

## *Rehmannia Radix*의 IGF-II로 유도된 HIF-1 $\alpha$ 와 VEGF 발현 억제

박 응 · 신용철 · 고성규\*

경희대학교 한의과대학 예방한의학교실

### *Rehmannia Radix*(RR) Extracts Inhibit IGF-II Induced VEGF and HIF-1 $\alpha$ Expressions in HaCaT Keratinocyte Cells

Ung Park, Yong-Cheol Shin & Seong-Gyu Ko\*

Dept. of Preventive Medicine, College of Traditional Korean Medicine, Kyunghee Univ.

#### Abstract

Psoriasis is a chronic skin disease characterized by angiogenesis. It has been reported that growth factor as vascular endothelial growth factor(VEGF) and insulin like growth factor(IGF) II are overexpressed in psoriatic epidermis.

To investigate the inhibitory effects of IGF-II induced VEGF and HIF-1 $\alpha$  expression by RR extracts, we performed MTS assay, western blots using HaCaT cells.

RR extracts significantly reduced IGF-II induced HIF-1 $\alpha$  protein level via MAPK pathway in HaCaT cells. Also, RR extracts inhibited IGF-II induced VEGF mRNA and protein expression levels in the HaCaT keratinocytes.

These results suggest that inhibition of HIF-1 $\alpha$  and VEGF expressions by RR extracts contributes to the anti angiogenic effects.

---

**Key words** : *Rehmannia Radix*, Insulin-like growth factor-II, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, Psoriasis

---

---

\* Corresponding author : Seong-Gyu Ko, Department of Preventive Medicine, College of Traditional Korean Medicine, Kyunghee University. Tel : 82-2-961-0329, E-mail : epiko@khu.ac.kr

## I. 서론

혈관신생은 암의 전이뿐만 아니라 배발생과정, 상처치유 및 조직재생 등 정상적인 상태에서도 중요한 역할을 담당하고 있다. 하지만 혈관신생기전에 이상이 발생하여 비정상적인 혈관신생 과다에 의해 악성암, 당뇨병성 망막증, 류마티스 관절염, 건선, 만성염증 등의 질환들이 일어난다고 알려져 있으며,<sup>1-3)</sup> 이 질환들의 효과적인 치료방법은 아직 개발되지 않은 상태이다. 특히, 악성암의 증식과 전이 및 여러 혈관신생 관련질환은 혈관신생과정과 밀접한 관계가 있으며, 이 혈관신생과정은 많은 혈관신생인자 및 억제인자의 균형에 의해 조절된다.

건선은 피부의 과형성, 다양한 염증세포들의 유입 및 피부세포의 증식 등으로 발생하는 피부병의 일종이다.<sup>4,5)</sup> IGF-II는 인간의 각질세포의 증식을 촉진시키며,<sup>6)</sup> 건선 주변조직에 그 발현이 증가되어 있음이 밝혀진 바 있다.<sup>7)</sup> 따라서 IGF-II는 대표적인 혈관신생 관련질환인 건선을 촉진시키는 인자이다. Insulin like growth factor II(IGF-II)는 proinsulin과 구조적인 상동성을 가지며 여러 세포에서 증식과 분화를 조절하는 인자로 알려져 있을 뿐만 아니라,<sup>8)</sup> 암화과정에서는 혈관신생인자로도 작용함이 알려져 있다.<sup>9,10)</sup>

혈관신생유도에 매우 중요한 역할을 하고 이 과정에서 hypoxia inducible factor 1(HIF-1)이 핵심적인 전사인자로서 작용한다. 전사조절인자인 HIF-1은 HIF-1 $\alpha$ 와 HIF-1 $\beta$  두 가지의 subunit으로 heterodimer로 구성되어 있으며, 암세포에서 VEGF 발현의 상위 조절 인자로 중요한 역할을 한다.<sup>11-14)</sup> HIF-1 $\alpha$ 의 과발현은 암세포의 신생혈관과 암세포 증식, 그리고 침윤과 연관되어 있다. 다양한 암세포에서 vascular endothelial growth factor(VEGF)뿐만 아니라

HIF-1 $\alpha$ 도 과발현 되어있다.<sup>15-18)</sup> HIF-1 $\alpha$ 는 VEGF, erythropoietin, transferring, inducible nitric oxide synthase와 insulin like growth factor II 유전자의 전사를 조절하여 증가시킨다.<sup>19-22)</sup> 따라서 HIF-1 $\alpha$ 의 활성화 억제는 신생혈관을 억제하는 또 다른 방법으로 제시될 수 있을 것이다.

현재까지 여러가지 혈관억제제가 신생혈관이나 그들의 수용체 타겟으로 개발되어 왔다.

