

扶正防癌湯 構成 藥物의 癌轉移 抑制에 대한 研究

박준혁 · 유영범 · 심범상 · 최승훈 · 안규석

Anti-metastatic Effects of ingredients of Fuzhengfangaitang

Joon-Hyuck Park, Young-Beob Yu, Bum-Sang Shim,
Seung-Hoon Choi, Koo-Seok Ahn

Dept. of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Fuzhengfangaitang is a prescript for inhibiting recurrence and metastasis of cancer. We had examined the anti-metastatic effect of Fuzhengfangaitang. Furthermore, we performed the following experiments with ingredients of Fuzhengfangaitang. The purpose of this thesis is to study what ingredients of Fuzhengfangaitang have more valuable anti-cancer effects. And the results are listed below :

1. Cell Viability assay

At the dose of $400\mu\text{g/ml}$, most ingredients of Fuzhengfangaitang depressed viability of ECV-304. And especially, *Scutellaria barbata* D. DON($50\mu\text{g/ml}$: 53.118%, $100\mu\text{g/ml}$: 49.092%, $200\mu\text{g/ml}$: 43.765%, $400\mu\text{g/ml}$: 12.747%), *Polygonum bistorta* L.($50\mu\text{g/ml}$: 45.554%, $100\mu\text{g/ml}$: 45.554%, $200\mu\text{g/ml}$: 0.0%, $400\mu\text{g/ml}$: 0.0%) and *Psoralea corylifolia* L.($50\mu\text{g/ml}$: 86.591%, $100\mu\text{g/ml}$: 81.307%, $200\mu\text{g/ml}$: 24.801%, $400\mu\text{g/ml}$: 3.111%) highly depressed cell viability more than the other ingredients. ($\alpha < 0.05$)

2. Cell Proliferation assay

Proliferation assay with ingredients of Fuzhengfangaitang on ECV-304 showed that *Crataegus pinnatifida* BGE($50\mu\text{g/ml}$: 63.276%, $100\mu\text{g/ml}$: 64.092%, $200\mu\text{g/ml}$: 68.966%, $400\mu\text{g/ml}$: 38.517%, $\text{ED}_{50}=296.974\mu\text{g/ml}$), *Polygonum bistorta* L.($50\mu\text{g/ml}$: 83.981%, $100\mu\text{g/ml}$: 86.997%, $200\mu\text{g/ml}$: 58.780%, $400\mu\text{g/ml}$: 26.408%, $\text{ED}_{50}=266.725\mu\text{g/ml}$) and *Psoralea corylifolia* L.($50\mu\text{g/ml}$: 103.037%, $100\mu\text{g/ml}$: 82.529%, $200\mu\text{g/ml}$: 2.829%, $400\mu\text{g/ml}$: 0.998%, $\text{ED}_{50}=177.369\mu\text{g/ml}$) depressed cell proliferation more than the other ingredients.

* 경희대학교 한의과대학 병리학교실

3. Tube Formation assay

Compared with the control group, most ingredients of Fuzhengfangaitang did not remarkably inhibited the Tube Formation assay of ECV-304 at the dose of 100 μ g/ml. But, Polygonum bistorta L. highly inhibited the tube formation of ECV-304 at the lower dose of 50 μ g/ml.

4. Rat Aortic Ring assay

In comparison with the control group, Scutellaria barbata D. DON., root of Polygonum bistorta L. and Psoralea corylifolia L. restricted the angiogenesis of the rat aortic ring at the dose of 100 μ g/ml. And the other ingredients of Fuzhengfangaitang did not restricted the angiogenesis of the rat aortic ring at that dose. Especially, Polygonum bistorta L. highly inhibited the angiogenesis of the rat aortic ring at the lower dose of 50 μ g/ml.

From our research, the anti-angiogenic effects of the ingredients of Fuzhengfangaitang was proven. Moreover, it will be helpful for designing more effective prescription for anti angiogenesis.

I. 緒 論

암세포의 특징은 정상세포에 비해 암세포 주위에 있는 血管의 基底膜이 현저히 감소되고 透過性 및 間質液壓이 증가되는 것으로 그 결과 암세포 혈관의 내부가 폐쇄되어 虛血 및 癌의 중앙부에서 壞死가 일어나 암세포가 일차 종양괴로부터 脫出하여 나와 혈관이나 주위의 조직으로 가도록 촉진한다. 암세포의 血管形成은 암세포의 成長과 轉移에 결정적 기여를 하게 된다⁶²⁾.

실제로 암환자 사망의 주요 원인은 轉移이다^{3,72)}. 또한 腫瘍에 있어서 보다 중요하면서 가장 특징적인 증상의 하나는 체중 감소인데 이는 주로 식욕부진과 관련되어 있다. 전형적으로 식욕 부진에 빠진 환자는 영양 요구가 증가했음을 분명히 이해하면서도 단순히 음식을 섭취할 수 없다³⁾. 이러한 문제들에 대하여 扶正祛邪하는 원칙을 근거로 해서 한약과 방사선, 화학요법을 종합으로 치료효과를 높이고 방사선과 화학요법 약물의 부작용을 경감시키는 방법

은 중앙 치료율을 높이는 하나의 중요한 방안이 될 수 있다⁸⁾.

한의학에서 암의 치료에 있어 가장 많이 사용되는 扶正祛邪法은 수술, 방사선, 화학요법과의 併用治療 時에 治療效果를 上升시키고 生命延長率을 提高시키며 生活의 質을 높인다는 것으로 요약된다. 특히 生命延長率을 높인다는 것은 再發癌을 억제할 수 있음을 내포하고 있기 때문에 한약이 암세포의 轉移를 억제할 수 있다는 의미로 여겨지고 있다.

扶正防癌湯은 각종 癌의 수술 후 혹은 방사선, 화학요법의 치료기간 중에 病情의 維持, 癌의 再發 豫防 및 治療의 목적으로 사용되고 있는 처방이다⁴⁸⁾. 본 연구는 기존에 암전이 억제 효과가 검토된 扶正防癌湯의 구성약물의 암전이 억제 효과에 대한 기초적 평가를 목표로 하고 있다. 扶正防癌湯을 구성하는 개개의 韓藥材의 혈관신생 억제 효과를 비교 분석하여, 암전이 억제 약물 개발을 위한 기초를 만들고자 한다.

본 실험에서는 扶正防癌湯 구성약물이 암전

Table 1. Prescription of Fuzhengfangaitang

Herbs	latine name	Scientific Name	Dose
黃芪	Astragali Radix	Astragalus membranaceus Bunge	15.0g
太子參	Pseudostellarie Radix	Pseudostellaria heterophylla Pax ex Pax et Hoffm.	15.0g
半枝蓮	Scutellaria barbata Herba	Scutellaria barbata D. Don	15.0g
白花蛇舌草	Oldenlandia Diffusae Herba	Oldenlandia Diffusa(Wild.) Roxb.	15.0g
白英	Solanui lyrati Herba	Solanum lyratum Thunb.	15.0g
藤梨根	Actinidia chinensis Radix	Actinidia chinensis Planch	15.0g
山楂	Crataegi Fructus	Crataegus pinnatifida BGE	15.0g
神麩	Massa Medicata Fermentata	Massa Medicata Fermentata	15.0g
麥芽炒	Hordei Fructus Germinatus	Hordeum vulgare var hexastichon Aschers	15.0g
草河車	Bistortae Rhizoma	Polygonum bistorta L.	15.0g
龍葵	Solani nigri Herba	Solanum nigrum L	7.5g
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	Atractylodis Macrocephalae Koidz	7.5g
茯苓	Poria	Poria cocos (Schw.) Wolf	7.5g
陳皮	Aurantii Nobilis Pericarpium	Citri unshiu Markovich	7.5g
破故紙	Psoraleae Semen	Psoralea corylifolia L.	7.5g

이 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 扶正防癌湯 구성약물 농축액을 ECV-304에 투여하여 Viability assay, BrdU Incorporation assay를 시행하였으며, 혈관신생에 대해 미치는 영향에 대한 실험으로 扶正防癌湯 구성약물 농축액을 ECV-304에 투여하여 Tube Formation assay를 실시하고, 白鼠 大動脈을 이용하여 Ring assay를 실시하여 다음과 같은 유의한 결과를 얻었으므로 이에 그 내용을 보고하는 바이다.

II. 實驗 方法

1. 檢液 準備

切片한 扶正防癌湯의 구성약물을 15가지를 각각 100g씩 유리병에 넣고, 85% methanol을 시료가 잠기도록 충분히(1 l) 넣은 후 5일간 냉

침한 다음 50℃에서 30분간 2회 씩 초음파세척기로 물리적 자극을 가하여 시료의 용해를 촉진하여 얻은 녹은 용액을 filter paper로 여과한 다음 여과액을 감압농축하여 농축액을 얻었다. 이 농축액에 용액이 가장 잘 녹은 상태가 되도록 40% methanol로 완전히 녹여 농도 10mg/ml으로 약물을 준비하여 -20℃에 보관한 후 실험에 사용하였다.

2. 細胞 培養

본 실험에서는 人間 血管內皮細胞인 ECV-304 (ATCC, CRL-1998)를 사용하였다.

ECV-304는 혈관신생억제효과를 살피기 위해 사용되는 人間 臍帶靜脈細胞 HUVEC(human umbilical vein endothelial cell)에 발암유전자인 SV-TAg을 transfection시켜서 不滅化시킨 것이다.

