

固本祛瘀1號方의 抗癌活性에 關한 研究(I)

徐寅源* · 金聖勳** · 최봉근*** · 金東熙*

Abstract

Study on Antitumor Activity of Gobongeer1hobang(GG1B)

Seo In-weon O.M.D, Kim Sung-Hoon O.M.D, Ph. D, Choi Byong-gyun O.M.D, Kim Dong-Hee O.M.D, Ph. D.
Dept. of Oriental Medicine Pathology,
College of Oriental Medicine, Taejon University, Taejon, Korea.

To evaluate the antitumor activity and antimetastatic effects of Gobongeer1hobang(GG1B), studies were done experimentally.

The results were obtained as follows:

1. GG1B extracts exhibited a significant cytotoxicity against HT1080, A549, SK-MEL-2 and SK-OV-3 cell lines.
2. The T/C% was 120.7% in GG1B treated group in S-180 bearing ICR mice.
3. GG1B extracts exhibited inefficient adhesive effect of A549, B16-BL6 cell to complex extracellular matrix.
4. GG1B extracts showed a significant inhibition of lung metastasis of B16-BL6 cells in C57BL/6.
5. In CAM assays, angiogenesis was insignificantly inhibited in GG1B treated group than control group.

These results suggested that GG1B extracts might be usefully applied for prevention and treatment of cancer.

I. 緒 論

現代醫學이 當面한 가장 큰 課題중의 하나는 癌에 대한 適切한 治療法 開發이다. 그 동안의 癌治療 研究는 手術療法, 放射線 療法, 化學療法등 主

로 癌細胞柱에 對하여 直接的인 殺傷作用에 關한 研究가 進行되어 왔으나, 이와 더불어 나타나는 正常細胞에 대한 殺傷作用으로 많은 副作用이 惹起되고 있다¹⁾.

이에 最近에는 免疫療法, apoptosis, 細胞分化誘導法, 血管形成沮害法 및 遺傳子 療法 등의 다양한 研究 및 治療法이 試圖되고 있는 實情이며 특히 韓藥을 포함한 天然物로부터 새로운 抗癌物質을 開發하려는 研究가 활발히 進行되고 있다²⁻⁴⁾.

* 大田大學校 韓醫科大學 病理學教室

** 慶熙大學校 東西醫學大學院 韓方腫瘍學教室

*** 푸른한의원

韓醫學에서 癌의 治療는 健脾益氣, 養血滋陰, 養陰生津, 補腎溫陽, 健脾益腎 등 人體의 抗病能力을 增進시키는 扶正培本法과 清熱解毒, 活血化癥, 化痰消癥, 理氣消腫 등 癌細胞를 直接 攻擊하는 祛邪法 및 이 두가지 方法을 配合한 扶正祛邪法(5-11)이 應用된다. 그 중 扶正培本法 및 活血化癥法에 대한 研究가 比較적 많은데 이것은 이 治療法이 臨床에서 治療效果가 比較적 높음을 말해주고 있는 것이기도 하다(6-10,12-15). 특히 活血化癥藥物의 活血化癥 作用은 直接的으로 癌細胞에 作用하는 것 이외에 血管形成抑制作用 등 癌細胞의 轉移 및 轉寫過程의 變移抑制에도 改善을 가져올 것으로 期待되고 있다.

이에 著者는 黃芪, 茯苓, 枸杞子, 兔絲子, 仙靈脾 등의 扶正藥物과 鷄血藤, 丹蔘, 三七根의 活血化癥藥物로 構成되어 現在 臨床에서 應用되고 있는 固本祛癥1號方의 抗癌活性을 實驗的으로 立證하고자, 이를 試料로 HT1080을 비롯한 癌細胞에 對한 細胞毒性, sarcoma 180에 對한 生存比 등의 測定을 通해 抗癌效果를 評價하고, A549 癌柱의 附着 阻止作用, 肺癌轉移抑制作用, 血管形成 阻害作用 등을 測定하여 抗轉移 效果를 評價하였던 바 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 動 物

動物은 雄性 4주령의 ICR(International Cancer Research, U.S.A)계 생쥐를 韓國化學研究所에서 供給받아 實驗當日까지 固形飼料(抗生劑 無添加, 三養飼料 Co.)와 물을 充分히 供給하고 室溫 22±2℃를 계속 維持하면서, 2 週日間 實驗室 環境에 適應시킨 後 S-180 癌細胞에 對한 生存比 測定 實驗에 使用하였다.

2) 藥 物

本 實驗에 使用한 藥材는 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入하여 精選한 것을 使用하였으며, 固本祛癥1號方의 내용은 郁의 《中醫腫瘤學》¹⁶⁾에

記載된 것을 기본으로 構成하였으며 處方의 內容과 한 貼 分量은 아래와 같다.

Prescription of Gobongeerlhobang(GG1B)

韓 藥	生藥名	用量(g)
黃 芪	<i>Astragali Radix</i>	30
茯 苓	<i>Hoelen</i>	10
枸 杞 子	<i>Lycii Fructus</i>	15
兔 絲 子	<i>Cuscutae Semen</i>	15
鷄 血 藤	<i>Spatholobi Caulis</i>	30
仙 靈 脾	<i>Epimedii Herba</i>	10
三 七 根	<i>Notoginseng Radix</i>	3
丹 蔘	<i>Salviae miltiorrhizae Radix</i>	10
總 量		123

3) 試藥 및 機器

試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), HBSS (Hank's balanced salt solution), glycerol, bromophenol blue, Tris base, boric acid, agarose, sodium dodecyl sulfate (SDS), trypsin-EDTA, 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), sulforhodamine-B (SRB), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, formaldehyde, lysophosphatidic acid, lipopolysaccharide (LPS), trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma 製品, ethanol, HCl은 Merck 製品, sodium bicarbonate는 Gibco 製品, acetic acid는 Glicial 製品, DNA topoisomerase I, pBR322 DNA는 Takara 製品을 각각 使用하였다.

機器는 CO₂ incubator (Vision scientific Co., Model VS-9108 MS), clean bench (Vision scientific Co., KMC-14001), centrifuge (Beckman Co., GS-6R), inverted microscope (Nikon Co., Japan), bright microscope (UFX-DX, Nikon), linear accelerator(Varian Co, U.S.A.), ELISA-reader(Emax, U.S.A), FACScan (Becton dickinson, U.S.A), rotary vacuum evaporator (Büchi 461), autoclave (Hirayama, Japan), micro-pipet (Gilson, U.S.A), autostill WG25 (Japan), titer plate shaker (Labline Inst., U.S.A), culture flask (Falcon 3024), multiwell plate (96-well, Falcon), conical tube, disposable pipet (5ml, 10ml, 25ml,

Falcon), camera(601S, Nikon) 및 syringe filter (0.22, 0.45 μ m, Falcon)등을 使用하였다.

