

인간제대정맥내피세포에서
brazilein의 혈관신생 억제 효과

연세대학교 대학원
의 학 과
이 향 아

인간제대정맥내피세포에서
brazilein의 혈관신생 억제 효과

지도 정 인 배 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2004년

6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 향 아

이향아의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2004년 6월 일

감사의 글

부족한 저에게 대학원에서 배움을 더 견고케 하여주신 하나님께 감사드립니다. 산모와 환자를 보는 일에 이론적 뿐만 아니라 실제적으로도 눈을 뜨게 하여 주신 정인배 지도교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 늘 관심을 아끼지 않으시고 사랑으로 지도하여 주신 차동수 교수님, 한혁동 교수님, 이영진 교수님, 최성진 교수님께 감사드립니다. 힘들 때마다 응원해 주며 동거 동락한 산부인과 전공의들과도 기쁨을 함께 하고 싶습니다. 실험에 대한 개념이 부족한 저에게 실험을 계획하고, 논문을 완성하는 모든 과정을 도와주신 생화학 교실 최종환 교수님, 이현우 선생님께 감사드립니다. 좋은 벗들인 내분비 내과 이연 선생, 산부인과 한경희 선생, 늘 따뜻한 마음으로 함께 해준 김상하 선배님 가족, 우선씨 유영이에게도 고맙다는 말을 꼭 전하고 싶습니다. 딸자식 뒷바라지 하시느라 많이 늙으신 사랑하는 아버지, 어머니, 동생 태훈이, 늘 죄송스러운 마음뿐인 시부모님께 감사드립니다. 마지막으로 가장 좋은 선배이자 인생의 동반자인 남편 이봉기 선생과 매일 아침 엄마 화이팅을 외치는 딸 유진이에게 사랑한다는 말을 하면서 감사의 말을 맺습니다. 앞으로 더 좋은 의사가 되는 일에 늘 최선을 다하겠습니다.

2004년 6월

저자 씀

차 례

차 례	i
그 립 차 례	iii
국 문 요 약	iv
제1장 서 론	1
제2장 재료 및 방법	5
2. 1. 혈관신생 저해제의 정제 및 동정	5
2. 2. 인간제대정맥내피세포의 배양	5
2. 3. 인간제대정맥내피세포의 형태에 미치는 영향	6
2. 4. 인간제대정맥내피세포의 이동에 미치는 영향	6
2. 5. 인간제대정맥내피세포의 침윤에 미치는 영향	7
2. 6. 관형성에 미치는 영향	7
2. 7. 젤라틴 자이모그램	8
2. 8. 인간제대정맥내피세포의 증식 억제 효과	8
2. 9. 인간제대정맥내피세포의 세포사멸	9
제3장 결 과	10
3. 1. 인간제대정맥내피세포의 세포 형태에 미치는 영향	10
3. 2. 인간제대정맥내피세포의 이동 억제 효과	10
3. 3. 내피세포 침윤 억제 효과	10
3. 4. 맥관형성 억제 효과	14
3. 5. 혈관내피세포의 MMP-2 분비에 미치는 영향	14
3. 6. 인간제대정맥내피세포의 증식 및 사멸에 대한 효과	17
3. 7. 인간제대정맥내피세포의 세포사멸	17
제4장 고 찰	20
결 론	24
참고문헌	25

ABSTRACT 31

그림 차례

그림 1. 인간제대정맥내피세포의 형태에 미치는 brazilein의 영향	11
그림 2. Brazilein의 인간제대정맥내피세포 이동 억제	12
그림 3. Brazilein의 인간제대정맥세포 침윤 억제	13
그림 4. Brazilein의 인간제대정맥세포 관형성 억제	15
그림 5. 인간제대정맥내피세포에서 brazilein의 MMP-2 발현 억제	16
그림 6. Brazilein의 인간제대정맥세포 증식 억제	18
그림 7. DNA 절편가닥 사진	19

국 문 요 약

인간제대정맥내피세포에서 brazilein의 혈관신생 억제 효과

암치료 등에 이용할 수 있는 혈관신생 저해제를 탐색하던 중에 소목 (*Caesalpinia sappan*)의 추출물이 혈관신생 억제에 효과가 있는 성분을 함유하고 있음을 발견하였으며, 소목에서 유래한 물질들에 대한 항암효과나 항혈관신생에 대한 연구가 보고된 바 없어 본 연구에서 소목을 연구의 소재로 선택하였다. 소목의 메탄올 추출물에서 혈관내피세포의 성장 및 맥관형성을 억제하는 활성부분을 크로마토그래피법과 재결정으로 순수하게 분리하여 분자량이 264인 brazilein임을 확인하고 본 실험에 사용하였다. Brazilein의 혈관신생 억제효과는 인간제대정맥내피세포 (Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)에 대한 성장, 이동, 침윤, 관형성 및 MMP-2 생산 등에 대한 억제능력으로 평가하였다.

인간제대정맥내피세포에 3-5 ug/ml 정도의 brazilein을 처치하고 24 시간이 지난 후 관찰한 결과 세포가 위축되어 세포와 세포사이에 분리가 일어났으며, 48 시간 후에는 대부분의 세포가 심하게 위축되어 사멸하는 것을 관찰할 수 있었다. 혈관신생 과정에서 내피세포의 이동, 국부적인 침윤, 관형성 등은 혈관신생의 중요요소로 brazilein이 혈관신생에 필요한 다단계 과정에 미치는 영향을 *in vitro* 혈관신생 측정 방법들을 사용하여 조사한 결과 혈관내피세포의 성장, 이동, 침윤, 관형성 등을 효과적으로 억제하였다. Brazilein이 각종 세포성장인자들에 의하여 유도되는 혈관내피세포의 이동과 침윤을 억제하였으며, matrigel 상에서 혈관내피세포의 관형성을 저해하였다. MMPs 중에서 특히 MMP-2는 기저막을 분해하여 내피세포의 침윤을 촉진하는 등 혈관신생 과정에서 중요한 역할을 담당할 뿐 아니라 내피세포의 맥관형성이 MMP-2 활성화에 의존적이라고 알려져 있다. 따라서 젤라틴 자이모그램 분석 방법을 이용하여 조사한 결과 혈관내피세포들이 분비하는

MMP-2의 분비가 *brazilein* 처리로 저하되었다. 이 결과는 *brazilein*이 나타내는 혈관내피세포의 침윤과 맥관형성 억제력이 어느 정도는 MMP-2 분비의 억제와 관련이 있을 것으로 판단된다. 혈관신생의 가장 중요한 단계 중의 하나는 내피세포의 성장으로 인간제대정맥내피세포에 대한 *brazilein*의 IC₅₀는 2.3 ug/ml 정도로 낮은 농도에서 강력하게 혈관내피세포 성장을 억제하였다. *Brazilein*은 내피세포 성장을 억제하는 농도에서 세포독성을 나타내었고, 혈관내피세포에 *brazilein*을 처리하면 세포자연사에서 나타나는 전형적인 DNA 절편화가 관찰됨으로 *brazilein*에 의한 항혈관신생 효과는 혈관내피세포의 세포자연사 유도에 의한 효과가 중요한 요소임을 알 수 있었다.

결론적으로 소목에서 강력한 혈관신생 저해제인 *brazilein*을 분리하였으며, *brazilein*은 인간제대정맥세포의 이동, 침윤, 맥관형성, MMP-2의 생산 등을 억제하여 혈관신생 억제제로서의 가능성을 확인하였다.

핵심되는 말 : 브라질레인 (*Brazilein*), 소목 (*Caesalpinia sappan*), 혈관신생 (Angiogenesis), 인간제대정맥내피세포 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell ; HUVEC), 암 (Tumor), 침윤 (Invasion), 이동 (Migration), 맥관형성 (Tube formation)

인간제대정맥내피세포에서 brazilein의 혈관신생 억제 효과

<지도 정 인 배 교수>

연세대학교 대학원 의학과

이 향 아

제1장 서 론

혈관신생은 태아발생기, 조직의 성장, 손상조직의 재생, 배란 등의 정상적인 생명현상에서 일어난다 (Arjan 등, 2000). 또한 암, 당뇨병 망막병증, 류마티스 관절염, Crohn 병, 건선, 자궁내막 증식증 및 지방축적 등의 질병으로 인한 병리적 현상으로 발생하기도 한다 (Arjan 등, 2000; Paleolog 등, 1999; Cao 등, 1999; Paleolog 등, 1999). 휴지기의 혈관세포는 세포증식에 수백일이 걸리나, 이들 질환에서는 혈관의 형성이 빠르게 일어나 과도한 조직의 성장이 질병의 원인이 된다. 반면 혈관형성이 부족할 경우에는 만성궤양, 상처치유의 지연, 선천성 기형, 허혈성 뇌졸중, 치매 등 노인성 질환의 발생과 관련이 있다 (Carmeliet 등, 1999; Carmeliet, 2000; Ferrara 등, 1999; Francesca 등, 2001). 오늘날 다양한 혈관신생에 관련된 요인들이 밝혀지고 있으나, 현재 과도한 혈관신생과 관련된 질환들의 근원적 치료법이 확립되지 못한 상황으로 혈관신생의 분자적 기전을 규명하고, 이에 근거한 새로운 치료법이 필요한 실정이다.