혈관억제제로 식물에서 분리된 genistein, isoliquitrin과 ginsenoside 등과 같은 혈관억제 화합물이 있다. 또한 Genistein은 콩 등에 들어 있는 phytoestrogen isoflavone으로 tyrosine kinase inhibitor로 작용하며, VEGF와 같은 혈관생성인자에 의한 혈관내피세포 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>23)</sup> Isoliquitrin은 감초에서 분리된 flavonoid로 in vivo와 in vitro에서 신생혈관 억제 작용이 있다고 보고된바 있다.<sup>24)</sup> 그리고 Ginsenoside는 인삼에서 분리된 화합물로 폐암세포의 전이뿐만 아니라 암과 관련된 신생혈관을 억제한다.<sup>25)</sup>

일반적인 건선치료에 있어서 일차적인 치료는 피부에 직접 적용하는 스테로이드 크림 연구였고, 이차적으로는 광선치료법이였다. 근래에는 면역계에 작용하는 약물을 이용하여 피부세포의 과잉을 방지하는 쪽으로 연구가 진행중이다.

본 실험에서는 피부 질환 치료에 쓰이는 여러 한약재 중에서 면역기능과 관련하여 HIF-1 $\alpha$ 의 발현을 억제하는 한약재를 스크리닝하여 그중 건선과 관계되는 RR의 VEGF 발현 억제와 그 경로를 연구하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 약재

본 실험에서 사용한 약재인 RR(*Rehmannia*

*Radix*은 옴니허브(Korea)에서 구입하여 100g 정량 후 1L의 80% 에탄올을 가하여 30분 동안 sonication 하였다. Filter 2 여과지(Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압여과 하였다. 이 여과액을 감압농축기(Eyela, Japan)를 이용하여 농축한 후, 얻어진 농축액을 동결건조하여(Freeze-dryer, Matsushita, Japan) 6g의 RR 분말을 얻어(수율 : 6%) 세포배양에 사용되는 배지에 vortexing하여 녹였다. 그리고 난 후 37°C shaking incubator에서 12시간 섞어 준 다음 syringe filter(0.20  $\mu$ m, Sartorius, Germany)을 이용하여 여과한 후 실험에 사용하였다.

## 2. 세포주와 세포배양

변형된 인간 각질형성세포주인 HaCaT cell은 10% fetal bovine serum(FBS)을 첨가한 Dulbesco's modified eaglemedia(DMEM)에 100U/ml Penicillin과 100ug/ml Streptomycin을 첨가한 배지에서 2~3일마다 배양액을 교환해 주었으며, 배양 환경은 37°C 포화 습도로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. HaCaT 세포는 100mm dish 배양용기에 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells에서 24시간 키운 후 serum free 조건에서 24시간 미만으로 배양한 뒤 100ug/ml 농도의 RR 추출물을 1시간 전 처리한 후 IGF-II를 시간별로 처리하여 세포를 얻었다. DMEM은 GIBCO BRL의 제품을 구입하여 사용하였다.

## 3. MTS assay

HaCaT cell에 RR를 농도별로 처리했을 때 생존율을 MTS(Promega, Madison, USA) assay로 조사하였다. 세포를 96-well culture plate에 각각 5 $\times$ 10<sup>3</sup> 개가 되도록 심어준 후 RR 추출물을 농도별로 24시간 처리한 후 MTS를 최종농도 0.25mg/ml로 넣어 2시간 반응하였다. 490nm에

서 흡광도를 측정하여 약재의 세포독성 및 증식효과에 대한 영향을 조사하였다.

## 4. Reverse transcription-PCR

배양한 세포를 PBS로 세척한 후 4°C에서 원심분리 하여 모으고 Trizole Reagent(Invitrogen, Grand Island NY, USA) 1ml을 가하고 상온에서 5분간 반응시킨 다음 0.2ml의 클로로포름을 첨가하여 15초간 완전히 섞은 뒤, 4°C, 12,000 x g에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 0.5ml의 2프로필알코올을 섞었다. 상온에서 10분간 반응시키고 4°C, 12,000 x g에서 10분간 원심분리 하였다. RNA 침전물을 75% 에탄올로 세척하고, 상온에서 건조시킨 다음 diethylpyrocarbonate(DEPC)로 처리한 증류수에 녹였다. RNA 용액에 RNase-free DNase(Promega, USA)를 2units 가하고 37°C 수조에서 30분간 반응시켜 남아 있는 genomic DNA를 제거하였다. 동량의 페놀과 클로로포름 혼합액(1:1, v/v)으로 추출한 다음 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 다시 동량의 클로로포름으로 추출하였다. 상층액에 2배량의 에탄올과 0.1배량의 3M sodium acetate(pH 5.2)를 가하고 -70°C에서 2시간 이상 방치하였다. 4°C, 12,000 x g에서 10분간 원심분리 하여 침전시키고 70% 에탄올로 세척한 후, 상온에서 건조시킨 다음 DEPC로 처리한 증류수에 녹였다. 정제된 RNA를 GeneQuant Pro(Amersham Biosciences)로 정량하고, ethidium bromide를 넣은 한천 겔에 전기영동하여 RNA를 정량하였다.

