell (BAEC; ATCC, Manassas, Va, USA)은 MEM 배양액, 10% fetal bovine serum (FBS)으로 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

실험 동물: 5-6주령의 specific pathogen-free 암컷 C3H/HeJ 백서를 전문적으로 사육하는 회사에서 구입하여, 환경적응을 1-2주일 간 한 후 실험에 사용하였다. 쥐들은 23 ± 0.5°C, 55 ± 10% 상대습도와 12시간씩 교차하는 낮과 밤의 환경조건이 갖추어진 방에서 적당량의 고압멸균 소독된 수돗물과 실험실용 사료로 사육하였다.

2. 실험 방법

가. 혈관내피세포 생존 분석(endothelial cell viability assay)

세포독성을 보이지 않는 KJ3의 최적농도를 구하기 위하여 혈관내피세포 생존 분석은 trypan blue exclusion 방법을 이용하였다. BAEC를 24-well culture plate에 1.5×10^4 개씩 넣고 KJ3를 0, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 첨가하여 72시간동안 배양하였다. 72시간 후에 세포를 trypan blue로 처리하고 죽은 세포의 수를 세었다. 실험은 독립적으로 2번을 시행하였다.

나. 생체의 혈관내피세포 침습 검사 (*in vitro* endothelial cell invasion assay)

생체의 혈관내피세포의 신생혈관생성 억제작용을 검사하기 위하여 Kwon 등¹³이 개발한, 혈관내피세포 침습을 평가하는 방법을 사용하였다. 8.0- μm -pore-polycarbonate 필터가 있는 transwell chamber system을 이용하여 검사하였으며, 필터의 아래쪽은 gelatin 10 μl (1mg/ml)로 코팅하였고, 위쪽은 Matrigel 10 μl 로 코팅하였다. 1×10^5 개의 BAEC를 필터의 윗 부분에 위치시킨 후 37°C에서 18시간동안 배양하였다. 이때 BAEC를 각 군당 6 chamber씩 다섯 군으로 나누어 다음과 같이 약제를 투여하였다.

- 1) 대조군: bFGF (-) / KJ3 (-)
- 2) bFGF만 투여: bFGF (30 ng/ml) / KJ3 (-)
- 3) bFGF + KJ3: bFGF (30 ng/ml) / KJ3 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- 4) bFGF + KJ3: bFGF (30 ng/ml) / KJ3 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- 5) bFGF + KJ3: bFGF (30 ng/ml) / KJ3 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

이 후 세포를 methanol로 고정하고 hematoxylin/eosin으로 염색하였다. 세포의 침습은 전체 세포의 수와 필터의 아래쪽으로 이동한 세포를 광학현미경으로 100배의 배율에서 세어서 비교하였다.

다. 생체의 모세관 형성 검사 (*in vitro* capillary tube formation assay)

모세관 형성(capillary tube formation)은 신생혈관생성에서 혈관 내피세포 분화의 중요한 현상으로¹⁶, 신생혈관생성 억제를 검사하는 다른 생체의 검사로 모세관 형성을 KJ3가 억제하는 것을 검사하였다. 10 mg/ml의 Matrigel 150 μ l를 48-well culture plate에 37°C에서 두 시간 동안 반응시킨 후, 한 well당 1×10^5 개의 BAEC를 Matrigel 위에 놓고, 각각 6 well씩 세 군으로 나누어 다음과 같이 약제를 투여하였다.

- 1) 대조군: bFGF (-) / KJ3 (-)
- 2) bFGF만 투여: bFGF (30 ng/ml) / KJ3 (-)
- 3) bFGF + KJ3: bFGF (30 ng/ml) / KJ3 (10 μ g/ml)

이 후 세포와 모세관 형성을 광학현미경으로 100배에서 관찰하고 기록하였다.

라. 생체내 용모요막 검사 (*in vivo* chorioallantoic membrane assay)

생체내에서 KJ3의 신생혈관생성에 미치는 영향은 chick embryo의 용모요막(chorioallantoic membrane: CAM)을 이용하여 검사하였다. 수정된 달걀을 37°C에서 3일간 인큐베이터에 보관한 후, 용모요막과 난황란(yolk

sac)이 달걀껍질에서 떨어지도록 2 ml의 egg albumin을 제거하였다. 3.5일에 껍질을 구멍내어 막을 벗겨내었다. 수정 후 4.5일에 달걀을 4군으로 나누어 다음과 같이 각각의 약제를 함유한 cover slip을 CAM 표면에 부착하였다. 신생혈관생성 억제작용이 있다고 알려진 retinoic acid^{15,17}는 양성 대조군으로 사용하였다.

- 1) 음성대조군 (n=21)
- 2) 양성대조군 (n=20): retinoic acid 1 $\mu\text{g}/\text{egg}$
- 3) KJ3군 a) KJ3 10 $\mu\text{g}/\text{egg}$ (n=15)
 b) KJ3 100 $\mu\text{g}/\text{egg}$ (n=14)
 c) KJ3 200 $\mu\text{g}/\text{egg}$ (n=21)

2일 후 10%의 fat emulsion을 주입한 후 용모요막을 광학현미경으로 관찰하였다. KJ3와 retinoic acid로 처리한 cover slip과 아무 것도 처리하지 않은 cover slip의 혈관 수를 세어서 비교하였다.

마. 동소이식 유방암 백서를 이용한 종양성장억제 검사

백서에서 KJ3의 신생혈관생성 억제작용을 검사하기 위하여 C3H/HeJ 백서에서 자라는 FM3A 유방암을 이용하였다. FM3A 유방암 세포주를 실험실에서 키운 후 7주령의 암컷 C3H/HeJ 백서에 5×10^6 개씩 피하주사하여 유방암 종괴를 얻고, 종괴가 1cm 이상 커지면 무균적인 조작으로 종괴를 제거하고 이를 잘게 부수어 7주령의 암컷 C3H/HeJ 백서의 피하조직에 주입함으로써 종괴를 얻었다. 종괴의 크기가 5 mm (90 mg) 이상 되면 실험을 시작하였다. 종괴를 갖고 있는 C3H/HeJ 백서를 네 군으로 나누어 생리 식염수 및 세 가지 약제를 복강내로 0, 2, 4, 6일째 주입하였고 동시에 종괴의 크기와 백서의 무게를 측정하였다. 각 군의 백서는 6마리로 하였으며,