발암, 암전이 및 고형암의 성장에서 혈관신생이 진행되어 병변부위에 밀집된 혈관을 형성하여 암조직에 필요한 성장인자 및 영양분을 충분히 공급 할 수 있는 통로가 된다 (Folkman 등, 1971). 초기 원발암의 경우에 수밀리미터 이상으로

자라지 못하는데 초기암이 악성종양으로 발전하기 위하여 혈관신생이 반드시 동반 된다 (Douglas 등 1996, Gabriele 등, 1999; Gary 등, 2000). 따라서 발암 및 암전이 과정에 동반되는 혈관신생을 억제하면 암치료를 기대할 수 있다고 제안되었다 (Folkman, 1995 Hanahan 등, 1996). 즉 각종질환에서 혈관신생 저해제를 사용하고자 하는 목적은 병변부위의 혈관형성을 억제함으로써 영양분 및 성장인자의 공급을 줄여 과도한 이상조직의 증식을 억제하거나, 염증부위로 염증세포가 침투할 때 통로가 되는 혈관의 형성을 줄임으로써 염증을 줄이고자 함이 목적이다 (Andreas 등, 2002).

혈관신생과정은 복잡한 기전에 의하여 정교한 네트워크를 형성하고 있다. 혈관내피세포의 수용체에 혈관신생촉진인자가 작용하면 혈관내피세포를 증식시키고, 세포외 기질분해효소의 분비가 촉진되어 혈관내피세포가 유리되며, 혈관의 증식이 필요한 부위로 이동하게 되고 적절한 부위에 부착해서 혈관을 형성 한다 (Folkman, 1995; Carmeliet, 2000; Diand 등, 2001; Eileen 등, 1999). 이들 과정에서 각기 다른 단계에 작용하여 혈관신생을 촉진하거나 억제 할 수 있는 많은 인자들이 밝혀져 있어서 혈관신생은 매우 복잡하게 조절되고 있음을 알 수 있다. 혈관신생을 촉진하는 인자들로는 내피세포, 상피세포, 중배엽세포, 백혈구 및 종양세포 등이 생산하는 혈관 내피세포 성장인자 (vascular endothelial growth factor; VEGF), 상피세포 성장인자 (epidermal growth factor; EGF), 섬유상세포 성장인자 (fibroblast growth factor; FGF), 골로니형성 유도인자 (G-colony stimulating factor; G-CSF), 암 괴사인자 (tumor necrosis factor- α ; TNF- α), 간장세포 성장인자 (hepatocyte growth factor; HGF), 혈소판유래 성장인자 (platelet-derived growth factor; PDGF), angiogenin, interleukin 8 (IL-8), prostaglandin E1, prostaglandin E2, 등이 알려져 있다 (Shawver 등, 1997, Gary 등, 2000). 저산소증이나 압력 등의 자극에 의하여 혈관형성을 유도하는 세포들은 각종 혈관신생 유도인자들을 생산하며, 동시에 혈관신생 억제인자들을 생산하여 두 종류의 물질들 간의 균형에 의해서 혈관신생이 결정된다 (Douglas 등, 1996). 혈관신생 과정을 단계별로 살펴보면 혈관신생의 초기에 혈관신생 유도인자들이 혈관내피세포의 수용체에 결합하면 수용체

tyrosine kinase가 활성화되면서 혈관신생이 시작된다. 자극 받은 내피세포는 증식하면서 세포부착물질들과 단백질분해효소 (특히 metalloproteinase; MMP-2, 9)의 생산이 증가하고, 이동과 분화가 진행되어 혈관신생이 이루어지게 된다. 이때 혈관벽이 이완되어 투과성이 증가되고 혈관내피세포들 간의 결합이 끊어지며 세포의 수축이 일어난다. 이 후 다양한 단백질 분해효소가 활성화 되어 기저막을 분해하고, 혈관내피세포들은 자극이 있는 방향의 혈관 주변조직으로 이동하여 루프를 형성하게 되며, 루프들이 분화하여 혈관망을 형성하게 된다 (Shawver 등, 1997).

Folkman이 항암제로의 개발가능성을 주장하면서 혈관신생 억제제에 대한 연구가 시작되었다 (Folkman, 1971). Angiostatin, endostatin 등 강력한 내인성 혈관신생억제제가 발견된 이후 암치료 등을 목적으로 다양한 혈관신생 억제제에 대한 연구가 성과를 거두고 있다 (Michael 등, 1997). Angiostatin은 동물실험에서 부작용이 없고 내성이 유발되지 않는 것으로 알려졌으나 임상에 사용하는 것이 불가능한 정도의 고용량이 필요하다. 또한 재조합 DNA 기술을 이용한 대량생산이 4개의 kringle 도메인에 있는 이황화결합이 정확히 이루어지지 않아 활성형을 얻는 것에 한계가 있다. 따라서 이러한 단점을 극복할 수 있는 약물을 개발하기 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 또한 과도한 혈관신생이 동반되는 망막증이나 관절염 등의 만성질환 치료에도 혈관신생 저해제가 유용한 치료물질로 기대되기 때문에 이들 질환의 치료제를 개발할 목적으로 혈관신생 저해제의 개발이 진행되고 있다 (Bussolino 등, 1997).

혈관신생 억제제는 작용기전에 따라 혈관내피세포의 증식 저해제, matrix 파괴 저해제, 내피세포 특이적 인테그린 저해제, 내피세포 생존에 관련된 신호전달 저해제, 혈관신생 촉진인자의 저해제 등으로 분류할 수 있다 (Bussolino 등, 1997). 이러한 저해제를 이용하여 혈관내피세포의 활성화, 증식 및 재편을 억제하여 혈관신생을 막을 수 있을 것으로 기대하고 있다. 현재 다양한 작용기전의 혈관신생 저해제 후보물질들에 대한 임상실험이 시도 되고 있으나 아직 임상에 상용화된 혈관신생 저해제는 없는 실정이다. 혈관신생의 다양한 생화학적 기전이 알려지면서 천연물 및 화학합성물 등에서 다양한 작용기전을 갖는 혈관신생

억제물질의 개발이 가능하게 되었다. 특히 단백질성 혈관신생 저해제의 단점을 보완한 혈관신생 저해제를 개발하기 위하여 다양한 생물자원에서 저분자 혈관신생 저해제의 탐색이 시도되고 있다.

우리나라에서 매년 십만 명 이상의 암 환자가 발생하고 절반 이상이 암으로 사망한다. 이는 전체 사망인구의 20% 정도로 사망원인 중에서 1위를 차지하고 있다. 기존의 치료법으로는 한계가 있어 새로운 암치료법의 개발이 절실히 요구된다. 현재 사용되는 항암제들은 대부분 세포독성을 나타내는 물질로 암세포와 더불어 정상세포에도 심각한 부작용을 초래한다. 암의 퇴치를 위하여 발암기전 등에 대한 많은 지식이 축적되었으나 아직도 효과적인 암치료법은 매우 부족한 실정이다. 암에 의한 사망의 약 70%는 암세포가 발암부위에서 다른 조직으로의 침윤이 일어나는 암전이가 직접적인 원인이 되는데 이때 혈관신생이 동반되어 암세포 성장에 필요한 영양성분 및 성장인자들의 공급이 가능하게 된다 (Folkman, 1971; Shawver 등, 1997). 그러므로 혈관신생을 억제하여 암의 전이를 억제하는 새로운 기전의 항암제를 개발하기 위한 일환으로 혈관신생 저해제의 개발이 활발히 진행되고 있다. 또한, 많은 안과질환에서 망막증이 동반되는데 이러한 망막증의 중요한 병리기전은 과도한 혈관신생이며 (Cao 등, 1999), 관절부위의 과도한 조직의 성장으로 인하여 발병하는 류마티스 관절염의 경우에도 과도한 혈관신생이 그 원인으로 지적되고 있다 (Paleolog 등, 1999). 따라서 생체에서 활성이 우수한 혈관신생 억제제를 개발한다면 암, 망막증 및 관절염 등의 만성질환에 유용한 치료물질로 활용이 기대된다.

암치료 등에 응용할 수 있는 저분자 혈관신생 억제제를 탐색하던 중에 소목 (*Caesalpinia sappan*)에서 인간제대정맥내피세포 (human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)의 증식억제 및 matrigel 상에서 관형성을 강력히 억제하는 물질을 분리정제하여 기기분석으로 brazilein임을 확인하였다. 본 연구에서 brazilein이 갖는 혈관내피세포의 증식 억제, 관형성 억제 및 침윤성 억제 등 혈관신생과 관련된 요소들의 억제 효과를 조사하고자한다.