정제된 총 RNA 1ug에 random hexamer 4ug(Amersham Biosciences, USA)과 DEPC를 처리한 물을 가하고 65°C에서 10분간 반응시킨 뒤 얼음에서 2분간 식혔다. 5 x first strand buffer와 0.1M DTT, 10mM dNTP, 200unit M-MLV reverse transcriptase(Invitrogen, USA)

그리고 DEPC 처리한 증류수를 가하여 총 30ul가 되게 하고 42°C에서 1시간동안 반응시켰다. 다시 95°C에서 5분간 가열한 뒤 cDNA를 만들었다. Polymerase chain reaction(PCR)은 2.5ul cDNA 주형, VEGF(5' AGG AGG GCA GAA TCA TCA CG 3' ; 5' AAG GCC CAC AGG GAT TTT CT 3')와 GAPDH(5' CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA 3'; 5' CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT 3')의 primer 25uM, 1x PCR buffer, 2.5mM MgCl<sub>2</sub> 그리고 2.5unit Taq. DNA polymerase(TaKaRa Korea, Seoul, Korea)를 혼합하여 시행하였다. PCR 조건은 95°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 하였다. 반응액 중 cycle 별로 각각 5ul를 취해서 2.0% 한천 겔에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 PCR 산물을 확인하였다.

### 5. Western blot analysis

얻어진 세포를 차가운 PBS로 두 번 세척한 후 40mM Tris-HCl, pH 7.4, 10mM EDTA, 120mM NaCl, 1mM dithiothreitol, 0.1% nonidet P-40, 1mM PMSF, 1mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and P1 cocktail이 포함된 lysis buffer를 사용하여 vortexing하여 섞어 준 후 얼음에서 30분간 반응시켰다. 그리고 난 후 4°C, 13,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하여 총 단백질을 얻었다. 얻은 총 단백질을 Bradford assay(Bio Rad Laboratories, Hercules, California) 방법을 이용하여 정량한 다음 20ug의 단백질을 15% acrylamide gel에 전기영동하였다. 이것을 nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Germany)에 transfer하여 PBST에 1% skim milk와 1% BSA가 든 blocking 용액에서 1시간 동안 blocking한 후 PBST로 5분간 2회 세척하였다. Anti- $\alpha$ -tubulin(Sigma Aldrich, Louis, MO), anti-HIF-1 $\alpha$ (BD Biosciences Pharmingen, Chi-

cago, Illinois), anti-VEGF antibody(Santa Cruz, California)를 이용하여 1차 항체반응을 4°C에서 16시간 반응시킨 다음 PBST로 2차 항체반응을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 10분, 15분, 30분간 세척한 후 ECL(Amersham Biosciences, UK)로 발광하여 X-ray film에 노출시켜 단백질 발현 분석을 실시하였다.

## III. 실험 결과

### 1. 세포의 독성 및 생존율

RR 추출물의 세포독성 및 생존율을 관찰하기 위하여 각질 형성세포인 HaCaT keratinocytes 세포에 RR 추출물을 0.1, 1, 5, 10, 50, 100 및 1000ug/ml의 농도별로 MTS assay를 실시하였다. RR 추출물을 농도별로 처리한 결과 24시간에서는 농도와 상관없이 아무것도 처리하지 않은 세포와 비슷한 생존율을 나타내었다. 각 농도별로 유사한 경향의 생존율을 나타내었으며, 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1.).

### 2. IGF-II로 유도된 HIF-1 $\alpha$ 의 감소

최근 보고에 따르면 IGF-II가 human embryonic kidney 293 세포에서 HIF-1 $\alpha$ 의 발현을 유도된다고 증명한 바 있다.<sup>20)</sup> 본 실험에서는 RR 추출물의 HIF-1 $\alpha$  발현 억제 가능성을 Western blots방법으로 확인하였다. 그 결과 RR 추출물 100ug/ml의 농도에서 HIF-1 $\alpha$ 의 단백질 발현이 억제됨을 보였다(Fig. 2.).