약제의 주입량은 미리 FACS를 이용하여 구한 FM3A의 LD₅₀의 1/3 씩을 주입하였다. LD₅₀은 KJ3 4.89 µg/ml, betulinic acid 3.99 µg/ml, fumagillin 3.00 µg/ml였다. 종피의 무게 W(mg) = 장경(mm) × 단경(mm)² × 0.5 의 수식을 이용하여 얻었으며, 첫날 종피 크기와 비교하여 각 군을 비교하였다. 종피를 주입한 첫날과 비교하여 얻은 실험군 평균비교종양무게 (T_{RW})와 대조군 평균비교종양무게(C_{RW})의 치료효과는 Battle Columbus Laboratories의 프로토콜^{18,19}에 따라 최대억제율(maximal inhibition rate: MIR)을 계산하여 비교하였다.

$$\text{MIR (\%)} = \left(1 - \frac{T_{RW}}{C_{RW}} \right) \times 100$$

$$\text{실험군 평균비교종양무게 (T}_{RW}\text{)} = \frac{\text{특정일의 종피무게 (T}_n\text{)}}{\text{시작일의 종피무게 (T}_0\text{)}}$$

$$\text{대조군 평균비교종양무게 (C}_{RW}\text{)} = \frac{\text{특정일의 종피무게 (C}_n\text{)}}{\text{시작일의 종피무게 (C}_0\text{)}}$$

약제 주입 후 7일째에 백서를 희생시켜 종피를 얻고 이 후 실험에 사용하였다. 이전 연구²⁰에서 신생혈관생성 억제제를 투여한 군들과 대조군간에 종피 주입 후 8일 이후에는 종피의 크기나 신생혈관생성 억제에서 차이가 없었기 때문에 본 연구에서는 처음 6일간의 결과만 얻었다.

바. 백서 유방암 종피에서의 MMP-2와 MMP-9의 발현 측정

MMP-2와 MMP-9의 발현은 gelatin zymography를 이용하여 측정하였다. 대조군과 각 각의 약제를 사용한 세 군에서 각 6개씩 총 24개의 종양 조직을 사용하였다.

양성 대조 세포주와 conditioned media 추출 및 농축: 실험에 사용된 양성 대조 세포주는 사람 섬유육종 세포주인 HT-1080 (ATCC CCL 121)

을 이용하여 MMP-2, 9의 대조세포주로 이용하였다. 75 cm² flask에 이들 세포가 90% 정도 자라면 배양액을 제거하고 PBS로 2회 세척 후 무혈청 Opti-Media (GIBCO, Grand Island, NY, USA) 20 ml에 넣어 48시간 동안 배양하였다. 48시간 동안 배양된 배양액을 모아 400g에서 10분간 원침 후 Centriprep centrifugal filter device (Millipore, Beverly, MA, USA)를 이용하여 60배까지 농축하였다. Bradford (Bio-rad, CA, U.S.A)법으로 단백질 정량 후 분주하고 -80°C에서 보관하여 실험 시 사용하였다.

Total cell lysate 추출: 75 cm² flask에 세포가 90% 정도 자라면 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 수확 후 PBS로 3차례 세척 후 lysis buffer (0.2M Tris-HCl (pH 8.5), 0.14M NaCl, 0.002M MgCl₂, 0.5% Nonidet P-40)를 넣었다. 이를 얼음 위에서 5분간 방치한 다음 4°C 14,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상층액을 취하여 단백질 정량 후 분주하여 -80°C에서 보관하였다.

Gelatin zymography: 세포주와 조직에서 gelatin 활성을 관찰하기 위하여 gelatin zymography를 시행하였다^{21,22}. 단백질 정량 후 동량의 단백질을 가진 sample을 4배의 non-reducing sample buffer (0.5M Tris-HCl, 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate(SDS) 4 ml, 0.1% bromophenol blue, 0.5ml glycerol, 2.0 ml 증류수)를 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 0.1%의 gelatin이 포함된 precast 10% acrylamide gel (Novex, San Diego, CA, USA)에서 전기 영동을 얼음이나 냉장실에서 2시간 정도 시행하였다. 전기 영동 후 gel를 2.5%의 Triton X-100에서 30분간 반응시켜 SDS를 제거 한 다음 developing buffer (50 mM Tris-base, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij, pH 7.6)에 넣어 37°C에서 18시간 동안 반응시켰고, 이때 반응 시간은 매 실험마다 일정하게 유지하였다. 반응이 끝난 gel를 Coomassie brilliant blue로 염색 후 methanol : acetic acid : DW (50:10:40) 에서

destain 하여 gelatin이 녹아 밝게 나타나는 band를 관찰하였다. Computer-assisted image analyzer (Bioprofile, vilber-Lourmat biotechnology, Marne La Vallee, Cedex, France)를 이용하여 band의 면적과 밀도를 측정하여 활성을 비교 분석하였다.

사. ELISA를 이용한 백서 VEGF의 측정

Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용한 백서 VEGF의 측정을 위해 생체 내에서 각 약제로 처리한 종양조직을 적출하여 총 단백을 추출하고 시료의 총 단백질 농도를 동일하게 정량하였다. 이 후 sandwich enzyme (Ab1-Ab2)으로 immunoassay하여 정량하였다. mouse VEGF에 specific 하게 binding 하는 항체(Ab1)를 96-well microplate에 coating하고 각각의 well에 standard, control, sample을 각각 넣어 결합시켰다. 이 때 standard를 잡아주는 이유는 비교 절대값으로써 sample의 수치를 비교하는 기준값을 정하기 위해서이다. 세척과정을 거쳐 결합되지 않은 항체(Ab1)와 시료를 제거한 후, 표지된 항체(Ab2)를 결합시켜 ELISA reader로 측정하여 실험군과 양성대조군, 음성대조군의 VEGF 농도를 측정하였다.

3. 통계 방법

결과들은 평균 \pm 표준편차 (S.D.)로 표시했다. 자료의 통계분석은 Student's *t*-test를 사용하였다. $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 세포독성을 보이지 않는 KJ3의 최적농도

혈관내피세포 생존 분석으로 세포독성검사를 하여 72시간 후에 세포를 trypan blue로 처리하고 죽은 세포의 수를 세었다. KJ3 농도가 20 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서는 생존세포의 수가 95% 이상이었다(그림 1). 이에 따라서 20 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서는 세포독성을 보이지 않는 것으로 판단하고 이후의 신생혈관 생성 분석에 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 사용하였다.