2. 方法

A. 抗癌性 探索

1) 試料의 製造

上記한 固本祛癆1號方の 5첩 分量(615g)을 各各 3,000ml round flask에 蒸溜水 2,000ml와 함께 넣은 다음 冷却器를 附着시키고 2時間 동안 加熱하여 濾過한 濾液을 rotary vacuum evaporator (Büchi 461)에서 減壓 濃縮하였고, 이 round flask를 -84 $^{\circ}$ C deep freezer(Sanyo, Japan)에서 24시간 동안 放置하고 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12시간을 凍結 乾燥하여 32g의 粉末을 얻어, 檢液으로 製造하여 使用하였다. 動物 實驗時에는 生理食鹽水에 溶解시켜 使用하였으며, 細胞毒性 實驗時에는 RPMI 1640 free medium에 溶解시켜 syringe filter (0.22, 0.45 μ m, Falcon)로 濾過하여 使用하였다.

2) 細胞 培養

In vitro 細胞毒性 測定에는 HT1080(ATCC CCL121), A549(ATCC CCL185) 肺癌柱, SK-OV-3(ATCC HTB 77) 卵巢癌柱 및 B16-BL6 melanoma (ATCC CRC 6322), SK-MEL-2(ATCC HTB 77) 黑色腫을 in vivo 抗癌 實驗에는 S-180(ATCC TIB 66) 腹水癌柱, B16-BL6(ATCC CRC 6322) 생쥐 黑色腫을 使用하였는데 이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 培地에 56 $^{\circ}$ C 水槽에서 30分間 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum (FBS)을 10% 包含하고 1% 抗生劑(penicillin-G 10만 units/streptomycin 100 mg)와 NaHCO₃ 2g을 添加하여 製造하였다.

3) HT-1080, A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 癌柱에 對한 細胞毒性 測定

Solid tumor에 대한 細胞毒性은 1989年에 美國의 國立癌研究所에서 藥物의 in vitro 抗癌活性度를 測定하기 위하여 開發된 sulforho- damine-B (SRB)assay 法¹⁷⁾을 使用하였다. 繼代中인 이들 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여 trypsin-EDTA용액으로 附着面으로부터 分離시키고, 96-well

flat-bottom microplate (Falcon)에 well당 細胞數가 2 \times 10⁴개가 되도록 분주하였다.

분주된 細胞들은 CO₂ incubator내에서 24時間 培養하여 바닥 면에 附着시킨 후, medium에 濃度別(100, 10, 1, 0.1 μ g/ml)로 稀釋된 試料溶液들을 넣어 細胞가 들어있는 well에 各各 200 μ l씩 넣어주고 다시 48時間 동안 培養하였다.

試料는 加하기 前에 0.22 μ m filter로 濾過하여 實驗의 無菌狀態를 維持하였다. 藥物과 함께 48時間 培養이 끝난 後, 各 well의 medium을 除去하고, 10% trichloroacetic acid(TCA)를 well당 100 μ l씩 加하여 4 $^{\circ}$ C에서 1時間 동안 放置하여 細胞들을 plate의 바닥 면에 固定시켰다.

細胞의 固定이 끝난 후 plate를 물로 5~6회 洗滌하여 남아 있는 TCA 용액을 完全히 除去하고 室溫에서 남은 물기가 없도록 乾燥시켰다. 完全히 乾燥된 plate는 well당 250 μ l의 1% acetic acid 溶液에 0.4% SRB를 녹인 染色 溶液을 加하여 30分間 細胞를 染色하고 다시 1% acetic acid 溶液으로 5~6회 洗滌하여 細胞에 結合하지 않은 SRB를 除去하였다.

染色된 cell plate들은 다시 室溫에서 乾燥시킨 후, control의 O.D. (optical density) 값이 520nm에서 0.8~1.0A(吸光度) 값이 되도록 一定量의 10mM Tris로 染色液을 잘 녹여 낸 다음 520nm에서 0.8~1.0A(吸光度) 값을 구하여 ED₅₀값을 얻었다. 癌 細胞들에 대한 藥物의 效果를 評價하기 위하여 細胞數의 測定은 藥物을 加할때의 細胞數(T_z)와 藥物이 들어 있지 않은 medium을 가하여 48時間동안 培養했을 때의 細胞數(C) 및 各 濃度의 藥物과 함께 48時間 培養했을 때의 細胞數(T) 등을 測定하였다(Scheme 1).

다음의 數式에 의해 抗癌活性 程度를 測定하였다. 즉, T_z≥T 인 境遇에는 (T-T_z)/(C-T_z) \times 100의 數式으로 計算하였고, T_z<T 인 境遇에는 (T-T_z)/T_z \times 100의 數式으로 計算하였으며, 이렇게 計算된 값들로부터 lotus program의 data regression 機能을 利用하여 藥物의 癌細胞 成長을 50% 抑制하는 濃度인 50% effective dose (ED₅₀)값을 計算하여 各 藥物의 細胞毒性 程度

를 比較하였다. ED₅₀값은 對照群의 50% 水準으로 癌細胞의 成長을 抑制하는 試料의 濃度(μg/ml)로 주어지며, 美國立癌研究所인 NCI(National Cancer Institute, U.S.A) manual의 方法¹⁸⁾에 따라서 決定하였다. 試驗群의 各濃度에 대한 成長率 Y(%)는 다음과 같이 計算하였다.

$$Y(\%) = [(T - C_0) / (C - C_0)] \times 100$$

이때, T = 試驗群의 48時間 培養後 平均 細胞數 (cells/ml)

C = 對照群의 48時間 培養後 平均 細胞數 (cells/ml)

C0 = 培養 始作時 平均 細胞數 (cells/ml)

各各 濃度의 Y(%)값과 Log10 dose를 圖式化하고 다음과 같은 式에 의하여 회귀선을 구했다. 이때 各各의 濃度에 대하여 計算한 Y(%)값이 모두 50%보다 작으면 再實驗을 實施하였다.

$$B = \text{slope} = \frac{N \cdot \sum(X_i \cdot Y_i) - (\sum X_i) \cdot (\sum Y_i)}{N \cdot \sum(X_i)^2 - (\sum X_i)^2}$$

$$A = \text{intercept} = \frac{\sum Y_i}{N} - B \frac{\sum X_i}{N}$$

이때, N=number of points selected
[≤ number of dose level & > 2]

X_i = log dose i

Y_i = growth ratio calculated dose I

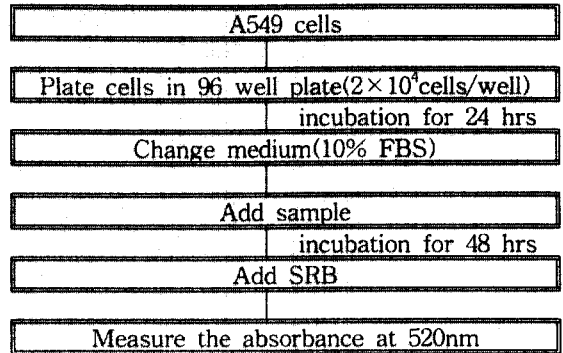
여기서 구한 기울기와 절편을 이용하여 회귀선 Y = A + BX 를 얻었으며 이 회귀선의 기울기와 절편으로부터 ED₅₀값을 계산하였다.

$$50 = A + B (\log_{10} ED_{50})$$

$$\log_{10} ED_{50} = (50 - A) / B$$

$$ED_{50} = 10^{\log_{10} ED_{50}} \mu\text{g/ml}$$

NCI manual에 따르면 細胞毒性 評價는 植物 抽出物인 경우 20μg/ml 이하, 合成物인 경우 4μg/ml 以下일 境遇 抗癌 作用이 있다고 規定^{18,19)}하고 있다.