ECV-304는 Medium-199 (M-199, Gibco BRL)

배양액에 각각 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL), antibiotics (penicillin 10units/l, streptomycin 10 μ g/l, GIBCO BRL) 을 보충하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다.

3. Viability assay

본 실험에는 Mosmann⁶⁸⁾이 개발한 MTT법을 변형 사용하였다.

ECV-304를 96 well cell culture plate에 각각 2 \times 10⁴cells/well이 되도록 seeding하고 100 μ l 10% FBS M-199/well로 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 세포가 90%의 밀도가 되도록 성장한 후 100 μ l의 serum free M-199에 扶正防癌湯 구성약물을 각각 50, 100, 200, 400 μ g/ml로 가하여 각각의 well에 투여하였다.

20시간이 경과한 후 MTT dye solution (Promega)을 20 μ l/well 가한 후 10분 후에 ELISA reader(Molecular Device, U.S.A.)를 이용하여 測定 波長 490nm, 參照 波長 650nm에서 측정하였다. 대조군은 약재를 가하지 않은 100 μ l serum free M-199를 가하였다. 또한 한약시료의 색깔이 MTT용액과 간섭을 일으킬 수 있으므로 한약시료·배양액dye solution을 혼합하여 약물 blank로 하여 sample값에서 빼주고, 배양액과 dye solution만을 혼합한 것을 완전 blank로 하여 control값에서 감해 주었다.

이상에 대한 세포생존율은 다음의 식으로 구하였다.

Formula. 1.

$$\text{Viability}(\%) = \frac{\text{average of absorbance of sample (490nm-650nm-blank)}}{\text{average of absorbance of control (490nm-650nm-blank)}} \times 100$$

4. Proliferation assay

ECV-304에 대하여 BrdU incorporation 실험을 실시하였다. 우선 ECV-304를 96 well plate에 각각 2 \times 10⁴cells/well의 비율로 10% FBS·M-199 100 μ l와 함께 seeding하였다. 24시간이 지난 후 扶正防癌湯 구성약물을 각각 50, 100, 200, 400 μ g/ml로 가하여 각각의 well에 투여하고 동시에 BrdU labeling solution 10 μ l/well을 가하였다. 18시간이 지난 후 ethanol 70% in HCl(7 ml of 100% ethanol, 2.33ml of distilled water and 0.67ml of Hydrochloric acid) 200 μ l/well을 가하여 -20 $^{\circ}$ C에 30분간 두어 세포를 고정한 후 PBS를 200 μ l/well로 3회 washing한다. 다시 nuclease 100 μ l/well로 가한 후 30분간 37 $^{\circ}$ C waterbath에 넣어 두었다가 PBS 200 μ l/well로 3회 씻는다. 다시 anti-BrdU-POD를 100 μ l/well로 가하고 30분간 37 $^{\circ}$ C waterbath에 둔 후 washing buffer 200 μ l/well로 3회 washing한다. Peroxidase를 100 μ l/well를 넣고 10분 후에 ELISA reader(Molecular Device, U.S.A.)로 측정 파장 405nm, 참고 파장 490nm에서 Optical Density 값을 읽는다.

5. Tube Formation assay

24-well cell culture plate를 얼음 접시에 놓고 matrigel 220 μ g 을 가한 후 spatula를 이용해 도포하였다. Matrigel을 바른 plate는 37 $^{\circ}$ C incubator에 30 분간 방치하고 matrigel이 겔상태가 되도록 하였다. ECV-304를 matrigel이 도포된 plate에 8 \times 10⁴cells /well로 접종하고 10% FBS M-199에 한약시료를 첨가하여 18시간동안 배양하였다. control well에는 한약시료를 첨가하지 않고, 같은 양의 40% methanol을 첨가하였다. 18시간 후 control well에 tube가 형성된 것을 확인한 후 20배율로 사진 촬영하였다.

6. Aortic ring assay

48-well cell culture plate에 well 마다 120 μ l의 matrigel (11.46mg/ml)을 4 $^{\circ}$ C를 유지하면서 도포한 후, CO₂ incubator에서 30-60 분간 정치하여 용액상태의 matrigel이 겔상태로 바뀌게 하였다.

白鼠를 CO₂ asphyxiation 시킨 다음 白鼠의 흉부를 sagittal section 하여 diaphragm 위로 흉강이 노출되게 한 뒤 흉강 뒤쪽의 大動脈弓을 찾아, 가위를 사용하여 大動脈弓 밑을 자르고, 잘려진 부위를 핀셋으로 잡고 약간 들어주면서 가위로 뒷벽의 조직을 절개하면서 천천히 aorta를 분리시킨 후 3cm 정도로 잘라낸 뒤 dish 속의 Hank's balanced salt solution (HBSS) 에 담고, 작은 지방조직과 大動脈 속의 응고 혈액을 잘 제거하였다.

위에서 준비된 白鼠 大動脈을 fine scissor를 사용하여 1mm 미만의 폭으로 잘라 ring으로 만든 후, matrigel이 도포된 48-well culture plate 각각의 well에 ring 하나씩을 well 중앙에 놓고 50 μ l의 matrigel을 추가로 주입하여 ring을 완전히 덮어주었다.

CO₂ incubator에서 30분간 배양한 후, 한약 시료 및 endothelial cell growth supplement (ECGS)를 함유한 human endothelial-SFM basal growth medium 200 μ l를 넣어주었다.

37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 5일 동안 배양하였고, 4일째 되는 날 aortic ring이 불안정한 것 같으면 100 μ l의 fresh media를 더 가해주었다. 실험 5일째 되는 날, 혈관의 형성정도를 관찰한 후, 현미경 (Olympus, Japan) 상에서 4 배율로 사진 촬영하였다.

7. 統計分析

이상의 실험결과에 대하여 통계분석을 하였

다. Cell viability 억제활성의 유의성 검정은 SPSS를 이용하여 one way ANOVA를 실시하였으며 Proliferation assay를 통한 약물의 DNA 합성 50%저지 농도(ED50)를 회귀분석을 통하여 구하였다.

Cell viability 억제활성의 유의성 검정에 사용된 SPSS를 이용하여 one way ANOVA에서는 P-value가 0.05이하인 경우 95%의 범위에서 유의한 차이가 나타나는 것을 의미하므로, 세포 생존율에 유의한 영향을 미치는 것으로 판단할 수 있다.

Proliferation assay를 통한 약물의 DNA 합성 50%저지 농도(ED₅₀)는 회귀분석을 통해 방정식의 상수값을 계산하여 구하였다.

Ⅲ. 實驗 成績

1. 細胞生存率에 미치는 影響

扶正防癌湯 구성약물 각각의 암세포에 미치는 세포독성과 실험용량을 알아 보기 위해 먼저 ECV-304세포를 이용하여 MTT assay를 한 실험 결과, 扶正防癌湯 구성약물 중 白英, 神麩, 麥芽, 龍葵, 黃芪, 茯苓, 太子參, 陳皮의 경우 400 μ g/ml 농도이하에서 100% 전후이거나 최소한 80% 이상의 세포생존율을 보여줌으로써 세포생존을 저해하지 않는 것으로 나타났다.

대부분의 약물이 400 μ g/ml의 농도에서는 세포생존율이 떨어지는 것으로 나타났는데 50% 이하의 세포생존율을 보이는 것으로는 藤梨根 (42.427 \pm 0.010%), 白花蛇舌草 (27.585 \pm 0.013%), 半枝蓮 (12.747 \pm 0.035%), 白朮 (12.139 \pm 0.015%), 破古紙 (24.801 \pm 0.042%), 草河車 (-27.802 \pm 0.103%) 등이었다.

草河車 (-24.148 \pm 0.048%), 破古紙 (24.801 \pm

0.042%)의 경우는 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서부터도 특히 낮은 세포생존율을 보여주므로 이후 실험에서 특히 이 두 가지 약물을 주목하여 살펴보았다.

또한, 이상의 결과가 통계적 유의성을 가지는지 검정하기 위해 SPSS를 이용하여 one way ANOVA를 실시하였는데, 그 결과는 다음과 같다.

黃芪의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 7.513 P-value 0.002, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군과의 유의한 차이를 보이지 않았다. (p=0.327)

太子參의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 3.376 P-value 0.037, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. (p=0.216)

半枝蓮의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하여 (F-value 16.110 P-value 0.001, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의한 차이를 나타내었다. (p=0.001)

白花蛇舌草의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 16.187 P-value 0.001, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의한 차이를 나타내었다. (p=0.035)

白英의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 43.060 P-value 0.001, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군과의 유의한 차이를 나타내지 않았다. (p=0.170) 다만, 白英은 그 이하의 농도에서 세포생존율을 높이는 방향으로 유의한 효과를 나타낸다.

藤梨根의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 153.149 P-value 0.001, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의한 차이를 나타내었는데 (p=0.001) 이것은 세포생존을 억제해서가 아니라 증가시킴으로 인해서이다.

山楂의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 37.683 P-value 0.001, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의한 차이를 나타내었는데 (p=0.001) 이것도 藤梨根의 경우와 마찬가지로 세포생존을 억제해서가 아니라 증가시킴으로 인해서이다.

