

Angiostatin과 Endostatin의 인체 신생혈관 형성에 대한 억제효과

순천향대학교 의과대학 외과학교실

정 성 필 · 이 민 혁

Inhibition Effect of Angiostatin and Endostatin on Human Angiogenesis

Sung Pil Jung, M.D., Ph.D. and Min Hyuk Lee, M.D., Ph.D.

Purpose: Angiogenesis is a critical determinant of tumor growth and the development of metastasis. Angiostatin and endostatin have been used in a variety of *in vitro* and *in vivo* animal models as effective inhibitors of angiogenesis. However, human angiostatin and endostatin have not been tested against an intact human tissue target *in vitro* to determine its ability to achieve an antiangiogenic response. We performed our study to determine if human angiostatin and endostatin would inhibit the development of an angiogenic response (initiation) and to determine the subsequent growth (angiogenic index) of human vessels in a dose-dependent manner with a human placental vein angiogenesis model (HPVAM).

Methods: We used full thickness human placental vein discs cultured in three-dimensional fibrin-thrombin clots with an overlay of liquid media. Human angiostatin and endostatin were evaluated in concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-4} M. A positive control containing 20% fetal bovine serum and a negative control using heparin and hydrocortisone 21-phosphate were also tested.

Results: Human angiostatin did not inhibit the initiation of an angiogenic response and the subsequent development of the angiogenic response (angiogenic index) at any concentration. Human endostatin significantly inhibited the initiation rate of an angiogenic response at a concentration of 10^{-4} M ($p < 0.001$) and the subsequent development of an angiogenic response (angiogenic index) from a concentrations of 10^{-5} M to 10^{-4} M ($p < 0.001$, $p < 0.001$, respectively).

Conclusion: We conclude that a very high concentration of human endostatin can inhibit the angiogenic response in human vascular tissue and that human angiostatin will not inhibit angiogenesis of normal human blood vessels *in vitro*.

These results suggest that human endostatin has a more powerful antiangiogenic effect than human angiostatin, but we need further investigations of human angiostatin against an intact human tissue target. (J Korean Surg Soc 2001; 60:1-7)

Key Words: Angiostatin, Endostatin, Angiogenesis, Antiangiogenesis, Human placental vein angiogenesis model

중심 단어: 엔지오스테틴, 엔도스테틴, 신생혈관형성, 항신생혈관형성, 인체태반정맥신생혈관 모델

Department of Surgery, College of Medicine, Soonchunhyang University

서 론

신생혈관 형성(angiogenesis)은 기존 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 일련의 과정이다. 이것은 정상적인 인체 내에서는 태아기를 제외하고는 드물게 발생되며 비종양성 병적 상태인 당뇨병성 망막증, 류마티드 관절염, 건선, 창상치유 등에서는 병의 유발에 중요한 역할을 한다. 특히 과거 20여년 간 종양의 성장과 전이의 발생이 신생혈관의 발육에 의존한다는 사실이 많은 연구에서 밝혀졌다. 그리고 이 신생혈관 형성에 관여하는 혈관신생인자도 규명되었다.(1-6)

이에 종양의 성장과 전이를 막기 위해 항 신생혈관 요법 (anti-angiogenic therapy)이 새로운 암 치료법으로 제시됨에 따라 이에 대한 많은 보고 및 연구가 진행되고 있다. 현재까지 발견된 신생혈관 억제제(angiogenesis inhibitors)는 약 30종에 달하고 있다.(7,8) 특히 O'Reilly등(9,10)에 의해 1994년 plasminogen의 internal fragment에서 처음 분리한 38 KDa의 angiostatin과 1997년에 발견된 20 KDa의 collagen XVIII의 단백질인 endostatin은 많은 관심이 집중되고 있다. Angiostatin과 endostatin의 신생혈관 억제 효과에 대한 *in vitro* 및 *in vivo*상에서 많은 연구 보고가 있으며 현재 임상 실험 중에 있다. 그러나 아직 정상 인체 조직을

책임저자 : 정성필, 경북 구미시 공단동 250
☎ 730-030, 순천향대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 054-463-7151, Fax: 054-462-1746
E-mail: spjung_md@hotmail.com
접수일 : 2000년 11월 6일, 게재승인일 : 2000년 12월 16일

이용한 이들 약제의 신생혈관 억제효과에 대한 연구 보고가 미흡한 상태이다.(11-15)

이에 저자들은 인체 태반정맥 신생혈관 모델(Human Placental Vein Angiogenesis Model, HPVAM)을 이용하여 인체 endostatin과 인체 angiostatin 농도의 양에 의존한(dose-dependent manner) 신생혈관 발현과 증식정도(신생혈관 지표로 표시)를 측정하여 이들에 의한 신생혈관 억제 효과를 알아보기 위한 연구를 시행하였다.

방 법

1) 재료

(1) **태반정맥:** 태아 출산직후 산모 태반을 공여 받아 태반 정맥을 박리 하여 정맥의 주위 조직을 깨끗이 제거 한 후 세로로 절개하여 편평한 전 층의 정맥(full thickness venous tissue)을 이용하였으며 각 농도군마다 2개의 태반을 이용하였다.