Scheme 1. The experimental scheme for cytotoxicity of GG1B on A549 cells

4) A549, B16-BL6 癌柱의 附着 沮止 作用 測定^{20,21)}

A549, B16-BL6 細胞를 cell culture dish에 monolayer로 자라도록 細胞 濃度를 調節하면서 키웠다. 癌細胞는 2% FBS로 調節한 培地에 懸濁시켜 96 well plate의 各 well에 100μl 씩 가한(5×10⁴cells/well). 후 0.001, 0.01, 0.1mg/ml 濃度의 試料를 녹인 培地 100μl를 加하고 5% CO₂, 37°C에서 培養하였다. 3時間 後 培養液을 除去시키고 96 well plate의 바닥을 2% FBS로 洗滌한 다음 24時間 培養시킨 후 SRB法¹⁷⁾에 의하여 바닥에 붙어 있는 細胞數를 觀察하였다.

5) 肺臟 轉移 抑制 作用 測定

(1) Pulmonary colonization 測定²²⁾

In vitro에서 繼代培養한 B16-BL6 肺癌細胞를 實驗에 使用하였다. 즉, 繼代中인 이들 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여 trypsin-EDTA 溶液으로 附着面으로부터 分離시켜 HBSS 溶液으로 細胞數가 2×10⁴ cells/ml이 되도록 細胞懸濁液을 만들었다. 18~20g인 C57BL/6에 細胞懸濁液 0.2ml을 尾靜脈 注射하였다. 檢液은 B16-BL6 癌細胞를 移植한 後 24時間부터 1日 1回씩 10mg/20g/day의 試料를 生理食鹽水에 녹여 4°C에서 保管하면서 7日間 每日 zonde를 使用하여 經口 投與하였다. 癌移植 21日 後에 cervical dislocation으로 致死시킨 다음 開腹하여 肺에 轉移된 癌細胞 colony를 計算하였다.

6) 血管形成 抑制作用 測定

(1) CAM(Chorioallantoic membrane) assay^{23,24)}

- 1日째(0日胚) : 受精卵을 培養基에서 孵化시켰다. 이 때 培養基의 溫度는 37~38°C, 濕度는

90% 以上 維持되도록 隨時로 確認하였다. 여기에 서 0日胚란 受精卵이 産卵되어 18℃에서 保管된 지 3~4日 以內的 것을 말한다.

- 3日째(2日胚) : 受精卵의 뾰족한 끝 部分에 칼로 홈을 낸 후 水平으로 뒤어놓고 5ml 注射器로 구멍을 낸 다음 알부민을 3~5ml 정도 뽑아내었다. 受精卵이 乾燥되지 않고 또 感染되지 않도록 구멍을 유리 테잎으로 봉한 후 구멍이 아래로 향하도록 놓고 다시 培養시켰다.

- 4日째(3日胚) : 受精卵의 air sac이 있는 쪽 (주사기 구멍의 반대쪽)으로 직경 2~3cm 크기의 圓形 window를 내고 受精卵으로 확인된 것만 넓은 유리 테잎으로 막고 다시 培養시켰다. 참고로, 圓形 window를 내는 方法은 날카로운 칼로 受精卵의 겹질 위에 圓形으로 홈을 낸 뒤 핀셋으로 겹질을 뜯어내었다. 이때 겹질가루가 안쪽으로 떨어지지 않도록 주의하였다. 受精卵이란 window를 났을 때 십자가형의 가는 血管이 보이는 것을 意味한다.

- 5日째(4.5日胚) : 이 時期가 되면 CAM이 生成되며, 그 直徑이 2~5mm 정도 된다. 샘플을 적당한 溶媒(물, 에탄올)에 녹인 다음 4等分된 thermanox coverslip 위에 10 μ l씩 떨어뜨리고 clean bench안에서 말렸다. 여기에 thermanox coverslip은 가위로 잘라 4等分하여 clean bench안의 UV 아래에서 overnight시켰다. 受精卵의 유리 테잎을 칼로 뜯어내고 CAM을 찾아 確認한 후 핀셋으로 샘플이 처리된 thermanox를 뒤집어 조심스럽게 올려놓고 다시 유리 테잎으로 막았다. 이때 使用하는 가위, 칼, 핀셋 등은 70% 에탄올로 消毒하여 使用하고, 핀셋은 샘플을 하나하나 loading할 때마다 消毒하여 使用하였다. 기타 實驗 機具들도 受精卵이 感染되지 않도록 注意하면서 使用하였다.

- 7日째(6.5日배) : 유리 테잎을 칼로 뜯어내었다. 注射器로 intralipose (fat emulsion)를 1ml 취하고, 기포를 除去한 뒤 CAM의 바로 아래 部分에 注入한다. 이 때 흰색 바탕에 뚜렷한 血管을 觀察할 수 있었다. 注射器로 intralipose로 注入할 때는 血管이 다치지 않도록 注意하였다. 觀察이 끝난 受精卵은 카메라로 近接 撮影하였다.

7) S-180 癌細胞에 對한 生存比 測定

ICR 마우스의 腹腔內에 7日間 培養된 sarcoma 180 細胞를 腹水와 함께 취하여 滅菌된 冷生理食鹽水를 加해 400 \times g로 2分間 遠心分離하여 細胞沈澱物을 分離하였다. 分離된 細胞 沈澱物을 冷滅菌 生理食鹽水에 浮遊시켜 다시 遠心分離하여 上澄液을 除去한 後 混在된 赤血球를 溶血시키고 sarcoma 180 細胞만을 取하였다. 同一한 方法으로 3회 洗滌한 後 hemacytometer로 세어 10⁷cells/ml 의 濃度가 되도록 細胞 浮游液을 만들고 이 浮游液을 0.1ml씩 腹腔內에 移植하였다. 移植 後 24時間부터 各 群을 8마리로 配定하였다. 試料는 生理食鹽水로 溶解시켜 保存液(10mg/20g/day)을 만든 후 4℃에 保存하였으며, 0.2ml씩 經口로 1週日 間 連續 投與하였으며 對照群에는 同量의 生理食鹽水를 投與하였다. 生存比(T/C%)는 美國立 癌研究所 protocol에 言及된 式²⁵⁾에 따라 計算하였다.