### 3. IGF-II로 유도된 VEGF 발현의 감소

혈관신생인자 IGF-II는 HIF-1 $\alpha$ 의 단백질 유도를 통해 VEGF의 발현을 조절한다고 증명

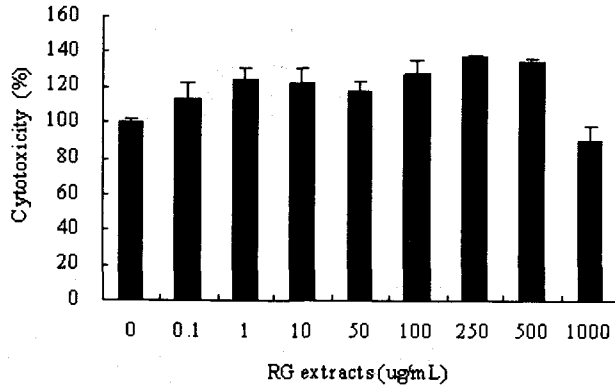


Fig. 1. Cytotoxic effects of RR extracts on HaCaT cells

Dose responses of RR extracts on cytotoxicity of HaCaT cells for 24 h. Cell were seeded in 96 well plates at 5,000 cells per well and treated with the indicated concentrations or times of RR extracts. After treatment, cell cytotoxic effect was determined by MTS assay.

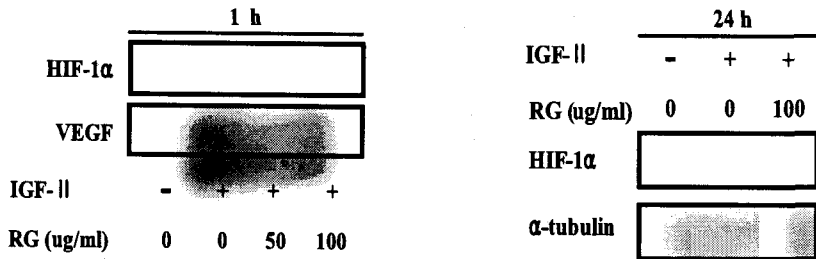


Fig. 2. Inhibition of HIF 1 $\alpha$  protein expression by RR extracts

HaCaT cells were cultured to 90% 100% confluence, followed by treatment with RR extracts. HIF 1 $\alpha$  protein levels were detected by Western blotting as described in Materials and Methods.

된 바 있다.<sup>26)</sup> 우리는 그림 2에서 IGF-II에 의해 HIF-1 $\alpha$ 가 24시간에서 유도되는 것을 확인한 후 RR추출물 100ug/ml의 농도에서 HIF-1 $\alpha$ 가 억제됨을 보았다. 그 다음으로는 IGF-II로 유도된 VEGF가 RR 추출물에 의해 어떻게 발현 조절되는지 확인하였다. 우선 HaCaT 세포에서 IGF-II를 0, 1, 3, 6, 12 및 24시간 처리하여 VEGF mRNA levels을 확인한 결과 1시간부터 증가하기 시작하여 6시간에 감소하다가 다

시 12 및 24시간에 증가되어 나타났다. VEGF mRNA 발현이 1시간에서부터 증가되는 것을 확인한 후 RR 추출물이 VEGF mRNA 발현을 조절하는지 시험하기 위해 IGF-II를 1시간 동안 처리하여 관찰한 결과 IGF-II로 유도한 세포보다 RR 추출물을 100 ug/ml의 농도로 처리한 세포에서 50% 감소효과를 보였다. 또한 VEGF의 단백질 발현에서도 IGF-II로 유도한 세포보다 RR 추출물을 100ug/ml의 농도로 처