(2) **Angiostatin과 Endostatin:** angiostatin (M.W. 30,000) (EnterMed Inc. Rockville, MD, USA)용액(in 0.15 M NaCl)과 endostatin (M.W. 20094) (EnterMed Inc. Rockville, MD, U.S.A)용액(in 0.15 M NaCl) 은 인체용을 사용하였다. 이들 시약은 분량하여 -85°C 의 냉동실에 보관하였다. 배지는 20% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 HPVAM용액 [Medium 199+antibiotic/antimycotics (100 u penicillin, 100 u streptomycin sulfate and 0.25 μg amphotericin β)+endothelial growth media (25%)]에 각 농도의 필요 분량의 시약만 용해하여 2일 간격으로 교환하였다. FBS, Media 199과 endothelial growth media는 GibcoBRL (Gaithersburg, MD, U.S.A.)에서 구입하였다.

2) 실험방법

(1) **인체태반정맥을 이용한 신생혈관 모델(Fig. 1):** 실험 모델은 태반으로부터 박리 된 전 층의 정맥을 2 mm의 소독된 피부판치(skin punch)를 이용하여 정맥 절편(vein discs)을 만든 후 standard 96 well plate (Corning Inc., Corning, NY, USA)에 이식하였다. 정맥 절편은 모든 실험군에 무작위로 고루 분산하였으며 혈관 내피 세포의 생존 능력을 유지하기 위해 태반 공여 후 2시간 이내 시행하였다. 각 96 well은 정맥 절편 이식 전 인체 트롬빈용액(0.05 u in 1.0 μl /well)을 주입하였으며 이식된 정맥 절편 위에 100 μl 의 응고 용액을 주입하였다. 응고 용액은 HPVAM 용액에 fibrinogen (3 mg/ml)과 ϵ -amino caproic acid (0.5%)를 이용하였으며 인체 트롬빈과 fibrinogen, ϵ -amino caproic acids는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 응고 용액을 첨가 후 5% CO_2 가 함유된 37°C 의 배양기에서 10시간 배양 후 응고된 응고 용액 위에 20% FBS가 첨가된 HPVAM용액을 100 μl 씩 주입

하였다. 각 well의 전체 용량은 200 μl 으로 하였다.

(2) **Angiostatin 및 Endostatin 치료 실험군:** Angiostatin과 endostatin의 각각의 발현(initiation)과 증식(promotion)에 대한 효과를 관찰하기 위해 정상 대조 군, 음성 대조 군과 치료 군으로 구분하였다. 정상 대조 군은 20% FBS가 함유된 HPVAM용액을 사용하였으며 음성 대조 군은 20%FBS가 함유된 HPVAM용액에 heparin 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (55 USP unit/ml), hydrocortisone 21-phosphate 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 치료 군은 angiostatin과 endostatin 각각 10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M의 농도를 사용하였으며 각 농도 군에 따라 2회씩 시행하였다. 각 군은 총 60개의 정맥절편(N=30/placenta)이 이용되었으며 모든 모델은 5% CO_2 가 함유된 37°C 의 배양기에서 2주간 배양하였다.

(3) **Angiostatin 및 Endostatin 치료 효과에 대한 평가:** Angiostatin 및 endostatin 치료 효과에 대한 평가는 신생혈관의 발현과 증식 정도로 평가하였다. 신생혈관 발현과 증식 정도는 20배의 현미경하에서 2~3일 간격으로 관찰하였다.

① **발현:** 각 정맥절편에서 길이 2 mm 이상 5개 이상의 신생혈관이 발생 시 신생혈관의 발현이라 정의하였다.

② **신생혈관 지표:** 발현된 신생혈관의 성장과정을 증식으로 정의하였으며 증식의 정도는 신생혈관 지표(angio-genic index)로 표시하였다. 실험이 끝날 때까지 발현되지 않은 정맥 절편은 증식 정도의 평가에서 제외하였다. 신생혈관 지표의 기준은 각 정맥절편을 4등분하여 각 구획별 신생혈관의 평균 길이가 0~5 mm는 1점, 5~10 mm는 2점, 10~15 mm는 3점, 15 mm 이상은 4점의 점수를 부여하였으며 밀도가 높을 시 1점 가산하였고 밀도가 낮을 시 1점 감산하여 각 4구획을 합산하여 0~16점으로 구분하여 산출하였다.

(4) **통계 검정:** 각 정상 대조 군, 음성 정상 군과 치료 군간의 발현 율의 유의성 여부를 위해 one-sided Fisher Exact test를 사용하였으며 신생혈관 지표의 검정을 위해 one-way ANOVA와 Turkey's HSD (Honestly Significant Different) test를 이용하였다.

결 과

1) 발현율

(1) **정상 대조군과 음성대조군의 비교:** 각 농도군의 모든 실험에서 정상대조군의 발현율은 71.7%에서 100%로 음성대조군의 발현율 38.3%에서 73.3%와 통계학적인 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$).