제2장 재료 및 방법

2. 1. 혈관신생 저해제의 정제 및 동정

소목 (*Caesalpinia sappan*)의 목질부위를 한약재료상에서 구입하여 약물추출을 위한 재료로 사용하였다. 소목 200 g을 500 ml 메탄올로 70°C에서 8시간 동안 방치하여 추출하기를 3회 반복하였다. 메탄올 추출물과 물을 1:3 (v/v)으로 혼합한 후 동량의 에틸아세테이트로 2회 추출하여 에틸아세테이트 층을 분리하고 감압 농축하여 조추출물을 얻었다. 조추출물을 에틸아세테이트에 녹여 크로로포름과 1:1 (v/v)로 혼합한 후 크로로포름으로 충전된 실리카젤 [silica gel column, (30 mm × 90 cm)]에 크로로포름:메탄올 [15:1 (v/v)]로 용출 시키며 인간제대정맥내피세포의 성장을 억제하는 활성 부위를 모아 위와 동일한 조건에서 실리카젤 컬럼 크로마토그래피 (silica gel column chromatography)를 반복하였다. 활성부위를 감압 농축한 후 에틸아세테이트로 녹여 실온에서 4 시간 방치한 후 형성된 침전을 모아 에틸아세테이트로 세척하여 실온에서 건조하였다. 침전물을 70°C 메탄올에 녹여 증류수와 1:1 (v/v)로 혼합한 후 실온에서 방치하여 결정을 형성시켰다. 침전된 결정체를 수세한 후 동결건조하여 혈관신생 저해물질을 얻었다. 물질의 화학구조를 동정하기 위하여 electrospray ionization (ESI)-TOP 질량분석기로 질량을 측정하였으며, H¹-NMR로 분석을 시행하였다. 그 결과 Kim 등 (1997)이 보고한 바 있는 brazilein과 동일한 실험 결과를 얻어 본 실험에서 정제한 신혈관형성 저해제는 brazilein으로 동정하였다. 본 실험에서 위의 과정으로 분리하여 동정한 brazilein을 혈관신생 저해제로 사용하여 실험을 수행하였다.

2. 2. 인간제대정맥내피세포의 배양

인간제대정맥내피세포 (Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)는 3 passage까지 배양하여 판매하는 Clonetics사 (CC-2517, Bio Whittaker Inc., Walkersville, MD, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 인간제대정맥세포의 배양을 위한 배지는 혈관내피세포 성장인자, 및 섬유상세포 성장인자 등 여러 성장인자가 포함된 Clonetics EGM-2 (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA)을 사용하였다. EGM-2 배지에 이식한 6 passage 세포를 5% CO₂ 하에서 37℃로 24-48 시간 배양한 후 trypsin 처리하여 회수한 세포를 헤마토사이토메터로 계수하여 실험에 사용하였다.

2. 3. 인간제대정맥내피세포의 형태에 미치는 영향

24-well plate에 1×10^5 인간제대정맥내피세포를 이식하여 24 시간 배양한 후 5 ug/ml brazilein을 첨가한 배지 750 ul을 가하여 5% CO₂, 37℃에서 24 시간 또는 48 시간 더 배양하여 현미경으로 200배에서 관찰하였다.

2. 4. 인간제대정맥내피세포의 이동에 미치는 영향

Brazilein에 의한 인간제대정맥내피세포의 이동 (wound-migration) 억제효과를 측정하기 위해서 단일세포로 수거한 1×10^5 인간제대정맥내피세포를 EGM-2 배지 750 ul을 현탁하여 24-well plate에 접종하여 5% CO₂, 37℃에서 24 시간 배양하였다. 고무막대를 이용 중앙부위의 세포를 제거하고 이때 떨어져 나온 세포와 배지를 제거하였다. 세포가 제거된 부위에 대한 대조군은 세포를 제거하고 바로 40배 현미경으로 관찰하였고, 세포의 이동에 대한 대조군은 신선한 EGM-2 배지 750 ul을 가하여 24 시간 배양한 후 관찰하였다. 약물 처치군은 2 ug/ml 또는 4 ug/ml의 brazilein을 가하여 24시간 배양 후 관찰하였다. 세포가 잘 보이도록 하기 위하여 관찰하기 전에 300 ul의 crystal violet 용액 [메탄올:증류수

(1:4, v/v)]을 가하여 10 분 동안 실온에서 방치한 후 수세하여 세포를 염색한 후 현미경으로 40배에서 관찰하였다.

2. 5. 인간제대정맥내피세포의 침윤에 미치는 영향

Brazilein에 의한 인간제대정맥내피세포의 침윤 억제 효과를 측정하기 위하여 Boyden chamber를 통과하는 세포를 억제하는 능력을 측정하였다. 미리 matrigel 100 ug/cm^2 로 코팅된 필터 (8 μm pore-size, PET track-etched membrane 24 well format cell culture insert, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 50 ul의 배지로 재수화시키고 단일세포로 수거한 2×10^4 내피세포를 100 ul EBM-2배지에 현탁하여 Boyden chamber 안쪽에 가하였다. EGM-2 배지 300 ul을 가한 24-well plate 위에 올려놓고 2 시간 동안 5% CO_2 , 37°C에서 배양하여 여과막에 세포를 붙인 후 brazilein을 농도별로 가하고 12시간을 더 배양한 후 여과막을 통과한 세포의 수를 측정하였다. 세포수를 측정하기 위하여 Boyden chamber 안쪽에 있는 세포를 세포용해완충액 (1% SDS, pH 7.4 PBS)으로 3회 세척하여 제거하고 막을 통과한 세포가 붙어 있는 chamber의 아래쪽 막 부분을 Diff-Quick Fixative로 염색한 후 건조하고 현미경 상에서 무작위로 다섯 영역을 선정하여 침윤된 세포의 수를 측정하였다.

2. 6. 관형성에 미치는 영향

24-well plate에 300 ul의 matrigel을 가하고 37°C에서 30분 방치하여 굳혔다. 단일세포로 수거된 4×10^4 cell/500 ul의 인간제대정맥내피세포를 24-well plate에 분주하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 여기에 혈관신생억제물질을 각 농도별로 희석하여 넣은 후 16 시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 조심스럽게 제거하고 여기에 Diff-Quick Fixative로 고정하여 염색하고 현미경하에서 사진을 찍어 관형성 억제 정도를 image analyzer로 분석하여 계산하였다.

2. 7. 젤라틴 자이모그램

Brazilein을 처리하거나 혹은 처리하지 않고 배양된 혈관내피 세포들의 젤라틴 분해 효소의 활성을 측정하기 위해 다음과 같이 SDS-PAGE를 실시하였다. 20 μ l의 배양액을 non-denaturing loading buffer에 섞어 0.1%의 젤라틴을 기질로 함유하고 있는 10% SDS-PAGE를 시행하였다. 젤은 2.5% Triton X-100 용액으로 실온에서 1시간동안 수세하여 SDS를 제거하고 developing buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 100 mM CaCl₂, 그리고 0.01% NaN₃, pH 7.5)로 실온에서 30분간 수세한 후 37°C 진탕수조에서 밤새 반응시켰다. 반응이 끝난 젤은 0.5% coomassie brilliant blue가 첨가된 탈색용액 (10% 2-propanol, 10% acetic acid)으로 염색한 후 다시 탈색용액으로 탈색하여 투명대를 확인하였다.

2. 8. 인간제대정맥내피세포의 증식 억제 효과

약물처리 후 세포의 증식정도 및 생존도는 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 방법으로 측정하였다. 이는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 succinate dehydrogenase에 의하여 형성되는 formazan 반응생성물의 양으로 생존 세포의 양을 측정하는 방법이다. 96-well plate에 10⁴ cell/well로 접종하여 4 시간 배양한 후 배지를 제거하고 각 농도의 약물을 혼합한 배지 100 μ l을 가하여 5% CO₂, 37°C에서 24 시간 또는 48 시간 배양하면서 약물을 처리하였다. 각각의 well에 50 μ l의 MTT용액을 [2 mg MTT/ml PBS (pH 7.4)] 가하여 5% CO₂, 37°C에서 4 시간을 더 배양하고, 배양액을 제거한 후 100 μ l의 DMSO를 가한 후 37°C에서 20분간 방치하여 formazan을 녹이고 ELISA reader (VERSAmax microplate reader, Molecular Device, USA)로 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 양을 계산하였다. (대조군-약물처리군)/대조군 \times 100으로 계산하여 세포의 증식량을 퍼센트로 환산하여 표시하였다.