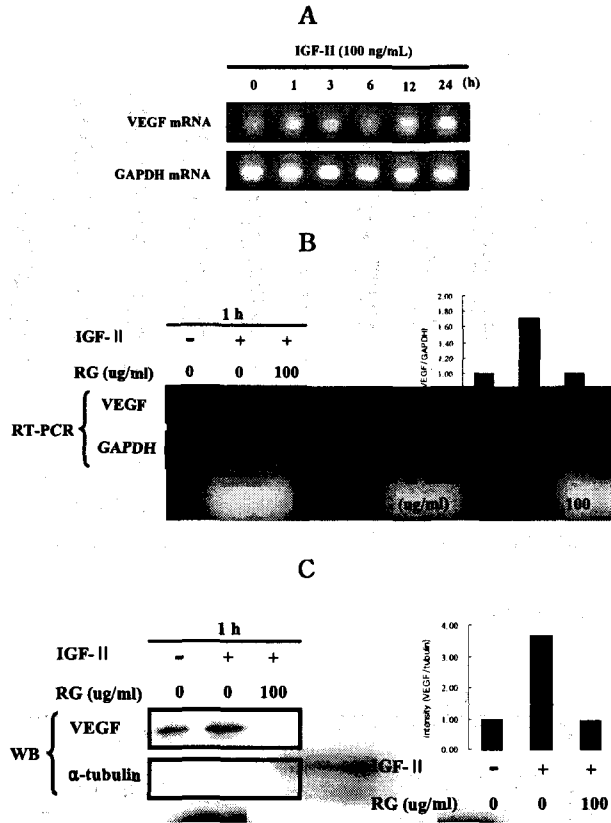


Fig. 3. Reduction of IGF II induced VEGF expression by RR extracts treatment in HaCaT cells  
 (a) First, HaCaT cells were treated with IGF-II for indicated times(0, 1, 3, 6, 12 and 24 h). And then harvest cells were isolated by total RNA as described in Materials and Methods.  
 (b, c) HaCaT cells were pretreated with RR extracts for 1 h. And then were treated with IGF II for 1 h.  
 (b) Total RNA was isolated and VEGF mRNA was detected as described in Materials and Methods. Right graph show relative VEGF mRNA levels verse GAPDH mRNA levels.

리한 세포에서 약 4배 정도 감소효과를 나타냈다(Fig. 3).

#### 4. ERK 1/2 경로를 통한 IGF-II 유도 HIF-1α 발현의 감소

Hypoxia에 의해 유도되는 성장 인자들은 세포의 증식과 생존을 촉진한다고 알려져 있다. 가장

잘 알려진 IGF-II(insulin like growth factor-II)와 TGF-α(transforming growth factor-α)도 HIF-1의 타겟 유전자이다.<sup>27,28)</sup> 이러한 인자들이 각각의 수용체(the insulinlike growth factor 1 receptor(IGF1R), epidermal growth factor receptor(EGFR))에 결합하면 신호 전달계를 활성화시켜 HIF-1α의 발현과 세포 증식을 유도한다.<sup>29)</sup> 그리고 세포 외부의 성장 인자에 반응

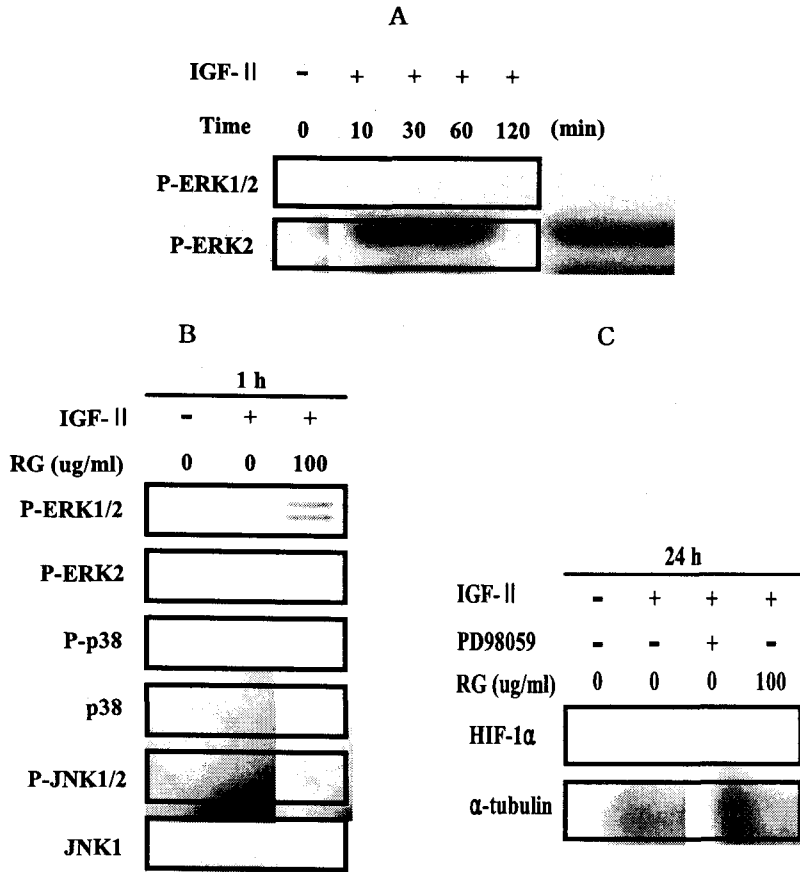


Fig. 4. Inhibition effects of RR extracts on HIF-1 $\alpha$  expression induced by IGF-II  
HaCaT cells were pretreated with RR extracts for 1 h followed by treatment with IGF-II.  
Total protein analyzed by Western blotting with antibodies against phospho ERK1/2 and total ERK2.

