

活絡效靈丹合人蔘養胃湯이 血管新生 抑制 에 미치는 影響

고기완 · 박준혁 · 강희 · 김성훈 · 유명범 · 심범상 · 최승훈 · 안규석

Effect of Whalakhyleyng-dan plus Yinsamyangwui-tang on Anti-angiogenesis

Ki-Wan KO, Joon-Hyuk Park, Hee Kang, Sung-Hoon Kim,
Young-Beob Yu, Bum-Sang Shim, Seung-Hoon Choi, Koo-Seok Ahn

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

Anti-angiogenesis is one of therapies which have been high-lightened on the research of cancer treatment. Anti-angiogenesis means that new blood vessels are created from a existing capillary tube and it is a important process on metastasis and permeation when cancer is created or formed. Since angiogenesis have been under research, a complete recovery oriented treatment against cancer have been suggested blocking metastasis, delaying the growth of cancer cell, and blocking the supply of oxygen and nutritive substance through the web of blood vessels.

Until now, there are several anti-angiogenesis, which have been known to the public, such as thalidomide, angiostatin, endostatin, 2-methoxyestradiol, TNP-470, and marimastat, etc. Additionally, 17 clinical testing projects about anti-angiogenesis are on the process in NCI(National Cancer Institute). Especially, TNP-470 showed effectiveness against cancer on clinical testing after finishing animal testing.

Based on existing researches showing that Yinsamyangwui-tang is effective to strengthening body resistance and Whalakhyleyng-dan effects cells on the inside of blood vessel because Whalakhyleyng-dan restrains cell adhesion during the restraining period of a blood vessel, I tried to research the effect of Whalakhyleyng-dan plus Yinsamyangwui-tang on angiogenesis.

I made a conclusion putting into operation through using SK-Hep-1 (KCLB 30052), A549(KCLB 10185), AGS(KCLB 21739), and BCE(Bovine Capillary Endothelial Cell).

* 경희대학교 한의과대학 병리학교실

Followings are the results of my experimental research:

1. According to the researching results of anti-cancer activation against cancer cell, Whallkhyoleyng-dan plus Yinsamyangwui-tang decreased the number of cancer cells -- While injecting 600 $\mu\text{g/ml}$, injected groups decreased 3.1% more comparing with the contrastive group of SK-Hep-1, 49.7% more comparing with the contrastive group of A549, and 31.0% more comparing with the contrastive group of AGS.
2. According to the researching results of DNA composition effect between BCE and cancer cell, Whallkhyoleyng-dan plus Yinsamyangwui-tang reduced the rate of SK-Hep-1 synthesis inhibition by 59.1% at 600 $\mu\text{g/ml}$ intensity comparing with contrastive group; for A549, 72.6%; for AGS, 6.1%, for BCE, 28.9%.
3. According to the researching results about the effect of BCE cell to angiogenesis, angiogenesis was restrained at 400 $\mu\text{g/ml}$ intensity during 18 hours observation.
4. In the case of aortic ring assay, the half level of angiogenesis was reduced comparing with the contrastive group while injecting with 400 $\mu\text{g/ml}$ intensity; with 800 $\mu\text{g/ml}$, under 10% comparing with contrastive group; and with 1600 $\mu\text{g/ml}$, complete restrain.

According to the above results, Whallkhyoleyng-dan plus Yinsamyangwui-tang was proved to have an anti-angiogenic effects.

Key Words : Whallkhyoleyng-dan Plus Yinsamyangwui-tang(활락효령인삼양위탕), coagulation, anti-angiogenesis, metastasis, cancer

I. 緒 論

근래 癌환자수는 매년 증가하여 국민건강을 위협하는 주요 원인으로 대두되고 있으며⁹⁾, 세계적으로 매년 200~300만명이 사망하고 있다²⁶⁾.

癌에 대한 기존 치료법으로는 수술요법, 화학요법, 방사선요법과 면역요법이 있으며, 최근에는 유전자치료법과¹⁾ 병용하는 방법을 시행하고 있으나, 癌의 정복에는 한계가 있으며 부작용을 나타내는 경우가 많다^{11,20,40,96)}. 최근 癌치료 연구 가운데 가장 부각되고 있는 것 중에 하나가 血管新生抑制(anti-angiogenesis)이다^{97,101,111,137,138,139)}.

血管新生(angiogenesis)이란 기존의 모세혈관에서 새로운 혈관이 형성되는 것을 뜻하며, 癌의 형성과 신생에 있어서 轉移와 浸潤의 중요한 과정에 해당된다. 정상적인 과정에서의 血管新生은 胚成長 및 상처치유의 과정에서, 病的인 상태에서는 암세포의 혈관형성, 血栓 초기의 내피세포 국소환경, 류마티스성 관절염, 안과 질환, 당뇨병성 망막장애, 乾癬 등에서 볼 수 있다¹⁾.

血管新生에 대한 연구가 이루어지면서 癌조직에 혈관망을 통한 산소와 영양분 공급을 차단함으로써 癌자체의 성장을 지연시키고 轉移를 억제하여 궁극적으로는 癌의 완전한 소멸을 지향하는 치료 방법이 제시되고 있는데

54,111,113,118,128,133), 최근에는 MMPs(matrix metalloproteinases) inhibitor 개발, 혈관 내피세포의 증식 억제제 개발, 血管新生 촉진 인자의 활성 저해제 개발, 혈관내피세포 특이적 integrin의 저해제 개발이라는 4가지 측면에서 접근하고 있다¹³²⁾.

지금까지 알려진 대표적인 血管新生 抑制劑는 thalidomide^{106,109)} · angiostatin¹²⁸⁾ endostatin¹³³⁾ · 2-methoxyestradiol⁹⁸⁾ · TNP-470^{98,100,123,134,141)} · marimastat 등이며 현재 미국 NCI(National Cancer Institute)에서 진행하고 있는 血管新生억제제의 임상시험 프로젝트는 17건에 달하고 있으며¹³²⁾, 이중 TNP-470은 이미 동물실험을 끝내고 임상실험을 하고 있는데 매우 효과적인 것으로 학계에 보고 되었다^{98),100,123,134,141)}.

癌의 한의학적 치료법으로는 辨證論治에 근거한 扶正과 祛邪의 輕重緩急이 조절되어야 한다는 이론을 바탕으로, 正氣의 補養을 위주로 하면서, 祛邪의 방법으로는 活血化癥法, 清熱解毒法, 軟堅散結法, 化痰祛濕法, 消腫止痛法 등이 주로 활용되고 있다^{20,70,73,75,83,86)}. 血管新生은 한의학적으로 瘀血의 개념과 관련되므로 活血祛瘀 약물이 血管新生에 영향을 미칠 것으로 추정할 수 있으며, 이와 관련하여 活血祛瘀 약물의 coagulation억제 효과가 보고된 바 있다^{30,33,35,39,48)}.

이에 저자는 張錫純의 《醫學衷中參書錄》에

있는 活絡效靈丹⁹²⁾이 세포 부착억제 효과를 통해 혈관내피세포의 血管新生 억제기전에 영향을 미치며⁴¹⁾, 《太平惠民和劑局方》에 있는 人蔘養胃湯⁹⁵⁾은 扶正효과가 있다는 기존의 연구 보고³⁴⁾를 토대로 活絡效靈丹과 人蔘養胃湯을 선택하여 活絡效靈丹合人蔘養胃湯이 血管新生에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 이를 위하여 肝癌 細胞株인 SK-Hep-1, 肺癌 細胞株인 A549, 胃癌 細胞株인 AGS와 牛血管 內皮細胞株인 BCE(bovine capillary endothelial cell)를 사용하여 MTT assay, proliferation assay, tube formation assay, aortic ring assay 등을 시행하여 다음과 같이 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗 方法

1. 檢液의 準備 및 調劑

活絡效靈丹 600 g 을 5,000ml round flask에 증류수 3,500ml와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 2시간동안 가열하여 濾過한 濾液을 식힌 후 원심분리하여 상층액 700ml을 얻은 후 1000 ml round flask에 옮겨 凍結乾燥器(freeze dryer, Eyla, Japan)로 24시간 동안 凍結 乾燥하여 61.64 g 의 분말을 얻었다(yield: 8.6%).

人蔘養胃湯은 463g을 5,000ml round flask에

Table 1. Composition of Whallakhyoleyng-dan (WLHLD).

Herb	Latine Name	Scientific Name	Dose(g)
當歸	Angelicae Gigantis Radix	Angelicae gigas NAKAI	15
丹蔘	Salviae Miltiorrhizae Radix	Salviae miltiorrhizae BGE	15
乳香	Olibanum	Boswellia, Carterii BIRDW	15
沒藥	Myrrha	Commiphora myrrah ENGL	15
Total amount			60

증류수 3,000ml와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 2시간동안 가열하여 濾過한 濾液을 식힌 후 거어즈로 거르고, 8000rpm에서 5분간 원심분리하여 殘渣를 제거한 후, 상층액을 취하여 1l가 될 때까지 감압농축한 뒤 동결건조하여 50g의 분말을 얻었다(yield: 10.8%).