III. 實驗 成績

A. In vitro

1. HT1080 癌柱에 對한 細胞毒性

HT1080 癌柱에 對한 細胞毒性 實驗에서는 0.001, 0.01, 0.1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群에 비해 各各 93.46 \pm 4.61, 90.17 \pm 2.59, 50.15 \pm 1.57%로 0.1mg/ml에서 40% 以上 細胞毒性을 나타내었다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Cytotoxic Effect of GG1B on HT1080 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100 \pm 4.41
0.001	93.46 \pm 4.61
0.01	90.17 \pm 2.59
0.1	50.45 \pm 1.57

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度

- 0(control) : Non-treated group
- 0.001 : 0.001mg/ml GG1B treated group
- 0.01 : 0.01mg/ml GG1B treated group
- 0.1 : 0.1mg/ml GG1B treated group

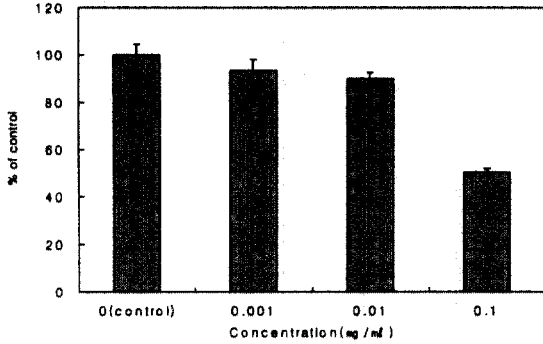


Fig. 1. Cytotoxic effect of GG1B on HT1080 cells.

0(control) : Non-treated group
 0.001 : 0.001mg/ml GG1B treated group
 0.01 : 0.01mg/ml GG1B treated group
 0.1 : 0.1mg/ml GG1B treated group

2. A549 癌柱에 대한 細胞毒性

A549 癌柱에 對한 細胞毒性 實驗에서는 0.001, 0.01, 0.1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群에 比해 各各 96.61±2.06, 91.04±3.69, 49.05±1.12%로 0.1mg/ml에서 50% 이상 細胞毒性의 效果를 나타내었다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Cytotoxic Effect of GG1B on A549 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100±5.17 ^{a)}
0.001	96.61±2.06
0.01	91.04±3.69
0.1	49.05±1.12

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度

a) : Mean± standard error

Control : Non-treated group
 0.001 : 0.001mg/ml of GG1B treated group
 0.01 : 0.01mg/ml of GG1B treated group
 0.1 : 0.1mg/ml of GG1B treated group

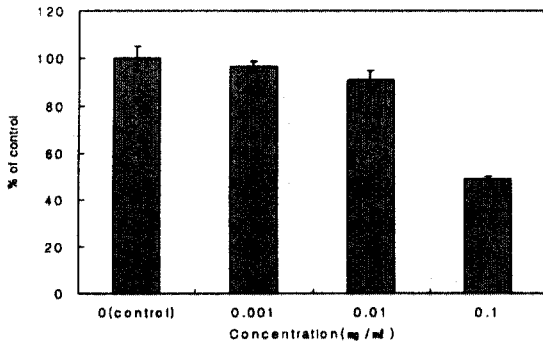


Fig. 2. Cytotoxic effect of GG1B on A549 cells.

0(control) : Non-treated group
 0.001 : 0.001mg/ml GG1B treated group
 0.01 : 0.01mg/ml GG1B treated group
 0.1 : 0.1mg/ml GG1B treated group

3. SK-OV-3 癌柱에 對한 細胞毒性

SK-OV-3 癌柱에 對한 細胞毒性 實驗에서는 0.001, 0.01, 0.1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群에 比해 各各 99.61±0.67, 69.19±1.18, 50.09±2.01%로 0.1mg/ml에서 50%로 細胞毒性의 效果를 나타내었다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Cytotoxic Effect of GG1B on SK-OV-3 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100±6.18 ^{a)}
0.001	99.61±0.67
0.01	69.19±1.18
0.1	50.09±2.01

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度

a) : Mean± standard error

Control : Non-treated group
 0.001 : 0.001mg/ml of GG1B treated group
 0.01 : 0.01mg/ml of GG1B treated group
 0.1 : 0.1mg/ml of GG1B treated group

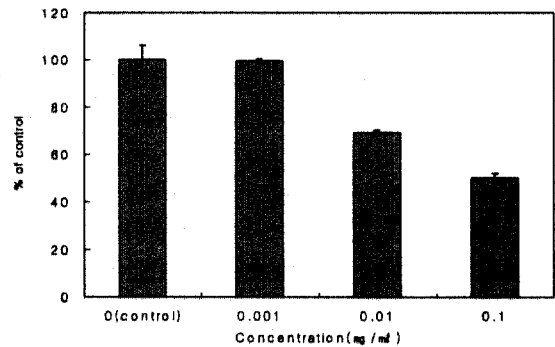


Fig. 3. Cytotoxic effect of GG1B on SK-OV-3 cells.

0(control) : Non-treated group
 0.001 : 0.001mg/ml GG1B treated group
 0.01 : 0.01mg/ml GG1B treated group
 0.1 : 0.1mg/ml GG1B treated group

4. B16-F10 癌柱에 對한 細胞毒性

B16-F10 癌柱에 對한 細胞毒性 實驗에서는 0.001, 0.01, 0.1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群에 比해 各各 96.82±3.73, 88.45±3.16, 44.27±0.01%로 0.1mg/ml에서 50% 以上 細胞毒性의 效果를 나타내었다(Table 4, Fig. 4).

Table 4. Cytotoxic Effect of GG1B on B16-F10 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100±8.08 ^{a)}
0.001	96.82±3.73
0.01	88.45±3.16
0.1	44.27±0.01

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度

a) : Mean± standard error

Control : Non-treated group

0.001 : 0.001mg/ml of GG1B treated group

0.01 : 0.01mg/ml of GG1B treated group

0.1 : 0.1mg/ml of GG1B treated group

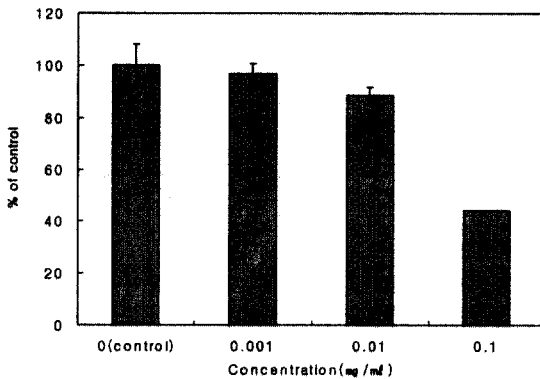


Fig. 4. Cytotoxic effect of GG1B on B16-F10 cells.