2. 9. 인간제대정맥내피세포의 세포사멸

6-well plate에 2×10^5 인간제대정맥내피세포를 접종하여 5% CO₂, 37°C에서 24 시간 배양한 후 5 ug/ml brazilein을 가한 1.5 ml의 EGM-2 배지를 가하여 24 시간과 48 시간 처리한 후 배양액을 제거하고 세포를 세포용해완충액으로 녹여내었다. Invisorb Spin Cell Mini Kit(3) (Invitek, Berlin, Germany)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 DNA를 1.5% 아가로스젤에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 관찰 하였다.

제3장 결 과

3. 1. 인간제대정맥내피세포의 세포 형태에 미치는 영향

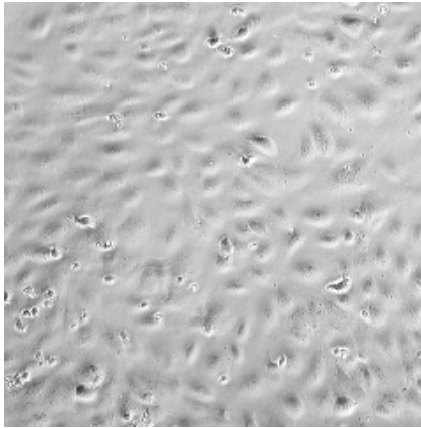
24-well plate에 1×10^5 인간제대정맥내피세포를 접종하여 24시간 배양한 후 5 ug/ml brazilein을 첨가한 배지 750 ul을 가하여 5% CO₂, 37°C에서 24 시간 또는 48 시간에 현미경하에서 100배로 관찰하였다. 24 시간 또는 48 시간 배양 후 무처리 대조군은 넓게 깔린 단일층으로 고르게 세포가 성장하였다. Brazilein을 처리한 경우에 24 시간 경과 후 세포와 세포가 분리되면서 평면으로부터 두껍게 위축되는 것이 관찰되었고, 48 시간 처리 후 세포가 완전히 단일세포로 분리되었으며 심하게 위축 되어 사멸되는 것을 관찰 할 수 있었다 (그림 1).

3. 2. 인간제대정맥내피세포의 이동 억제 효과

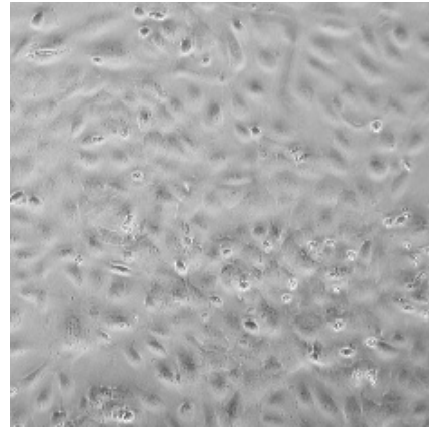
Brazilein에 의한 인간제대정맥내피세포의 이동 억제 효과를 측정하기 위해서 고무막대를 이용 중앙부위의 세포를 제거하고, 제거된 부위로 세포가 이동하여 증식하는 정도를 관찰하였다. 2 ug/ml brazilein을 처리한 경우 약 50% 정도의 세포 이동이 억제되는 것을 관찰 할 수 있었으며, 4 ug/ml brazilein을 처리한 경우 에는 세포 이동이 완전히 억제 되는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 2).

3. 3. 내피세포 침윤 억제 효과

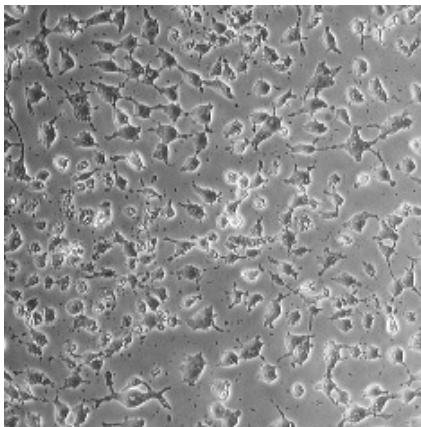
Brazilein에 의한 인간제대정맥내피세포의 침윤 억제 효과를 측정하기 위하여 Boyden chamber를 통과하는 세포를 억제하는 능력을 측정한 결과 그림 3과 같이



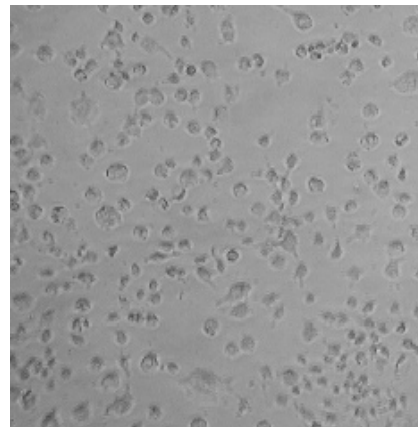
(A)



(B)

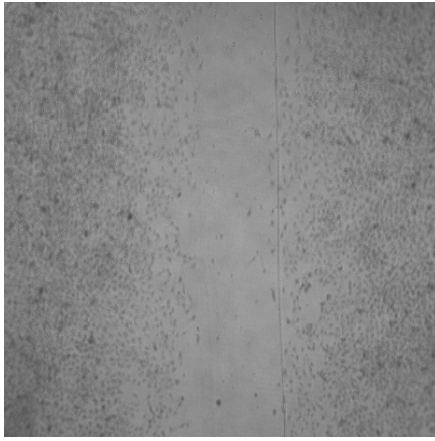


(C)

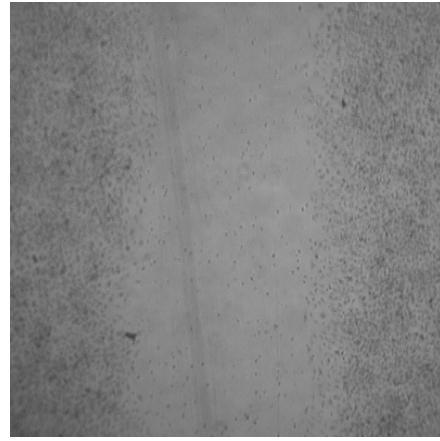


(D)

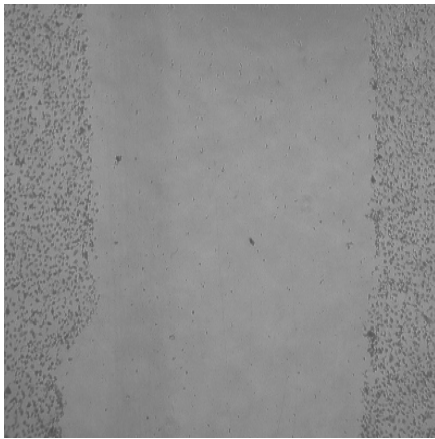
그림 1. 인간제대정맥내피세포의 형태에 미치는 brazilein의 영향
젤라틴 상에서 바닥에 깔리도록 배양한 후 EGM-2 배지를 교환하여 24 시간 (A)
및 48 시간 (B) 더 배양한 대조군들과 5 ug/ml brazilein을 첨가한 EGM-2 배지에
서 24 시간 (C) 및 48 시간 (D) 배양한 후 관찰한 현미경 사진 (200 배).



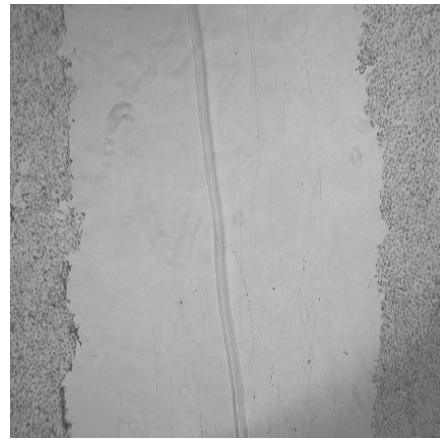
(A)



(B)