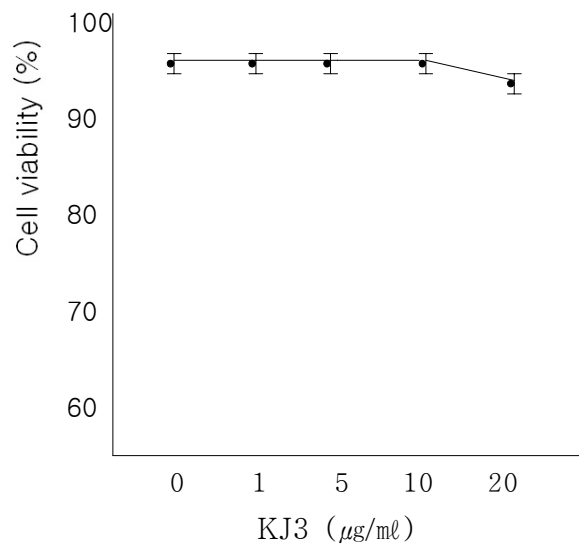


그림 1. KJ3의 농도와 BAEC의 생존율. BAEC를 다양한 농도의 KJ3 (0 - 20 $\mu\text{g/ml}$)로 처리 후 72시간 배양하였으며, 생존세포는 trypan blue로 처리 후 측정함. 각 실험은 두 번 반복함

2. 혈관내피세포 침습 억제 작용

세포이동 검사결과 bFGF는 효과적으로 세포 침습을 유도하여 필터를 지나가게 하였다. 그러나 KJ3는 1 - 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 농도에 비례하여 bFGF에 의하여 유도된 BAEC의 세포침습을 억제하는 것이 관찰되었다 (그림 2).

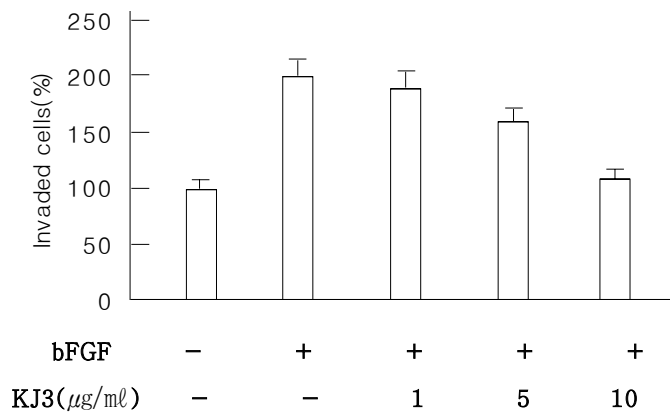


그림 2. BAEC의 세포침습에 미치는 KJ3의 영향. 각 1×10^5 개의 BAEC를 필터의 윗 부분에 위치시킨 후 다섯 군으로 나누어 약제를 투여함. 37°C에서 18시간 배양 후 필터의 아랫부분으로 이동한 세포를 광학현미경 ($\times 100$)으로 관찰함.

3. 생체의 모세관 형성 억제 작용

KJ3의 Matrigel상에서 모세관 형성에 미치는 영향을 검사하였다. bFGF가 없을 때에는 Matrigel 위의 BAEC는 불완전하고 좁은 관모양의 구조를 형성하였다(그림 3A). bFGF를 첨가하였을 때에는 모세관망이 형성되어서 길쭉하고 견실한 관모양의 구조를 형성하나(그림 3B), 여기에 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 KJ3를 가하면 bFGF의 작용을 효과적으로 차단하여 관모양의 구조가 생기지 않음을 보였다(그림 3C). 이때에 trypan blue를 넣어 보면 죽은 세포가 보이지 않아 KJ3의 작용이 세포독성이 아님을 알 수 있었다.

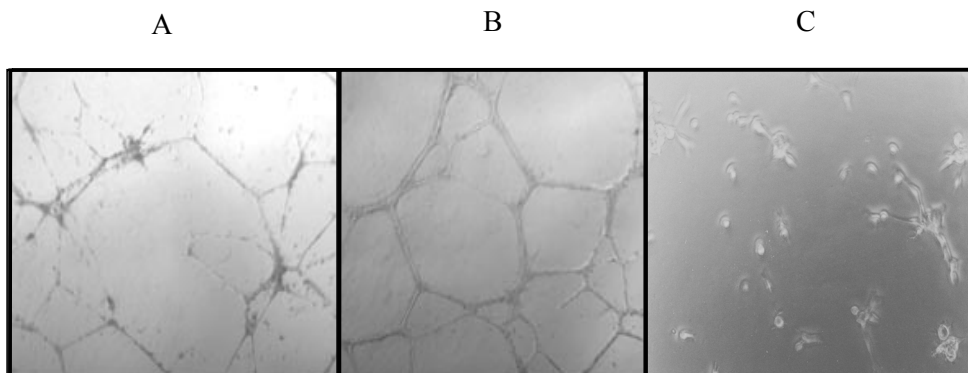


그림 3. BAEC의 모세관 형성에 미치는 KJ3의 영향. 1×10^9 cells/well의 BAEC에 A) bFGF와 KJ3를 모두 처리하지 않은 경우 B) 30 ng/ml의 bFGF만 처리 한 경우 C) 30 ng/ml의 bFGF와 함께 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 KJ3을 처리한 경우를 광학현미경 ($\times 100$)으로 관찰함.

4. 생체내 용모요막 검사에서의 신생혈관생성 억제작용

용모요막 검사법에서 retinoic acid에 의한 신생혈관생성 억제율은 85% (n=20) 였으며, 아무것도 처리하지 않은 cover slip은 10% (n=21) 의 신생혈관생성 억제를 보였다. KJ3는 기존 혈관에 어떤 독성작용도 보이지 않고 농도에 비례하여 신생혈관생성을 억제하였다(표 1).

표 1. 용모요막의 신생혈관생성에 미치는 KJ3의 영향

Drug	Inhibited / live egg	inhibition ratio (%)
Empty	2/21	10
Retinoic acid		
1 $\mu\text{g}/\text{egg}$	17/20	85
KJ3		
10 $\mu\text{g}/\text{egg}$	7/15	47
100 $\mu\text{g}/\text{egg}$	9/14	64
200 $\mu\text{g}/\text{egg}$	18/21	86

5. 동소이식 유방암 백서에서의 종양성장억제 효과

실험군과 대조군의 종괴의 무게는 2일 마다 비교하였다. C3H/HeJ 백서에 주입한 FM3A 종괴는 양성대조군으로 사용한 fumagillin과 betulinic acid 에서와 같이 KJ3에서도 종괴 증식억제를 보였는데, 종괴주입 후 2, 4, 6일 모두 통계적으로 유의있는 감소를 보였다 ($p < 0.05$)(표 2).