(2) **Angiostatin 치료군(Fig. 2-A, B, C):** Angiostatin 10^{-4} M 치료 군에서의 발현율은 61.7%로 정상 대조 군의 71.7%와 통계적인 유의한 차이는 없었으나($p=0.166$) 음성

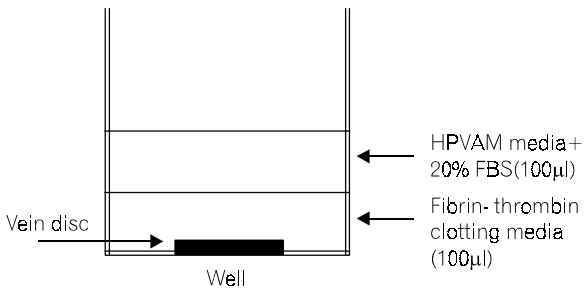


Fig. 1. Schematic drawing for Human Placental Vein Angiogenesis Model (HPVAM).

대조 군 38.3%과는 통계학적인 유의한 차이가 있었다($p=0.009$). Angiostatin 10^{-5} M 치료군에서는 발현율이 100%로 정상 대조 군의 96.7%과는 유의한 차이는 없었으나 음성 대조 군 73.3%과는 유의한 차이가 있었다($p=0.002$). Angiostatin 10^{-6} M 치료군에서는 발현율이 90.0%로 정상 대조 군과 음성 대조 군 모두 유의한 차이는 보이지 않았다. Angiostatin 10^{-7} M, 10^{-9} M 치료군에서는 발현율이 각각 50.8%, 50.0%로 모두 정상 대조 군 71.7%, 음성 대조 군 46.7% 간에 유의한 차이는 보이지 않았다($p=0.016$, $p=0.033$).

(3) Endostatin 치료군(Fig. 3-A, B, C): Endostatin 10^{-4} M 치료군에서의 발현율은 18.3%로 정상 대조 군 78.3% 음성 대조 군 48.3% 모두에 통계학적인 유의한 차이를 보였다

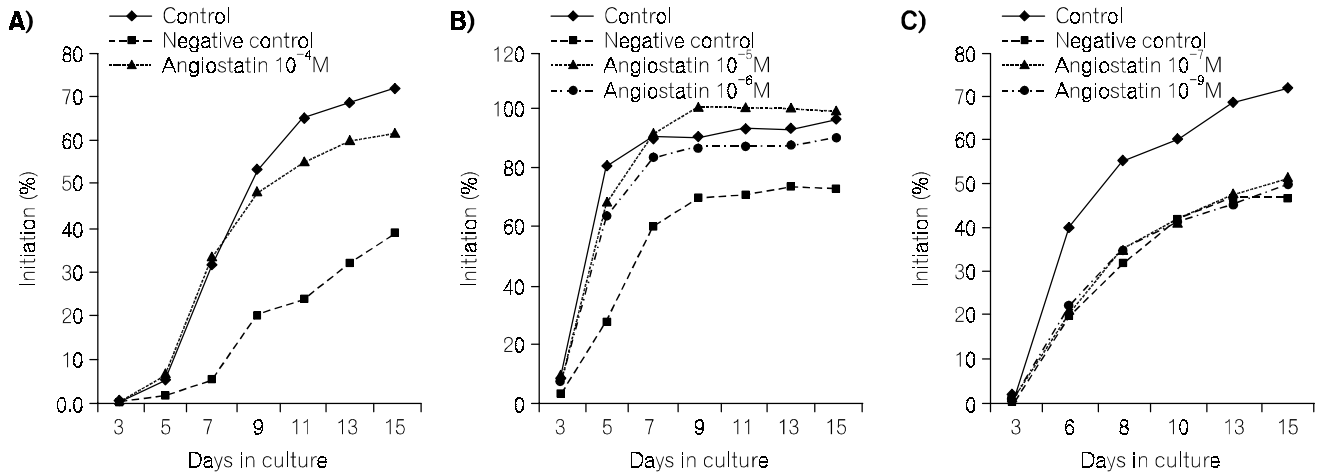


Fig. 2. Effect of angiostatin treatment on initiation (percent of wells exhibiting sprouting divided by the total number of wells plated). Combined data from two times experiment is shown as a mean value. There were not significant with control in any concentration of angiostatin.