하여 세포 증식을 조절하는 p42/p44 mitogen-activated protein kinase(MAPK)는 HIF-1를 인산화시키고 HIF-1의 타겟 유전자의 전사 능력을 활성화시킨다.<sup>30)</sup> 그래서 본 실험에서는 IGF-II에 의한 HIF-1 $\alpha$ 의 단백질 발현 증가를 RR 추출물이 어떠한 경로를 통해 억제하는지 알아보았다. 그 결과 MAPK 경로 중에서 ERK1/2 경로의 활성을 억제함으로써 HIF-1 $\alpha$ 의 단백질 발현을 감소시키는 것을 알 수 있었다. 이에 반해 p38 또는 JNK 경로의 활성은 변화가 없었다(Fig. 4).

#### 5. IGF-II로 유도된 p53단백질 증가

p53의 손실은 저산소 상태에서 VEGF의 전사활성과 HIF-1 $\alpha$  level을 증가시킨다.<sup>31)</sup> 이러한 p53의 기능저하는 HaCaT세포에서 IGF-II에 의해 유도된 MDM2에 의한 proteasome-dependent한 경로를 통해 나타남을 밝힌 바 있다.<sup>26)</sup> 본 실험에서는 IGF-II에 의해 감소된 p53의 발현이 RR 추출물 처리시 변화하는지 관찰하였다. 그 결과 IGF-II에 의해 감소되었

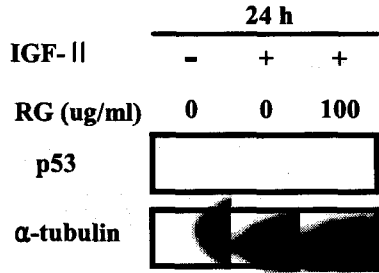


Fig. 5. p53 expression recovery in p53 decreased cells by IGF-II by RR extracts treatment  
HaCaT cells were pretreated with RR extracts for 1 h. After treatment, were treated with IGF-II for 24 h. p53 protein detected by Western blots with p53 antibody.

던 p53의 발현이 RR 추출물 100ug/ml의 농도로 처리한 결과 24시간에서 확연히 증가함을 알 수 있었다(Fig. 5).

#### IV. 고찰

혈관신생과정은 정상적인 성장과 발달에 있어 필요한 과정이며 상처와 골절의 회복과 같이 치유과정의 하나로 일어날 수 있다. 이 시기의 혈관신생과정은 기간이 짧고 엄격하게 조절이 된다. 그러나 이러한 혈관신생과정이 조절되지 않는 경우를 고형 종양의 성장과 혈관종 등에서 관찰할 수 있다. 종양의 형성, 성장 그리고 전이는 혈관신생과정에 의존적이며 혈관신생에 관여하는 여러 인자 중 VEGF는 많은 연구가 진행되어 왔다.<sup>32)</sup>

혈관신생과정은 암, 건선, 류마티스 등 다양한 질병에서 나타나는 현상으로, 여러 가지 생리현상들이 복잡하게 작용하여 일어나는 복잡한 생체반응이다. 이러한 혈관신생은 그 복잡성으로 인해 논리적인 분석이 상당히 힘들다.<sup>44)</sup>

건선은 혈관신생의 촉진으로 피부세포의 증식과 염증반응을 촉진시키는 만성피부염 질환으로서 그 발생 기전이 명확히 밝혀져 있지 않다. 피부의 각질층이 정상인보다 몹시 빠르

게 증식하는 경향이 있으며, 대개는 유전적인 소인과 환경적인 인자가 같이 작용하여 발생한다. 본 연구에서는 건선의 신생혈관 증식을 억제할 수 있는 효과적인 질병 치료 방법을 제시하려고 하였다.

IGF-II는 DNA의 합성 및 세포증식을 유도하는 인자임이 알려져 있다.<sup>33-38)</sup> 이러한 세포증식의 유도로 IGF-II는 건선의 발생과정에서 그 발현이 급격히 증가되는 것으로 알려져 있다. IGF-II는 human embryonic kidney 293 세포와 HaCaT 세포에서 HIF-1a의 발현을 유도한다고 증명된 바 있다.<sup>20,26)</sup> HIF-1a는 혈관신생, 세포증식, 생존, 당 대사와 관련된 중요한 전사 인자이다. 그러므로 HIF-1a의 단백질 발현 억제는 효과적인 신생혈관 억제 치료의 타겟이 될 것이다.