0(control) : Non-treated group

0.001 : 0.001mg/ml GG1B treated group

0.01 : 0.01mg/ml GG1B treated group

0.1 : 0.1mg/ml GG1B treated group

5. A549 癌柱에 대한 附着阻止 效果

A549 細胞에 對한 附着阻止 實驗에서는 0.001, 0.01, 0.1mg/ml의 濃度에서 對照群에 比해 124.8±1.16, 100.9±1.07, 96.07±3.61%로 細胞 附着阻止 效果가 거의 나타나지 않았다(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Inhibitory Effect of GG1B on Cell Adhesive of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100±5.47 ^{a)}
0.001	124.8±1.16
0.01	100.9±1.07
0.1	96.07±3.61

a) : Mean± standard error

Control : Non-treated group

0.001 : 0.001mg/ml of GG1B treated group

0.01 : 0.01mg/ml of GG1B treated group

0.1 : 0.1mg/ml of GG1B treated group

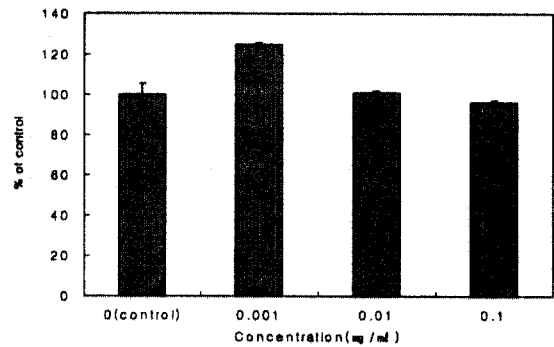


Fig. 5. Inhibitory effect of GG1B on cell adhesive of A549 cells to complex extracellular matrix.

0(control) : Non-treated group

0.001 : 0.001mg/ml GG1B treated group

0.01 : 0.01mg/ml GG1B treated group

0.1 : 0.1mg/ml GG1B treated group

6. B16-BL6 癌柱에 대한 附着阻止 效果

B16-BL6 細胞에 對한 附着阻止 實驗에서는 0.001, 0.01, 0.1mg/ml의 濃度에서 對照群에 比해 109.5±0.96, 99.73±5.19, 76.07±2.53%로 細胞 附着阻止 效果가 거의 나타나지 않았다(Table 6, Fig. 6).

Table 6. Inhibitory Effect of GG1B on Cell Adhesive of B16-BL6 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100±3.31 ^{a)}
0.001	109.5±0.96
0.01	99.73±5.19
0.1	76.07±2.53

a) : Mean ± standard error

Control : Non-treated group
 0.001 : 0.001mg/ml of GG1B treated group
 0.01 : 0.01mg/ml of GG1B treated group
 0.1 : 0.1mg/ml of GG1B treated group

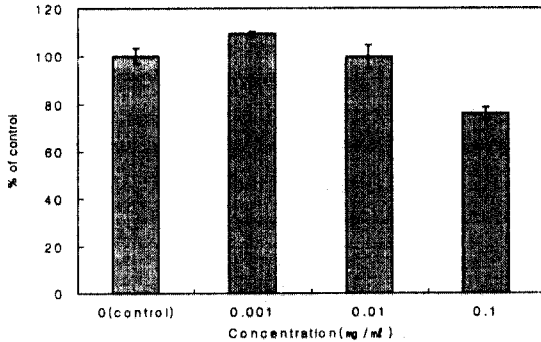


Fig. 6. Inhibitory effect of GG1B on cell adhesive of B16-BL6 cells to complex extracellular matrix.

0(control) : Non-treated group
 0.25 : 0.25mg/ml GG1B treated group
 0.5 : 0.5mg/ml GG1B treated group
 1 : 1mg/ml GG1B treated group

B. In vivo

1. S-180이 移植된 생쥐의 生存比에 미치는 效果

S-180이 移植된 생쥐에 10日間 經口 投與한 後 體重 增加를 測定하였던 바 腹水癌으로 인한 體重 增加는 對照群에서는 癌柱 移植 後 11日에 급격히 增加하여 18日에 모두 죽었다.

平均 生存日數에서 對照群의 MST는 17.12日, GG1B 投與群은 21.12日로 나타나, T/C%는 120.7%로 나타났다(Table 7.).

Table 7. Effect of GG1B on MST and T/C % in ICR Mice Bearing Sarcoma 180.

Group	No. of animals	MST (day)	T/C(%) ^{a)}
Control	8	17.12	100
GG1B	8	21.12	120.7

$$T/C (\%)^{\#} : \frac{MST \text{ of sample}}{MST \text{ of control}} \times 100 (\%)$$

2. 肺臟 轉移 抑制에 미치는 效果

B16-BL6 黑色腫을 C57BL/6의 尾靜脈에 注射한 後 10日間 GG1B를 投與하면서 21日째에 肺臟의 colony 數를 觀察한 結果 對照群은 48.62 ± 2.48(개)이었는데 比해서 GG1B 投與群은 38.15 ± 7.41(개)로써 22%의 有意性있는(P<0.05) 肺癌轉移 抑制效果를 보였다(Table 8, Fig. 7).

Table 8. Inhibitory Effect of GG1B of Lung Colonies in C57BL/6 Injected i.v. with B16-BL6 Cells.

Group	No. of animals	Number of colonies
Control	10	48.62 ± 2.48 ^{a)}
GG1B	10	38.15 ± 7.41*

a) : Mean ± standard error

GG1B : 10mg/20g/day GG1B treated group

* : Statistically significant value compared with control data(*: P<0.05)

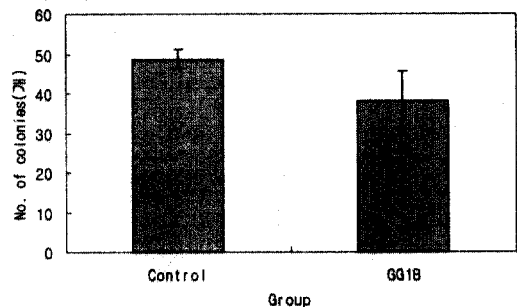


Fig. 7. Inhibitory effect of GG1B of lung colonies in C57BL/6 injected i.v. with B16-BL6 cells.