이 두 약물을 합하여 최종 농도가 각각 200, 400, 600, 800 μ g/ml가 되게 증류수에 용해하여 사용하였다. 活絡效靈丹의 處方은《醫學衷中參書錄》⁹²⁾에 기재된 것이며, 人參養胃湯은《東醫寶鑑》²⁵⁾에 기재된 것으로 한 첩의 내용과 분량은 아래와 같다(Table 1, 2).

2. 細胞株 培養

본 실험에는 人間 肝癌細胞株인 SK-Hep-1 (KCLB 30052), 肺癌細胞株인 A549 (KCLB 10185), 胃癌細胞株인 AGS (KCLB 21739)와 牛血管內皮細胞株인 BCE 를 사용하였다.

SK-Hep-1의 배양은 DMEM 배지에 55℃ 恒

溫槽에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 Fetal Bovine serum (FBS, Gibco, BRL)를 10% 포함시키고 1% 抗生劑(penicillin/streptomycin)와 NaHCO₃ 2.2 g 을 첨가하였고 A549, AGS는 RPMI 배지를 이용하되 위와 동일한 조건으로 첨가하였고 BCE의 배양은 DMEM 培地에 55℃ 恒溫槽에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 Calf Serum (CS, Gibco, BRL)를 10% 포함시키고 1% 抗生劑 (penicillin/streptomycin)와 NaHCO₃ 2.2 g 을 첨가하였고 basic fibroblast growth factor (bFGF, Upstate Biotechnology)를 3ng/ml의 농도로 첨가하였으며 1.5% gelatin으로 도포된 배양접시에 繼代培養을 3일 간격으로 실시하였다.

3. MTT assay¹³⁰⁾

본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann이 개발한 방법으로 Promega사의 실험방법에 준하여 실험하였다.

Table 2. Composition of Yinsamyangwui-tang (YSYWT).

Herb	Latine Name	Scientific Name	Dose(g)
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	<i>Atractylodis japonica</i> KOIDZ	5.6
陳皮	Citri Pericarpium	<i>Citri unshiu</i> MARKOVICH	4.7
厚朴	Magnoliae Cortex	<i>Magnolia officinalis</i> REHD et WILS	4.7
半夏	Pinelliae Rhizoma	<i>Pinellia ternata</i> BREIT	4.7
赤茯苓	Poria	<i>Poria cocos</i> WOLF	3.8
藿香	Pogostemonis Herba	<i>Pogostemonis cablin</i> BENTH.	3.8
人參	Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i> MEYER	1.9
草果	Tsaoko Fructus	<i>Amomum tsaoko</i> CREVOST	1.9
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH	3.8
烏梅	Mume Fructus	<i>Prunus mume</i> SIEB et ZUCC.	3.8
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens	<i>Zingiber officinale</i> ROSC	3.8
大棗	Jujubae Fructus	<i>Zizyphus jujuba</i> MILL	3.8
Total amount			46.3

BCE 세포를 96-well cell culture plate에 세포 수가 각각 2×10^4 cells/well이 되도록 seeding하여 100 μ l 10% CS-DMEM과 함께 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 100 μ l의 serum free DMEM에 檢液의 농축액을 가하여 세포에 투여하였다.

20시간이 경과한 후 MTT dye solution을 20 μ l/well에 가한 후 10분 후에 ELISA reader (Molecular Device, U.S.A.)를 이용하여 측정 파장 490nm, 참조 파장 650nm에서 측정하였다. Blank 값을 위해서 대조군에는 약제를 가하지 않은 100 μ l serum free DMEM의 측정값을 blank로 하였고 실험군은 배양액에 약을 첨가한 측정값으로 정하였다.

4. Proliferation assay

BCE 세포에 대하여 BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) incorporation 실험을 실시하였는데 Rocher Molecular Biochemicals사의 방법에 준하였다. 우선 세포를 96-well plate에 각각 2×10^4 cells/well의 비율로 10% FBS-DMEM 100 μ l와 함께 seeding하였다. 48시간이 지난 후 檢液을 각 농도별로(200, 400, 600 μ g/ml) 가하고 동시에 BrdU labeling solution 10 μ l/well을 가하였다. 18시간이 지난 후 ethanol 70% (in HCl) 200 μ l/well을 가하여 -20 $^{\circ}$ C에 30분간 두어 세포를 고정한 후 PBS 200 μ l/well로 3회 세척한다. 다시 nuclease 100 μ l/well로 가한 후 30분간 37 $^{\circ}$ C water bath에 놓고 나서 PBS 200 μ l/well로 3회 씻는다. 다시 anti-BrdU-POD (peroxidase labeled antibody to BrdU, Fab fragments)를 100 μ l/well에 30분간 37 $^{\circ}$ C water bath에 둔 후 washing buffer 200 μ l/well로 3회 세척한다. Peroxidase 100 μ l/well를 넣고 10분 후에 ELISA reader를 이용하여 측정 파장 410nm, 참고 파장 490nm로

하여 측정값을 읽는다.

5. Tube formation assay¹³⁵⁾

24-well cell culture plate를 얼음 접시에 놓고 2.4 mg matrigel (12.1 mg/ml)을 가한 후 spatula를 이용해 도포하였다. Matrigel을 바른 plate는 37 $^{\circ}$ C incubator에 30분간 방치하여 matrigel이 gel화 되도록 하였다. BCE 세포를 matrigel이 도포된 plate에 8×10^4 cells/well로 접종하고 10% CS과 bFGF (3mg/ml)이 첨가된 DMEM 배지와 함께 檢液을 50, 100, 200, 400 μ g/ml의 농도로 첨가하여 CO₂ incubator에서 배양하였다. 6, 12, 18시간이 경과한 후 新生血管網을 역상 현미경 (Olympus CK40, Japan)으로 50배율에서 사진을 촬영하여 BCE 세포의 분화 정도를 관찰하였다.

6. Aortic ring assay³⁸⁾

48-well tissue culture plate에 100 μ l/well(11.46 mg/ml)의 matrigel (Beckton-Dickinson)을 coating한 뒤 CO₂ incubator에 well plate를 30~60분간 두어 용액상태의 matrigel이 gel이 되게 한다.

4~6주 된 무게 200g 미만의 SD (Sprague-Dawley) rat을 CO₂ 가스를 이용하여 질식사시킨 후 흉부를 sagittal section하여 대동맥궁을 중심으로 3cm 정도로 잘라낸 뒤 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)에 담근다. 무균상태에서 주변 조직과 대동맥 속의 blood를 잘 제거한 뒤 대동맥을 HBSS가 담긴 배양접시에 놓고 메스를 사용하여 0.8mm의 두께의 ring 24개를 잘라낸 다음 matrigel로 coating된 48-well tissue culture plate에 대동맥의 ring을 well 중앙에 하나씩 놓고 40 μ l의 matrigel를 추가로 주입하여 ring을 coating하고 그 다음 incubator에 30분간

넣어두었다. 그 후 ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement) 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 함유한 human endothelial basal growth media에 檢液을 첨가하여 각 well에 200 μl 씩을 넣어주고 대조군은 ECGS를 함유한 media 만을 넣어주었다.

5일 동안 CO₂ incubator에 배양한 뒤 media를 제거하고 역상 현미경으로 40배율에서 촬영하였다.

7. 統計處理

Cell viability 억제활성의 유의성 검정은 SPSS를 이용하여 one way ANOVA를 실시하였다. 그리고 SK-Hep-1 cell proliferation의 50%저지 농도(ED₅₀)을 다음과 같이 구하였다. Log dose값을 X축으로 하고 성장률(%)을 Y축으로 하여 최소 자승법으로 회귀직선을 얻고 그 방정식을 도출하면 $Y = -25.83X + 144.8$ 이 된다. $Y = 50\%$ 놓고 $X = \log_{10} \text{ED}_{50}$ 를 구하고 ED₅₀값을 계산하면 4677.35 $\mu\text{g/ml}$ 가 된다. 이와같은 방법으로 A549($Y = -38.56X + 186.4$, $r_2 = 0.5332$)에 대한 ED₅₀=3338.44 $\mu\text{g/ml}$, AGS($Y = -176.1X + 497.7$,

$r^2 = 0.9943$)에 대한 ED₅₀=346.73 $\mu\text{g/ml}$, BCE($Y = -76.27X + 240.0$, $r^2 = 0.9950$)에 대한 ED₅₀= 309.02 $\mu\text{g/ml}$ 값을 각각 구하였다.