표 2. 평균비교종양무게의 변화

Day	Fumagillin	Betulinic acid	KJ3	Control
2	0.98 ± 0.21	0.99 ± 0.15	0.97 ± 0.17	1.82 ± 0.69
4	1.33 ± 0.18	1.28 ± 0.17	1.26 ± 0.15	2.15 ± 0.98
6	2.19 ± 0.41	2.12 ± 0.37	2.14 ± 0.49	3.63 ± 1.57

n=6, respectively

종괴를 주입한 첫날과 비교하여 얻은 T_{RW} (처치군)와 C_{RW} (대조군)의 치료효과는 Battle Columbus Laboratories의 프로토콜^{18,19}에 따라 최대억제율(maximal inhibition rate: MIR)로 구하여 비교하였다. Battle Columbus Laboratories의 프로토콜에 따르면, 종양의 성장이 감소되면 ($T_{RW} < 1.0$) “아주 효율적” 이라하며, 최대억제율이 58% 이상이면 ($MIR \geq 58\%$) “효율적”, 최대억제율이 58% 미만이면 ($MIR < 58\%$) “비효율적”이라 판정하는데, 세 약제 모두 종양의 증식억제에는 어느 정도 효과가 있었으나 MIR은 모두 50% 이하로 비효율적이었다.

6. 백서 유방암 종괴에서의 MMP-2와 MMP-9의 발현 정도

Zymography를 이용한 MMP-9과 MMP-2의 발현도를 보면 MMP-9은 대조군에 비하여 약제투여군에서 높게 나왔는데 이는 저농도에서 신생혈관생성을 억제하지만 MMP-9의 발현을 억제하지는 않는 양상이고, MMP-2의 경우는 대조군이나 실험군 모두에서 발현이 되지 않았다(그림 4, 표 3).

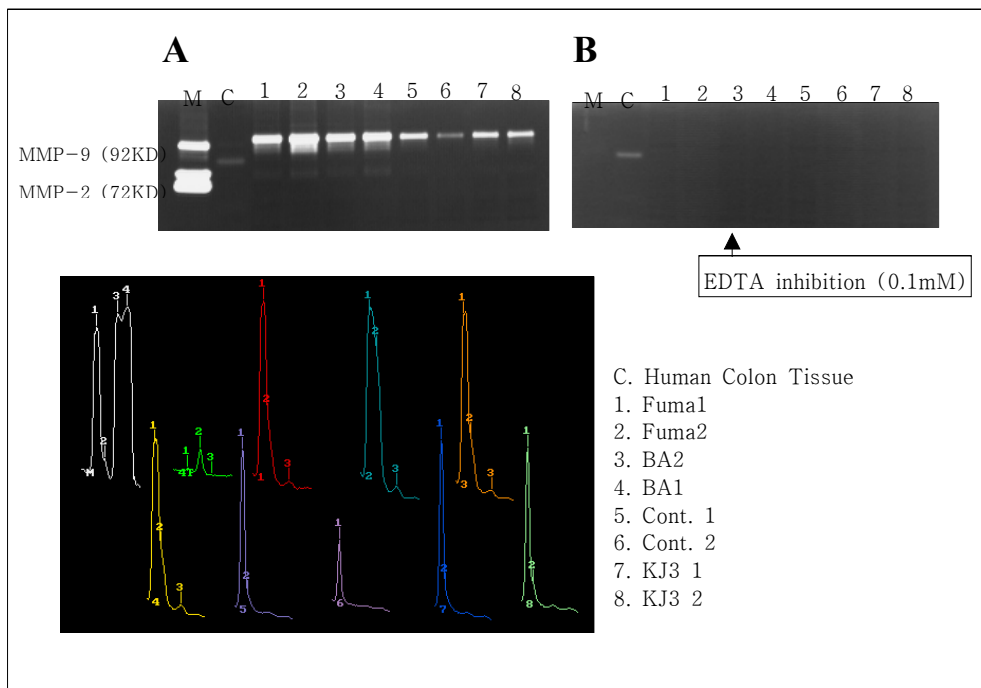


그림 4. Zymography를 이용한 MMP-9과 MMP-2의 측정. A) MMP-9 (92KD)은 선명한 밴드로 나타나나 MMP-2(72KD)는 거의 발견되지 않았고, B) EDTA로 처리시 모든 밴드가 사라지는 것으로 MMP임을 알수 있음.

표 3. 각 군에서의 MMP-9와 MMP-2의 발현

	Marker	Control	Fumagillin	Betullinic acid	KJ3
MMP-9					
Pro form (92 KD)	151	113	177	169.5	162
Active form (82 KD)	27	12	105.5	64.5	30
MMP-2					
Pro form (72 KD)	164	0	10	19	0
Active form (62 KD)	170	0	0	0	0

7. 백서 VEGF의 발현

ELISA를 이용한 mouse VEGF 측정결과 betulinic acid 와 KJ3는 대조군에 비하여 유의있게 감소한 VEGF 농도를 보였으나 ($p < 0.05$), fumagillin 은 대조군과 비슷한 농도를 보여 KJ3가 신생혈관생성 억제에 보다 효율적임을 보였다(그림 5).

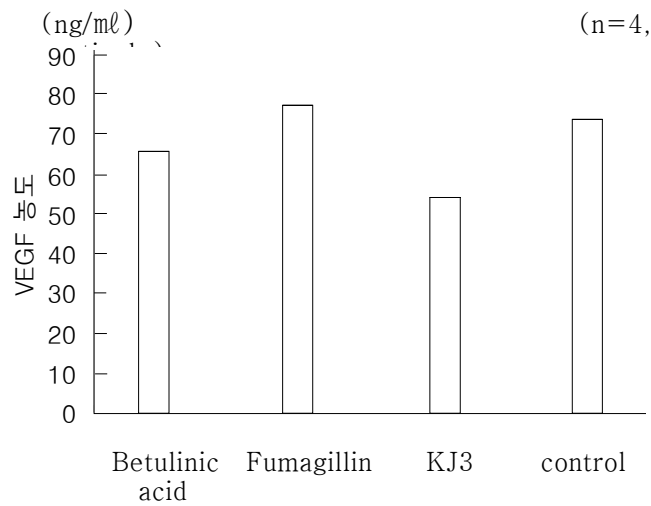


그림 5. 각각의 약제로 처리한 백서 유방암의 VEGF 발현. 대조군에 비하여 KJ3와 betulinic acid 투여군은 유의있는 VEGF 농도의 감소를 보였으나 ($p < 0.05$), fumagillin 처리군은 큰 차이가 없었음.