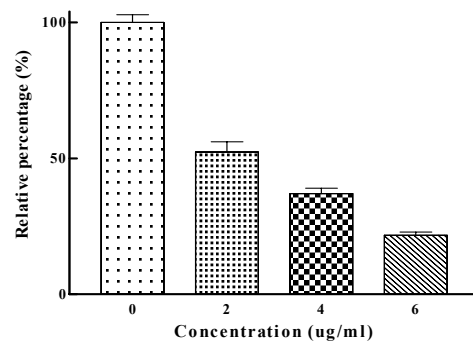
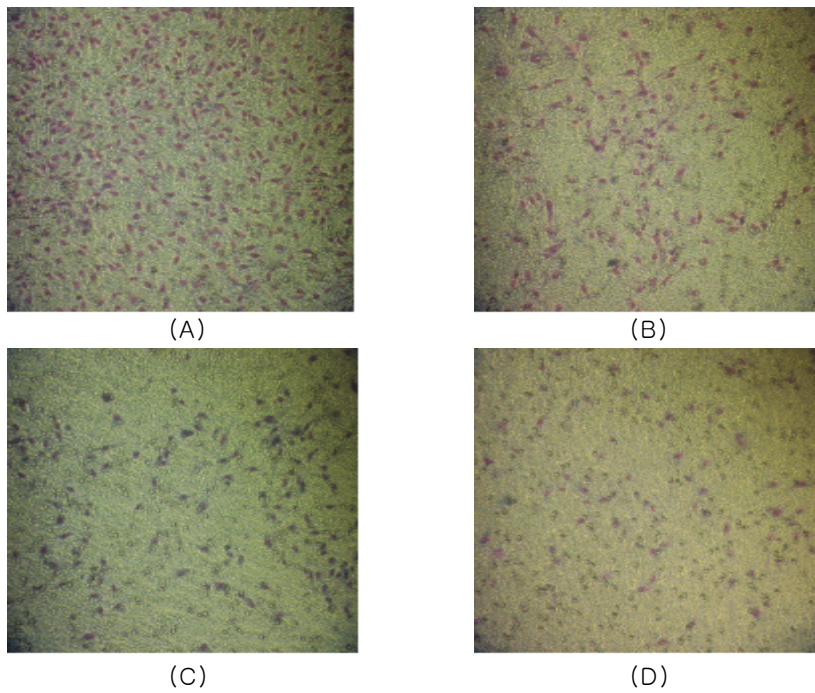
(C)



(D)

그림 2. Brazilein의 인간제대정맥내피세포 이동 억제

젤라틴이 코팅된 용기에서 인간제대정맥내피세포가 바닥에 깔리도록 배양한 후 고무막대로 선을 긋고 24시간 더 배양한 대조군 (A), 2 ug/ml brazilein을 처리하여 24 시간 배양 (B), 4 ug/ml brazilein을 처리하여 24 시간 더 배양한 세포 (C) 및 고무막대로 선을 그은 직후의 사진 (D)



(E)

그림 3. Brazilein의 인간제대정맥세포 침윤 억제

EGM-2 배지에서 Boden chamber 막을 통과한 세포 (A), 2 ug/ml brazilein이 존재하는 배지에서 막을 통과한 세포 (B), 4 ug/ml brazilein이 존재하는 배지에서 막을 통과한 세포 (C), 6 ug/ml brazilein이 존재하는 배지에서 막을 통과한 세포 (D), 각각 3회에 걸친 시험을 시행하였으며, 매번 다섯 지역의 현미경 시야에서 계수한 평균값 (E)

2 ug/ml brazilein에 의하여 약 50% 정도의 침윤억제효과를 보였으며 4 ug/ml과 6 ug/ml brazilein을 처치한 경우에 각각 63%와 75% 정도 침윤이 억제되어 brazilein은 강한 혈관내피세포 침윤 억제 효과를 나타내었다.

3. 4. 관형성 억제 효과

Matrigel 상에서 인간제대정맥내피세포의 관형성을 억제하는 brazilein의 효과를 검토한 결과를 그림 4의 사진으로 나타내었으며, 현미경하에서 사진을 찍어 관형성 억제 정도를 image analyzer로 분석한 결과를 그림 4 (E)의 도표로 나타내었다. 1 ug/ml의 brazilein을 처치한 경우 관형성 억제 효과가 경미하였으며, 2 ug/ml 처치한 경우 관형성이 약 50% 정도 억제 되었고, 6 ug/ml brazilein을 처치 할 경우 관형성이 대부분 억제되었다.

3. 5. 혈관내피세포의 MMP-2 분비에 미치는 영향

혈청이 제거된 배양 배지를 젤라틴 자이모그램으로 분석한 결과 혈관내피세포들은 항상 MMP-2를 분비하였으며 brazilein의 처리로 혈관내피세포는 MMP-2의 분비가 농도 의존적으로 억제되었다. 5 ug/ml의 brazilein을 자이모그램 developing buffer에 첨가하였을 때 MMP-2의 활성화에는 영향이 없는 것으로 미루어 brazilein은 MMP-2 자체에 직접적인 저해효과를 나타내지는 않았다. 인간제대혈내피세포는 2 ug/mlbrazilein 처치로 MMP-2의 생산이 완전히 억제되어, 혈관신생과정에서 내피세포의 유리 및 침윤에 필요한 MMP-2의 역할을 저해하는 것으로 판단된다.

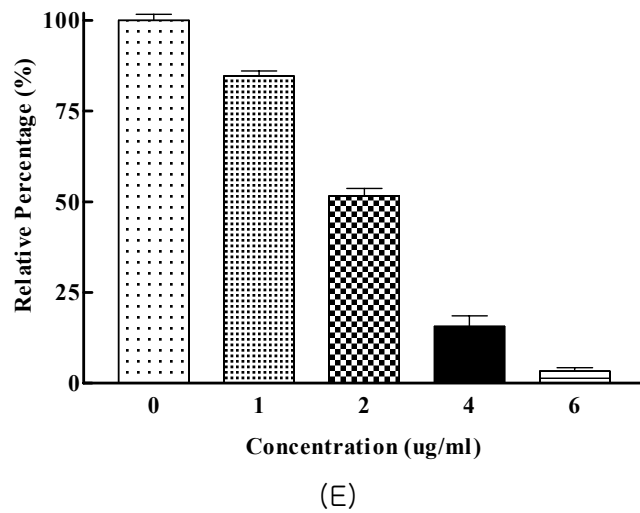
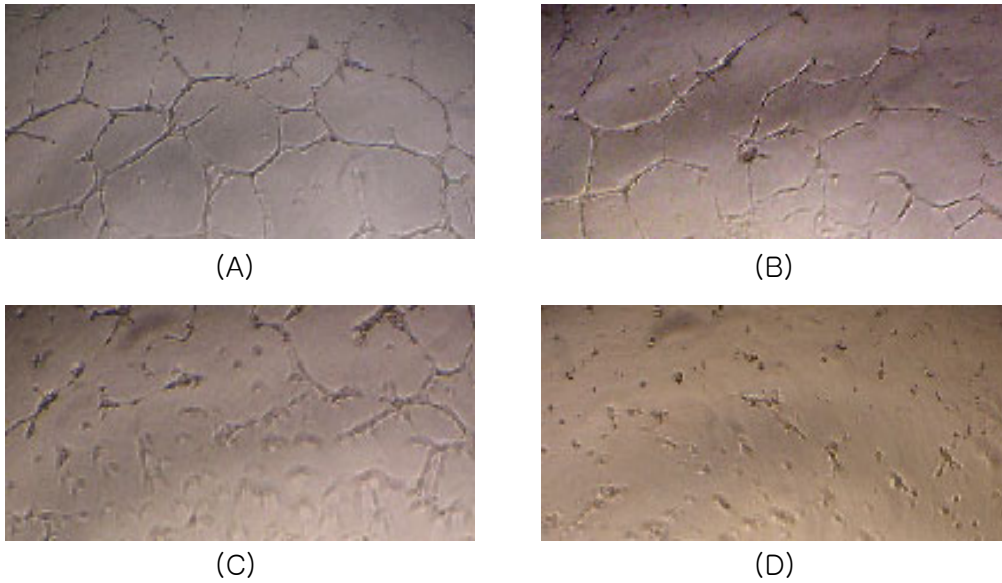


그림 4. Brazilein이 인간제대정맥세포 관형성 억제

Matrigel상에서 EGM-2 배지로 유도된 관형성 대조군 (A), 1 ug/ml brazilein이 첨가된 EGM-2 배지에서 배양한 세포 (B), 2 ug/ml brazilein이 첨가된 EGM-2 배지에서 배양한 세포 (C), 4 ug/ml brazilein이 첨가된 EGM-2 배지에서 배양한 세포 (D), 각기 다른 3번의 실험 결과를 Scion Image software를 이용하여 전체 관길이를 측정 한 평균값 (E)

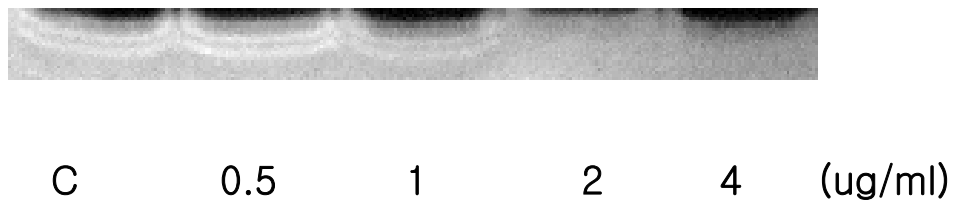


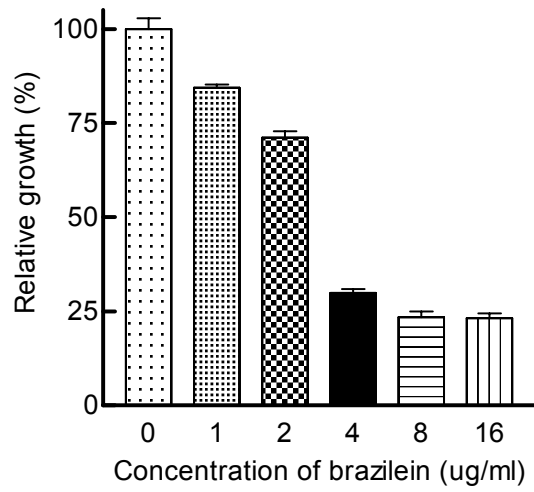
그림 5. 인간제대정맥내피세포에서 brazilein의 MMP-2 발현 억제
 세포 배양액을 0.1% 젤라틴이 함유된 SDS-PAEG에서 전기영동 하여 24시간 효
 소반응을 시켜 0.5% coomassie brilliant blue용액으로 염색하였다.