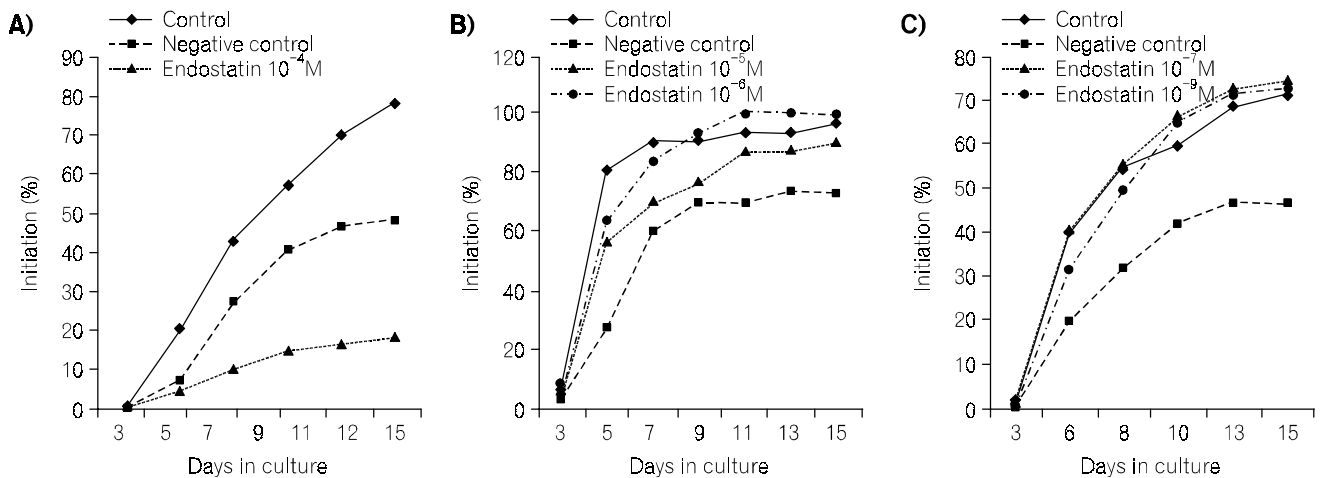


Fig. 3. Effect of endostatin treatment on initiation (percent of wells exhibiting sprouting divided by the total number of wells plated). Combined data from two times experiment is shown as a mean value. The endostatin 10^{-4} M group significantly inhibited the initiation of an angiogenic response ($p<0.001$).

($p < 0.001$, $p < 0.001$). Endostatin 10^{-5} M 치료군의 발현율은 90.0%로 정상 대조군 96.7%와 음성 대조군 73.3%와는 모두 유의한 차이를 보여주지 않았다($p=0.306$, $p=0.09$). Endostatin 10^{-6} M 치료군의 발현율은 100%로 정상 대조군과는 유의한 차이는 보여주지 않았으며 음성 대조군과는 유의한 차이를 보여 주었다($p=0.500$, $p=0.0025$). Endostatin 10^{-7} M, 10^{-9} M 치료군에서는 각각 74.6%, 73.3%로 모두 음성 대조군 46.7%와는 통계학적인 유의한 차이를 보였으나($p < 0.001$, $p=0.002$) 정상 대조군 71.7%와는 통계학적인 유의한 차이는 없었다($p=0.211$, $p=0.500$).

2) 신생혈관 지표

(1) 정상 대조군과 음성대조군의 비교: 각 농도군의 모

든 실험에서 정상 대조군의 신생혈관 지표의 평균치는 6.0 ± 3.70 에서 11.7 ± 3.29 , 음성 대조군의 신생혈관 지표의 평균치는 2.8 ± 1.48 에서 5.6 ± 2.53 으로 두 군간의 통계학적으로 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$).

(2) Angiostatin 치료군(Fig. 4-A, B, C): Angiostatin 10^{-4} M 치료군의 신생혈관 지표의 평균치는 6.8 ± 3.33 으로 정상 대조군 6.0 ± 3.70 과는 통계적인 유의한 차이가 없었고($p=0.484$) 음성 대조군 2.8 ± 1.48 과는 통계학적인 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$). Angiostatin 10^{-5} M, 10^{-6} M 치료군에서 신생혈관 지표의 평균치는 각각 9.5 ± 3.49 , 11.0 ± 3.18 로 정상 대조군 11.7 ± 3.29 와는 통계학적인 유의한 차이는 없었으나 음성 대조군 4.0 ± 1.66 과는 각각 통계학적인 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$, $p < 0.001$). Angio-