Hypoxia-inducible factor 1(HIF-1)은 저산소 상태에서 외부의 산소 농도의 변화에 적절하게 반응하기 위해 해당과정, 혈관신생과정 등을 유도 함으로서 세포내의 항상성을 유지시키는 전사인자이다.<sup>40-42)</sup> 특히 HIF-1a는 특이적이며 산소농도에 의해 조절되는 subunit이다. HIF-1a가 산소농도에 의해 조절되는 기전은 복잡하나 mRNA의 발현, 단백질의 안정성, 저산소중에 반응하는 활성 기능 등이 이 기전에 관여한다.<sup>43)</sup>



VEGF는 이배체 헤파린 결합 당단백질(dimer heparin-binding glycoprotein)로 혈관내피세포들의 가장 강력한 분열촉진인자 중 하나로 혈관투과성을 증가시켜 혈관순환으로부터 섬유소원(fibrinogen) 같은 거대분자들의 혈관외 유출을 일으킨다. 이것은 종양세포뿐 아니라 혈관내피세포의 이동과 기질화를 위한 섬유소겔 그물망구조(fibrin gel meshwork)나 기질층을 제공하기도 한다. 이러한 작용으로 VEGF는 혈관신생과 직접적으로 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>39)</sup>

본 실험에서 RR 추출물의 혈관신생 억제효과를 연구하기 위해 먼저 MTS assay를 통하여 RR 추출물의 세포독성 및 세포증식 효과를 조사하였다. 그 결과 RR 추출물은 24시간에서 HaCaT에서 세포독성이 없었다(Fig. 1).

HaCaT 세포인 인간 각질형성세포에 RR 추출물을 1 시간 전 처리하고 IGF-II를 처리하였을 때 HIF-1 $\alpha$ 의 단백질 발현이 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해 현저히 감소됨을 확인하였다(Fig. 2).

이 뿐만 아니라 IGF-II에 의해 그 발현이 유도되는 VEGF의 발현 또한 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 3).

이러한 세포 성장 인자인 IGF-II는 세포 증식을 조절하는 p42/p44 mitogen-activated protein kinase(MAPK)를 통해 HIF-1 $\alpha$ 를 인산화시키고 HIF-1의 타겟 유전자의 전사 능력을 활성화시킨다<sup>30)</sup>. HIF-1 $\alpha$ 의 억제 경로는 ERK1/2의 활성화 억제와 p53 활성화를 통해 HIF-1 $\alpha$ 의 축적이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4, 5).

결론적으로 본 연구에서는 RR 추출물이 세포증식 및 전이에 필수적으로 요구되는 혈관신생에 필수적인 HIF 1 $\alpha$ 의 단백질 발현 저해를 통한 VEGF 발현의 억제효과를 보였다. 이러한 억제 경로는 p42/p44 mitogen-activated protein kinase의 비활성화와 p53의 증가를 통

한 것임을 보여주었다.

이 연구를 통해 비이상적 각질형성 세포의 증식을 억제할 수 있는 새로운 혈관신생억제제의 개발을 위해 RR을 통한 면역기능 개선의 가능성을 제시하였다고 사료된다.

## V. 결론

본 연구에서는 RR(*Rehmannia Radix*) 추출물이 MAPK 경로를 통해 HaCaT 세포에서 HIF-1 $\alpha$  단백질 발현과 VEGF mRNA, 단백질 발현을 억제하는 작용이 있음을 확인하였다. 이러한 사실로 볼 때, RR 추출물은 여러 혈관신생인자 중 HIF-1 $\alpha$  단백질 발현 감소를 통해 VEGF 단백질 발현을 감소시켜 암세포의 증식 및 각질형성세포의 과도한 혈관신생과정을 억제하는 것으로 보인다. 더불어 VEGF를 통한 혈관신생 유도 억제유전자의 발현을 조절하여 혈관신생을 억제하는 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- 1) Herron GS, Werb G, Dwyer K, Banda MJ. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. J Biol Chem 1986; 261: 2814-2819.
- 2) Frater-Schroder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Bohlen P. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 5277-5281.
- 3) Gimbrone MA, Leapman SB, Cotran RS,

- Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1992; 136: 261-276.
- 4) Christophers E, Parzefall R, Braun-Falco O. Initial events in psoriasis: quantitative assessment. *Br J Dermatol* 1973; 89: 327-334.
  - 5) Braverman IM, Keh-Yen A. Three-dimensional reconstruction of endothelial cells gaps in psoriatic vessels and their morphologic identity with gaps produced by the intradermal injection of histamine. *J Invest Dermatol* 1986; 86: 577-581.
  - 6) Neely EK, Morhenn VB, Hintz RL, Wilson DM, Rosenfeld RG. Insulin like growth factors are mitogenic for human keratinocyte and a squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 104-110.
  - 7) Xu S, Cwyfan-Hughes SC, Stappen JWJ, Sansom J, Burton JL, Donnelly M, Holly JMP: Altered Insulin-like growth factor-II (IGF-II) level and IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) protease activity in interstitial fluid taken from the skin lesion of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 109-112.
  - 8) Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 131-153.
  - 9) Kim KW, Bae SK, Lee OK, Bae MH, Lee MJ, Park BC. Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 348-351.
  - 10) Bae MH, Lee MJ, Bae SK, Lee OK, Lee YM, Park BC, Kim KW. Insulin like growth factor II(IGF-II) secreted from HepG2 human hepatocellular carcinoma cells shows angiogenic activity. *Cancer Lett* 1998; 128: 41-46.
  - 11) Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1474-1480.
  - 12) Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604-4613.
  - 13) Fang J, Yan L, Shing Y, Moses MA. HIF-1 $\alpha$ -mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor, independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 5731-5735.
  - 14) Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732.
  - 15) Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G. Expression of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1661-1668.
  - 16) Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL. Expression of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* 2000; 88: 2606-2618.
  - 17) Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW.

- Overexpression of hypoxia inducible factor alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999;59:5830-5835.
- 18) Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000;157:411-421.
- 19) Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5510-5514.
- 20) Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999;59:3915-3918.
- 21) Semenza GL. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:551-578.
- 22) Elson DA, Ryan HE, Snow JW, Johnson R, Arbeit JM. Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res* 2000;60:6189-6195.
- 23) Fotsis J, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Nat Acad Sci* 1993;90:2690-2694.
- 24) Kobayashi S, Miyamoto T, Kimura I, Kimura M. Inhibitory effect of isoliuqitrin, a compound in licorice root, on angiogenesis in vivo and tube formation in vitro. *Biol Pharm Bull* 1995;18:1382-1386.
- 25) Sato K, Mochizuki M, Saiki I, Yoo YC, Samukawa K, Azuma I. Inhibition of tumor angiogenesis and metastasis by a saponin of *Panax ginseng*, ginsenoside-Rb<sub>2</sub>. *Biol Pharm Bull* 1994;17:635-639.
- 26) Kwon YW, Kwon KS, Moon HE, Park JA, Choi KS, Kim YS, Jang HS, Oh CK, Lee YM, Kwon YG, Lee YS, Kim KW. Insulin like growth factor-II regulates the expression of vascular endothelial growth factor by the human keratinocyte cell line HaCaT. *J Invest Dermatol* 2004;123:152-158.
- 27) Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, Semenza GL. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia inducible factor 1. *Cancer Res* 2003;63:1138-1143.
- 28) Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  and insulin like growth factor 2. *Cancer Res* 1999;59:3915-3918.
- 29) Semenza GL. Targeting HIF 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-732.
- 30) Berra E, Pages G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:139-145.
- 31) Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev* 2000;14:34-

- 44.
- 32) Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue- G. H. A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 186; 46: 467-473.
- 33) Hill DJ, Milner RDG. Somatomedins and fetal growth. In the fetus and independent life, Ciba foundation symposium 1981; 86: 124-151. London: Pitman.
- 34) Milner RDG, Hill DJ. Fetal growth: The role of insulin and related peptides. *Clin Endocrinol* 1984; 21: 415-433.
- 35) Underwood LE, D'Ecole AJ. Insulin and somatomedins / insulin-like growth factors in fetal and neonatal development. In: ed, by Daughaday WH *Clinics in Endocrinology and Metabolism* vol. 13, *Tissue Growth Factors*. pp 68-89, East Essex, England: Saunders WB Co, Ltd, 1984.
- 36) Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf J. Actions of insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 1985; 47: 443-467.
- 37) Zapf J, Froesch ER. Insulin-like growth factors / somatomedins: Structure, secretion, biological actions and physiological role. *Homone Res* 1986; 24: 121-130.
- 38) Baxter RC. The somatomedins: Insulin-like growth factors. *Adv Clin Chem* 1986; 25: 49-115.
- 39) Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 852-858.
- 40) Wenger RH & Gassmann, *J Biol Chem* 1997; 378: 609-616.
- 41) Semenza GL. *Trends Cardiovasc Med* 1996; 6: 151-157.
- 42) Iyer NV et al. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 1998; 12: 149-162.
- 43) Semenza GL. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 551-578.
- 44) 배명호, 송현석, 배수경, 이석기, 이세원, 김철우, 김규원. 새로운 혈관신생인자인 인슐린-유사 성장인자 II(IGF-II)의 전사조절에 관한 연구. *대한암예방학회지* 2002; 7: 27-33.