神麴의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 8.538 P-value 0.001, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군과의 유의한 차이를 나타내지 않는다. (p=0.170)

麥芽炒의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 5.679 P-value 0.005, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군과의 유의한 차이를 나타내지 않는다. (p=0.059)

草河車의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 17.835 P-value 0.001, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의한 차이를 나타내었다. (p=0.036)

龍葵의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 12.121 P-value 0.001, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의한 차이를 나타내었다. (p=0.009)

白朮의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 110.384 P-value 0.001, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군과의 유의한 차이를 나타냈다. (p=0.001)

茯苓의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 3.630 P-value 0.029, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군과의 유의한 차이를 나타내었다. (p=0.087)

陳皮의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 1.220 P-value 0.344, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의한 차이를 나타내지 못하였다. (p=0.827)

破古紙의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제

활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 320.891 P-value 0.001, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의한 차이를 나타내었다. (p=0.030)

이상을 요약하면, 扶正防癌湯 구성약물 중 黃芪, 太子參, 白英, 藤梨根, 山楂, 神麩, 麥芽炒, 陳皮는 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 유의한 세포생존 억제효과를 보이지 못하며, 龍葵, 白朮, 茯苓은 400 $\mu\text{g/ml}$, 白花蛇舌草, 草河車는 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서부터 유의성 있는 세포생존 억제효과를 보인다. 半枝蓮, 破古紙는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서부터 유의성 있게 세포생존을 억제하는 것으로 나타났다.

따라서, 세포생존율에 대한 억제효과를 보이는 半枝蓮, 草河車, 破古紙의 효능은 통계적인 유의성에 있어서도 의미를 가진다(Table 2, Fig. 1).

Table 2. Effects of the Ingredients of FZFAT on the Cell Viability of ECV-304

drug	dose	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
		0	50	100	200	400
1	O.D.	0.816 \pm 0.049	0.646 \pm 0.047	0.682 \pm 0.068	0.709 \pm 0.007	0.739 \pm 0.044
	(%)	100.000	81.294	87.609	93.489	97.514
2	O.D.	0.816 \pm 0.049	0.717 \pm 0.040	0.721 \pm 0.027	0.717 \pm 0.062	0.732 \pm 0.042
	(%)	100.000	87.030	87.727	81.965	87.056
3	O.D.	0.816 \pm 0.049	0.607 \pm 0.010	0.644 \pm 0.045	0.647 \pm 0.053	0.622 \pm 0.035
	(%)	100.000	53.118	49.092	43.765	12.747
4	O.D.	0.816 \pm 0.049	0.790 \pm 0.047	0.669 \pm 0.086	0.647 \pm 0.092	0.497 \pm 0.013
	(%)	100.000	89.503	67.877	58.958	27.585
5	O.D.	0.502 \pm 0.050	0.801 \pm 0.040	0.845 \pm 0.056	0.707 \pm 0.046	0.587 \pm 0.027
	(%)	100.000	178.963	189.697	144.957	103.890
6	O.D.	0.502 \pm 0.050	0.923 \pm 0.046	0.944 \pm 0.031	0.982 \pm 0.024	1.063 \pm 0.010
	(%)	100.000	153.746	120.533	87.392	41.427
7	O.D.	0.502 \pm 0.050	0.748 \pm 0.103	0.882 \pm 0.023	0.907 \pm 0.060	0.793 \pm 0.016
	(%)	100.000	129.755	164.769	147.622	79.347
8	O.D.	0.502 \pm 0.050	0.726 \pm 0.035	0.648 \pm 0.129	0.745 \pm 0.032	0.629 \pm 0.031
	(%)	100.000	144.622	129.622	147.622	125.822

	(%)	100.000	159.582	132.133	154.371	107.781
9	O.D.	0.672±0.027	0.704±0.067	0.826±0.042	0.814±0.111	0.819±0.093
	(%)	100.000	102.464	102.464	117.605	108.076
10	O.D.	0.672±0.027	0.732±0.041	0.809±0.122	0.823±0.048	0.996±0.103
	(%)	100.000	45.554	45.554	0.000	0.000
11	O.D.	0.672±0.027	0.662±0.044	0.770±0.039	0.726±0.022	0.763±0.010
	(%)	100.000	99.511	99.511	109.512	111.731
12	O.D.	0.672±0.027	0.711±0.073	0.696±0.022	0.673±0.014	0.263±0.015
	(%)	100.000	107.293	107.293	95.219	12.139
13	O.D.	0.733±0.012	0.727±0.071	0.733±0.026	0.711±0.018	0.651±0.029
	(%)	100.000	99.972	100.625	97.372	84.716
14	O.D.	0.733±0.012	0.706±0.023	0.689±0.051	0.659±0.091	0.691±0.016
	(%)	100.000	93.239	88.466	81.861	82.628
15	O.D.	0.733±0.012	0.664±0.021	0.638±0.032	0.325±0.042	0.218±0.006
	(%)	100.000	86.591	81.307	24.801	3.111

O.D. : Optical Density, % : sample/control according to Formula. 1

- | | |
|--|--|
| 1. Astragalus membranaceus Bunge | 9. Hordeum vulgare var hexastichon Aschers |
| 2. Pseudostellaria heterophylla Pax ex Pax et HOFFM. | 10. Polygonum bistorta L. |
| 3. Scutellaria barbata D. Don | 11. Solanum nigrum L. |
| 4. Oldenlandia Diffusa (Willd.) Roxb. | 12. Atractylodis Macrocephalae Koidz |
| 5. Solanum lyratum Thunb. | 13. Poria cocos (Schw.) Wolf |
| 6. Actinidia chinensis Planch. | 14. Citri unshiu Markovich |
| 7. Crataegus pinnatifida Bge | 15. Psoralea corylifolia L. |
| 8. Massa Medicata Fermentata | |

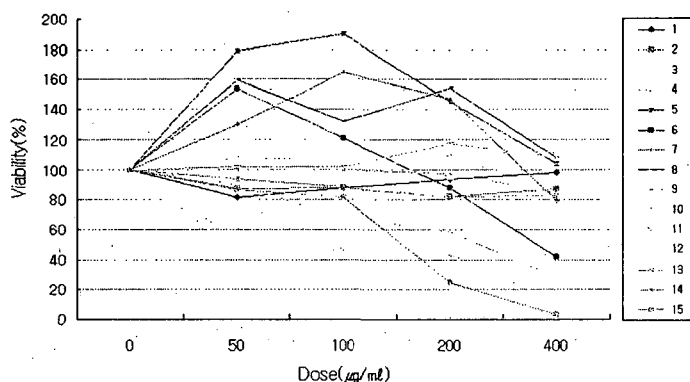


Fig. 1. Effects of the Ingredients of FZFAT on the Cell Viability of ECV-304

1. Astragalus membranaceus Bunge
2. Pseudostellaria heterophylla Pax ex Pax et Hoffm.
3. Scutellaria barbata D. Don
4. Oldenlandia Diffusa (WILLD.) Roxb.
5. Solanum lyratum Thunb.
6. Actinidia chinensis Planch.
7. Crataegus pinnatifida Bge
8. Massa Medicata Fermentata
9. Hordeum vulgare var hexastichon Aschers

10. Polygonum bistorta L.
11. Solanum nigrum L.
12. Atractylodis Macrocephalae Koidz
13. Poria cocos (SCHW.) Wolf
14. Citri unshiu Markovich
15. Psoralea corylifolia L.

※ samples were extracted with 85% methanol, dried in vacuum, adjusted in 10 mg/ml aliquots in 40% methanol

2. 細胞增殖에 미치는 影響

실험 결과 扶正防癌湯 구성약물 중 茯苓과 麥芽는 농도의 증가에 따라 세포증식율이 꾸준히 증가하였다.

또한 白花蛇舌草, 藤梨根, 半枝蓮, 龍葵, 太子參, 白朮, 陳皮, 白英 등은 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 120%에서 80% 사이의 세포증식율을 보여줌으로써 세포증식에 대한 억제효과는 유의하게 나타나지 않는 것으로 드러났다. 다만 山楂가 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 38.517 \pm 0.037%의 낮은 세포증식율을 보여 주고 있다.

세포생존율에 대해 높은 억제효과를 보인 草河車와 破古紙는 세포증식의 억제에도 탁월한 효과가 있는 것으로 나타났다. 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 草河車는 58.780 \pm 0.015%, 破古紙는 2.829 \pm 0.009%의 세포증식율만을 보여주었고, 400

$\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 草河車는 26.408 \pm 0.010%, 破古紙는 0.998 \pm 0.002%의 세포증식율을 보여 주는 등 월등한 효과를 나타내었다(Table 3, Fig. 2).