3. 6. 인간제대정맥내피세포의 증식 및 사멸에 대한 효과

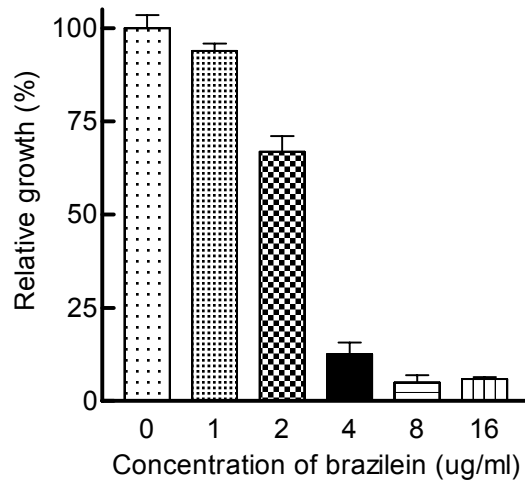
약물처리 후 세포의 생존도를 MTT 방법으로 측정한 결과 그림 5와 같이 24 시간 또는 48 시간 배양할 경우 공히 8 ug/ml에서 최대사멸 농도에 도달하였다. Brazilein 8 ug/ml 정도를 24 시간 처치 할 경우 약 25% 정도의 세포가 생존하였으며, 48 시간 처치하면 약 5% 정도의 세포가 생존하는 것으로 나타났다. 이는 brazilein에 의하여 세포의 증식이 억제될 뿐 아니라 사멸이 유도되기 때문으로 판단이 된다 (그림 6). 세포성장을 50% 억제하는 농도인 IC₅₀ 값은 2.3 ug/ml 정도로 brazilein은 비교적 낮은 농도에서 인간제대정맥내피세포의 성장을 억제하는 것으로 판단되었다.

3. 7. 인간제대정맥내피세포의 세포사멸 확인

Brazilein을 5 ug/ml 첨가한 EGM-2 배지에서 인간제대정맥내피세포를 24 시간과 48 시간 처리한 후 배양액을 제거하고 세포용해완충액으로 녹여내어 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 DNA를 1.5% 아가로스젤에서 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 관찰 한 결과 그림 7과 같이 48 시간 동안 약물 처리한 경우 사다리형 DNA 절편가닥들이 관찰되어서 인간제대정맥내피세포가 brazilein에 의하여 세포사멸 (apoptosis)이 유도되는 것으로 판단되었다.



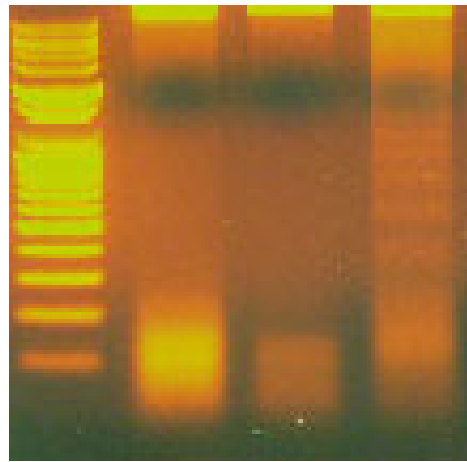
(A)



(B)

그림 6. Brazilein의 인간제대정맥세포 증식 억제

인간제대정맥세포 (10^4 cells)를 96-well plate에 이식하고 4 시간 후 각 농도의 brazilein을 처리하여 24 시간 (A)과 48 시간 (B) 배양한 후 MTT 방법으로 생존 세포를 측정하였다. 각각 5회 실험하여 평균값을 구하고 약물을 처리하지 않은 대조군을 100으로 하여 환산하였다.



1 2 3 4

그림 7. DNA 절편가닥 사진

1; 분자량 marker (1-10 kb), 2; 48 시간 배양한 대조군, 3; 5 ug/ml brazilein을 24 시간 처치, 4; 5 ug/ml brazilein을 48 시간 처치

제4장 고 찰

Folkman (1971)은 혈관내피세포와 암세포 부분으로 구성된 암모델을 제시하였다. 즉, 암세포는 섬유상세포 증식인자, 혈관내피세포 성장인자 등의 혈관형성유도인자들을 생산하여 혈관내피세포의 성장, 이동, 침윤 및 분화를 촉진한다. 또한 혈관내피세포들도 성장인자를 분비하여 암세포의 성장과 전이를 증가시킨다. 암의 성장 및 전이에 혈관신생이 반드시 동반되기 때문에 이를 억제하면 암의 성장 및 전이를 억제할 수 있을 것으로 제안되었다. 일련의 혈관형성과정에 작용하는 혈관신생 저해제는 화학요법제에서 나타나는 부작용이 없이 암의 성장을 억제할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 또한 혈관신생저해제의 활용은 화학요법제의 사용에서 나타나는 약물 저항성 세포의 출현을 피할 수 있는 방법으로 주목받고 있다. 오늘날 다양한 혈관신생 단계의 분자들을 목표로 약물들이 개발되었으며 임상적 응용을 위한 연구가 진행되고 있는데, 임상실험이 시도 중인 대표적인 예를 살펴보면 다음과 같다 (Andreas 등 2002; Arjan 등, 2000; Bisacchi 등, 2003; Kazuo, 1996; Gabriele 등, 1999; Laura 등, 1997; Ribatti 등, 2002; Rooprai 등, 2003; Srikala 등, 2003; Vladislav 등, 2003). 첫째, MMP 저해제들로 혈관내피세포 및 암세포의 이탈과 침윤을 억제할 것으로 기대되는 marimastat (BB2515), prinomastat (AG3340), BMS 275291, BAY 12-9566, neovastat (AE-941) 등의 MMP 저해제에 대한 임상연구가 진행되고 있다. 둘째, 혈관내피세포의 신호전달 저해제들로 혈관내피세포 성장인자에 대한 재조합 인간화단일클론항체인 Avastin과 혈관내피세포 성장인자 수용체에 대한 단일클론항체 등이 임상적으로 연구되고 있다. 또한 혈관내피세포 성장인자 수용체의 신호전달과정에 관여하는 타이로신 카이네이즈 저해제인 SU5416, SU6668, ZD6474, CP-547,632 등이 연구된 바 있다. 셋째, 내재성 저해제들로 임상에 응용이 시도되고 있는 경우는 angiostatin, endostatin, interferon- α , interlukin-12 등이 있다. 넷째, 혈관내피세포의 성장이나 분화를 억제하는 thalidomide, squalamine, celecoxib, ZD6126, TNP-470 등이 혈관신생 억제 효과를 바탕으로 임상적 응용이 시도되고 있다. 그 외 내피세포의 이동,

분화, 증식, 세포자연사 등을 조절하는 integrin에 대한 길항제 (antagonist) 등도 혈관신생 저해제로 개발되었다 (Vladislov 등, 2003). 류마티스 관절염, 동맥경화, 건선설, 비만, Crohn 병, 괴양성 회장염 등의 혈관신생과 염증이 동시에 존재하는 병변의 경우 서로간의 상승효과를 일으켜 병의 진행을 촉진 한다 (Arjan 등, 2000; Carmeliet, 2000; Paleolog 등, 1999). 만성 염증질환에서 혈관신생 저해제가 혈관생성을 억제함으로써 첫째, 병변조직의 활동성 세포에 공급되는 영양성분, 산소의 공급을 줄여 병인세포의 과도한 성장을 줄인다. 둘째, 염증부위에 과도하게 모여드는 염증세포의 침투를 억제한다. 셋째, 혈관내피세포의 활성화, 성장, 혈관재편 과정에서 생성되는 MMP, 각종 사이토카인 등의 용해성 염증인자의 생산을 줄여준다 (Arjan 등, 2000). 이와 같은 효과들은 병변의 진행을 방지하거나 염증의 억제에 효과가 있을 것으로 기대된다. 실제로 동물실험에서 혈관신생 저해제인 AGM-1470 (TNP-470)과 thalidomide는 관절염을 호전 시킨다고 보고된 바 있다 (Oliver 등, 1995). 또한, 혈관신생 인자들의 생성을 감소시켜 혈관신생억제 효과를 거두는 경우는 류마티스관절염 환자에게 인간화된 암 괴사인자에 대한 항체를 사용하면 혈관내피세포 성장인자를 감소시킨다고 보고하였다. Thalidomide의 경우 Crohn 병에 효과를 보이는데 이는 암 괴사인자의 생산 억제 및 혈관신생의 억제에 기인한다고 알려졌다 (Ehrenpreis 등, 1999). 이처럼 혈관신생 저해제는 과도한 혈관형성으로 인한 병변이나 만성염증 등에 부작용이 적고 효과적인 치료약물이 될 수 있어 신규 혈관신생 저해제의 탐색이 활발히 이루어지고 있다.