IV. 고 찰

종양에 혈관이 풍부하다는 것은 오래 전부터 수술 시 관찰되었지만²³, 단순히 기존에 존재하던 숙주의 혈관이 확장된 때문이라고 생각하였다. 그러나 1939년²⁴과 1945년²⁵에 발표된 두 논문에서 종양의 혈관은 새로운 혈관이 유도된 것이라는 제안이 있었다. 이 생각은 대부분의 연구자들이 받아들이지 않았다. 종양의 신생혈관생성에 대한 전통적인 생각은 (1) 괴사된 종양세포에 대한 숙주의 염증반응, (2) 종양에 해로운 숙주의 반응, 또는 (3) 퇴행하지 않은 이미 형성된 혈관이라는 것이었다¹. 종양이 신생혈관생성 물질을 만들어낸다는 가설이 1968년에 발표되었고^{26,27}, 1971년 Judah Folkman이 종양의 성장과 전이는 신생혈관생성-의존적(angio-genesis-dependant)이며, 따라서 신생혈관생성을 차단하는 것은 종양의 성장을 차단할 수 있는 전략이 될 수가 있다는 것을 제안하였다¹. 이러한 가능성에 자극을 받아 친-신생혈관생성 물질(pro-angiogenic molecule)과 항-신생혈관생성 물질(anti-angiogenic molecule)을 찾는 광범위한 조사가 진행되었다. 1976년에는 Gullino가 전암병소의 세포들이 신생혈관생성 능력을 얻는 과정에서 암성병소로 된다는 것을 보여주었다²⁸. 그는 이러한 개념이 암 예방 전략을 구상하는데 사용되어 질 수 있을 것이라고 제안하였으며, 이 가설은 나중에 유전적인 접근으로 입증되었다.

인간과 mouse 종양에서, 세포수준에서 적어도 4가지 신생혈관생성 스위치의 기전이 알려져 있다³: (1) 무혈관성 상피내암의 경우는 인접한 숙주의 혈관상(vascular bed)에서 신생혈관생성을 자극하여 자신의 혈액공급을 유지하는데, 이는 종양에서는 가장 흔한 형태이다. (2) 골수로부터 나와서 순환하고 있는 전구체 혈관내피세포가 신생혈관 병소로 결합해 들어간다. (3) 종양은 신생혈관생성 인자(예를 들면, vascular endothelial growth factor;

VEGF)의 과발현으로 숙주의 섬유아세포와 대식세포를 종양쪽으로 유도한다. (4) 기존에 있던 혈관들이 종양세포에 의하여 둘러 쌓인다. 신생혈관생성 스위치는 이런 기전들의 조합일 것이다. 일단 종양이 신생혈관생성 쪽으로 전환이 되면, 비-신생혈관생성 표현형으로 다시 돌아가는 경우는 드물다. Neuroblastoma와 retinoblastoma에 있어서도 종양이 자연 소실되는 경우는 많으나 저절로 신생혈관생성 능력이 소실되어 종양이 수축하는 경우는 아주 드물다. 신생혈관생성으로 전환이 된 후에는, 새로운 미세혈관들이 발생부위에 그대로 있는(*in situ*) 아주 작은 종양 쪽으로 모인다. 종양세포들이 각각의 새로운 혈관주위로 microcylinder나 perivascular cuff를 형성하면서 자란다. 1개의 혈관내피세포들은 대략 5개에서 100개 정도의 종양세포를 지원한다고 알려져 있다.

악성종양의 치료에서 신생혈관생성이 중요한 이유는 첫째, 체내에서 종양이 발생할 경우 종양세포들이 새로운 혈관을 만들지 못하면 2 - 3mm 크기 이상으로는 더 이상 커지지 않고 계속 같은 상태(dormant state)를 유지하며, 신생혈관들은 종양세포에서 유도인자들이 분비되기 시작하면 활발히 증식하여, 전이를 하게 되므로 이 과정을 막는 것은 종양에 의한 숙주(host)의 파괴를 막는데 결정적인 역할을 할 수 있을 것이라는 점이다^{1,4-6}. 둘째, 종양세포를 목표로 한 기존의 항암제치료는 종양세포들의 유전자적 불안정성에 의하여 약제내성이 빈번하게 생기나, 혈관내피세포를 목표로 한 항-신생혈관생성 치료는 혈관내피세포가 유전적으로 안정하여 변이가 거의 없어 약제내성이 생기는 경우가 없을 것^{7,8}이라는 점이다.

여러 가지 화학물질과 단백질들이 신생혈관생성을 억제하는 것으로 개발되었으며⁹⁻¹⁵, 새로운 신생혈관생성 억제제의 구조를 발견하는 것은 이에 대한 연구 뿐 아니라 그 물질을 변형하여 더 새로운 신생혈관생성 억제제를 개발하는데도 중요한 참고가 된다.

본 연구에서 실험한 KJ3(그림 6)는 *Embellisia chlamydospora* KF208에서 추출한 것으로 bicyclo 5-15-fused sesterterpene인 terpestacin이며, 처음에는 *Arthrinium* 종의 대사산물에서 분리되어 HIV감염시 $IC_{50}=0.46$ mg/ml의 농도에서 syncytium 형성을 억제한다고 알려졌다²⁹. 또한 이 물질은 *Bipolaris cynodontis*에서 phytotoxin인 bipolaroxin으로도 분리가 가능하다³⁰.

실험은 우선 세포독성을 보이지 않는 KJ3의 최적농도를 구하였으며, 20 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서 95% 이상의 세포가 살아 있었고, 이 후의 실험에서는 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 실험을 하였다.