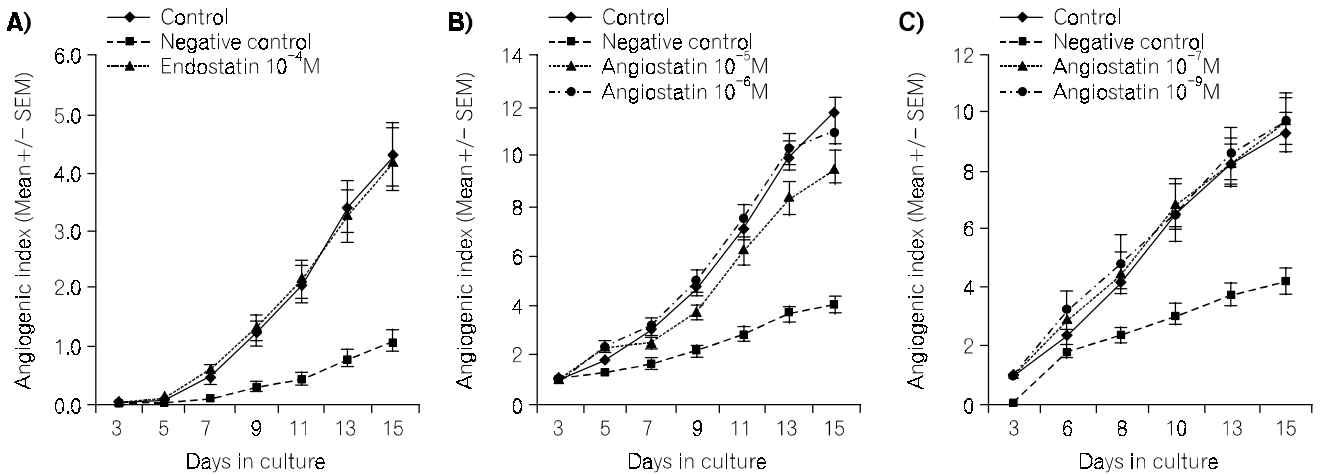


Fig. 4. The effect of angiostatin treatment on angiogenic index (growth of angiogenic vessel) from two times experiments and combined as a mean value. Wells which did not initiate an angiogenic response are excluded from this analysis. There were not significant with control in any concentration of angiostatin.

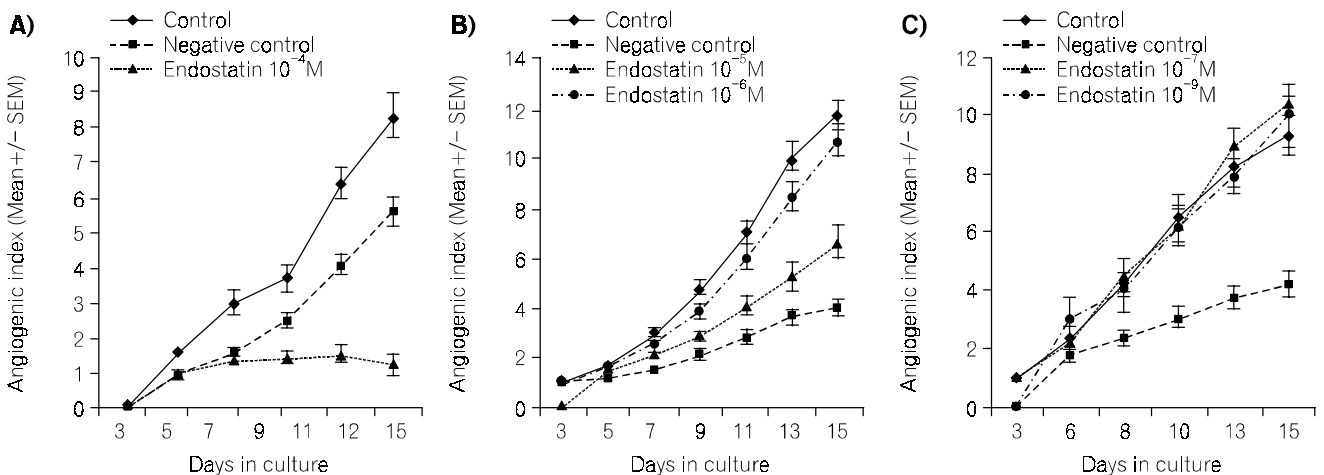


Fig. 5. The effect of endostatin treatment on angiogenic index (growth of angiogenic vessel) from two times experiments and combined as a mean value. Wells which did not initiate an angiogenic response are excluded from this analysis. The endostatin significantly inhibited the promotion of an angiogenic response at concentrations of 10^{-5} M, 10^{-4} M ($p < 0.001$).

statin 10^{-7} M, 10^{-9} M 치료군의 신생혈관 지표의 평균치는 9.73 ± 4.35 , 9.7 ± 4.51 로 정상대조 군 9.30 ± 4.45 와는 통계학적인 유의한 차이가 없었으며 음성 대조 군 4.17 ± 2.37 과는 통계학적인 유의한 차이를 보여 주었다($p < 0.029$, $p < 0.029$).

(3) Endostatin 치료군(Fig. 5-A, B, C): Endostatin 10^{-4} M 치료 군에서의 신생혈관 지표의 평균치는 1.27 ± 0.65 로 정상 대조 군 8.3 ± 4.99 및 음성 대조 군 5.6 ± 2.53 에 각각 통계학적인 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$, $p = 0.008$). Endostatin 10^{-5} M 치료 군의 신생혈관 지표 평균치는 6.6 ± 3.59 로 정상 대조 군 11.7 ± 3.29 및 음성 대조 군 4.0 ± 1.66 의 신생혈관 지표 평균치와 통계학으로 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$, $p = 0.005$). Endostatin 10^{-6} M 치료군의 신생혈관 지표의 평균치는 10.7 ± 3.52 로 정상 대조 군과는 통계학적인 유의한 차이가 없었으며($p = 0.894$) 음성대조 군만 통계학적인 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$). Endostatin 10^{-7} M, 10^{-9} M 치료군의 신생혈관 지표의 평균치는 각각 10.5 ± 3.73 , 10.1 ± 4.08 로 정상 대조 군 9.3 ± 4.45 와는 통계학적인 유의한 차이가 없었으며 음성 대조 군 4.18 ± 2.37 에만 통계학적인 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$, $p < 0.001$).