III. 實驗 成績

1. 活絡效靈丹合人蔘養胃湯의 癌細胞株에 대한 抗癌活性

檢液을 SK-Hep-1, A549, AGS에 투여한 결과 (Table 3, Fig.1), 檢液은 SK-Hep-1의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 대조군에 비하여 89.2%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 86.9%, 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 36.6%, 600 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 3.1%로 항암활성을 나타내었다. 또한 A549의 경우 600 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 대조군에 비하여 49.7%로 세포수가 줄어들었다. AGS의 경우 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 대조군에 비하여 41.5%, 600 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 31.0%로 저하시켰다. 抗癌活性를 가장 많이 나타낸 것은 SK-Hep-1, AGS, A549의 순서였다.

SK-Hep-1의 cell viability 억제활성의 유의성

Table 3 . Effects of the WLHLD plus YSYWT on Viability of SK-Hep-1, AGS and A549.

	WLHLD plus YSYWT ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	100	200	400	600
SK-Hep-1	1.036 \pm 0.039* (100.0%)	0.925 \pm 0.050 (89.2%)	0.901 \pm 0.058 (86.9%)	0.373 \pm 0.143 (36.0%)	0.032 \pm 0.008 (3.1%)
A549	1.251 \pm 0.066 (100.0%)	1.202 \pm 0.094 (96.1%)	1.072 \pm 0.123 (85.7%)	0.807 \pm 0.082 (64.5%)	0.621 \pm 0.033 (49.7%)
AGS	1.037 \pm 0.027 (100.0%)	1.145 \pm 0.124 (110.4%)	0.941 \pm 0.207 (90.7%)	0.431 \pm 0.140 (41.5%)	0.322 \pm 0.029 (31.0%)

*represents mean \pm S.D. of measurement in optical density

SK-Hep-1: adenocarcinoma of liver

A549: carcinoma of lung

AGS: adenocarcinoma of stomach

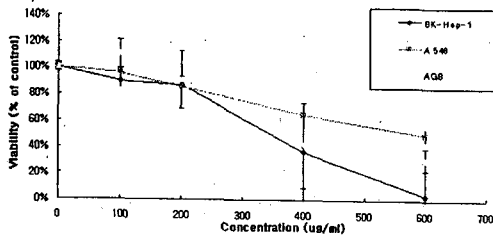


Fig. 1. Effects of the WLHLD plus YSYWT on viability of SK-Hep-1, AGS and A549.

검정을 ANOVA 분석을 실시하였으며(F-value 244.835 P-value 0.001, $F_{0.05}(5,30)2.53$) Sheffe 사후 검정결과 200µg/ml에서부터 대조군과의 유의적 차이를 나타내었다 (P-value, 0.0016). A549 주는 (F-value 63.347 P-value 0.001, $F_{0.05}(5,30)2.53$) 400µg/ml에서부터 대조군과의 유의적 차이를 나타내었으며 (P-value, 0.001), AGS (F-value 281.186 P-value 0.001, $F_{0.05}(5,30)2.53$) 는 400µg/ml에서부터 대조군과의 유의적 차이를 나타내었다 (P-value, 0.001).

2. 活絡效靈丹合人蔘養胃湯이 癌細胞株와 血管內皮細胞의 증식에 미치는 영향

檢液을 癌細胞株와 혈관내피세포에 투여하여 DNA 합성에 미치는 영향을 살펴 본 결과 (Table 4, Fig. 2), 檢液은 SK-Hep-1에 대하여 600µg/ml 농도에서 대조군의 DNA 합성율에 비하여 59.1%로 저하되었으며, A549는 72.6%,

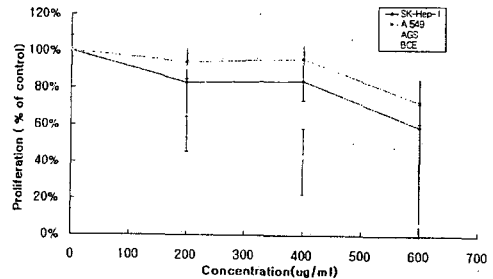


Fig. 2. Inhibition effects of the WLHLD plus YSYWT on proliferation of SK-Hep-1, AGS, A549 and BCE.

Table 4. Inhibition Effects of the WLHLD plus YSYWT on Proliferation of SK-Hep-1, AGS, A549 and BCE.

	WLHLD plus YSYWT (µg/ml)			
	0	200	400	600
SK-Hep-1	0.857±0.029 (100.0%)	0.712±0.134 (83.1%)	0.720±0.076 (84.0%)	0.507±0.116 (59.1%)
A549	0.944±0.063 (100.0%)	0.887±0.060 (94.0%)	0.908±0.067 (96.2%)	0.685±0.092 (72.6%)
AGS	1.081±0.058 (100.0%)	0.983±0.076 (91.0%)	0.465±0.069 (43.0%)	0.066±0.009 (6.1%)
BCE	0.240±0.020 (100.0%)	0.157±0.031 (65.3%)	0.097±0.017 (40.4%)	0.069±0.022 (28.9%)

*represents mean±S.D. of measurement in optical density

SK-Hep-1: adenocarcinoma of liver

A549: carcinoma of lung

AGS: adenocarcinoma of stomach

AGS는 6.1%, BCE는 28.9%로 저하시켰다.

SK-Hep-1 Proliferation: $ED_{50}=4677.35\mu\text{g/ml}$

A549 Proliferation: $ED_{50}=3338.44\mu\text{g/ml}$

AGS Proliferation: $ED_{50}=346.73\mu\text{g/ml}$

BCE Proliferation: $ED_{50}=309.02\mu\text{g/ml}$

3. 活絡效靈丹合人蔘養胃湯이 BCE 細胞의 血管新生에 미치는 영향

Matrigel이 도포된 plate에 BCE 세포를 접종한 후 檢液을 0, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 檢液이 BCE 세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하였고 6, 12, 18시간 후에 사진을 촬영하였다.

실험 결과 대조군은 6시간이 경과하면서 세포들이 분화하여 毛細血管을 형성하기 시작하고 12, 18시간이 경과하면 이러한 정도가 더욱 분명해지고 있으나, 18시간 후에는 일부 분화되지 않고 세포가 바닥에서 탈락되려는 상태에 있는 것이 일부 관찰되고 있다 (Fig. 3).

檢液을 투여한 경우 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서는 血管網의 형성이, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서

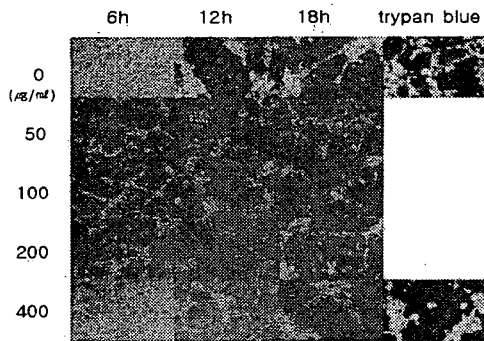


Fig. 3. Effects of the WLHLD plus YSYWT on capillary tube formation of bovine capillary endothelial cells (BCE).

는 혈관의 형성이 일부 저해되고 있는 소견이 관찰되며, 특히 200, 400 $\mu\text{g/ml}$, 18시간 후 투여군에서는 plate바닥에서 떨어져 나오려는 세포들이 관찰되고 있다. 이러한 소견이 세포사에 의한 것인지를 확인하기 위하여 사진 촬영 직후 trypan blue를 이용하여 염색한 결과 대조군과 檢液 투여군에서 모두 세포사가 관찰되지 않았다.

4. 活絡效靈丹合人蔘養胃湯이 白鼠 大動脈 血管內皮細胞의 血管新生에 미치는 영향

실험 결과(Fig. 4), 檢液은 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 대조군에 비하여 血管新生 정도에서 별다른 차이를 나타내고 있지 않으나, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군에 비하여 血管新生 정도가 절반 수준으로 저하되어 있음이 관찰되고, 800 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군의 약 10% 이하, 1600 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 血管新生이 완전히 억제되어 있는 소견을 보이고 있다.

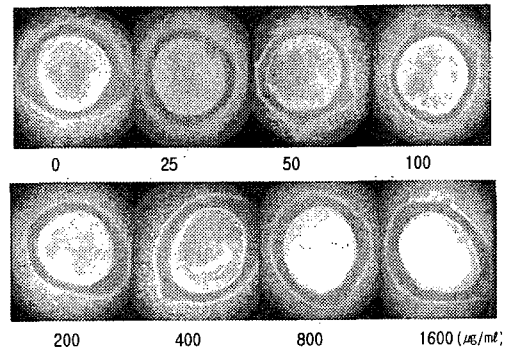


Fig. 4. Effects of the WLHLD plus YSYWT on angiogenesis of rat aortic endothelial cells.