이상의 실험결과로써 (扶正防癌湯 구성약물의 ECV-304에 대한 50%저지 농도(ED50)를 다음과 같이 구하였다. 약물의 농도를 X축으로 하고 성장률(%)을 Y축으로 하여 최소 자승법으로 회귀직선을 얻고 그 방정식을 도출한 뒤 방정식 $Y=aX+b$ 을 얻는다. $Y=50(\%)$ 로 놓고 ED50값을 계산하였는데, 그 중 의미있는 함수 관계를 보인 약물과 방정식 및 ED50값은 다음과 같다.

$$\begin{aligned} \text{山楂} : Y &= -0.115X + 84.152 & \text{ED}_{50} &= 296.974 \\ \text{草河車} : Y &= -0.182X + 98.544 & \text{ED}_{50} &= 266.725 \\ \text{破古紙} : Y &= -0.290X + 101.437 & \text{ED}_{50} &= 177.369 \end{aligned}$$

Table 3. Effects of the Ingredients of FZFAT on the Cell Proliferation of ECV-304

drug	dose	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
		0	50	100	200	400
1	O.D.	0.575 \pm 0.088	0.653 \pm 0.010	0.516 \pm 0.028	0.536 \pm 0.016	0.515 \pm 0.025
	(%)	100.000	114.061	85.582	92.612	87.901
2	O.D.	0.575 \pm 0.088	0.414 \pm 0.023	0.416 \pm 0.024	0.408 \pm 0.023	0.479 \pm 0.017
	(%)	100.000	66.096	65.096	64.240	79.372
3	O.D.	0.575 \pm 0.088	0.232 \pm 0.072	0.576 \pm 0.065	0.571 \pm 0.055	0.539 \pm 0.155
	(%)	100.000	103.929	97.216	101.178	93.291

4	O.D. (%)	0.575±0.088 100.000	0.598±0.127 101.660	0.701±0.108 127.463	0.591±0.088 103.640	0.618±0.107 109.422
5	O.D. (%)	0.875±0.064 100.000	1.027±0.183 124.966	0.676±0.240 76.690	0.734±0.166 85.690	0.542±0.083 56.690
6	O.D. (%)	0.875±0.064 100.000	0.822±0.075 104.827	0.822±0.075 102.069	1.212±0.155 98.943	0.804±0.211 99.770
7	O.D. (%)	0.875±0.064 100.000	0.549±0.081 63.276	0.549±0.014 64.092	0.570±0.067 68.966	0.351±0.037 38.517
8	O.D. (%)	0.875±0.064 100.000	0.614±0.047 71.448	0.621±0.072 72.241	0.807±0.073 97.839	0.693±0.049 84.276
9	O.D. (%)	0.509±0.088 100.000	0.657±0.132 122.453	0.722±0.038 151.139	0.730±0.077 149.799	0.696±0.061 152.547
10	O.D. (%)	0.509±0.088 100.000	0.400±0.077 83.981	0.406±0.042 86.997	0.278±0.015 58.780	0.175±0.010 26.408
11	O.D. (%)	0.509±0.088 100.000	0.532±0.048 116.756	0.486±0.123 103.686	0.525±0.059 114.008	0.450±0.119 90.550
12	O.D. (%)	0.509±0.088 100.000	0.514±0.072 111.595	0.501±0.084 110.188	0.535±0.085 116.488	0.338±0.028 65.147
13	O.D. (%)	0.684±0.146 100.000	0.936±0.255 129.035	0.875±0.220 122.754	1.103±0.115 162.313	1.003±0.245 149.917
14	O.D. (%)	0.684±0.146 100.000	0.786±0.115 117.346	0.720±0.076 100.499	0.559±0.133 79.118	0.494±0.070 65.183
15	O.D. (%)	0.684±0.146 100.000	0.698±0.056 103.037	0.573±0.037 82.529	0.094±0.009 2.829	0.085±0.002 0.998

O.D. : Optical Density, % : sample/control × 100 according to Formula. 1.

- | | |
|--|--|
| 1. Astragalus membranaceus Bunge | 8. Massa Medicata Fermentata |
| 2. Pseudostellaria heterophylla Pax ex Pax et Hoffm. | 9. Hordeum vulgare var hexastichon Aschers |
| 3. Scutellaria barbata D. Don | 10. Polygonum bistorta L. |
| 4. Oldenlandia Diffusa (WILLD.) Roxb. | 11. Solanum nigrum L. |
| 5. Solanum lyratum Thunb. | 12. Atractylodis Macrocephalae Koidz |
| 6. Actinidia chinensis Planch. | 13. Poria cocos (SCHW.) Wolf |
| 7. Crataegus pinnatifida Bge | 14. Citri unshiu Markovich |
| | 15. Psoralea corylifolia L. |

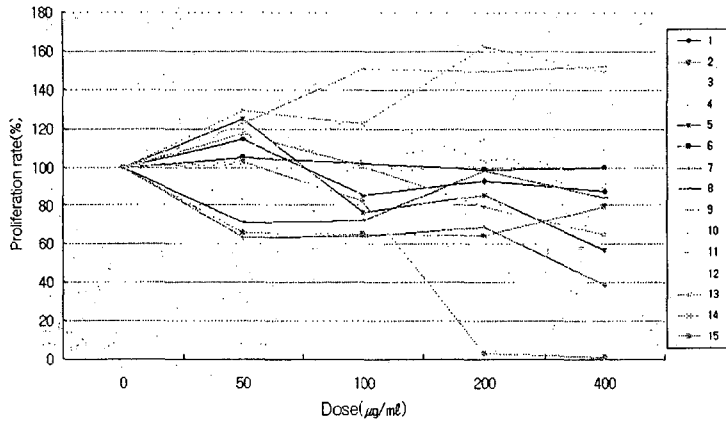


Fig. 2. Effects of the Ingredients of FZFAT on the Cell Proliferation rate of ECV-304

- | | |
|--|--------------------------------------|
| 1. Astragalus membranaceus Bunge | 11. Solanum nigrum L. |
| 2. Pseudostellaria heterophylla Pax ex Pax et Hoffm. | 12. Atractylodis Macrocephalae Koidz |
| 3. Scutellaria barbata D. Don | 13. Poria cocos (SCHW.) Wolf |
| 4. Oldenlandia Diffusa (WILLD.) Roxb. | 14. Citri unshiu Markovich |
| 5. Solanum lyratum Thunb. | 15. Psoralea corylifolia L. |
| 6. Actinidia chinensis lanch. | |
| 7. Crataegus pinnatifida Bge | |
| 8. Massa Medicata Fermentata | |
| 9. Hordeum vulgare var hexastichon Aschers | |
| 10. Polygonum bistorta L. | |

※ samples were extracted with 85% methanol, dried in vacuum, adjusted in 10 mg/ml aliquots in 40% methanol

3. Tube formation 抑制에 미치는 影響

실험결과 한약 시료의 용매로 쓰인 methanol 을 처리한 대조군에서는 capillary tube가 잘 형성되어 있음을 볼 수 있다. 한약을 처리한 실험군에서는 黃芪, 太子參, 白英, 神麩, 麥芽, 茯苓, 陳皮의 경우 100 μ g/ml의 농도에서 혈관형성 억제효과를 보여주지 못하였고, 그 보다 더 낮은 50 μ g/ml의 농도에서도 실험한 半枝蓮, 白花蛇舌草, 藤梨根, 山楂 추출물 투여군에서도 혈관형성이 잘 되어 있는 것으로 나타났다. 破古紙의 경우에는 10, 30, 50, 100 μ g/ml의 농도에서 특별한 혈관 형성 억제 효과를 나타내지 못하였지만, 草河車는 50 μ g/ml의 농도에서 상당한 혈관형성 억제 효과를 보여주고 있다. 현미

경사진 상으로 불완전한 혈관형성의 모습을 보여주면서 많은 세포들이 공유를 통한 혈관형성을 하지 못하고 따로 떨어져 있는 모습을 볼 수 있다. 100 μ g/ml의 농도에서는 세포의 대부분이 파괴되어 있다. 반면에 30 μ g/ml의 농도에서는 혈관형성이 무난하게 이루어져 있다.

결론적으로 15가지의 扶正防癌湯 구성약물 중에서 혈관형성을 가장 저해하는 약물은 草河車이며 혈관형성을 방해하는 최저 농도는 30 μ g/ml에서 50 μ g/ml 사이이다(Fig. 3).

4. Rat aortic ring의 新生血管 抑制에 미치는 影響

扶正防癌湯 구성약물의 白鼠 大動脈에 대한

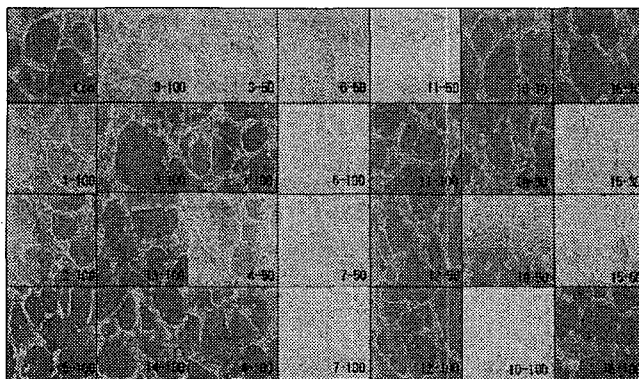


Fig. 3. Effects of the Ingredients of FZFAT on the Tube Formation of ECV-304

1. Astragalus membranaceus Bunge
2. Pseudostellaria heterophylla Pax ex Pax et Hoffm.
3. Scutellaria barbata D. DON.
4. Oldenlandia Diffusa (WILLD.) Roxb.
5. Solanum lyratum Thunb.
6. Actinidia chinensis Planch.
7. Crataegus pinnatifida Bge
8. Massa Medicata Fermentata
9. Hordeum vulgare var hexastichon Aschers

10. Polygonum bistorta L.
11. Solanum nigrum L.
12. Atractylodis Macrocephalae Koidz
13. Poria cocos (SCHW.) Wolf
14. Citri unshiu Markovich
15. Psoralea corylifolia L.