고 찰

신생혈관은 휴면상태의 혈관 내피세포가 증식성 표현형(proliferative phenotype)으로 전환되어 내피 세포의 이동(migration), 내피세포의 혈관성 구조 형성, 기저막 분해(degradation)의 과정을 거쳐 새로운 혈관이 형성되는 일련의 과정이다. 신생혈관과 종양은 서로 밀접한 관계를 가지며 종양의 성장과 전이는 혈관 형성에 의존한다는 이론이 성립되었다.(16) 종양이 발생되면 종양세포로부터 염기성 섬유아 세포 성장인자(basic fibroblast growth factor), 혈관 내피 세포 성장 인자(vascular endothelial growth factor) 및 혈관 침투 인자(vascular permeability factor) 등 혈관 내피 세포의 성장을 유도하는 성장 인자를 분비하며 내피 세포는 종양의 성장을 촉진시키는 인자를 분비한다. 또한 종양 형성시 신생혈관 인자와 신생혈관 억제 인자가 분비되는데 신생혈관 인자가 과다시 종양의 증식이 일어나며 신생혈관 인자와 신생혈관 억제 인자가 균형을 이룰 때 종양의 휴면상태(dormancy)를 유도할 수 있고 신생혈관 억제 인자 과다시 세포의 퇴축(regression)을 일으킬 수 있다.(17-19) 항 신생혈관 요법은 직접적으로 내피세포의 증식을 선택적으로 차단하거나 신생혈관 생성을 조절하는 cytokine environment를 변화시킴에 의해 간접적으로 조절할 수 있다. 이에 신생혈관을 억제하여 암세포의 휴면 상태 또는 퇴축을 유도하여 암세포의 성장, 전이 및 재발을 방지할 수 있을 것으로 생각되며 현재까지 시행되고 있는

수술적 절제, 화학요법, 및 방사선 요법에 의한 독성, 합병증, 저항성 획득 등에 의한 문제점에 반해 항 신생혈관 요법은 체내 축적에 의한 부작용 및 합병증이 적고 저항성 획득에 의한 치료 실패율이 낮고 환자 체력적 부담이 적다는 것에 많은 장점을 가지고 있다.

이러한 이유에서 현재 많은 신생혈관 형성의 억제를 위한 연구가 이루어지고 있으며 특히 angiostatin과 endostatin에 대한 많은 관심이 집중되고 있다.

Angiostatin은 1994년 O'Reilly등에 의해 Lewis 원발 폐암을 가진 쥐의 혈청과 소변으로부터 38 KDa인 plasminogen의 internal fragment에서 처음 분리되어 내피 세포 증식 및 신생혈관과 종양의 성장을 억제한다고 보고되었다.(9) 이 angiostatin은 plasminogen을 분리하는 효소의 촉매 부위(catalytic site)를 차단하여 신생혈관 형성의 기질(matrix)의 재생(remodelling)을 방해하는 것으로 보고되고 있으며(20,21) 신생혈관 작용에 관여하는 내피 세포 형성을 선택적으로 억제하여 휴면 상태를 초래하는 것으로 보고되고 있다.(18) 이 후 O'Reilly등은 다시 1997년 혈관 내피 종으로부터 내피 세포를 특이하게 억제하는 20 KDa의 collagen XVIII의 단백질을 발견하여 endostatin이라 명명하였으며 이는 angiostatin과 같이 collagenase를 차단하여 기질 재생(matrix remodelling)을 방해하는 것으로 보고되고 있다. Endostatin을 전신 투여 시 내피 세포의 분열을 직접적으로 억제하여 최상의 휴면상태의 치료 효과를 얻을 수 있었으며(10) 주기 반복 투여시 종양의 재발을 예방할 수 있었고 많은 항암 화학 요법 시 문제가 되는 약제 저항성에 대한 문제는 일어나지 않는다고 한다.(22) Hanahan은 신생혈관 생성을 억제하는 기능으로는 3그룹으로 나눌 수 있는데 첫째로 순수 신생혈관 억제제로 이미 형성된 종양의 혈관에는 영향을 미치지 못하고 신생혈관의 증식을 억제하는 그룹, 둘째로 종양 혈관 독소(tumor vessel toxins)로 이미 형성된 종양 혈관을 파괴하는 그룹이며 셋째는 두 기능을 모두 가지고 있는 그룹으로 angiostatin과 endostatin이 이 그룹에 속한다 하였다.(23)