IV. 考 察

최근 한국인의 질병사인 중에서 癌은 순환기 계질환에 이어 2위를 차지하고 있으며, 또한 癌에 의한 사망률은 환경공해, stress, 흡연, 음주, 식습관 등의 요인으로 10년간 통계를 보더라도 지속적인 증가를 보이고 있다.^{8,22,129).}

癌은 조직의 자율적인 과잉적 성장이며, 개체에 대해서 의의가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대해서 파괴적인 것을 말한다.^{10).} 腫瘍은 일반적으로 임상 및 병리 형태학적으로 양성과 악성 腫瘍으로 구분하는데 그 기준은 침입성과 확산성이다. 양성 腫瘍은 비교적 서서히 성장하며 주변 조직으로 확산되지 않기 때문에 수술적 제거에 의해 치유시킬 수 있다. 반면에 악성 腫瘍은 빠른 성장을 주된 특징으로 하며 국지적으로 발생한 상태 그대로 있지 않고 주위의 조직으로 침투하거나, 체내 순환기관으로 침투하여 본래 발생부위로부터 먼 부위까지 확산된다. 이러한 이차적인 癌을 유발하는 현상을 轉移라고 부르며 癌이 몸 전체에 퍼지면 생명에 위협을 초래한다.^{10,47).} 고형암의 약 80%에서 轉移가 이루어지는 것으로 보고되었고, 癌으로 인한 사망의 약 70%는 轉移에 의한 것이다.^{140).}

현재 사용되고 있는 抗癌療法의 대부분은 조혈 및 면역기능에 부작용을 초래하고 癌細胞 이외의 정상세포에도 독성을 나타내고 있으며^{7,36,40)} 이에 대한 문제점을 극복하기 위해 최근에는 apoptosis · cell differentiaion · angiogenesis 등을 활용한 다양한 연구가 진행되고 있다.^{36).} 그 중에서도 최근 가장 부각되고 있는 것은 血管新生抑制이다.^{97,101,111,137,138,139).}

血管新生을 조절하는 물질을 찾아내어 抗癌劑로 개발하려는 가장 큰 이유는 癌細胞에 대하여 직접적으로 작용하여 癌細胞를 죽이기보

다는 癌細胞가 성장하기 위해서 필수적인 血管新生을 원천적으로 억제함으로써 부작용이 없는 이상적인 抗癌劑를 개발할 수 있다는 점이다.^{54).} 기존의 固形癌에 대한 化學療法은 약물의 癌의 接近性, 多劑藥劑耐性, 藥劑의 副作用 및 癌의 多樣性 등의 문제를 가지고 있다. 癌내 위치한 혈관은 癌細胞보다는 약제가 도달하기 쉬우며, 癌의 생존에도 혈관의 존재가 필수적이다. 또한 癌細胞가 유전적으로 불안정하여 多劑藥劑耐性 등이 잘 발생하는 반면, 혈관은 유전적으로 비교적 안정되어 있어 약제내성이 잘 발생하지 않는다. 그러나 新生血管 억제를 위한 新藥開發은 신물질 개발의 어려움과 함께 임상적용 단계에서 예기치 못한 부작용이 발생할 수 있는 문제를 안고 있기 때문에^{58,105,107)} 이에 비해 상대적 부작용에 대한 위험성이 적고, 인체의 免疫增強效果가 있다고 인정되는 한약의 抗癌效果에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.^{23,29,31,36,40,41,45,46,47,55,56,59,62,63,65,80,96).}

癌의 轉移와 血管新生의 과정은 세포가 癌細胞인가, 혈관내피세포인가의 차이와 서로의 방향성에 차이가 있을 뿐 그 과정(local invasion)은 근본적으로 동일하다.^{47).} 따라서 癌의 재발 방지라는 입장에서 轉移와 血管新生은 동전의 양면이라고 할 수 있으며 血管新生이 없으면 대부분의 癌은 1mm 이상 성장할 수 없기 때문에^{99,112)} 血管新生의 억제를 통해 肺癌, 肝癌, 乳房癌, 前坡前琨 등 악성 및 轉移性 癌의 선택적인 증식억제와 轉移 억제 방법의 일환으로 血管新生을 억제하는 약제나 방법의 개발이 세계적으로 활발히 이루어지고 있다.^{108,119,122).}

Douglas 등에¹⁰³⁾ 의하면 angiogenic CIS (carcinoma-in-situ)는 곧 invasive carcinoma로 진전됨을 보고하였는데, 이는 경도의 癌에서 浸潤癌까지의 점진적인 진행과정에 新生血管形成이 관여함을 시사하는 것으로 임상적 의미

가 크다. 이는 癌의 진단, 예후 결정에 있어 血管新生의 가치를 부각시켰으며^{97,101,137,138,139}, 실제로 乳房癌^{67,115,116,120}, 膀胱癌^{102,121}, 肺癌¹¹⁰, 胃腸管癌^{37,43,44,64,125}, 子宮頸部癌⁴⁹ 등에서 血管新生의 정도를 癌의 독립적 예후 인자로서의 가능성이 연구되고 있다.

血管新生의 과정은 생식, 성장 및 상처치유 등에 필수적이며 이 경우의 血管新生은 인체가 통제를 할 수 있지만 각종 질환에 있어서는 통제되지 않는 血管新生으로 진행된다. 주요질환으로는 癌, rheumatoid arthritis, corneal graft neovascularization, angiofibroma, hemangioma, hypertrophic scars, 골절의 접합 지연, scleroderma, 乾癬과 같은 피부질환, arteriovenous malformation, 動脈硬化, AIDS complication 등 다양한 질환을 유발하는 원인으로 알려져 있는데¹¹⁴ 관절염에서는 새로운 모세혈관이 관절에 침범하여 연골을 파괴하며 당뇨병에서는 망막에 새로 생긴 모세혈관이 초자체를 침범하여 출혈이 생기면서 실명을 하게 된다. 癌의 성장과 轉移 또한 血管新生에 의존하는데 癌은 자신의 성장을 위해 지속적으로 새로운 모세혈관의 성장을 자극해야 하며, 癌에 다다른 신혈관은 癌細胞가 혈액속에 들어가서 먼 곳으로 轉移하는 통로가 된다⁴⁷.

현재까지 血管新生을 저해하는 물질로 thalidomide^{106,109} · angiostatin¹²⁸ · endostatin¹³³ · 2-methoxyestradiol⁹⁸ · TNP-470^{98,100,123,134,141} 등의 화합물이 血管新生抑制와 관련하여 임상실험중에 있는 것으로 알려져 있다^{98,100,123,134,141}. 그러나 아직까지 이들 血管新生 저해제는 체내안정성 및 생산방법에 따른 활성의 변화로 인해 실험에서 일관된 효과를 발휘하지 못하고 있다.

1865년 Trousseau⁹⁰, 1974년 Clifton^{104,117,126}, Michaels¹²⁷의 보고한 바에 의한 근거로 癌의

血液凝固說이 제기되었는데 이는 첫째, 癌細胞가 방류한 물질이 혈액의 응고상태를 유발한다는 것이고, 둘째는 혈액의 응고를 저지하는 약물은 癌 치료율을 높이고 재발율을 감소시키며 생존기간을 연장시킨다는 것이다. 이와 같은 사실들은 癌細胞에 의해서 감작된 혈관내피세포에서 일어나는 血管新生에는 응혈인자(coagulation factor)들이 관여하고 있음을 알 수 있다. 임상자료들은 癌의 경우 혈액의 응고상태가 객관적으로 존재한다는 사실을 입증하고 있으며, 이는 活血化瘀法이 癌의 血管新生을 억제함으로써 癌의 치료에 활용될 수 있음을 시사하고 있다^{83,87}.

瘀血은 韓醫學의 병리개념으로, 각종 원인에 의하여 정상적인 생리공능을 상실한 혈액이 체내 일정부위에 응취되어 형성한 병리적 산물^{5,68})로서, 氣血運行에 영향을 미쳐 臟腑機能을 실조시킴으로써 다양한 질병을 야기하는 중요 발병인자의 하나로 인식되고 있다^{6,79,93}.

瘀血證은 血液循環障礙, 血液流變性(血行速度減少), 血液粘度異常 및 이로 인한 組織器官의 水腫 變性 炎症 增殖 潰瘍 壞疽 萎縮 血栓形成 血管狹窄 혹은 閉塞 등 일련의 病理變化狀態를 包括한 證候概念이다^{5,68}). “氣滯則血瘀”, “氣塞不通, 血壅不流”라 하여 氣滯가 오래되면 반드시 血瘀하고 氣滯血瘀가 오래되면 腫塊를 형성하고 이러한 腫塊는 지속적으로 존재하면서 위치가 고정되어 있는데, “癥積”이라고 하였다. 王清任은 “肚腹結塊者, 必有形之血也”⁸⁴)라 하였는데, 이는 癌의 형성과 瘀血 사이에 밀접한 관계가 있음을 설명하는 것이며²⁰), 이러한 瘀血이 심하게 인체 조직간에 積聚, 停留하면 결국 인체내 이상증식을 하는 癌이 된다는 주장이 있다⁷⁴).