3. 血管形成 抑制效果

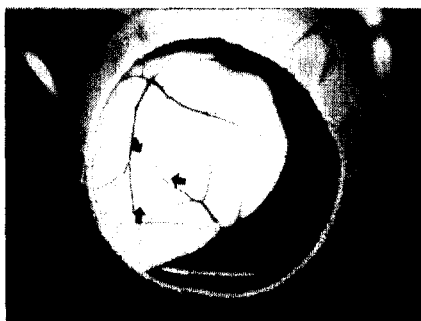
血管形成 抑制效果는 CAM assay를 實施하여 測定하였는데, 實驗에 使用된 受精卵 10個중 2個에서 血管形成 抑制效果가 나타나 20%의 血管形成 抑制效果를 나타내었다(Table 9, Fig. 8)

Table 9. Antiangiogenic Activity of GG1B in a CAM Assay

Sample	Dose(μg/egg)	No. of CAM (avascular/total)
GG1B	10	2/10



GG1B treated group



Control group

Fig. 8. Photography of control and GG1B(10 μ g/egg) on embryonic angiogenesis in CAM 2 day after sample implantation.

IV. 考 察

癌은 지금까지 알려져 있는 死亡原因 중 높은 比率을 차지하고 있는 疾患으로 癌治療는 現代醫學이 當面한 가장 큰 課題 중의 하나로 되어있다. 最近 “21세기 암”이라는 報告書에 의하면 세계 抗癌劑 市場이 年平均 12% 成長하고 있는 趨勢에 있다. 그 간 aminopterin으로부터 시작한 抗癌劑는 많은 發展을 이루어 왔으나 現在 臨床的으로 쓰이고 있는 大部分의 抗癌劑는 合成醫藥品이었다. 그러나 그 중에는 各種 真菌에서 얻은 抗生劑 bleomycin, adriamycin, 民間療法으로 쓰이던 植物에서 추출한 알카로이드 vinblastine과 vincristine 및 人蔘으로부터 抽出한 ginsenosides, 주목나무에서 抽出한 taxol등 天然物에서 얻어지는 抗癌製劑

들이 근래 많은 關心을 받고있다. 더구나 現在 大部分의 既存 藥物은 그 治療效果 보다는 毒性이 問題視되고 있어 天然物을 이용한 抗癌劑 開發에 대한 研究는 世界的인 關心事로 떠오르면서 이에 대한 開發이 활발해지고 있다.

癌이란 細胞調節機能이나 惡性腫瘍遺傳子를 抑制하는 能力의 喪失로서 發生하는 組織의 自律的인 過剩成長으로 個體에 對해서 이롭지 않을 뿐더러 正常組織에 對해서 破壞的인 것으로 定義되는데^{1,26,27)} 빠른 浸潤性 成長과 各 部位로의 擴散 및 轉移와 같은 特異性을 지녀 生命에 危險을 招來한다.

韓醫學에서는 일찌기 周殷 시대부터 腫瘍에 대한 記錄이 있는데, 즉 殷墟에서 發見된 甲骨文字上에 “瘤”라는 病名이 記載되어 있고, 紀元前 12世紀의 周禮에는 “負責治療 腫瘍”이라 하여 腫瘍만을 專任하는 腫瘍科가 있었다^{8,10,28)}. 癌이라는 용어는 宋代의《衛濟寶書》에 오늘날 病理組織的으로 나타나는 癌과는 區別되지만 文獻上 最初로 癌字가 記載되었으며, 內經을 爲始한 各種 韓醫書에서 나타난 積聚, 癥瘕, 疝瘕, 疝膈, 反胃, 癭瘤, 石瘕 및 石疽 등이 癌과 類似病症으로 認識^{8,10)}되고 있다.

韓醫學에서는 癌의 發病機轉으로 “正氣存內 邪不可干”, “邪之所湊 其氣必虛”라 하여 正氣라는 生體의 抵抗能力을 重要視 여겨, 正氣가 先虛한 以後에 各種 邪氣에 의해 留滯客邪·氣滯血瘀·邪毒積聚·成塊하여 癌이 發生한다 認識하여 扶正法을 中心으로 各種 祛邪法을 活用하고 있다^{8-11,29-31)}.

韓醫學에서 癌의 治療는 健脾益氣, 養血滋陰, 養陰生津, 補腎溫陽, 健脾益腎등의 扶正培本法과 清熱解毒, 活血化瘀, 化痰消癆, 理氣消腫등의 祛邪法 및 이 두가지 방법을 배합한 扶正祛邪法으로 區分되며⁸⁻¹¹⁾, 扶正祛邪法을 中心으로 初期에는 攻法爲主, 中期에는 攻補兼法, 末期에는 先補後攻法으로 臨床에서 活用되고 있다¹⁵⁾.

實驗的으로도 扶正法은 個體의 免疫機能을 改善하고 骨髓機能과 血液狀 및 內分泌, 體液調節, 物質代謝, 解毒能力등을 改善增強시키며, 腫瘍에 대해서도 免疫機能이 있어 癌의 發生과 成長을 抑制

하고, 個體健康의 回復을 促進시키며, 化學療法의 對한 耐耐力을 뚜렷이 增強시키고, 放射線 및 化學療法의 副作用을 減少시킨다³²⁻³⁴)고 報告되었다. 또한 祛邪法은 清熱解毒과 活血化癥로 大別되는데, 이의 藥物들은 病毒 抑制와 個體의 非特異的 免疫能力을 增強시키고, 結體組織代謝나 微細循環을 개선하며 血液循環의 調節作用을 하고, 細網內 皮系細胞의 食食能力을 增強시키고 癌에 續發하는 感染을 치료하며 腫瘍細胞에 直接 一定한 作用을 하는 것으로 알려져 있다³⁵).

특히 活血化癥藥物의 活血化癥 作用은 直接的으로 癌細胞에 作用하는 것 이외에 血管形成抑制作用 등 癌細胞의 轉移 및 轉寫過程의 變移抑制에도 改善을 가져올 것으로 期待되고 있다¹²⁻¹⁴).

本 實驗의 試料인 固本祛癥1號方은 郁의 《中醫 腫瘍學》¹⁶⁾에 記載된 處方으로 黃芪, 茯苓, 枸杞子, 兔絲子, 仙靈脾, 鷄血藤, 丹蔘, 三七根으로 構成되어 臨床에서 癌患者에게 投與하여 有意性있는 效果가 報告된 바가 있다.

固本祛癥1號方 構成藥物의 效能을 살펴보면, 黃芪는 辛甘溫하여 益衛固表, 利水消腫, 托毒生氣, 補中益氣 效能이 있고, 白茯苓은 甘淡而平하여, 健脾涼心, 利水滲濕시키는 效能이 있으며, 枸杞子는 甘寒하여 滋腎潤肺, 補肝明目의 效能이 있다. 菟絲子는 辛甘溫하여, 補肝腎, 益精髓, 明目, 止瀉의 效能이 있고, 仙靈脾는 辛甘溫하여 補腎壯陽, 祛風除濕의 效能이 있으며, 三七根은 甘微苦溫하여 散瘀止血, 消腫止痛, 丹蔘은 苦微寒하여 活血祛癥, 涼血消癥, 除煩安神의 效能이 있다³⁶).