이러한 angiostatin과 endostatin에 의한 신생혈관 억제 효과가 인체 angiostatin, 쥐 angiostatin과 인체 endostatin, 쥐 endostatin에 대한 in vitro 및 in vivo상에서 증명되어 왔으며 현재 임상 실험에까지 이루어지고 있다. 그러나 정상 인체 조직을 이용한 연구는 많이 보고되지 않은 실정이다. 이에 저자들은 인체 조직에서의 인체 angiostatin과 endostatin의 신생혈관의 억제 효과를 in vitro상에서 시행하였다. 저자들은 이 실험에 앞서 heparin과 steroid에 의한 신생혈관 생성 억제 효과를 실험하였다. 각각 heparin 30 μ g/ml, 300 μ g/ml, 3000 μ g/ml, hydrocortisone 21-phosphate 35 μ g/ml, 350 μ g/ml, 3500 μ g/ml 및 Heparin+steroid의 각각의 농도 군에 대한 실험을 3차례씩 시행한 결과 heparin 300 μ g/ml+hydrocortisone 21-phosphate 350 μ g/ml의 농도

부터 양에 의존하는(dose-dependent) 강력한 신생혈관 억제 효과를 이미 입증하였다(data not published). 이에 본 실험에 있어 신생혈관 생성 억제 효과의 정도를 비교하기 위해 정상 대조 군과 더불어 신생혈관 생성 억제효과의 기대치로 heparin 300 $\mu\text{g/ml}$ +hydrocortisone 21-phosphate 350 $\mu\text{g/ml}$ 치료 군을 음성 대조 군으로 이용하였다.

Mohanraj등은 인체 제대정맥 내피세포를 이용한 연구에서 인체 endostatin 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포의 apoptosis가 유발함을 증명하였고 endostatin이 내피 세포의 세포 분열 시기 G_1 arrest를 일으킴으로 신생혈관 생성을 억제한다고 보고하였다.(11,12) 반면 saphenous vein을 이용하여 인체 endostatin에 대한 실험을 한 Erwin A등은 250 $\mu\text{g/ml}$ 과 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 미세 혈관 형성의 억제 효과를 보고하였다.(13) 최근 Yoon등은 endostatin에 의해 인체 제대정맥 내피 세포의 증식이 36~51% 감소됨을 보고하였고 종양 세포의 폐와 간 전이를 감소시킴을 보고하였다.(14) 또한 Perletti등은 동물 실험에서 endostatin을 4주간 치료시 전신 독성 없이 쥐 유선 종양의 성장을 억제됨을 보고하였다.(24) 저자들의 실험 결과 인체 endostatin은 10^{-5} M (200 $\mu\text{g/ml}$)의 농도부터 양에 의존하는(dose-dependent) 억제 효과를 보였다. 특히 저자들의 실험에서 10^{-4} M군에서는 신생혈관의 정지 상태에서 증식이 시작되는 이른 바 "angiogenic switch"로 설명되는 발현(initiation)이 정상 대조 군에 비해 76.6%가 억제되었으며 신생혈관의 증식 정도를 보여주는 신생혈관 지표(angiogenic index)는 약 96%의 억제를 보여 주어 높은 농도에서 강력한 신생혈관 억제 효과를 입증하였다.

O'Reilly등은 chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay을 이용하여 인체 angiostatin이 20 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ disc에서 억제 효과를 나타내기 시작하여 40 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ disc에서 가장 강력한 신생혈관 억제 효과가 있음을 보여주었으며,(9) Lena등에 의한 보고에 의하면 인체 제대 정맥 세포를 이용한 실험에서 angiostatin 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도부터 FGF-2 및 VEGF의 감소에 의한 내피세포의 migration 억제 및 apoptosis를 보여 주었다.(15) Wu등은 in vitro 실험상 angiostatin 50 ng/ml에서 bovine capillary endothelial cell의 증식이 억제되기 시작하였으며 in vivo 실험상 6 mg/kg/day에서 Lewis 원발성 폐암의 성장이 억제됨을 보고하고 있다.(25) O'Reilly등은 인체 암세포를 이용한 동물 실험에서는 50 mg/kg의 angiostatin을 투여 시 인체 유방암세포는 95%, 대장암세포 97%, 전립선암 세포의 100%에서 신생혈관 억제에 의한 암세포의 apoptosis를 보여주고 있다. (21) 또한 Sim등은 동물 실험에서 angiostatin 1.5 mg/kg을 전신 투여 시 Lewis 원발성 폐암의 성장이 억제됨을 보고하였다.(26) 이상 여러 연구를 검토한 결과 억제 효과의 적정 농도가 대상 및 방법에 따라 다양함을 보여주고 있다.