※ Drug No-Dose($\mu\text{g/ml}$)

※ samples were extracted with 85% methanol, dried in vacuum, adjusted in 10 mg/ml aliquots in 40% methano

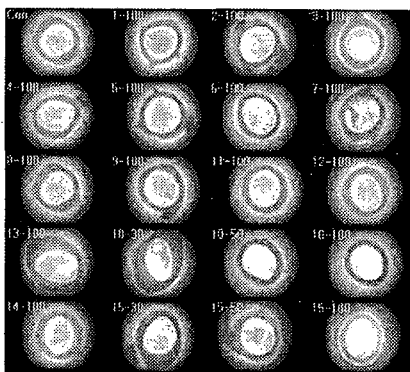


Fig. 4. Effects of the Ingredients of FZFAT on Rat Aortic Ring assay

1. Astragalus membranaceus Bunge
2. Pseudostellaria heterophylla Pax ex Pax et Hoffm.
3. Scutellaria barbata D. Don
4. Oldenlandia Diffusa (WILLD.) Roxb.
5. Solanum lyratum Thunb.
6. Actinidia chinensis Planch.
7. Crataegus pinnatifida Bge
8. Massa Medicata Fermentata
9. Hordeum vulgare var hexastichon Aschers

10. Polygonum bistorta L.
11. Solanum nigrum L.
12. Atractylodis Macrocephalae Koidz
13. Poria cocos (SCHW.) Wolf
14. Citri unshiu Markovich
15. Psoralea corylifolia L.

※ Drug No-Dose($\mu\text{g/ml}$)

※ samples were extracted with 85% methanol, dried in vacuum, adjusted in 10 mg/ml aliquots in 40% methanol

혈관신생억제 효과에 대한 실험 결과, 약물을 처리하지 않은 대조군에서는 혈관신생이 잘 되어 있음을 볼 수 있다. 15개의 扶正防癌湯 구성 약물 중 일부는 혈관신생이 증가한 것을 볼 수 있는데, 본 실험의 목적인 혈관신생 억제 효과를 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 확연하게 나타내는 구성약물은 半枝蓮, 草河車, 破古紙 등이다. 藤梨根, 山楂에서도 일정 정도의 혈관신생 억제 효과를 보인다. 破古紙는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서부터 혈관형성 억제 효과를 보이고 있다. 草河車 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 보다 현저한 혈관형성 억제 효과를 보이며 혈관 형성이 거의 이루어지지 않고 있고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 혈관 형성이 완전히 차단된 것을 볼 수 있다.

결론적으로 扶正防癌湯 구성약물의 白鼠 大動脈에 대한 혈관형성 억제효과를 보는 실험에서 큰 효과를 나타내는 것은 草河車와 破古紙이며, 특히 草河車가 가장 낮은 농도에서 혈관형성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

IV. 考 察

종양에 관한 기록은 오래 전부터 전해져 내려왔다. 일찍이 殷墟의 갑골문에 '瘤'라고 하는 병명이 나타나고, 2천여 년 전의 『周禮』에는 종양만을 전문적으로 치료하는 '瘍醫'라는 명칭이 등장하는 것으로 보아 종양에 대한 인식이 이미 오래 전부터 시작되었음을 알 수 있다⁸⁾. 또한 종양의 원인으로 原發性因子와 續發性因子를 제시하고 있는데 原發性病因에는 風·寒·暑·濕·燥·火의 外感因子와 情志·飲食·過勞에 의한 內傷病因이 있고, 續發性病因에는 痰飲과 瘀血을 들고 있다⁸⁾.

이러한 六淫·七情·飲食·痰飲·瘀血 등 병인이 인체에 작용하여 종양을 형성하는 病機

는 氣滯血瘀·痰結濕聚·熱毒內蘊·臟腑失調·氣血虧虛·經絡瘀阻 등으로 개괄되며^{8,18)}, 치료법으로는 辨證論治에 근거한 扶正과 祛邪의 輕重緩急을 조절하는 이론을 바탕으로 正氣의 補養을 위주로 하면서 破積·活血·解鬱·行氣 등의 治法을 겸용하고 있다. 특히 최근에는 健脾益氣法을 위주로 한 扶正祛邪法과 扶正培本法이 많이 이용되고 있으며, 祛邪의 방법으로는 活血化瘀法·清熱解毒法·軟堅散結法 등이 활용되고 있다^{8,32,34,40)}. 특히 중국에서는 수술 및 방사선·화학요법과 결합이나, 수술 및 방사선·화학요법의 치유기나 후유증의 치료를 위해 한약을 함께 처방하는 방법이 많이 쓰이고 있다⁸⁾.

1971년 Folkman에 의해서 원발성 종양이 존재할 경우 혈액 속에 혈관형성을 억제하는 물질이 존재한다는 가정 아래 처음으로 anti-angiogenic therapy가 암치료를 위한 수단으로 등장한 이래⁶¹⁾, 1985년에는 Harvard의대의 Vallee 등에 의해 혈관신생 유도단백질인 angiogenin이 사람의 腺癌細胞의 배양액으로부터 최초로 분리되었고¹¹⁾, 1994년에는 원발성 종양을 갖고 있는 쥐의 혈청과 오줌으로부터 38kDa의 angiostatin을 분리해내어 angiogenesis 억제효과를 확인했으며⁶⁷⁾, 1997년에는 20kDa의 endostatin이라는 물질을 분리해내어 혈관내피세포의 성장을 억제하는 효과를 확인하였고, 1998년에는 NCI에서 공식적으로 angiostatin과 endostatin을 동시에 투여하여 쥐에 유발된 종양의 성장을 억제함을 발표함으로써, 종양의 angiogenesis억제가 새로운 종양 치료방법으로 세계적인 관심을 끌게 되었다^{16,63,67,69)}.

현재까지 알려진 angiogenesis 억제제는 thalidomide^{59,60)}·angiostatin⁶⁷⁾·endo-statin⁶⁹⁾·2-methoxyestradiol⁵⁶⁾·TNP-470^{56,57,66,70,77)} 등 11종 화합물이 angiogenesis와 관련하여 임상실험

중에 있는 것으로 알려져 있으며, 이중 TNF-470은 이미 동물실험을 끝내고 두 번째 임상실험을 진행 중에 있는데 매우 효과적인 것으로 학계에 보고되고 있다^{56,57,66,70,77}.

이와 같이 혈관신생을 조절하는 물질을 찾아 내어 항암제로 개발하려는 가장 큰 이유는 암세포에 대하여 직접적으로 작용하여 암세포를 죽이기보다는 암세포가 성장하기 위해서 필수적인 혈관신생을 원천적으로 억제함으로써 부작용이 없는 이상적인 항암제를 개발할 수 있다는 점이다¹⁵). 그러나 신생혈관 억제를 위한 신약개발은 신물질 개발의 어려움과 함께 임상 적용 단계에서 예기치 못한 부작용이 발생할 수 있는 문제를 안고 있기 때문^{16,58,64})에 이에 비해 상대적 부작용에 대한 위험성이 적고, 인체의 면역증강효과가 있다고 인정되는 한약의 항암효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{9,11,14,17-20,22-29,31,51,52,55}).

최근까지 발표된 실험적 연구로서 桂枝²⁰ · 鬱金²³ 등 단미제가 angiogenesis의 억제효과가 있는 것으로 보고되었으며, 처방으로는 扶正防癌湯²⁵)외에도 沒藥散¹⁹ · 活絡效靈丹²²) · 加味慈桃丸^{21,26,30}) · 立安散²⁸) · 桃紅四物湯加減方³¹) 등이 angiogenesis의 억제효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.

扶正防癌湯은 중국에서 각종 癌症의 수술 후 혹은 방사선, 화학요법의 치료기간 중에 병정의 유지, 암의 재발 예방 및 치료의 목적으로 사용되고 있는 처방이다⁴⁸).

扶正防癌湯에 사용된 약물의 약효와 항암효과를 살펴보면, 方中の 黃芪는 生用으로 益衛固表, 托毒, 生肌하며 炙用으로 補中益氣하는 약재이다. 방사선요법, 화학요법으로 야기된 백혈구 감소를 치료한다^{41,54}). 黃芪水煎劑는 마우스에서 IL-2의 증가와 함께 NK-cell activity를 증강시키는데 10~100 μ g/ml의 농도에서 가장

강한 효과가 나온다³⁷). 原發性 肺癌, 胃癌에 유효하며 혈관 질환에도 이용된다³²).

太子參은 甘苦微溫하여 補氣養血, 健脾生津하며 이러한 효과 때문에 암환자의 病後體虛, 疲乏無力, 食欲不振 등에 응용하며 방사선 치료 후 혹은 화학요법 시에 백혈구 감소를 예방, 치료할 수 있다⁴⁰).

半枝蓮은 清熱解毒, 利尿消腫하며 急性粒細胞白血病細胞에 대한 억제율이 75%에 달하며 Walker carcinosarcoma 256, sarcoma 130 등의 종양에 일정한 억제 작용을 나타낸다⁴⁰).

白花蛇舌草는 甘淡微苦, 涼하여 清熱解毒, 消癰活血, 利水通淋하며 Walker carcinoma 256, sarcoma 130, 肝癌實體型 등에 대한 억제작용이 있다⁴⁰).

白英은 微苦寒하며 有小毒하다. 清熱解毒, 祛風利濕하며 성분중의 β -solamarine은 sarcoma 130, Walker carcinoma 256에 대한 억제작용이 있고, 人體 肺癌細胞에도 억제작용이 있다. 각종 암증의 치료에 적용하여 胃腸管癌, 肝癌, 肺癌, 膀胱癌, 乳房癌, 子宮頸部癌 등에 응용한다⁴⁰).

藤梨根은 苦澁涼하며 解毒活血, 清熱利濕한다. 생쥐의 복강에 투여하였을 때 sarcoma 130에 대한 억제율이 30~40%로 나타났다. 주로 消化器 癌症에 적용한다⁴⁰).