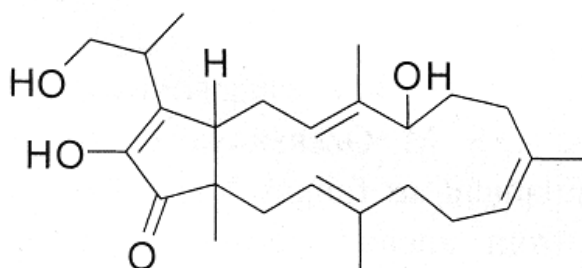


그림 6. KJ3의 화학구조 ($C_{25}H_{38}O_4$)

현재, 신생혈관생성 스위치를 움직이는 여러 신호들이 발견되었으며, 그런 것들에는 metabolic stress(저 pO_2 , 저 pH, 저혈당 등), mechanical stress(증식하는 세포들에 의하여 생기는 압력 등), 면역/염증 반응(조직에 침습하여 들어가는 면역/염증세포 등), 유전적 변이(신생혈관생성 조절자의 생산을 조절하는 종양유전자의 발현이나, 종양-억제 유전자의 결손 등)가 포함된다^{31,32}. 환경적인 기전과 유전적인 기전간의 상호작용이 어떻게 종양의 신생혈관생성과 성장에 영향을 미치는가 하는 것은 복잡하고 상당부분

이 미해결인 문제이다. 친-신생혈관생성 및 항-신생혈관생성 물질들은 종양세포, 혈관내피세포, 기질세포, 혈액, 그리고 세포외 기질 등에서 분비되며³³, 이것들의 상대적인 기여도는 종양의 종류와 종양의 부위에 따라서 뿐만 아니라, 종양의 성장, 위치, 재발 등에 따라서도 변하는 것으로 알려져 있다.

bFGF가 VEGF의 발현을 유도하며, *in vitro*에서 capillary tube formation을 상승적으로 자극하고, VEGF의 용해성 수용체인 Flk-1을 전신적으로 투여하면 각막에 이식된 bFGF에 의하여 유도된 각막의 신생혈관생성이 완전히 차단되는 등, bFGF의 기능의 일부는 VEGF에 의존적이라는 실험결과가 보고되었다. 이런 결과로 최근 임상에서 시도되고 있는 VEGF를 차단하는 신생혈관생성 억제제는 bFGF 또한 차단시킬 것으로 보인다³.

혈관내피세포의 침습은 이들의 이동과 전파에 중요한 과정이므로 이 과정을 억제하는 것이 신생혈관생성 억제제의 중요한 작용이다^{16,34}. 생체의 혈관내피세포 침습 검사에서는 먼저 bFGF를 투여하자 BAEC의 침습이 2배 이상 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이후 KJ3의 용량을 늘리면서 혈관내피세포의 침습이 용량에 비례하는 양상으로 줄어드는 현상을 보게 되었으며, KJ3 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 bFGF 30 ng/ml 의 효과를 거의 상쇄하는 작용을 관찰할 수 있었다.

종양의 신생혈관생성 과정에서 일반적으로 받아들여지고 있는 방법은 “endothelial sprouting(ES)”과 “intussusceptive microvascular growth (IMG)”이다. ES에 따르면 신생혈관의 생성은 모혈관의 기저막의 붕괴, 내피세포의 이주와 증식, tube formation(관형성), sprout와 loop들의 발생, 새로운 기저막의 생성, 그리고 pericyte 보충으로 진행된다³⁵⁻³⁸. IMG란 tissue pillar 또는 post라고 불리는 간질조직기둥(interstitial tissue column)이 혈

관 내강에 붙어서, 연이어 이 기둥들이 자라나고, 그 결과로 혈관 내강이 나누어지게 되는 혈관 네트워크 형성을 나타낸다^{35,38}.

생체의 모세관 형성 검사(*in vitro* capillary tube formation assay)는 생체내에서는 모혈관 기저막의 붕괴와 내피세포들의 이주가 진행된 다음 일어나는 단계인 관형성을 보는 검사로 정량적이지는 못하나, 쉽게 광학현미경으로 관찰할수 있고 정성적인 간편한 검사이다. 이 검사에서도 KJ3는 30 ng/ml의 bFGF의 영향을 차단시켰으며, 또한 이때에 trypan blue를 넣어 보면 죽은 세포가 보이지 않아 KJ3의 작용이 세포독성이 아님을 알 수 있었고, 이 두 가지 생체의 검사에서 bFGF의 작용을 효과적으로 차단시킴으로써 신생혈관생성 억제제로서의 가능성을 보여주었다.

한가지 주목할 점은, KJ3가 terpestacin으로 처음 *Arthrinium* 종에서 추출되었을 때는 HIV 감염시 $IC_{50}=0.46$ mg/ml에서 syncytium 형성을 억제하는 작용이 있는 것으로 알려져 있었는데²⁹, 이 농도는 본 실험에서 보인 bFGF의 작용을 억제하는 10 μ g/ml보다 아주 높은 농도로, KJ3의 생물학적 작용이 이 두 가지 농도에서 다르다는 것을 의미한다.

생체내 용모요막 검사는 개체의 발생단계에서 나타나는 정상적인 신생혈관생성에 대한 효과를 볼수 있는 검사로 KJ3는 용량에 비례하여 발생시 용모요막에서 일어나는 신생혈관생성을 억제하는 작용을 보였으며, VEGF에 의하여 유도되는 신생혈관생성 초기의 미세혈관의 투과성을 높이는 과정을 차단하는 것으로 알려진 retinoic acid^{15,17}와 비슷한 효과를 보였다.

백서를 이용한 전임상검사에서 KJ3는 기존의 신생혈관생성 억제제로 알려진 fumagillin이나 betulinic acid와 같이 백서에 이식한 종양의 성장을 억제하고, 종양내의 VEGF 농도를 떨어뜨리는 것을 보였다. 또한 체중이나 비장의 무게가 줄지 않아 좋은 연구 대상으로 밝혀졌다. 그러나 이전의 연구²⁰에서 KJ3는 다른 신생혈관생성 억제제와 마찬가지로 종양 이식 후 6일

이내에는 종양의 성장을 대조군에 비해 억제하나, 종양의 크기가 커진 8일 이후에는 억제능력이 떨어져, 다른 신생혈관억제제와 마찬가지로 해결해야 할 문제점을 나타내었다.

ES(endothelial sprouting)의 처음은, 종양의 전이와 마찬가지로, 혈관내피세포들이 그들을 둘러싸고 있는 기저막을 부수는 것으로 시작한다. 이 과정은 대개 혈관내피세포들이 만들어내는 단백분해능(proteolytic activity)에 의하여 수행된다. Metalloproteinase들이 혈관내피 기저막 분해에 중요한 역할을 한다. 그러므로, 거의 모든 MMP 억제제들은 신생혈관생성을 억제한다^{9,39}.