瘀血 치료하는 약물 活血祛瘀약물은 coagulation 억제효과가 있으며^{30,33,35,39,48},

coagulation이 癌의 血管新生의 과정에 연관이 있다고 보고되어 왔다^{136,142}). 瘀血에 대한 연구에 의하면, 尹은 瘀血을 혈전, 혈액변성, 체액성분변성으로 발생하는 질환이라 하였고⁵³), 有는 全血粘度가 항진된 것이라 하였고⁵²), 施 등은 혈액의 점도, 농도, 응고성 및 적혈구취집이 증가된 상태로 파악하였고^{72,77}), 또한, 金 등은 瘀血治療가 血栓症治療에 유효하다 하였으며^{33,35,39,48}), 吳 등은 治痰劑가 血栓症을 개선시키는 것을 보고하였고^{42,50}), 朴 등은 高粘度의 혈액성상이 瘀血病態의 일부로 인정된다고 보고하여^{42,66,93,94}) 瘀血에 관한 실험적 모형으로 高粘度血症을 인정할 수 있음을 보여주고 있다.

韓藥을 사용한 최근까지 발표된 血管新生抑制에 관한 실험적 연구로서는 桂枝³¹) · 鬱金⁴⁵) 등 單味劑가 血管新生의 억제효과가 있는 것으로 보고되었으며, 처방으로는 加味慈桃丸^{32,51}) 외에도 沒藥散²⁹) · 活絡效靈丹^{41,46}) · 扶正防癆湯⁴⁷) · 立安散⁵⁶) · 桃紅四物湯加減方⁶³) 등이 血管新生 억제효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.

기존의 연구보고된 活絡效靈丹과 人蔘養胃湯에 대한 연구결과를 살펴보면, 羅⁴¹)는 活絡效靈丹으로 인해 세포의 부착이 저지되어 $\alpha\beta$ 3를 비롯한 integrin들의 발현이 저해되고 그 downstream에 있는 Ca^{2+} 의존성 FAK의 인산화를 유도하지 못하게 되므로써 Ras-Raf-MAP kinase cascade를 통한 fos/jun의 발현 및 dimer형성이 억제되어 이로 인해 세포의 증식이 억제되고 p53의 활성화로 apoptosis가 유도됨을 알 수 있었고 따라서 活絡效靈丹이 세포부착 저지 효과를 통해 血管內皮細胞(ECV304, ECVPAR)의 apoptosis를 유도하므로써 혈관신생 억제기전에 영향을 미친다고 하였다. 林⁶⁰)은 活絡效靈丹의 고집도혈중에 양호한 효과가 있는 것으로 보고하였고, 孫⁴⁶)은 活絡效靈丹 농축액이

抗癌작용 및 癌轉移 억제 효과를 가지고 있음을 보고하였다.

李⁵⁷)는 人蔘養胃湯이 장관 평활근의 긴장을 이완시키는 작용과 위액분비기능의 억제로 인한 항궤양효과가 있다고 하였으며, 金³⁴)은 人蔘養胃湯이 세포성면역반응 및 체액성면역반응을 증강시키며, 항원의 자극에 대한 저항력이 있다는 사실을 확인한 바 있다.

본 실험에 사용한 活絡效靈丹은 張錫純의 《醫學衷中參書錄》에 처음 기재된 처방⁹²)으로 氣血凝滯, 疝癰癥瘕, 心腹疼痛, 腿痛臂疼, 內外瘡瘍, 一切臟腑積聚, 經絡瘀滯 등에 사용되어 왔다.

活絡效靈丹의 구성약물에 대해 살펴보면, 當歸는 溫無毒, 甘辛微苦하여 肝心脾經에 入하여 溫中止痛, 養新血, 行血和血, 散內寒, 潤腸通便, 祛瘀生新함으로써 諸瘡瘍, 金瘡, 月經不調, 月經痛, 腸燥便秘, 血滯疼痛, 癥瘕積聚 등 一切血에 응용되며, 丹蔘은 微寒無毒하고 苦하여 肝心腎經에 入하여 活血祛瘀 養血安神, 排膿止痛, 調經하여 產後瘀滯腹痛, 經閉, 癥瘕, 肢體疼痛, 心腹刺痛, 瘡瘍 등에 사용하고 乳香, 沒藥은 平無毒하고 苦하여 肝經에 入하여 活血止痛 生肌하여 經閉, 痛經, 風濕痺痛, 筋骨疼痛, 心腹瘀血, 散瘀消腫 등에 사용되고 있다^{12,14,15,16,17}).

人蔘養胃湯은 《太平惠民和劑局方》에 최초로 수록된 처방으로, “治脾胃中脘虛寒, 嘔逆, 惡心” 하며 主治症은 外感風寒과 內傷生冷으로 인한 諸疾患에 사용한다고 하였다⁹⁵). 人蔘養胃湯 처방 중 개개 약물의 구성은 문헌에 따라 다소 차이가 있으나 《東醫寶鑑》의 처방에 준하여 本草學의 性味, 歸經, 主治症에 관하여 요약하면 蒼朮은 性味が 辛, 苦, 溫하며 歸經은 脾, 胃에 관여하고 主治症은 健脾, 燥濕解鬱, 治濕盛困脾, 倦怠, 脘痞腹脹하고, 陳皮는 性味が 辛,

苦, 溫하고 歸經은 脾, 胃와 關여하고 主治症은 理氣, 調中, 燥濕, 化痰, 治胸腹脹滿, 不思飲食, 嘔吐하고, 厚朴은 性味가 苦, 辛, 溫하고 歸經은 脾, 胃, 大腸에 關여하고 主治症은 溫中, 下氣, 燥濕, 消痰, 治胸腹痞滿, 脹痛, 嘔吐, 宿食不消하고, 半夏는 性味가 辛, 溫有毒하며 歸經은 脾, 胃에 關여하고 主治症은 燥濕化痰, 降逆止嘔, 消痞散結, 治濕痰冷飲, 嘔吐, 咳嗽, 胸膈脹痛하고, 赤茯苓은 性味가 甘, 淡, 平하고 歸經은 心, 脾, 膀胱에 關여하고 主治症은 行水, 利濕熱, 治小便不利, 淋濁하고, 藿香은 性味가 辛, 微溫하고 歸經은 肺, 脾, 胃에 關여하고 主治症은 快氣, 和中, 辟穢, 祛濕, 治感冒, 嘔吐, 泄瀉하고, 人蔘은 性味가 甘味苦, 溫하고 歸經은 脾, 肺와 關여하고 主治症은 大補元氣, 固脫生津, 安神, 治勞傷虛損, 食少, 倦怠하고, 草果는 性味가 辛, 溫하고 歸經은 脾, 胃에 關여하고 主治症은 燥濕除寒, 祛痰, 消食化積, 治痰飲痞滿, 脘腹冷痛하고, 甘草는 性味가 甘, 平하고 歸經은 脾, 胃, 肺에 關여하고 主治症은 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥, 炙時 治脾胃虛弱하고, 烏梅는 性味가 酸, 溫하고 歸經은 肝, 脾, 肺, 大腸에 關여하고 主治症은 收斂生津, 安蛔驅蟲, 治久咳, 久瀉, 便尿血하고, 生薑은 性味가 辛, 溫하고 歸經은 脾, 胃, 肺하고 主治症은 發表, 散寒, 止嘔, 開痰, 治感冒風寒, 嘔吐, 泄瀉, 痰飲하고, 大棗는 性味가 甘, 溫하고 歸經은 脾, 胃하고 主治症은 補神和胃, 益氣生津, 調營衛, 治胃虛食少, 脾弱便溏, 氣血不足한다고 하였다¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾⁷⁶⁾⁸¹⁾⁸⁸⁾⁸⁹⁾.

본 연구에서는 活血祛瘀의 祛邪法으로서 活絡效靈丹과 補虛扶正疏泄의 扶正法으로서 人蔘養胃湯을 선택하고 活絡效靈丹合人蔘養胃湯이 血管新生에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SK-Hep-1, A549, AGS와 BCE를 사용하여 MTT assay, proliferation assay, tube formation assay, aortic ring assay 등을 시행하였다.

MTT assay는 세포의 증식, 생존력, 그리고 세포 독성을 colorimetric한 방법으로 약물처리 군에서 어떻게 변화하는지를 측정하는 것이다. 세포 생존률에 대한 이 실험은 blue crystal formazan으로 염색을 하여 관찰하는 것으로 색이 나타나는 것은 세포가 생존하고 있어 약물처리 군이 효과가 없다는 것을 의미하며, 색이 없는 것은 세포의 생존이 억제될 받아서 약물처리 군이 효과가 있다는 것을 나타낸다.

Viable 세포의 mitochondria에 있는 dehydrogenase를 염색한 뒤 ELISA reader로 scan하여 대조군과 檢液을 농도별로 가한 군을 비교하여 檢液이 SK-Hep-1, A549, AGS의 생존력에 어떠한 영향을 주는가를 확인해 보는 실험으로 대조군과 비교하여 수치가 비슷하거나 높으면 세포들이 검액에 영향을 받지 않았거나 오히려 세포생존력이 높아졌다는 것을 의미하며, 수치가 낮으면 그와 반대로 세포에 독성이 있거나 세포의 생존력을 저하시키는 방향으로 작용한다는 것을 의미한다.