암의 치료 등에 이용할 수 있는 혈관신생 저해제를 탐색하던 중에 소목의 추출물이 혈관 신생억제에 효과성분을 함유하고 있음을 발견하여 본 연구에서 실험 재료로 선택하였다. 소목 (Sappan Lignum, 학명; *Caesapinia sappan*)은 소방목으로도 불리며, 예부터 한약재로 쓰이고 적색염료로도 사용하였다. 소목의 산지는 태국, 대만, 베트남 등지이며 두과에 속하는 관목이다. 한방에서 소목이 몸속의 피를 잘 순환시키고 피가 막혀있거나 멎어있는 것을 잘 풀어준다 하여 여성들의 혈액순환이 원활치 않아 생기는 어혈에 의한 생리통 산후에 생기는 생리통에 주로 사용하는 약제이다 (Kim 등 2004). 신라시대부터 염료로 사용한 것으로 추정되며 조선시대에는 많은 양이 수입되어 사용되었다. 소목의 성분 중에서 brazilin이 생리

활성의 주요 성분으로 알려졌으며 그 외 다수의 이소프라보노이드가 함유되어 있어 항산화, 항염증, 혈관이완, 혈당강하, 항동맥경화 및 항균 효과 등이 보고된 바 있다 (Chien 등, 2003; Hong 등, 2002; Kim 등, 2004; Niranjani 등, 2003; Oh 등, 2001; Shrishailappa 등, 2003). 그러나 항암효과나 항혈관신생에 대한 연구결과가 보고된 바 없다. 천연물을 대상으로 혈관신생 저해제를 탐색하던 중 소목의 메탄올 추출물이 혈관내피세포의 성장 및 관형성을 억제하는 것이 발견되었으며 크로마토그래피법 및 재결정으로 순수하게 분리하여 electrospray ionization TOP 질량분석법으로 분석한 결과 분자량이 264 이었으며, UV spectrum 조사 및 $^1\text{H-NMR}$ 로 분석한 결과 Kim 등 (1997)이 소목에서 그 존재를 확인된 바 있는 brazilein의 분석결과와 일치하였다. 따라서 본 실험에서 분리한 혈관신생억제물질은 brazilein으로 동정하였으며, brazilein 또는 brazilin이 혈관신생 억제효과나 항암효과가 아직 보고된 바 없어서 본 연구에서 brazilein이 갖는 인간제대정맥내피세포에 대한 혈관신생억제 효과에 관하여 살펴보고자 하였다.

인간제대정맥내피세포는 5 ug/ml의 brazilein을 처치하고 24시간이 지난 후 관찰하면 세포가 위축되어 세포와 세포사이에 분리가 일어나는 것을 관찰할 수 있었으며, 48시간 후에 관찰하면 대부분의 세포가 심하게 위축되어 사멸하여가는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과로 보아 brazilein은 혈관내피세포에 대하여 낮은 농도에서도 강한 세포독성을 갖는 것으로 판단된다. 내피세포의 이동, 국부적인 침윤, 세포의 기저막에서 세포들 간의 상호 연결에 의한 분화 등은 혈관신생을 완성하는 중요한 요소이다 (Andreas 등, 2002; Bussolino 등, 1997; Bisacchi 등, 2003; Carmeliet 등, 2000). *In vitro* 혈관신생 측정 방법들을 사용하여 brazilein이 혈관내피세포의 성장, 이동, 침윤, 그리고 맥관형성 같은 혈관신생에 필요한 다단계과정을 효과적으로 억제함을 관찰하였다. Brazilein이 각종세포성장인자들이 유도하는 혈관내피세포들의 이동과 침윤을 억제하였으며, matrigel 상에서 혈관내피세포들의 관형성을 저해하였다. 위의 실험결과를 종합해보면 brazilein이 강력한 항혈관신생 효과가 있음을 알 수 있었다.

Matrix metalloproteinases (MMPs)는 세포의 외부로 분비되며 아연을 함유한 중성 endopeptidase를 총칭하며, extracellular matrix 및 기저막 (basement

membrane)을 분해하여 혈관내피세포를 이탈시킴으로 내피세포가 혈관형성에 필요한 부위로 이동할 수 있도록 한다 (Peter 등 1996). 또한, 내피세포가 혈관신생이 필요한 부위로 침투하는 과정에서 중요하게 작용한다. MMPs는 성장하고 있는 내피세포 또는 암세포에서 발현되며, 혈관신생 뿐 아니라 암의 성장, 침윤 및 전이과정에 관여 한다 (Peter 등, 1996; Bussolino 등, 1997). MMPs에는 collagenases, gelatinases, stromelysins 및 세포막 부착형 MMPs 등이 있으며, matrix metaloproteinase의 내인성 조직 저해제들이 존재하여 활성을 조절하고 있다 (Arjan 등, 2000). 여러 MMP들 중 MMP-2는 기저막을 분해하여 내피세포의 침윤을 촉진하며 혈관신생이 이루어지도록 하는데 중요한 역할을 담당한다 (Peter 등, 1996). 더구나 내피세포의 맥관형성은 MMP-2의 활성화에 의존적이라고 알려져 있다. 젤라틴 자이모그램 분석 방법을 이용하여 조사한 결과 혈관내피세포들이 분비하는 MMP-2의 분비가 brazilein 처리로 저해됨을 관찰하였다. 이 결과는 brazilein이 나타내는 혈관내피세포의 침윤과 관형성 억제력은 어느 정도는 MMP-2 분비의 억제와 관련이 있을 것으로 추정된다.

혈관신생의 가장 중요한 단계 중의 하나는 내피세포의 성장으로 사람 제대정 맥내피세포에 대한 brazilein의 IC_{50} 는 2.3 ug/ml 정도로 낮은 농도에서 강력하게 혈관내피세포 성장을 억제하였다. Brazilein은 내피세포 성장을 억제하는 농도에서 세포독성을 나타내었고, 혈관내피세포에 brazilein을 처리하면 전형적인 세포자연사에서 나타나는 DNA 절편화가 관찰되어 (Georg, 2000; Guy 등, 2000) brazilein에 의한 항혈관신생 효과는 혈관내피세포의 세포자연사 유도에 의한 효과가 중요한 요소임을 알 수 있었다. 이와 유사하게 내피세포의 세포자연사에 의한 혈관신생 저해제로는 혈관내피세포에 특이적 결합 단백질에 독소를 결합시켜 혈관신생 억제 효과를 기대하는 연구들이 보고된 바 있다 (Arjan 등, 2000).

Brazilein은 낮은 농도에서 혈관내피세포의 증식, 이동, 침윤, 관형성을 억제하는 등의 혈관신생 억제 효과가 실험관내에서 확인되었다. 향후 brazilein을 암치료 등에 응용할 수 있도록 하기 위한 brazilein이 갖는 혈관내피세포에 대한 세포독성의 기전 및 생체에서 brazilein이 나타내는 혈관신생 억제 효과 또는 항암 효과를 검증하는 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

제5장 결 론

Brazilein의 인간제대정맥내피세포에 대한 혈관신생 억제 효과를 조사하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 인간제대정맥내피세포의 이동을 4 ug/ml의 brazilein이 완전히 억제하였다.
2. Boyden chamber를 이용한 침윤 억제 효과 측정에서 2 ug/ml의 brazilein이 인간제대정맥내피세포의 이동을 50% 이상 억제하였다.
3. Matrigel에서 관형성 저해에 대한 효과를 측정한 결과 2 ug/ml의 brazilein이 인간제대정맥내피세포의 관형성을 약 50% 정도 억제하였다.
4. 2 ug/ml의 brazilein이 인간제대정맥내피세포의 MMP-2 생산을 완전히 억제하였다.
5. Brazlein의 인간제대정맥내피세포에 대한 IC₅₀ 값은 2.3 ug/ml 이었다.
6. 5 ug/ml brazilein을 인간제대정맥내피세포에 48 시간 처치하면 genomic DNA가 절편화 되면서 세포사멸이 유도되었다.