Matrix-metalloproteinase 중, 특히 MMP-2와 MMP-9은 주로 분해능력으로 종양의 신생혈관생성에 관여한다⁴⁰⁻⁴². 세포외 기질의 분해는 세포-기질 접촉과 세포-세포 접촉을 없애버려서 혈관내피세포 뿐만아니라 종양세포의 이주를 가져올 수 있다. 예를 들면, MMP-2에 의하여 Laminin-5(Ln-5)가 분해되면 혈관내피세포의 이주를 촉진하는 Ln-5 cryptic site의 노출을 가져온다^{40,41,43,44}.

그러나, MMP-활성은 언제나 종양의 신생혈관생성을 촉진하는 쪽으로만 작용하지는 않는다. 여러 세포외 기질의 조각(tumstatin, endostatin), plasminogen의 조각(angiostatin), MMP의 조각(PEX)이 종양 신생혈관생성에 억제적으로 작용한다^{9,45-53}. Collagen type IV의 $\alpha 3$ chain 조각인 tumstatin과 collagen type XVIII의 $\alpha 1$ chain의 조각인 endostatin의 작용 기전이 최근 알려지게 되었다⁵⁴. Tumstatin은 혈관내피세포의 증식을 억제하고 혈관내피세포의 세포고사(apoptosis)를 촉진함으로써, endostatin은 혈관내피세포의 이주를 억제함으로써 종양의 신생혈관생성을 억제한다. PEX의 기전은 아직 잘 알려지지 않았으나, *in vivo*와 *in vitro*에서 모두 다 신생혈관생성을 억제한다^{9,53}.

본 연구에서는 MMP-2는 백서의 동소이식 유방암에서는 큰 역할을 하지 못하는 것으로 나타났으며, MMP-9은 대조군에 비하여 종괴감소의 효과를 보인 약제투입 시 오히려 증가하는 양상을 보였는데, 이는 KJ3가 신생혈관생성의 첫 단계에서 MMP-9이 기저막을 분해시킨 후 신생혈관생성에 유리한 환경이 조성되어 MMP-9의 발현이 증가된 상태에서 혈관내피세포의 이주나 증식, 관형성 단계를 차단시키기 때문인지, 아니면 증가된 MMP-9에 의해서 세포외 기질의 분해산물들(tumstatin, endostatin)이 증가하여 항-신생혈관생성 억제작용을 하였는지, 또는 다른 기전이 작용하였는지는 알 수 없었다.

V. 결 론

이상의 실험 결과로 KJ3는 20 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서는 혈관내피세포에 독성을 보이지 않으면서, 생체외에서는 bFGF에 의하여 유도된 혈관내피세포 침습과 모세관 형성에 대한 억제작용을 보이며, 생체내에서는 용모요막의 신생혈관생성 억제작용을 나타내고, 동소이식 유방암 백서에서 종양 성장 감소 효과 및 VEGF 발현의 감소를 보여 혈관생성억제제로서 종양치료에 사용될 수 있는 가능성을 제시하였고, 종양의 MMP-9의 발현을 증가시켜 종양의 침습과 전이과정에도 관여할 수 있을 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *NEJM* 1971;285:1182-6.
2. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1985;43:175-203.
3. Folkman J. Angiogenesis. In: *Harrison's Textbook of Internal Medicine*, 15th edition. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, eds. New York: McGraw-Hill 2001;517-30
4. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other disease. *Nature* 2000;407:249-257.
5. Andre T, Chastre E, Kotelevets L, Vaillant JC, Louvet C, Balosso J. Tumoral angiogenesis: physiopathology, prognostic value and therapeutic perspectives. *Rev Med Interne* 1998;19:904-913.
6. Battegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995;73:333-346.
7. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997;390:404-7
8. Kerbel RS. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bio Essays* 1991;13:31-36.
9. Cao Y. Endogenous angiogenesis and their therapeutic implications. *Int J Biochem cell Biol Med* 2001;33:357-369.

10. Damato R, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:4082–4085.
11. Deplanque G, Harris AL. Anti-angiogenic agents; clinical trial design and therapies in development. Eur J Cancer 2000;36:1713–1724.
12. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamatu T, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. Nature 1990;348:555–557.
13. Kwon HJ, Shim JS, Kim JH, Cho HY, Yum DY, Lee SK, et al. Betulinic acid inhibits growth factor-induced *in vitro* angiogenesis *via* the modulation of mitochondrial function in endothelial cells. Jpn J Cancer Res 2002;93:417–425.
14. Shim JS, Kim DH, Jung HJ, Kim JH, Lim DY, Lee SK, et al. Hydrazinocurcumin, a novel synthetic curcumin derivative, is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation. Bioorg Med Chem 2002;10:2987–2992.
15. Kwon HJ, Kim MS, Kim MJ, Nakajima H, Kim KW. Histone deacetylase inhibitor, FK228, inhibits tumor angiogenesis. Int J cancer 2002;97:290–296.
16. Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. Trends Biochem Sci 1997;22:251–256.
17. Pal S, Iruela-Arispe ML, Harvey VS, Zeng H, Nagy JA, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Retinoic acid selectively inhibits the vascular permeabilizing effect of VPF/VEGF, an early step in the angiogenic cascade. Microvasc Res 2000;60:112–20.

18. Ovejera AA, Houchens DP, Barker AD. Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. *Ann Clin Lab Sci* 1978;8:50-6.
19. Geran RI, Greenberg NH, Macdonald MM, Abbott BJ. Modified protocol for the testing of new synthetics in the L1210 lymphoid leukemia murine model in the DR&D program, DCT, NCI. *Natl Cancer Inst Monogr* 1977;45:151-3.
20. Choi SH, Lee JH, Hwang EH. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by KJ3, betulinic acid, and fumagillin in mouse neuroblastoma. *J Kor Assoc Pediatr Surg* 2002;8:101-106.
21. Huessen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulphate and co-polymerized substrates. *Ann Biochem* 1980;102:196-202.
22. RHA SY, Lim JH, Roh JK, Lee KS, Min JS, Kim BS, et al. Sequential production and activation of matrix-metalloproteinase-9 (MMP-9) with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat* 1997;43:175-181.
23. Goldman E. The growth of malignant disease in man and lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 1907;170:1236-1240.
24. Ide AG, Baker NH, Warren SL. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Radiol* 1939;42:891-899.
25. Algire GH, Chalkley HW. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst USA*