檢液의 癌細胞株에 대한 抗癌活性에서는 SK-Hep-1, A549, AGS에 투여한 결과 (Table 3, Fig.1), 檢液은 SK-Hep-1에 대하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 대조군에 비하여 89.2%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 86.9%, 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 36.6%, 600 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 3.1%로 항암활성을 나타내었다. 또한 A549에 대하여 600 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 대조군에 비하여 49.7%로 세포수가 줄어들었다. AGS에 대하여 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 대조군에 비하여 41.5%, 600 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 31.0%로 저하시켰다. 抗癌活性을 가장 많이 나타낸 것은 SK-Hep-1, AGS, A549의 순서였다. 이것으로 보아 SK-Hep-1, A549, AGS에 투여한 결과, SK-Hep-1에서는 200 $\mu\text{g/ml}$, A549, AGS에서는 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서부터 유의성있는 세포 독성을 나타내었다. 이러한 실험결과는 檢液이

肝癌과 肺癌에 대한 항암활성은 있으나 그 증식을 차단하는 효과는 없고, 胃癌에 대한 항암활성은 약하나 종괴의 성장은 억제할 수 있으며 특히 혈관내피세포의 증식을 억제하여 血管新生이 저해될 수 있을 것임을 시사해 준다.

Proliferation assay는 세포가 분열, 증식할 때 DNA 합성에 필요한 thymidine에 동위원소를 부착시켜 배지에 넣어둔 뒤 배양하고 나서 이들 세포의 방사능을 측정하여 배지에서 세포 내로 흡수된 thymidine의 양을 비교하여 檢液이 세포의 분열에 어떠한 영향을 미치는 가를 알아보는 실험으로 檢液이 癌細胞株와 혈관내피세포의 증식에 미치는 영향에서는 檢液을 癌細胞株와 혈관내피세포에 투여하여 DNA 합성에 미치는 영향을 살펴 본 결과 檢液은 SK-Hep-1에 대하여 600 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군의 DNA 합성율에 비하여 59.1%로 저하되었으며, A549는 72.6%, AGS는 6.1%, BCE는 28.9%로 저하시켰다(Table 4, Fig. 2).

Tube formation assay는 BCE 세포를 배지에 키울때 대조군과 비교하여 검액이 모세혈관형성에 어떠한 영향을 주는가에 대한 실험으로 matrigel을 이용한 BCE 세포의 배양을 관찰하였는데 정상적으로 1주에서 수주가 걸리는 BCE 세포의 분화과정을 하루만에 관찰할 수 있기 때문에 혈관신생을 연구하는데 matrigel을 이용한 BCE의 배양은 유용한 모델이 될 수 있다. BCE 세포는 plastic culture dish에서는 단층으로 자라지만 기저막이 주성분인 matrigel에서는 증식을 멈추고 분화를 시작하여 12-18시간 만에 모세혈관의 network를 형성한다. 즉, BCE 세포를 matrigel 표면에 plating한 후 1-2시간이 지나면 matrigel 표면에 세포가 부착하고 3-5시간이 경과하면 세포 덩어리가 형성되며, 7-10시간 후에는 cell cord를 형성해서 혈관을 형성할 수 있는 준비를 하며 12-18시간이 지나면 내

공을 갖는 모세혈관이 형성되는 것을 관찰할 수 있다.

檢液이 BCE 세포의 血管新生에 미치는 영향으로 matrigel이 도포된 plate에 BCE 세포를 접종한 후 檢液을 0, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 檢液이 BCE 세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하였고 6, 12, 18시간 후에 사진을 촬영하였다.

실험 결과 대조군은 6시간이 경과하면서 세포들이 분화하여 모세혈관을 형성하기 시작하고 12, 18시간이 경과하면 이러한 정도가 더욱 분명해지고 있으나, 18시간 쯤에는 일부 분화되지 않고 세포가 바닥에서 탈락되려는 상태에 있는 것이 일부 관찰되고 있다(Fig. 3).

檢液을 투여한 경우 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서는 혈관망의 형성이, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서는 혈관의 형성이 일부 저해되고 있는 소견이 관찰되며, 특히 200, 400 $\mu\text{g/ml}$, 18시간 투여군에서는 plate 바닥에서 떨어져 나오려는 세포들이 관찰되고 있다. 이러한 소견이 세포사에 의한 것인지를 확인하기 위하여 사진 촬영 직후 trypan blue를 이용하여 염색한 결과 대조군과 檢液 투여군에서 모두 세포사가 관찰되지 않았다. 따라서 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군의 관찰 소견은 檢液이 BCE 세포의 분화과정 중 중요한 부분 혹은 cytoskeleton 등에 유의한 영향을 미치고 있을 것임을 시사해 준다.

檢液이 白鼠 大動脈 血管內皮細胞의 血管新生에 미치는 영향으로는 aortic ring assay는 증식과 분화가 끝난 성숙한 SD rat의 大動脈 血管內皮細胞를 배양하여 檢液이 대조군에 비해 血管內皮細胞의 增殖과 분화에 어떤 영향을 미치는가에 대해 알아보는 실험이다. 실험 결과 檢液은 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 대조군에 비하여 血管新生 정도에서 별다른 차이를 나타내고 있지 않으나, 400 $\mu\text{g/ml}$, 농도에서는 대조군에 비

하여 血管新生 정도가 절반 수준으로 저하되어 있음이 관찰되고, 800 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군의 약 10% 이하, 1600 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 血管新生이 완전히 억제되어 있는 소견을 보이고 있다(Fig. 4).

이상의 실험을 통해 活絡效靈丹合人蔘養胃湯이 낮은 독성으로 新生血管의 생성을 억제함으로써 타 장기로의 轉移를 막아 抗癌 및 癌 재발방지 치료에 많이 활용될 수 있는 것으로 사료된다.

V. 結 論

活絡效靈丹合人蔘養胃湯이 血管新生에 미치는 영향을 평가하기 위하여 SK-Hep-1, A549, AGS, BCE에 대한 세포독성과 세포증식능에 대한 영향과 BCE의 血管新生 및 백서 대동맥의 血管新生에 미치는 영향을 연구한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 癌細胞株에 대한 항암활성 연구 결과, 活絡效靈丹合人蔘養胃湯은 600 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 SK-Hep-1의 대조군에 비하여 3.1%, A549의 대조군에 비하여 49.7%, AGS의 대조군에 비하여 31.0%로 세포수가 줄어들었다.
2. 癌細胞株와 BCE의 DNA 합성에 미치는 영향을 알아본 결과, 活絡效靈丹合人蔘養胃湯은 SK-Hep-1에 대하여 600 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군의 DNA 합성율에 비하여 59.1%, A549는 72.6%, AGS는 6.1%, BCE는 28.9%로 저하시켰다.
3. BCE의 血管新生에 미치는 영향을 알아본 결과, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 18시간 관찰 소견에서 血管新生이 억제되었다.

4. Aortic ring assay에서는 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비하여 血管新生 정도가 절반 수준으로 저하되어 있음이 관찰되고, 800 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군의 약 10% 이하, 1600 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 血管新生이 완전히 억제되어 있는 소견을 보이고 있다.

이상의 실험 결과에서 活絡效靈丹合人蔘養胃湯의 血管新生抑制 효과를 확인할 수 있었다.

參 考 文 獻

1. 김민영: 癌研究의 最新指見, 서울, 암연구센터, pp.307-321, 1993.
2. 김로경 외 20인: 암백과, 서울, 瑞音出版社, p.118, 1992.
3. 金完熙·崔達永: 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, p.59, pp.371-375, 1985.
4. 金昌種: 病態生理學, 서울, 癸丑文化社, pp.72-74, 1988.
5. 文濬典·安圭錫·崔昇勳: 東醫病理學(1), 서울, 경희대학교 한의과대학 병리학교실, pp.166-169, pp.304-306, 1985.
6. 文濬典·安圭錫·崔昇勳: 東醫病理學, 서울, 高文社, pp.74-76, pp.78-90, 1990.
7. 朴在甲: 인간생명과과학, 서울, 서울대학교 출판부, pp.137-143, pp.193-205, pp.214-215, pp.225-234, 1996.
8. 保健年鑑編纂委員會: 保健年鑑 1999年版, 서울, 保健新聞社, pp.491-506, 1998.
9. 保健福祉部: 保健福祉白書, 서울, 保健福祉部, p.63, 1997.
10. 서울대학교 의과대학: 개정판 중앙학, 서울, 서울대학교 출판부, pp.3-4, p.17, pp.137-