構成藥物의 抗癌效果를 보면 黃芪는 免疫反應 增強作用, 網狀內皮系 食食機能 增強作用 등이 報告되어, 肺癌, 鼻咽癌, 晩期의 消化道 腫瘍에 활용되어지며, 枸杞子는 子宮頸部癌細胞를 抑制하며, mouse의 壽命을 延長하며³⁷), 各種 惡性腫瘍(骨癌, 胃癌, 血癌, 腸癌, 食道癌等)에 配合되어 肝腎不足者에게 活用되고 있으며³⁸), 茯苓은 單核大食細胞 機能增強作用, interferon 生産 誘發作用 등이 報告되어 주로 消化器 腫瘍에 活用되며, 丹蔘은 胃癌, 原發性 肝癌, 白血病, 骨肉瘤, 子宮癌, 腦腫瘍, 皮

膚癌등 多樣하게 活用되고 있으며, 腫瘍을 同伴한 各種 癆血性 癌症에 使用되고 있다³⁹).

이에 本 實驗에서는 이러한 本草學的 效能과 臨床的 報告를 바탕으로, 固本祛癥1號方을 試料로 抗癌 및 抗轉移 效果를 實驗的으로 評價하고자 한다.

먼저 抗癌性 評價는 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, S-180에 對한 生命延長率 等を 測定하였다.

細胞毒性의 測定에는 MTT assay와 SRB assay가 널리 利用되는데, 특히 SRB assay는 細胞數와 比례하고 水溶性의 性質 및 環境에 의한 影響을 덜 받는다는 長點으로 MTT assay 보다 廣範圍하게 利用되고 있다.

本 SRB assay에서는 실험한 모든 癌柱인 HT1080, A549, SK-OV-3, B16-F10 癌柱에서 GG1B 0.1mg/ml 濃度에서 各各 50% 以上 癌細胞 成長 抑制效果를 나타내었다(Table 1-4, Fig. 1-4).

또한 In vivo에서 抗癌效果를 評價하기 위하여 S-180이 移植된 생쥐를 利用하여 生存比를 測定한 實驗에서는 對照群의 MST는 17.12日, GG1B의 MST는 20.12日로 120.7%의 生存比(T/C%)를 나타내어 NCI가 設定한 再實驗 可能 T/C%인 140%에는 미치지 못하였으나 生命延長效果가 있었음을 알 수 있었다(Table 7).

다음으로 癌細胞가 二次的으로 다른 部位에 轉變되어 癌의 症狀을 惡化시킴으로써 死亡에까지 이르게 한다는 점에서 重要하게 認識되고 있는 轉移에 對한 實驗으로, in vitro에서는 複合基質에서 A549, B16-BL6 癌柱에 對한 附着 沮止作用과 B16-BL6 癌柱를 移植한 생쥐의 lung colony 形成 抑制效能을 評價하였다. 먼저 癌細胞의 複合機質外 附着沮止實驗에서는 가장 高濃度인 GG1B 0.1 mg/ml에서도 A549, B16-BL6 癌柱 모두 96, 76% 附着을 나타내어 附着沮止효과가 微弱함을 알 수 있었다(Table 5, 6, Fig.5, 6). 反面에 B16-BL6 癌柱를 利用한 肺癌轉移實驗에서는 GG1B 投與群이 22% 減少하여 有意性있는(P<0.05) 肺癌轉移 抑制效果(Table 8, Fig 7)가 나타났다.

마지막으로 抗轉移 實驗으로 癌의 成長, 浸透 및 轉移에 重要한 段階로 알려진 血管形成에 대한 抑制作用을 測定하였다.

Angiogenesis란 기존의 毛細血管에서 成長하여 새로운 血管이 形成되는 것을 뜻하며, 惡性 腫瘍細胞의 形成과 成長에 重要한 役割을 한다⁴⁰⁾.

Folkman은 primary tumor가 除去되면 轉移된 癌의 成長이 빨라진다는 報告로부터 primary tumor가 存在할 경우 血液속의 血管形成을 抑制하는 物質이 存在한다고 假定하고 primary tumor가 存在하는 쥐의 혈청과 소변으로부터 1994년에 angiostatin⁴¹⁾과 1997년에 endostatin⁴²⁾ 이라는 血管形成抑制 物質을 분리해 냈으며 1998년에는 NCI에서 公式적으로 angiostatin과 endostatin을 同時에 投與하여 쥐에 誘發된 腫瘍의 成長이 抑制됨을 發表하므로써, angiogenesis抑制가 惡性腫瘍의 새로운 治療方法이 되었다.

血管新生抑制劑는 現在까지의 化學療法과는 달리 腫瘍細胞를 직접 죽이지 않아 骨髓障礙, 消化器症狀, 脫毛 등의 副作用이 없으며, 또한 癌細胞는 遺傳子의 不安定하여 形質을 變化시키는 能力이 있음으로 藥劑에 대한 耐性이 생기는데 비하여 血管內皮細胞는 遺傳子의 不安定性이 없으므로 藥劑에 대한 耐性의 憂慮가 없어 癌治療를 위한 하나의 意味있는 手段⁴³⁻⁴⁵⁾으로써 浮刻되고 있다.

本 實驗에서는 血管形成의 抑制作用을 評價하기 위하여 血管移動과 形態形成에 影響을 주는 因子를 研究하는데 適當한 모델로 使用되고 있는 CAM assay를 實施하였는데, figure 8에서 보는 바와 같이 受精卵 10個중 2個에서 血管形成 抑制效果를 나타내어 20%의 血管形成 抑制效果를 나타내었다(Table 9).

以上の 結果를 綜合하여 보면, 本 試料의 抗癌活性이 認定되나 既存의 同一한 實驗 結果와 比較하여 볼 때, 效果的인 結果로 보기 어려우나, 藥物의 構成上 免疫調節作用에 대한 研究 등 多樣한 메커니즘에 대한 研究가 進行되어야 할 것으로 보이며, 數種의 藥物의 加減을 통한 檢索이 持續的으로 이루어져야 할 것으로 思料된다.

V. 結 論

固本祛癆1號方의 抗腫瘍 效果를 糾明하고자 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, 複合基質에 對한 附着阻止效果, 肺臟 轉移 抑制作用, CAM assay를 통한 血管形成抑制 效果, S-180에 對한 生命延長率 등을 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 數種 癌珠에 對한 細胞毒性에서는 HT1080, A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 모든 癌珠에서는 0.1mg/ml 以上の 濃度에서 50% 以上 細胞毒性을 나타내었다.