山楂는 消食健胃, 行氣散瘀하여 肉食積滯, 胃脘脹滿, 瀉痢腹痛, 瘀血經閉, 產後瘀阻, 心腹刺痛, 疝氣疼痛 등을 치료한다. 특히 니트로 아민의 전구물질 합성을 억제하고 황곡매소B1의 돌연변이 유발 작용을 억제하여 肝TM傷^Y에 대한 예방효과를 기대할 수 있다^{13,37}).

神麩은 甘辛溫하고 健脾和胃, 消食調中하여 飲食停滯, 胸痞腹脹, 嘔吐瀉痢, 產後瘀血腹痛, 小兒腹大堅積을 치료한다⁷).

麥芽는 甘溫하고 消食, 和中, 下氣하여 食積

不消, 脘腹脹滿, 食欲不振, 嘔吐泄瀉, 乳脹不消를 치료한다⁷⁾.

草河車는 苦微寒하며 有小毒하다. 清熱解毒, 消腫涼血하며 sarcoma 130에 대한 억제 작용이 있고 각종 악성종양을 치료하는데 적용하며 특히 頭頸部癌, 食道癌, 腸癌, 肝癌 및 乳房癌 등에 상용한다⁴⁰⁾.

龍葵는 苦微甘寒, 有小毒하다. 清熱解毒, 利水散結하며 sarcoma 130에 대한 억제작용이 보고되어 있고, 肺癌, 胃癌, 肝癌, 膀胱癌, 癌性胸水 腹水에 대한 치료에 응용된다⁴⁰⁾.

白朮은 健脾益氣, 燥濕利水, 止汗, 安胎하는 약재로서 保肝, 利膽作用, 胃潰瘍 豫防作用 등이 있으며 세망내피계의 탐식작용 증강, 백혈구수 증가, rosette 형성을 증가 등 면역증강효과가 있다. 또한 白朮중의 중성 휘발유는 食道癌細胞에 대한 억제작용이 있고, sarcoma 130에 대한 억제효과가 보고되어 있다³⁷⁾. 骨髓癌, 惡性 淋巴腺癌, 肝癌 등에 유효한 것으로 보고되고 있다^{46,50)}.

茯苓은 滲濕利水, 益脾和胃하는 약재로서 脾臟癌, 鼻咽癌 등에 유효하다. 胃癌과 肝癌 환자에게서는 식욕이 증진되고 증상이 개선되며, 화학요법의 부작용을 경감시키고 면역기능을 어느 정도 향상시키는 것으로 나타났다⁴³⁾.

陳皮는 理氣, 調中, 除濕, 化痰하여 胸脘脹滿, 不思飲食, 嘔吐噦逆, 咳嗽痰多를 치료한다⁷⁾.

破古紙 辛苦溫하며 補腎壯陽, 暖脾止瀉한다. 破古紙의 휘발유는 Sarcoma 130에 대한 억제 작용을 나타낸다. 骨肉腫, 腦癌, 腎癌의 치료에 응용하고 또한 방사선, 화학요법으로 인한 백혈구수 감소를 치료한다⁴⁰⁾.

扶正防癌湯은 扶正과 祛邪의 치료법이 적절히 배합되어 있을 뿐만 아니라 위와 같은 單味劑들의 抗癌效果가 우수하기 때문에 충분한 항암효과가 인정되고 있는 처방으로서 특히 암환

자에게 있어서 가장 특징적인 증상의 하나인 식욕부진으로 인한 체중 감소에 도움을 줄 수 있는 대표적인 약물들인 黃芪, 太子參, 白朮 등과 같은 補氣劑와 山楂, 神麩, 麥芽와 같은 消導劑와 茯苓, 陳皮 등의 약재가 포함되어 있다. 전형적으로 식욕 부진에 빠진 환자는 영양 요구가 증가했음을 분명히 이해하면서도 단순히 음식을 섭취할 수 없다³⁾. 이러한 문제들에 대하여 扶正祛邪하는 원칙을 근거로 해서 한약과 방사선, 화학요법을 결합해 치료효과를 높이고 방사선과 화학요법 약물의 부작용을 경감시키는 방법은 중앙 치료율을 높이는 하나의 중요한 방안이 될 수 있는데⁸⁾ 扶正防癌湯은 그 方劑의 구성이 이 원칙에 매우 접근하는 것이다. 이러한 扶正防癌湯의 腫瘍의 再發 防止에 관한 구체적인 최초의 실험은 沈²⁵⁾의 연구가 있다.

이 논문에서는 이러한 扶正과 祛邪의 방제로 구성된 扶正防癌湯 구성 약물 개개의 중앙 세포 생존율과 증식에 대한 억제 작용과 혈관 생성 억제 작용에 대한 연구를 통해 그 方劑의 意義와 藥理의 價値를 實驗的으로 糾明하는 것을 목표로 하고 있다.

扶正防癌湯 구성약물의 세포독성을 알아 보기 위해 Viability assay 실험 결과, 白英, 神麩, 麥芽, 龍葵, 黃芪, 茯苓, 太子參, 陳皮의 경우 400 μ g/ml 농도이하에서 100% 전후이거나 최소한 80% 이상의 세포생존율을 보여줌으로써 세포생존을 저해하지 않는 것으로 나타났다.

대부분의 약물이 400 μ g/ml의 농도에서는 세포생존율이 떨어지는 것으로 나타났는데 50% 이하의 세포생존율을 보이는 것으로는 藤梨根 (42.427 \pm 0.010%), 白花蛇舌草 (27.585 \pm 0.013%), 半枝蓮 (12.747 \pm 0.035%), 白朮 (12.139 \pm 0.015%), 破古紙 (24.801 \pm 0.042%), 草河車 (-27.802 \pm 0.103%) 등이었다.

草河車 (-24.148 \pm 0.048%), 破古紙 (24.801 \pm

0.042%)의 경우는 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서부터도 특히 낮은 세포생존율을 보여주므로 이후 실험에서 특히 이 두 가지 약물을 주목하여 살펴보았다.

예외적으로 半枝蓮(53.118 \pm 0.042%)의 경우는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서부터 꾸준히 낮은 수준의 세포생존율을 보인다.

또한, 이상의 결과가 통계적 유의성을 가지는지 검정하기 위해 SPSS를 이용하여 one way ANOVA를 실시하였는데, 95%유의도에서의 분석결과는 다음과 같다.

半枝蓮의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제 활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고(F-value 16.110 P-value 0.001, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의한 차이를 나타내었다. (p=0.001)

草河車의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제 활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고(F-value 17.835 P-value 0.001, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의한 차이를 나타내었다. (p=0.036)

破古紙의 ECV-304에 대한 Cell viability 억제 활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고(F-value 320.891 P-value 0.001, F0.05(4,15) 3.06), Sheffe 사후 검정결과 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의한 차이를 나타내었다. (p=0.030)

따라서, 세포생존율에 대한 억제효과를 보이는 半枝蓮, 草河車, 破古紙의 효능은 통계적으로 유의성에 있어서도 의미를 가진다.

沈²⁵⁾의 연구에서는 扶正防癌湯의 全體 抽出物은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 98.8%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 98.6%, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 98.7% 정도의 세포생존율을 나타내는 것으로 나타났다.

하지만 이것은 복합추출물의 경우이며, 扶正防癌湯 구성약물 각각의 경우에는 半枝蓮, 草河車, 破古紙와 같이 강한 세포독성을 나타내기도 하고, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대부분 세포활성을 저해하는 것으로 나타났다. 따라서, 扶正防癌湯은 구성약물 각각의 경우보다 합하였을 때 더 낮은 세포독성을 보이는 것을 알 수 있다.

扶正防癌湯 구성약물이 세포증식에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 ECV-304에 대하여 BrdU Incorporation assay를 실시하였다.

실험 결과 茯苓과 麥芽는 농도의 증가에 따라 세포증식율이 꾸준히 증가하였다. 또한 白花蛇舌草, 藤梨根, 半枝蓮, 龍葵, 太子參, 白朮, 陳皮, 白英 등은 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 120%에서 80% 사이의 세포증식율을 보여줌으로써 세포증식에 대한 억제효과는 유의하게 나타나지 않는 것으로 드러났다. 다만 山楂가 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 38.517 \pm 0.037%의 낮은 세포증식율을 보여 주고 있다.

세포생존율에 대한 실험에서 유의한 결과를 보여준 草河車와 破古紙는 세포증식의 억제에도 탁월한 효과가 있는 것으로 나타났다. 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 草河車는 58.780 \pm 0.015%, 破古紙는 2.829 \pm 0.009%의 세포증식율만을 보여 주었고, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 草河車는 26.408 \pm 0.010%, 破古紙는 0.998 \pm 0.002%의 세포증식율을 보여주는 등 월등한 효과를 나타내었다.

이상의 실험결과로써 扶正防癌湯 구성약물의 ECV-304에 대한 50%저지 농도(ED₅₀)는 다음과 같았다.

$$\text{山楂} : Y = -0.115X + 84.152 \quad \text{ED}_{50} = 296.974(\mu\text{g/ml})$$

$$\text{草河車} : Y = -0.182X + 98.544 \quad \text{ED}_{50} = 266.725(\mu\text{g/ml})$$

$$\text{破古紙} : Y = -0.290X + 101.437 \quad \text{ED}_{50} = 177.369(\mu\text{g/ml})$$

沈²⁵⁾의 연구에서는 扶正防癌湯의 全體 抽出

물은 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 대조군에 비하여 각각 66.4%, 89.8%, 99.7% 정도의 증식억제 효과를 나타내는 것으로 나타났다. 하지만, 扶正防癌湯 구성약물 각각의 세포 증식 억제효과는 이렇게 강하지 못하며, 단지 草河車, 破古紙와 같은 일부의 약물에서만 증식억제효과를 나타내고 있다. 즉 扶正防癌湯의 경우 각각의 구성약물들의 단순한 합 이상의 증식억제 효과를 나타내고 있다.