- 143, pp.193-205, pp.214-215, pp.225-234, 1996.
11. 예방의학과 공중보건 편찬위원회: 예방의학과 공중보건, 서울, 계축문화사, p.435, 1993.
 12. 申佶求: 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp.80-84, pp.519-521, pp.537-540, 1979.
 13. 申佶求: 最新國漢藥物學, 서울, 杏林書院, pp.67-68, pp.70-71, pp.91-92, pp.102-103, pp.131-132, pp.142, pp.145-147, pp.150-151, pp.196-197, pp.209-210, 1975.
 14. 辛民教: 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, pp.221-223, pp.372-374, pp.453-455, 1986.
 15. 李尙仁: 本草學, 서울, 醫藥社, pp.50-51, p.57, p.86, p.101, p.157, p.202, p.241, pp.278-279, pp.340-341, pp.344-345, pp.366, p.383, pp.390-391, p.428, pp.444-445, 1975.
 16. 李尙仁 等: 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp.56-57, p.173, pp.241-246, p.248, pp.253-254, p.345, pp.360-362, pp.433-434, pp.515-516, 1982.
 17. 李時珍: 本草綱目, 서울, 高文社, pp.440-441, pp.11118-1121, 1977.
 18. 李梴: 醫學入門, 서울, 翰成社, p.302, p.375, p.439, pp.451-456, pp.497-498, 1983.
 19. 朱震亨: 丹溪心法附餘, 서울, 大成文化社, p.117, p.179, p.258, p.285, p.288, pp.297-299, p.345, p.354, p.533, 1982.
 20. 崔昇勳: 東醫腫瘍學, 서울, 행림출판사, pp.13-14, pp.25-27, pp.32-38, 1995.
 21. 崔昇勳: 韓方病理學, 서울, 一中社, pp.70-71, pp.177-178, 1991.
 22. 통계청: 사망원인 통계연보, 통계청, 대전, pp.20-21, 1998.
 23. 한국한의학회: 암예방 및 치료를 위한 한의학적 연구, 서울, (주)다우문화사, pp.13-14, pp.78-80, 1998.
 24. 해리슨 내과학 편찬위원회: 내과학, 서울, 정담, 1997.
 25. 許浚: 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.181, pp.266-268, pp.274-277, p.385, p.429, pp.436-439, p.460, 1976.
 26. 洪元植: 現代中共의 癌治療, 서울, 英文社, p.361, 1984.
 27. 黃道淵: 方藥合編, 서울, 醫藥社, pp.85-86, 1977.
 28. 黃道淵: 醫宗損益, 서울, 醫藥社, p.371, 1976.
 29. 姜大寅: 沒藥散이 혈관신생억제에 미치는 효과에 대한 연구, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
 30. 康舜洙: 韓醫學에서 瘀血에 대한 概念, 서울, 대한한의학회지, 5(1):138-140, 1984.
 31. 姜玠熙: 桂枝가 Angiogenesis의 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1998.
 32. 姜顯淑: 가미자도환의 angiogenesis억제효과에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
 33. 金東秀: Endotoxin으로 誘發된 白鼠의 血栓症에 身痛逐瘀湯이 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校 大學院, pp.13-17, 1988.
 34. 金奉成: 人蔘養胃湯의 면역증강효과에 관한 연구, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1987.
 35. 金聖洙: Hydrocortisone acetate로 誘發된 瘀血病態model에 關한 研究, 서울, 大韓韓醫學會誌, 8(2):133-138, 1987.
 36. 金聖勳: 한의학계의 암연구동향과 연구 전략에 대한 연구, 대한한의학회지, 19(1):470-499, 1998.
 37. 김영우: 위암 조직의 종양 혈관 신생 정도

- 및 염기성 섬유모세포 성장 인자 발현과
에후와의 관련성, 서울대학교, 1998.
38. 김우호: Invasion and angiogenesis assay, 제
2차 세포주 연구 워크숍, pp.63-64, 1999.
 39. 金楨汜·安圭錫·崔昇勳: 桃仁承氣湯 및
그 構成藥物이 瘀血病態模型에 美治는 影
響. 大韓東醫病理學會誌 제11권 1호, pp.65-
76, 1997.
 40. 金賢兒·林成祐·李源哲: 한약을 이용한
항암 실험연구의 경향에 관한 고찰, 대한
한방중앙학회지, 4(1):213-226, 1998.
 41. 羅琪煥: 活絡效靈丹이 Angiogenesis 억제기
전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박
사학위논문, 1998.
 42. 朴元煥: 血栓症과 打撲性 充血 및 高脂血
症에 順氣導痰湯 및 化痰湯이 미치는 影
響, 경주, 東國大學校 大學院, pp.28-39,
1992.
 43. 朴正于: 진행성 위암에서 종양 맥관형성이
에후인자로서의 가치를 가지는가?, 慶尙大
學校, 1999.
 44. 박찬국: 위암에서 맥관형성 정도와 vascular
endothelial growth factor(VEGF) 발현에 관
한 연구, 全北大學校, 1997.
 45. 成熙根: 鬱금이 Angiogenesis 억제기전에
미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위
논문, 1998.
 46. 孫宗坤: 活絡效靈丹이 암전이 억제에 미치
는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논
문, 2000.
 47. 沈範相: 부정방암탕이 암전이 억제에 미치
는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논
문, 2000.
 48. 申鎭滉: 實驗的 肝瘀血에 미치는 桂枝茯
苓丸 및 그 加味方의 效果에 관한 研究, 서
울, 경희대학교 대학원, 1988.
 49. 申海英: 자궁경부암에서 종양의 맥관형성
이 암전이에 미치는 영향, 대구, 계명대학
교, 1998.
 50. 吳鐘珉: 二陳湯 및 滌痰湯이 Endotoxin으
로 誘發된 血栓症에 미치는 影響, 서울, 慶
熙大學校 大學院, pp.12-17, 1988.
 51. 王德仲: 가미자도환 구성약물의 혈관신생
억제효과에 관한 연구, 경희대학교 대학원
박사학위논문, 2000.
 52. 有地滋: 瘀血概念의 重要性, 서울, 東洋醫
學, pp.26-60, 1983.
 53. 尹吉榮: 東醫學의 客觀化와 東西醫學 病
名統一을 위한 方法, 서울, 東洋醫學, 2:7-
15, 1976.
 54. 윤성수: Angiogenesis inhibitors-clinical
applications, Angiogenesis 연구회 창립 기
념 심포지엄, pp.4-13, 1998.
 55. 尹在鎬: 十全大補湯이 암전이 억제에 미치
는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논
문, 1998.
 56. 李紀龍: 立安散이 Angiogenesis 억제기전에
미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위
논문, 1998.
 57. 李東炫: 人蔘養胃湯의 위장관에 미치는 영
향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1985
 58. 이준우·최승훈·안규석: Angiogenesis의
한의학적 치료전략, 제3의학, 3(1):21-31,
1998.
 59. 李眞華: 血府逐瘀湯이 癌轉移 抑制기전에
미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위
논문, 1999.
 60. 임강민: 活絡效靈丹이 瘀血病態模型에 미
치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논
문, 1999.
 61. 全英秀: 加味慈挑丸의 항암 및 면역증강효
과에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학

- 원 박사학위논문, 1998.
62. 전원경 · 이태희 · 윤유식 · 김연옥 · 성현제: 한약재의 신생혈관생성 억제 활성에 관한 연구, 한국한의학연구원논문집, 4:129-138, 1998.
 63. 趙漢震: 桃紅四物湯加減方の 항암 및 항전이 효과에 관한 연구, 대전대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
 64. 조현근: 진행성 위암환자에서 종양막관형성과 예후와의 상관관계, 서울, 연세대학교 대학원, 1996.
 65. 최승훈: 한의학의 종양에 대한 인식과 병리론, 대한한방종양학회지, 1(1):11-28, 1995.
 66. 崔昇勳: 黃帝內經에서의 瘀血의 認識에 對한 理論的 研究, 大田, 大田大學校 論文集, 6(2):313-320, 1987.
 67. 최윤정: 인체 유방암종에서 matrix metalloproteinase 와 tissue inhibitor of metalloproteinase의 발현과 맥관형성 및 침윤과의 관계, 서울, 연세대학교 대학원, 1999.
 68. 龔廷賢: 增補 萬病回春, 서울, 醫文社, p.250, 1975.
 69. 羅天益: 衛生寶鑑, 香港, 商務印書館, p.400, 1981.
 70. 孟琳升: 中醫治癌大成, 北京, 北京科學技術出版社, p.15, pp.96-143, p.235, p.244, p.249, 1995.
 71. 樓全善: 醫學綱目, 臺南, 北一出版社, 第39卷, p.22, 1973.
 72. 潘可勝: 血液患者部分血液流變學指標測定, 雲南中醫雜誌, 6:1, 1985.
 73. 潘敏求 主編: 中華腫瘤治療大成, 河北, 河北科學技術出版社, pp.51-65, 1996.
 74. 潘鴻鵠 著: 中醫藥抗癌藥, 北京, 中醫古籍出版社, pp.24-25, 1998.
 75. 史宇歷, 單書健 主編: 腫瘤專輯, 北京, 當代名醫臨證精華, 中醫古籍出版社, pp.18-22, 1993.
 76. 上海中醫學院編: 中草藥學, 香港, 商務印書館香港分館, pp.27-28, pp.42-43, pp.70-71, pp.73-74, pp.214-215, pp.218-219, pp.222-223, pp.225-226, pp.350-351, pp.460-461, pp.511-512, pp.524-526, pp.592-593, 1977.
 77. 施永德 外: 血瘀的實驗研究. 浙江中醫雜誌, 2:92, 1981.
 78. 時逸人: 中國藥物學, 臺灣, 東方書店, pp.32, pp.94-96, pp.107-108, pp.117-118, pp.130-131, pp.137-138, pp.183-184, pp.340-341, pp.410-411, pp.422-423, pp.506-507, 1960.
 79. 安徽中醫學院: 中醫臨床手冊, 香港, 商務印書館, pp.151-153, p.257, p.263, p.278, p.340, 1975.
 80. 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.
 81. 吳儀洛: 本草從新, 서울, 杏林出版社, pp.1-2, pp.9-10, p.38, p.41, pp.76-77, pp.121-122, pp.141-142, p.145, p.147, pp.150-151, p.170, 1972.
 82. 王肯堂: 六科準繩, 서울, 翰成社, p.96, 1982.
 83. 王守章 外: 中西醫結合臨床腫瘤內科學, 天津, 天津科技 澤出版公司, pp.150-155, 1994.
 84. 王清任: 醫林改錯, 臺北, 東方書店, pp.30-49, p.52, 1960.
 85. 于爾辛: 中醫中藥治療癌症38年的探索-경희대학교 제1회 동양의학 국제심포지움, pp.36-40, 1995.
 86. 郁仁存: 中醫腫瘤學(上), 北京, 科學技術出版社, pp.1-25, pp.95-146, pp.123-124, 1991.