그러나 본 저자들의 angiostatin 실험에서는 어떠한 농도

군에서도 신생혈관 억제의 효과는 나타나지 않았다. 연구 과정에서 시약의 조작에 세심한 주의를 기울였으며 항상 -85°C 에 보관하여 신선도를 유지하였고 배지 교환시 필요 분량에 의해 미리 나누어진 시약만을 해동하여 배지에 정확한 양을 희석하였으며 in vitro상에서의 시약의 빠른 대사 및 반감기를 감안하여 매 2일마다 배지를 교환하였다. 그러나 같은 방법으로 시행된 인체 endostatin에서는 억제 효과를 관찰할 수 있었으나 인체 angiostatin에서는 억제 효과를 관찰할 수 없었다. 이는 원인을 확실히 규명할 수 없으며 관련 자료를 찾을수 없으나 실험회수가 3회 반복이 아닌 2회에 제한된 실험과 태반의 상태에 따른 각기 다른 결과에 대한 bias의 가능성을 배제할 수 없으나 Cao의 angiostatin 연구에서 동물 실험에서는 여러 종양의 성장을 억제 효과를 볼 수 있으나 인체에 대한 임상 적용에는 너무 높은 농도의 필요로 아직 사용하기 어려움을 보고 한 바와 같이(27) 정상 인체 조직에서의 angiostatin은 신생혈관 생성에 대한 억제를 위해서는 10^{-4} M 이상의 농도가 필요하다는 가능성을 제시하고 있다.

이에 저자들은 인체 endostatin의 항 신생혈관 효과, 적은 내성 및 적은 부작용 등의 많은 장점에 비해 인체 조직 내에서는 높은 농도 군에서 신생혈관의 억제가 시작되어 다량의 endostatin의 추출 문제, 경제적인 문제 및 정확한 작용 기전에 대한 좀 더 연구가 필요하리라 사료되며 암 정복에 새로운 장을 열어 주리라 기대해 본다.

결 론

인체 태반정맥 신생혈관 모델로 인체 endostatin과 인체 angiostatin 농도의 양에 의존한(dose-dependent manner) 신생혈관 발현과 증식정도(신생혈관 지표로 표시)를 측정하여 신생혈관 억제 효과를 알아보기 위한 연구 결과, endostatin은 10^{-5} M 농도 군부터 양에 의존하는 신생혈관 억제 효과가 나타났으며 10^{-4} M (2 mg/ml)의 고 농도 군에서는 강력한 신생혈관 억제를 볼 수 있었다. 그러나 angiostatin은 어떠한 농도 군에서도 신생혈관 효과가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 angiostatin보다 endostatin이 더 강력한 신생혈관 억제 효과를 가지고 있으며 항암 치료에 새로운 치료제로 기대되며 angiostatin에 대한 좀 더 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

REFERENCES

- 1) Algire GH, Chalkley HW, Legallais F, Park H. Vascular reactions of normal and malignant tumors in vivo. 1. Vascular reactions of mice to wounds and normal and neoplastic transplants. J Natl Cancer Inst 1945;6:73-85.
- 2) Tannock I. The relation between cell proliferation and the

- vascular system in a transplanted mouse mammary tumor. *Br J Cancer* 1968;22:258-73.
- 3) Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972;175:409-16.
 - 4) Gimbrone MA, Cotran RS, Leapman SB, Folkman J. Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 1974;52:413-27.
 - 5) Folkman J. What is the evidence that tumor are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
 - 6) Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-4.
 - 7) McNamara DA, Harmey JH, Walsh TN, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Br J Surg* 1998;85:1044-55.
 - 8) Giampietro G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs* 1999;58:17-38.
 - 9) 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;79:315-28.
 - 10) O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-85.
 - 11) Mohanraj D, Ramani R, Matthew JFW, Hua L, Bertrand K, Mark S, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:11721-6.
 - 12) Mohanraj, Ruediger V, Ramani R, Michael S, Viksa PS. Cloning, expression and in vitro activity of human endostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258:346-52.
 - 13) Erwin AK, Paul HD, Maria GT, David JV, Steven KL, Shannon CD, et al. Endostatin inhibits microvessel formation in the in vivo rat aortic ring angiogenesis assay. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:183-91.
 - 14) Yoon S, Eto H, Lin CM, Nakamura H, Pawlik TM, Song SU, et al. Mouse endostatin inhibits the formation of lung and liver metastases. *Cancer Res* 1999;59:6251-6.
 - 15) Welsh LC, Welsh M, Ito N, Apte BT, Soker S, Zetter B, et al. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5579-83.
 - 16) Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;18:1182-6.
 - 17) Gimbrone M, Leapman S, Cotran R. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1972;136:261-76.
 - 18) Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastasis: balanced proliferation and apoptosis on the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995;1:149-53.
 - 19) Uhr JW, Scheuermann RH, Street NE, Vitetta ES. Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches. *Nat Med* 1997;3:505-9.
 - 20) Bussolin F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanism of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci* 1997;22:251-6.
 - 21) O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 1996;2:689-92.
 - 22) 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.
 - 23) Hanahan DA. A flanking attack on cancer. *Nat Med* 1998;4:13-4.
 - 24) Perletti G, Concari P, Giardini R, Marras E, Piccinini F, Folkman J, et al. Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. *Cancer Res* 2000;60:1793-6.
 - 25) Wu Z, O'Reilly MS, Folkman J, Shing Y. Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:651-4.
 - 26) Sim KL, O'Reilly MS, Liang H, Fortier AH, He W, Madsen JW, et al. A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Res* 1997;57:1329-34.
 - 27) Cao Y. Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer. *Haematologica* 1999;84:643-50.