扶正防癌湯이 암세포의 혈관 신생을 억제할 수 있는지 확인하기 위해 Tube Formation assay를 실시한 결과, 한약 시료의 용매로 쓰인 methanol을 처리한 대조군에서는 capillary tube가 잘 형성되어 있음을 볼 수 있다. 한약을 처리한 실험군에서는 黃芪, 太子參, 白英, 神麩, 麥芽, 茯苓, 陳皮의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 혈관형성 억제효과를 보여주지 못하였고, 그보다 더 낮은 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 실험한 半枝蓮, 白花蛇舌草, 藤梨根, 山楂 추출물 투여군에서도 혈관형성이 잘 되어 있는 것으로 나타났다. 破古紙의 경우에는 10, 30, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 특별한 혈관형성 억제 효과를 나타내지 못하였지만, 草河車는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 상당한 혈관형성 억제 효과를 보여주고 있다. 현미경사진 상으로 불완전한 혈관형성의 모습을 보여주면서 많은 세포들이 공유를 통한 혈관형성을 하지 못하고 따로 떨어져 있는 모습을 볼 수 있다. 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 세포의 대부분이 파괴되어 있다. 반면에 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 혈관형성이 무난하게 이루어진 모습을 보여준다.

결론적으로 15가지의 扶正防癌湯 구성약물 중에서 혈관형성을 가장 저해하는 약물은 草河車이며 혈관형성을 방해하는 최저 농도는 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 50 $\mu\text{g/ml}$ 사이이다.

扶正防癌湯 구성약물의 白鼠 大動脈에 대한

혈관신생억제 효과에 대한 실험 결과, 약물을 처리하지 않은 대조군에서는 혈관신생이 잘 되어 있음을 볼 수 있다. 15개의 扶正防癌湯 구성약물 중 일부는 혈관신생이 증가한 것을 볼 수 있는데, 본 실험이 밝히고자 하는 혈관신생 억제 효과를 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 확실하게 나타내는 구성약물은 半枝蓮, 草河車, 破古紙 등이다. 藤梨根, 山楂에서도 일정 정도의 혈관신생 억제 효과를 보인다. 破古紙는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서부터 혈관형성 억제 효과를 보이고 있다. 草河車는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 보다 현저한 혈관형성 억제 효과를 보이며 혈관형성이 거의 이루어지지 않고 있고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 혈관형성이 완전히 차단된 것을 볼 수 있다.

결론적으로 扶正防癌湯 구성약물의 白鼠 大動脈에 대한 혈관형성 억제효과를 보는 실험에서 가장 큰 효과를 나타내는 것은 草河車와 破古紙이며, 특히 草河車가 가장 낮은 농도에서 혈관형성을 억제하는 것으로 나타났다.

이상의 실험결과를 요약하자면, 扶正防癌湯을 구성하는 15개 약물의 추출액의 혈관생성 억제 효과를 평가한 결과, 扶正防癌湯은 각각의 구성약물을 따로 처방했을 때 몇 가지 약물에서 보여지는 세포독성은 감소시키며, 각각의 약물에서 그 효과의 편차가 심한 세포증식 억제효과가 안정적으로 나타나는 것을 볼 수 있었다. 또한, 扶正防癌湯 구성약물의 암전이 억제 효과에 대한 이상의 실험 결과, 암세포의 혈관신생과 전이를 억제하는 효과가 가장 좋은 약물은 破古紙와 草河車이며, 이 두 가지 약물이 扶正防癌湯의 암전이 억제에 주도적인 작용을 하는 것으로 드러났다. 따라서, 앞으로의 신약물 개발에 있어서 이 두 가지 약물을 가장 주목하여 연구하고자 하며, 이상의 결과를 보고하는 바이다.

V. 結 論

扶正防癌湯 구성약물이 암전이 억제에 미치는 영향을 알아 보기 위해 扶正防癌湯 구성약물 농축액을 ECV-304에 투여하여 Viability assay, BrdU Incorporation assay를 시행하였으며, 혈관신생에 대해 미치는 영향에 대한 실험으로 扶正防癌湯 구성약물 농축액을 ECV-304에 투여하여 Tube Formation assay를 실시하고, 白鼠 大動脈을 이용하여 Rat Aortic Ring assay를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 扶正防癌湯 구성약물의 ECV-304에 대한 세포독성 실험결과, 대부분의 약물이 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 세포생존율이 떨어지는 것으로 나타났으며, 특히 半枝蓮(50 $\mu\text{g/ml}$: 53.118%, 100 $\mu\text{g/ml}$: 49.092%, 200 $\mu\text{g/ml}$: 43.765%, 400 $\mu\text{g/ml}$: 12.747%), 草河車(50 $\mu\text{g/ml}$: 45.554%, 100 $\mu\text{g/ml}$: 45.554%, 200 $\mu\text{g/ml}$: 0.0%, 400 $\mu\text{g/ml}$: 0.0%), 破古紙(50 $\mu\text{g/ml}$: 86.591%, 100 $\mu\text{g/ml}$: 81.307%, 200 $\mu\text{g/ml}$: 24.801%, 400 $\mu\text{g/ml}$: 3.111%)가 95%의 이상의 유의성으로 세포활성을 억제하는 것으로 나타났다.
2. 扶正防癌湯 구성약물의 ECV-304에 대한 세포증식 억제에 대한 실험 결과, 山楂(50 $\mu\text{g/ml}$: 63.276%, 100 $\mu\text{g/ml}$: 64.092%, 200 $\mu\text{g/ml}$: 68.966%, 400 $\mu\text{g/ml}$: 38.517%, ED_{50} =296.974), 草河車(50 $\mu\text{g/ml}$: 83.981%, 100 $\mu\text{g/ml}$: 86.997%, 200 $\mu\text{g/ml}$: 58.780%, 400 $\mu\text{g/ml}$: 26.408%, ED_{50} =266.725), 破古紙(50 $\mu\text{g/ml}$: 103.037%, 100 $\mu\text{g/ml}$: 82.529%, 200 $\mu\text{g/ml}$: 2.829%, 400 $\mu\text{g/ml}$: 0.998%, ED_{50} =177.369)에서 강한 세포증식 억제효과를 관찰하였다.
3. 扶正防癌湯 구성약물의 ECV-304의 Tube

Formation에 대한 억제효과를 보는 실험 결과 한약 시료의 용매로 쓰인 methanol을 처리한 대조군에서는 capillary tube가 잘 형성되었으나, 한약을 처리한 실험군에서는 대부분의 약물이 50 $\mu\text{g/ml}$ 와 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 혈관형성 억제효과를 보여주지 못하였고, 草河車가 30 $\mu\text{g/ml}$ 와 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 사이 농도에서 혈관형성 억제 효과를 가지는 것으로 나타나고 있다.

4. 扶正防癌湯 구성약물의 rat aortic ring의 신생 혈관 억제에 미치는 영향에 대해 실험결과, 강력한 혈관신생 억제 효과를 나타내는 것은 半枝蓮, 草河車, 破古紙 등이다. 특히 草河車는 50 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서 혈관형성을 억제하는 것으로 나타났다.

이상의 실험결과로 보아 扶正防癌湯 구성약물 중 草河車와 破古紙가 혈관신생을 억제하는 효과가 가장 탁월함을 알 수 있었으며, 그 중 특히 세포생존과 증식을 억제하고 혈관신생을 더욱 효과 있는 구성약물에 대한 연구를 통해 앞으로 扶正防癌湯 방제에 대한 새로운 해석이 가능할 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 대한병리학회: 병리학, 서울, 고문사, p.222 · 225 · 232, 1991.
2. 文濬典 · 安圭錫 · 崔昇勳: 동의병리학, 서울, 고문사, pp.74~76, 1994.
3. 해리슨 내과학 편집 위원회: 내과학, 서울, 정담출판사, p.1963 · 1971, 1997
4. 朴在甲: 인간생명과학, 서울, 서울대학교출판부, pp.621~622 · 642~645 · 663~664, 1993.