87. 郁仁存, 姜延良, 于爾辛: 腫瘤研究, 上海, 上海科學技術出版社, pp.103-104, pp.123-124, 1991.
88. 李時珍: 本草綱目, 臺北, 文光圖書有限公司, p.400, p.406, p.426, p.524, pp.693-694, pp.925-926, p.992, p.1004, p.1022, p.1134, p.1224, 1977.
89. 李中梓: 醫宗必讀, 臺北, 文光圖書有限公司, p.72, p.75, pp.92-93, p.97, p.115, p.126, pp.133-135, pp.143-144, 1976.
90. 李佩文 主編: 癌症的中西醫最新對策, 北京, 中國中醫學出版社, p.393, 1995.
91. 張介賓: 景岳全書, 서울, 杏林出版社, p.276, p.289, p.300, p.319, p.864, p.999, 1975.
92. 張錫純: 醫學衷中參西錄, 河北, 河北科學技術出版社, pp.184-187, 1994.
93. 中山醫學院: 病理學, 北京, 人民衛生出版社, pp.53-59, 1978.
94. 陳可冀主編: 活血化瘀研究與臨床, 北京, 北京醫科大學中國協和醫科大學合出版社, pp.3-28, pp.169-236, 1991.
95. 太平惠民和劑局編: 太平惠民和劑局方, 北京, 中國中醫藥出版社, 제2권, p.46, 1996.
96. 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.
97. Andre T, Chastre E, et al: Tumoral angiogenesis; physiopathology, prognostic value and therapeutic perspectives, Rev Med Interne, Dec;19(12):904-13, 1998.
98. Arbisser 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.
99. Auerbach W. Auerbach R.: Angiogenesis inhibition a review. Pharmac Ther. 1994;63:265-311.
100. 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.
101. Blood CH and Zetter BR: Tumor interactions with the vasculature ; angiogenesis and tumor metastasis, Biochim biophys Acta, 1032:89-118, 1990.
102. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N. et al: Angio-in bladder cancer : Relationship between microvessel density and tumor prognosis, J. Natl Cancer Int, 87:1603-1612, 1995.
103. Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA : Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. Cell, 85(5):683-693, 1996.
104. Clifton EE, Grossi CE: The rational of anticoagulants in the treatment of cancer, J. Med., 5(1):107-13, 1974.
105. D' Amato RJ, Loughanan MS, Flynn E, Folkman J: Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci, Apr 26:91(9)4082-5, 1994.
106. Dixon SC, et al: Thalidomide up regulates prostate specific antigen secretion from LNCaP cells, Cancer Chemother Pharmacol, 43 Suppl:S78~84; 1999.
107. Franceschini M, et al: [Action of thalidomide on the growth of the chick-embro tibia in organotypic cultures], Boll Soc Itai Biol Sper, Jul 15;40(13):761-3, Italian, 1964.

108. Fidler IJ.: Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer J* 2000;6(suppl2):S134-S141.
109. Figg WD, et al: Pharmacokinetics of thalidomide in an elderly prostate cancer population, *J Pharm Sci*, Jan;88 (1):121-125, 1999.
110. Fontanini G, Bigini D, Vignati S, et al : Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer, *J Pathol*, 177:56-73, 1995.
111. Folkman J: Antiangiogenic therapy In; DeVita VT, Helman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5th ed. Philadelphia, Lippincott, P.3075-3085, 1997.
112. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. *Nature Medicine*. 1995;1:27-31
113. Folkman J: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, *J Natl Cancer Inst*, 82:4-6, 1990.
114. Folkman J and Shing, Y: angiogenesis; *J. Bio. Chem.*, 267;10931-10934, 1992.
115. Gasparini G and Harris AL : Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma : Much more than a new prognostic tool, *J clin Oncol*, 13:762-782, 1995.
116. Gasparini G, Weindner N, Bevilacqua P, et al : Tumor microvessel density, P53 expression, tumor size and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma, *OJ Clin Oncol*, 12:454-466, 1994.
117. Ghosh BC, Clifton EE: Malignant tumors with superior vena cava obstruction, *N. Y. State J. Med.*, 15;73(2):283-9, 1973.
118. Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell*, 86:353-364, 1996.
119. Harris AL. Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet*. 1997;349(S II):13-15.
120. Horak ER, Leek R, Klenk N, et al: Angiogenesis assessed by platelet, endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer, *Lancet*, 340:1120-1124, 1992.
121. Jaeger TM, Weidner N, Chew K, et al : Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer, *J Urol*, 154:69-71, 1995.
122. Jones A, Harris AL.: New developments in angiogenesis a major mechanism for tumor growth and target for therapy. *Cancer J Sci Am*. 1998;4:209-217
123. 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.
124. Liotta LA & Stracke ML: Tumor invasion and metastasis; biochemical mechanisms, *Cancer Treat Res*, 40: 223-238, 1988.
125. Maeda K, Chung Ys, Takatsuka S, et al: Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma, *J Clin Oncol*, 13:477-481, 1995.
126. Martini N, Beattie EJ Jr, Clifton EE, Melamed MR: Radiologically occult lung cancer. Report of 26 cases, *Surg Clin North Am Aug*; 54(4):811-23, 1974.

127. Michales L: The incidence and course of cancer in patients receiving anticoagulant therapy. Retrospective and prospective studies, *J Med*, 5(1):98-106, 1974.
128. 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 Angiostain: A Novel angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung Carcinoma cell, p.79 · pp.315-328, 1994.
129. 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 Angiostain: A Novel angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung Carcinoma cell, p.79 · pp.315-328, 1994.
130. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 65(1-2): 55-63, 1983.
131. National Statistical Office. Annual Report on the Cause of Death Statistics (Based on Vital Registration). 18th ed. Daejeon: The Office: 1998.
132. NCI: Angiogenesis Inhibitors in Clinical Trials. Available from: URL: <http://cancertrials.nci.nih.gov/news/angio/table.html> last updated 10/16/00.
133. 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, 1997.
134. 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
135. Schnaper HW, Grant DS, Stetler-Stevenson WG, Fridman R, D' Orazi, Murphy AN, Bird RE, Hoythya M, Fuerst TR, French DL, et al : Type IV collagenase and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro. *J Cell Physiol* 156(2): 235-246, 1993.
136. Shoji M, Hnacock WW, Abe K, Micko C, Casper KA, Baine RM, Wilcox JX, Danave I, Dillehy DL, Matthews E, Contrino J, Morrissey JH, Gordon S, Edgington TS, Kudryk B, Kreutzer DL, Rickles FR: Activation of coagulation and angiogenesis in cancer, *immuno histochemical localization in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer*. *Am J Pathol* 152(2):399-411, 1998.
137. Sillman F, Boyce J, and Fruchter R : The significance of atypical vessels and neovascularization in cervical neoplasia, *Am J Obstet Gynecol*, 159: 154-159, 1981.
138. Szabo S, Sandor Z : The diagnostic and prognostic value of tumor angiogenesis, *Eur J Surg Suppl*, (582):99-103, 1998.
139. Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, et al : Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma, *Gynecol Oncol*, 56:353-356, 1995.
140. Wilhem SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI.: SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a

- 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 1989;264:17213-17221.
141. 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.
142. 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, 1998.