이상의 실험결과로 미루어 보아 brazilein은 혈관신생 억제 효과를 갖는 것으로 판단되며, 그 주요 기전으로는 MMP-2 생산의 억제 및 세포사멸의 유도에 의한 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Andreas B, Roy B: Recent advances in angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting. *Trend in pharmacological sciences*. 2002; 23: 579-582.
- Arjan WG, Grietje M: Angiogenesis: Potential for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological reviews*. 2000; 52: 237-268.
- Bisacchi D, Benelli R, Vanzetto C, Ferrari N, Tosetti F, Albini A: Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanism, problems and perspectives. *Cancer detection and prevention*. 2003; 27: 229-238.
- Bussolino F, Mantovani A, Persico G: Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochemical Science*. 1997; 22: 251-6.
- Carmeliet, P: Mechanisums of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*. 2000; 6: 389-395.
- Cao J, Mathews MK, McLeod DS, Merges C, Hjelmeland LM, Luty GA: Angiogenic factor in human proliferative sickle cell retinopathy. *British Journal Ophthalmology*. 1999; 83: 838-846.
- Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, BrusselmansK, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Periard JC, Dewetrchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT: Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in

mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nature Medicine*. 1999; 5: 495-502.

Chien MH, Jaw JK, Chen CL, Ching HL, Jiunn WL, Yu WC: Introduction of vasorelaxation through activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by brazilin. *European Journal of Pharmacology*. 2003; 468: 37-45.

Diand B, Geke A.P.H, Coby M, Grietje M, Nanno HM: Endothelium *in vitro*: A review of human endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*.. 2001; 4: 91-102.

Douglas H. and Fokman J. Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86: 353-364.

Ehrenpreis ED, Kane SV, Cohen LB, Cohen RD, Hanauer SB. Thalidomide therapy for patients with refractory Crohn's disease: An open-label trial [See comments]. *Gastroenterology*. 1999; 117: 1271-1277.

Eileen TB, Graham TB, Stephen B, Broom IJ, Neil FKH, Denys NW: An *in vitro* model of angiogenesis: Basic features. *Angiogenesis*.. 1999; 3: 335-344.

Elise CK, Riccardo A, Joseph S, Robert PW, Lance AL: Angiogenesis: Role of calcium-mediated signal transduction. *Cell biology*. 1995; 92: 1307-1377.

Folkman, J. Tumor angiogenesis : therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*. 1971; 285: 1182-1186.

- Folkman, J. Seminars in medicine of the Beth Israel, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *New England Journal of Medicine*. 1995; 333: 1757-1763.
- Francesca L, Jacob M, Pjilippe G, Paul R, Michael D: Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nature medicine*. 2001; 7: 425-429.
- Ferrara N, Alitalo K: Clinical application of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature Medicine*. 1999; 5: 1359-1364.
- Gabriele B, Kashi J, Lo KM, Judah F, Douglas H: Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in Mice. *Science*. 1999; 284: 808-812.
- Gary JK, James AC, Vernon ES, Ronald AL, Charles WB, Winfred AM, Ernest TH, Ronald L, julia AL, Levy K, Iqbal A, Jayel V, Caroline CS: Progress in cancer chemoprevention. *Annals new york academy of sciences*. 2000; 1-12.
- Georg H: The morphology of apoptosis. *Cell tissue Research*. 2000; 301: 5-17.
- Gregg LS: HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in molecular medicine*. 2002; 8: S62-S67.
- Guy M, John AH: Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell tissue Research*. 2000; 301: 143-152.

- Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86: 353-364.
- Hong CH, Hur SK, Oh OJ, Kim SS, Nam KA, Lee SK: Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophages cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 83: 153-159.
- Kazuo U: Inhibition of experimental metastasis by enzyme inhibitors from microorganisms and plants. *Advance Enzyme Regulation*. 1996; 36: 267-281.
- Kim DS, Baek NI, Oh SR, Jung KY, Lee IS, Lee HK: NMR assignment of brazilein. *Pytochemistry*. 1997; 46: 177-178.
- Kim KJ, YU HH, Jeong SI, CHa JD, Kim SM, You YO: Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 91: 81-87.
- Laura M, Willian DF, Elise CK: New anti-angiogenesis agents: review of the clinical experience with carboxyamido-triazole(CAI), thalidomide, TNP-470 and interleukin-12. *Angiogenesis*. 1997; 1: 23-25.
- Michael SO, Thomas B, Yuen S, Naomi F, George V, William SL, Evelyn F, James RB, Bjorn RO, judah F: Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997. 88: 277-285.
- Niranjan VLReddy, V. Ravikanth, V.V.N.S. Jansi Lakshmi, U. Suryanarayan

- Murty, Y. Venkateswarlu: Inhibitory activity of homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan* against *Beauveria bassiana*. *Fitoterapia*. 2003; 74: 600-602.
- Oh GT, Choi JH, Hong JJ, Kim DY, LEE SB, KIm JR, Lee CH, Hyun BW, Oh SR, Bok SH, Jeong TS: Dietary hematein ameliorates fatty streak lesions in the rabbit by the possible mechanism of reducing VCAM-1 and MCP-1 expression. *Atherosclerosis*. 2001; 159: 17-26.
- Oliver SJ, Banquerigo ML, Baahn E, Supression of collagen-induced arthritis using an angiogenesis inhibitor, AGM-1470, and a microtubule stabilizer, taxol. *Cell Immunology*. , 1995; 166: 196-206.
- Paleolog EM, Miotla JM: Angiogenesis in arthritis : role in disease pathogenesis and as a potential therapeutic target. *Angiogenesis*. 1999; 2: 295-307.
- Peter C, Luraynne C, Tami L, Ronald T. William G, James P, David A: Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cell by interaction with integrin $\alpha v \beta 3$. *Cell*. 1996; 85: 683-693.
- Ribatti D, Vacca A, Nico B, Falco G, Montaldo PG, Ponzoni M: Angiogenesis and anti-angiogenesis in neuroblastoma. *European Journal of cancer*. 2002; 38: 750-757.
- Rooprai HK, Chrisidou M, Pilkington GJ: The potential for strategies using micronutrients and heterocyclic drugs to treat invasive gliomas. *Acta neurochir*. 2003; 145: 683-690.

Shawver LK, Lipson KE, Fong TT, McMahon G, Plowman GD, Strawn LM. Receptor tyrosine kinases as targets for inhibition of angiogenesis. *Drug Discovery Today*.1997; 2: 50-63.

Shrishailappa B, Sudheer M, Sujay RR, Elango K, Suresh B: Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* heartwood. *Biological. Pharmthetical. Bulltin* .2003; 26: 1534-1537.

Srikala SS, Frances AS: Targeting angiogenesis: a review of angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer. *Lung cancer*. 2003; 42: 581-591.

Vladislav G, Debra H, Francis SM: Anti-angiogenic activity of contortrostatin, a disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix* snake venom. *Angiogenesis*. 2003; 6: 213-224.

ABSTRACT

Anti-angiogenic Effect of Brazilein on the Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Lee, Hyang Ah

Depat. of Medicine

The Graduate School

Yonsei University

It was found during screening program that methanol extract of *Caesalpinia sappan* heartwood showed anti-angiogenic activity. Anti-angiogenic or anti-tumor agents identified from *Caesalpinia sappan* were not known until now. Anti-angiogenic compound was isolated by extraction, chromatography and crystalization from methanol extract of *Caesalpinia sappan*. The compound was identified as a brazilein by the analysis of electrospray ionization mass spectroscopy and H^1 -NMR spectroscopy.

In this experiment, anti-angiogenic effects of brazilein on the human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were investigated. After treatment with 5 ug/ml brazilein for 24 hours, HUVEC showed shrinkage and separation between cell and cell, and most of cells died after 48 hours. Angiogenic process was composed of proliferation, migration, invasion and tube formation of endothelial cells. Brazilein showed the inhibitory activities of these multiple process *in vitro*. Migration and invasion of HUVEC were inhibited by brazilein, and tube formation of HUVEC on the matrigel was inhibited by brazilein. Tube formation of vascular endothelial cells depends on MMP-2 activity, which

enhances mobility and invasion. MMP-2 expression was completely repressed with 2ug/ml brazilein. Brazilein showed cytotoxic effect against HUVEC, and ,IC₅₀ of brazilein against HUVEC is a 2.3 ug/ml. DNA fragmentation was examined as a characteristic of apoptosis. Brazilein induced the apoptosis of HUVEC, when HUVEC was treated with 5 ug/ml brazilein for 48 hours. Based on these results, it is suggested that brazilein is a potential angiogenesis inhibitor.

Key word : Brazilein, *Caesalpinia sappan*, Angiogenesis, Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC), Tumor, Invasion, Migration, Tube formation