2. S-180을 이용한 抗癌 動物實驗에서 T/C%는 120.7%의 生命延長效果를 나타내었다.

3. A549, B16-BL6 癌柱에 對한 附着 阻止作用에서는 對照群에 비하여 微弱하게 阻止하였다.

4. Pulmonary colonization assay 에서는 22%의 有意性있는 肺臟轉移 抑制效果를 보였다

5. CAM에서는 對照群에 비해 20% 血管 形成을 抑制하였다.

以上の 結果를 보아 固本祛癆1號方은 向後 臨床에서 癌의 轉移豫防 및 治療에 活用可能할 것으로 思料된다.

參考文獻

1. 서울대학교의과대학 : 腫瘍學, 서울大學校出版部, 1989, p.137, pp.1-3, 214- 215, 225-234.
2. 통계청 : Annual report on the cause of death statistics(Based on vital registration), Seoul, yoo hansa, 1997
3. 豫防醫學과 公衆保健 編輯委員會 : 豫防醫學과 公衆保健, 서울, 癸丑文化社, 1987, p.426.
4. 박재갑: 인간생명과학, 서울, 서울대학교출판부, 1994, pp.622-663.
5. 孟琳升 外: 中醫治癌大成, 北京, 北경과학기술출판사, 1995, pp.111-112, 122-143, 232-233.
6. 李岩: 腫瘍學, 北京, 人民衛生出版社, 1985, pp.2-5.

7. 錢伯文：腫瘤的辨證施治，上海，上海科學技術出版社，1983，pp.10-15.
8. 張寶娣：扶正抗癌活血爲主治療術後晚期胃炎158例，遼寧中醫雜誌，第7期，1993，p.25.
9. 于爾幸：健脾理氣法治療原發性肝癌臨床和機理的初步研究，中醫雜誌，第7期，1987，pp.28-30.
10. 呂麗娜 外：健脾理氣法治療原發性肝癌臨床和機理的初步研究，中醫雜誌，vol. 28, No.7, 1987, pp.28~30.
11. 胡濱 外：中醫健脾理氣法爲主合并阿霉素治療晚期原發性肝癌，中西醫結合雜誌，vol.10, no.12, 1990, pp.746~747.
12. 應榮多：活血化癥治則抗腫瘤實驗研究進展，中西醫結合雜誌，5(2), 1985, p.76.
13. 陳健民：惡性腫瘤活血化癥治療 中國中西醫結合研究會主編腫瘤防治研究進展學習班講義，1986, p.98.
14. 孫忠義：活血化癥法在腫瘤中的應用，中西結合腫瘤防治研究協，1981，pp.22-25.
15. 應榮多：活血化癥治則與抗腫瘤研究，全國第2次中西腫瘤防治研究協作會議資料，1981，pp.12-14.
16. 郁仁存：中醫腫瘤學(下冊)，臺灣，木鐸出版社，1992，pp.144, 23-28, 178, 187, 189.
17. Rubinstein, L.V., Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Simmon, R.M., Skehan, P. and Boyd, M.R. : Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines, Proceedings of the American Association for Cancer Research, 30, 1989, p.2418.
18. National Cancer Institute, Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600, Cancer Chemother. Res., (part 3), 3, 1972, p.17.
19. Spjut, R.W. and Perdue, R.E. : Plant folklore, a tool for predicting sources of antitumor activity, Cancer Treat. Rep., 60, 1966, p.979.
20. Mary K. Chelberg, Effie C. Tsilibary, Alan R. Hauser, James B. McCarthy ; Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration : Involvement of multiple, distant domains of the collagen molecule. Cancer Reserch, 49, 1989, 4796-4802.
21. Lin Yan et, al. : Inhibition of cell attachment by sellite, Cancer reserch 52, 5803-5807, 1992.
22. Martin J. Humphries., Kazue Matsumoto, Sandra L. White. and Kenneth Olden : Inhibition of experimental metastasis by castanospermine in mice : Blockage of two distinct stages of tumor colonization by oligosaccharide processing inhibitors, Cancer Reserach, 46, pp.5215-5222, 1986.
23. Robert, A. Wanda, A Igor, P. : Assays for angiogenesis, Pharmac., Ther., Vol.51, 1991, pp.1-11.
24. Auerbach, R., Kubai, L., Knighton, D., Forkman, J. : A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryos, Devl Biol.41 : 1974, 391-394.
25. Hellmann, K. and Carter, S.K. : Fundamentals of cancer chemotherapy, McGraw-Hill Book Company, New York, 1987, pp.132-140.
26. 大韓病理學會：病理學，서울，高文社，1990，pp.225-271, 632-638, 703-710, 742-759, 816-827, 936-941, 1015-1021, 1061-1070.
27. 孫泰重 編：病理學概論，서울，高文社，1979., p.227.
28. 李仲梓：醫宗必讀，상해，上海科學出版社，1987，p.6, 34, 215.
29. 趙鍾寬：免疫에 關한 東洋醫學의 考察，東洋醫學，12(1) : 1986, 19-23.
30. 傅芳：中醫免疫思想及成就，香港，中醫雜誌，11 : 1984, 55-57.
31. 文濬典，安圭錫，崔昇勳：東醫病理學，서울，高文社，1990，pp.23, 26-27, 118-123.
32. 郁仁存：中醫腫瘤學(上)，北京，科學出版社，1983，pp.120-139.

33. 金玲 外: 腫瘍患者의 증형과 증형연구의 재고찰, 한글판 중의잡지, 12 : 1993, 76.
34. 劉正才 尤煥文: 中醫免疫, 四川, 重慶出版社, 1993, p.113, 115.
35. 方藥中 外: 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, 1986, pp.630-631.
36. 全國韓醫科大學 本草學教室 共編著: 本草學, 서울, 永林社, 1991, p.302, 400, 419, 445, 553, 554, 596.
37. 程劍華 外: 抗癌食物藥及其驗方, 江西科學技術出版社, 1997, p.294, 82, 508.
38. 張民慶 外: 抗腫瘤中藥的臨床活用, 北京, 人民衛生出版社, 1997, p.82, 393, 72, 286, 354, 406.
39. 金有景: 抗癌食藥本草, 中國食品出版社, 1989, p.110, 152.
40. 김민영 : 癌研究의 最新指見, 암연구센터, 1993, pp.307-321.
41. Michael S. O'Reilly, Lars Holmgren, Yuen Shing, Catherine Chen, Rosalind A. Rosenthal, Marsha Moses, William S. Lane, Yihai Cao, E. Helene Sage, and Judah Folkman Angiostatin: A Novel Angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung Carcinoma. *Cell*. 79 ; 1994, 315-328.
42. O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen B. R. and Folkman, J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88 : 1997, 277.
43. Fiddker, I. J. and Ellis, L. M. : The implication of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*, 1994, 79, 185~188.
44. Rak, J. N. St., Croix, B., and Kerbel, R. S. : Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy, *Anti-Cancer Drugs*, 1995, 6, 3~18.
45. Folkman, J. : Angiogenesis and breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1994, 12, 441~443.