5. 서울대학교 의과대학: 종양학, 서울, 서울대학교 출판부, pp.137~143 · 193~205 · 214~215 · 225~234, 1996.
6. 예방의학과 공중보건 편찬위원회: 예방의학과 공중보건, 서울 계축문화사, p.435, 1993.
7. 전국한의과대학 본초학교수: 본초학, 서울, 영림사, pp.228~229 · 306~308 · 408 · 414~415 · 423~424 · 575~576 · 603~604, 1991.
8. 崔昇勳: 東醫腫瘍學, 서울,杏林出版, pp.13~14 · 19 · 32~36 · 78~80 · 147~155, 1995.
9. 한국한의학연구원: 암예방 및 치료를 위한 한의학적 연구, 서울, (주)다우문화사, pp.13~14 · 78~80, 1998.
10. 康舜洙: 한의학에서의 어혈에 대한 개념, 대한한의학회지, 5 (1):138~140, 1994.
11. 金聖勳: 한의학계의 암연구동향과 연구 전략에 대한 연구, 대한한의학회지, 19 (1):470~499, 1998.
12. 김정범: 桃仁承氣湯 및 그 구성약물이 어혈병태 모형에 미치는 영향, 대한동의학회지, 11 (1) pp.65~76, 1997
13. 안문생: 항암제 mitomycin C와 수종 보억제의 병용투여효과에 대한 연구. 대한한방내과학회지, 15(1): 60-80, 1994.
14. 金賢兒 · 林成祐 · 李源哲: 한약을 이용한 항암 실험연구의 경향에 관한 고찰, 대한한방종양학회지, 4 (1):213~226, 1998.
15. 윤성수: Angiogenesis inhibitors-clinical applications, Angiogenesis 연구회 창립기념 심포지엄, pp.4~13, 1998.
16. 이준우 · 최승훈 · 안규석: Angiogenesis의 한의학적 치료전략, 제3의학, 3 (1):21~31, 1998.
17. 전원경 · 이태희 · 윤유식 · 김연옥 · 성현재: 한약재의 신생혈관생성 억제 활성에 관한 연구, 한국한의학연구원논문집, 4:129~138, 1998.
18. 崔昇勳: 한의학의 종양에 대한 인식과 병리론, 대한한방종양학회지, 1 (1):11~28, 1995.
19. 姜大寅: 沒藥散이 혈관신생 억제에 미치는 효과에 대한 연구, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
20. 姜玟熙: 桂枝가 Angiogenesis의 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1998.
21. 姜顯淑: 加味慈桃丸의 angiogenesis 억제효과에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
22. 羅琪煥: 活絡效靈丹이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
23. 成熙根: 鬱金이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1998.
24. 孫宗坤: 活絡效靈丹이 암전이 억제에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 2000.
25. 沈範相: 扶正防癌湯이 암전이 억제에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 2000.
26. 王德仲: 加味慈桃丸 構成藥物의 血管新生抑制效果에 관한 研究, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 2000.
27. 尹在鎬: 十全大補湯이 암전이 억제에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1998.
28. 李紀龍: 立安散이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위

- 논문, 1998.
29. 李眞華: 血府逐瘀湯이 癌轉移 抑制에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1999.
 30. 全英秀: 加味慈桃丸의 항암 및 면역증강효과에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
 31. 趙漢震: 桃紅四物湯加減方의 항암 및 항진이 효과에 관한 연구, 대전대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
 32. 孟琳升: 中醫治癌大成, 北京, 北京科學技術出版社, p.15 · 96 · 143 · 235, 1995.
 33. 潘敏求: 中華腫瘤治療大成, 天津, 河北科學技術出版社, pp.51~65, 1996.
 34. 潘鴻鴻: 中醫藥抗癌學, 北京, 中國古籍出版社, pp.24~25, 1998.
 35. 史宇歷 · 單書健: 腫瘤專輯, 北京, 中國古籍出版社, pp.18~22, 1993.
 36. 盛展能: 抗癌治驗本草, 北京, 重慶出版社, p.119 · 389 · 499 · 655 · 672, 1994.
 37. 陰健, 郭力弓. 中藥現代研究與臨床應用 I. 北京: 學苑出版社; 1994
 38. 王守章: 中西醫結合臨床腫瘤內科學, 天津, 天津科技翻譯出版公司, pp.150~155, 1994.
 39. 王浴生: 中藥藥理與應用, 北京, 人民衛生出版社, pp.107~113 · 1240~1244, 1991.
 40. 郁仁存: 中醫腫瘤學(上), 北京, 北京科學技術出版社, pp.1~25 · 95~106 · 123~124, 1991.
 41. 黔南三十二醫院上海醫療隊: 貴州藥訊 (2): 34, 1976
 42. 劉春安 · 彭明: 抗癌中草藥大辭典, 洪湖, 湖北科學技術出版社, pp.91~94 · 322~326 · 811~813 · 1120~1124, 1994.
 43. 宋芳吉等: 新醫藥學雜誌, (6):61, 1979.
 44. 李宇彬: 抗癌中藥藥理與應用, 黑龍江科學技術出版社, p.158 · 986 · 995 · 1042 · 1285 · 1319, 1999.
 45. 李俊德 · 楊通禮: 中醫藥方治腫瘤特技集成, 北京, 北京科學技術出版社, p.42, 1997.
 46. 劉國聲等: 1978年度 上海地區性藥學學術會議 <藥學論文摘要>(中國藥學會北京分會編), 269頁, 1978
 47. 張民慶 · 龔惠明: 抗腫瘤中藥的臨床應用, 北京, 人民衛生出版社, p.402, 1998.
 48. 趙建成: 段鳳舞腫瘤積驗方, 合肥, 安徽科學技術出版社, pp.537~538, 1997.
 49. 中山醫學院《中藥臨床應用》編寫組: 中藥臨床應用, 廣州, 廣東人民出版社, p.227 · pp.147~148 · 282~283 · 292~294 · 407~408 · 562~563 · 595~596, 1976.
 50. 張鴻翔等: 腫瘤防治通訊, (2):40, 1976
 51. 余桂清: 中國傳統醫學治療癌症的作用和研究進展-경희대학교 제1회 동양의학 국제심포지움, pp.10~11, 1995.
 52. 于爾辛: 中醫中藥治療癌症38年的探索-경희대학교 제1회 동양의학 국제심포지움, pp. 36~40, 1995.
 53. 應榮多: 活血化瘀治則抗腫瘤實驗研究進展, 中西醫結合雜誌, 5 (2):76, 1985.
 54. 中國醫學技術院基礎醫學研究所等: 中華醫學雜誌(1):23, 1979.
 55. 邢雪梅 · 邢聰 · 邢磊: 抗癌中藥的生物治療效應研究近況, 中醫雜誌, 35 (3):177~179, 1994.
 56. Arbiser JL, et al: The antiangiogenic agents TNP-470 and 2-methoxyestradiol inhibit the growth of angiosarcoma in mice, J Am Acad Dermatol, Jun;40 (6 Pt 1):925~929, 1999.
 57. Bhargava P, et al: A phase I and pharmacokinetic study of TNP-470 administered weekly to patients with

- advanced cancer, *Clin Cancer Res*, Aug;5 (8):1989~1995, 1999.
58. D' Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J: Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci*, Apr 26;91 (9):4082~4085, 1994.
 59. Dixon SC, et al: Thalidomide up regulates prostate specific antigen secretion from LNCaP cells, *Cancer Chemother Pharmacol*, 43 Suppl:S78~84, 1999.
 60. Figg WD, et al: Pharmacokinetics of thalidomide in an elderly prostate cancer population, *J Pharm Sci*, Jan;88 (1):121~125, 1999.
 61. Folkman, J. and Shing, Y.: Angiogenesis. *J Bio Chem*, 267:10931~10934, 1992.
 62. Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol* 1976;16:207-48
 63. Folkman, J.: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent, *J Natl Cancer Inst.*, 82:4~6, 1990.
 64. Franceschini M, et al: [Action of thalidomide on the growth of the chick-embryo tibia in organotypic cultures], *Boll Soc Ital Biol Sper*, Jul 15;40 (13):761~763, Italian 1964.
 65. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 1980;102:196-202.
 66. Kudelka AP, et al: A phase I study of TNP-470 administered to patients with advanced squamous cell cancer of the cervix, *Clin Cancer Res*, Sep;3 (9):1501~1505, 1997.
 67. 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, p.79 · pp.315~328, 1994.
 68. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65 (1-2):55-63, 1983.
 69. 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*, 88:277, 1977.
 70. Offodile R, et al: Regression of metastatic breast cancer in a patient treated with the anti-angiogenic drug TNP-470, *Tumori*, Jan~Feb;85 (1):51~53, 1999.
 71. Oikawa T., Hasegawa M., Shimamura M., Ashino-Fuse H., Murota S. I., Morita I.: Eponemycin, a novel antibiotic, is a highly powerful angiogenesis inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, p.181 · pp.170~176, 1991.
 72. Sugarbaker EV, Weingard DN, Roseman JM. *Cancer Invasion and Metastases* (L.A. Liotta and I.R. Hart ed.), Boston, Nijhoff, 1982, p. 427-465.
 73. Shoji M, Hnacock WW, Abe K, Micko C, Casper KA, Baine RM, Wilcox JN, Danave I, Dillehay DL, Matthews E, Contrino J, Morrissey JH, Gordon S, Edgington TS,

- Kudryk B, Kreutzer DL, Rickles FR: Activation of coagulation in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer, *Am J Pathol*, 152 (2):399-411, 1998.
74. Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, Mukai K, Goto T. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 26 (3 Pt 1):265-74, 1990.
75. Takahashi K, Sawasaki Y. Rare spontaneously transformed human endothelial cell line provides useful research tool [letter]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 28A (6):380-2, 1992.
76. Tanaka N. G., Sakamoto N., Tohgo A., Nishiyama Y., Ogawa H.: Inhibitory effects of antiangiogenic agents on neovascularization, *Exp. Pathol*, p.30 · pp.143~150, 1986.
77. Yamamoto D, et al: Synergistic action of apoptosis induced by eicosapentaenoic acid and TNP-470 on human breast cancer cells, *Breast Cancer Res Treat*, May;55 (2):149-160, 1999.
78. Zucher S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, Jesty J: Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells; conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer*, 75 (5):780-786, 1988.