- 1945;6:73–85.
26. Greenblatt M, Shubik P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 1968;14:111–124.
 27. Ehrmann RL, Knoth M. Choriocarcinoma: transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch studied by light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst* 1968;14:1329–1341.
 28. Gullino PM. Angiogenesis and oncogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1978;61:639–643.
 29. Oka M, Iimura S, Tenmyo O, Sawada Y, Sugawara M, Ohkusa N, et al. Terpestacin, a new syncytium formation inhibitor from *Arthrinium* sp. *J antibiot* 1993;46:367–373.
 30. Sugawara F, Strobel G, Fisher LE, Van Duyne GD, Clardy J. Bipolaroxin, a selective phytotoxin produced by *Bipolaris cynodontis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:8291–4.
 31. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000;21:505–515.
 32. Carmeliet P. Controlling the cellular brakes. *Nature* 1999;401:657–658.
 33. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998;94:715–725
 34. Kuwano M, Fukushi J, Okamoto M, Nishie A, Goto H, Ishibashi T, et al. Angiogenesis factors. *Intern Med* 2001;40:565–572.
 35. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during

- angiogenesis. *Microvasc Res* 1997;14:53–65.
36. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res* 1986;46:467–473.
 37. Paku S, Paweletz N. First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab Invest* 1991;65:334–346.
 38. Patan S, Munn LL, Jain RK. Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1996;51:260–72
 39. Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, Kamps WA, De Bont ES. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)–2 and MMP–9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;50(2):87–100.
 40. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:960–970.
 41. Stetler–Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999;103:1237–1241.
 42. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001;7:14–23.
 43. Giannelli G, Falk–Marzillier J, Schiraldi O, Stetler–Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloprotease–2 cleavage of laminin–5. *Science* 1997;277:225–228.
 44. Seftor REB, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LM, Bilban M, et al. Cooperative interactions of laminin 5 γ 2 chain, matrix metalloproteinase–2, and membrane type–1 matrix

metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 2001;61:6322–6327.

45. Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, Maeshima Y, Hopfer H, Takahashi K, et al. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res* 2000;60:2520–2526.
46. Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, Hopfer H, Ramchandran R, Torre A, et al. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem* 2000;275:1209–1215.
47. Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, Holthaus KA, Grunkemeyer JA, Ericksen MB, et al. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem* 2000;275:21340–21348.
48. Marneros AG, Olsen BR. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol* 2001;20:337–345.
49. Moser TL, Stack MS, Wahl ML, Pizzo SV. The mechanism of action of angiostatin: can you teach an old dog new tricks? *Thromb Haemost* 2002;87:394–401.
50. O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, Folkman J, Moses MA. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biol Chem* 1999;274:29568–29571.
51. Gately S, Twardowski P, Stack MS, Cundiff DL, Grella D, Castellino FJ, et al. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10868–10872.

52. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;79:315–328.
53. Bello L, Lucini V, Carrabba G, Giussani C, Machluf M, Pluderi M, et al. Simultaneous inhibition of glioma angiogenesis, cell proliferation, and invasion by a naturally occurring fragment of human metalloproteinase-2. *Cancer Res* 2001;61:8730–8736.
54. Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J, Zeisberg M, Kalluri R. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4766–4771.

Abstract

Effects and mechanism of KJ3, a new angiogenesis inhibitor, on angiogenesis in orthotopic breast cancer mouse model

Chang Gyoo Byun

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Hoon Sang Chi)

Because angiogenesis or the formation of new blood vessels plays an important role in pathologic processes such as the growth and metastasis of tumors, blocking of this process may be a new strategy of cancer treatment. In this study, we evaluated the anti-angiogenic activity of KJ3, a new agent extracted from *Embellisia chlamydospora* KF208, by using *in vitro* and *in vivo* tests. The mechanism of this agent was also investigated by measuring the expression of matrix-metalloproteinase(MMP)-2, MMP-9 and vascular endothelial growth factor(VEGF) in experimental breast cancer animals. Trypan blue exclusion method was used for endothelial cell viability assay. Endothelial cell invasion assay and capillary tube formation assay were performed to evaluate the *in vitro* activity of anti-angiogenic effects. Chorioallantoic membrane(CAM) assay using chick embryo was examined for *in vivo* activity. C3H/HeJ mice with FM3A breast cancer cell lines were used to examine the anti-angiogenic activity of KJ3 in mice. 7 week old female C3H/HeJ mice were divided into 4 groups (n=24), and FM3A tumor tissues were inoculated in the subcutaneous area. Normal saline, KJ3, fumagillin and betulinic acid were injected

intraperitoneally with a third of LD₅₀, determined by FACS analysis. The size and weight of tumors and mice were measured on day 0, 2, 4 and 6. After sacrificing the mice, tumor masses were obtained, and MMP-2 and MMP-9 expression were measured by zymography and VEGF expression by ELISA. In endothelial cell viability assay, more than 95% of cells were viable under 20 $\mu\text{g/ml}$ of KJ3. In endothelial cell invasion assay, cell invasion induced by 30 ng/ml bFGF was suppressed gradually by KJ3 in dose dependent manner. *In vitro* capillary tube formation assay showed that 10 $\mu\text{g/ml}$ of KJ3 suppressed the tube formation of endothelial cells which was induced by bFGF 30 ng/ml . In CAM assay, control group showed 10 % inhibition rate whereas KJ3 inoculated groups with 10, 100, 200 $\mu\text{g/egg}$ showed 47, 64, 86 %, respectively. KJ3 treated group in CeH/HeJ mice with FM3A tumors, as well as the positive control groups treated with fumagillin and betulinic acid, showed statistically significant tumor growth inhibition effect on day 2, 4, and 6 ($p < 0.05$). MMP-9 expression was increased significantly in KJ3, fumagillin, and betulinic acid treated groups compared with negative control group ($p < 0.05$), but MMP-2 expression was not. KJ3 and betulinic acid treated groups showed significantly decreased expression of VEGF ($p < 0.05$). In conclusion, KJ3 showed inhibitory effects to endothelial cell invasion, capillary tube formation, vascular formation in CAM, tumor growth and expression of VEGF, and so possibility of using as an angiogenesis inhibitor in tumor treatment. It also showed increased tumor expression of MMP-9 and may be related with tumor invasion and metastasis.



Key Words : KJ3, Antiangiogenesis, Breast cancer