

乾薑의 血管新生 억제효과에 관한 연구

남상춘 · 명유진 · 강 희 · 심범상 · 김성훈¹ · 최승훈 · 안규석*

경희대학교 한의과대학 병리학 교실, 1:경희대학교 동서의학대학원

Angiogenic Inhibitory Effect of Zingiberis Rhizoma

Sang Choon Nam, Eu gene Myung, Hee Kang, Bum Sang Shim, Sung Hoon Kim¹, Seung Hoon Choi, Kyoo Seok Ahn*

Department of Oriental Medicine, Kyunghee University, 1:Department of Oncology, kyunghee university

This study was conducted to investigate angiogenic inhibitory effect of Zingiberis Rhizoma methanol extract using ECV-304 cells and HT1080 fibrosarcoma cells. The viability of ECV-304 was 30% at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Zingiberis extract and that of HT1080 was 30% at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Using the BrdU incorporation assay, Zingiberis inhibited the DNA synthesis of ECV-304 and HT1080 by 70% and 50 % at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In tube formation assay, at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Zingiberis, tube network began to degrade and at higher doses, it was completely destroyed. Zymography demonstrated that Zingiberis extract decreased MMP-9 at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and higher doses remarkably inhibited the expression of MMP-9. These data indicate that Zingiberis Rhizoma has angiogenic inhibitory effects and shows the possibility of future anti-metastatic drug.

Key words : Zingiberis Rhizoma, angiogenesis, ECV304, HT1080

서 론

血管新生은 암의 점진적인 성장을 위한 생물학적 과정일 뿐만 아니라 암의 형성과 신생에 있어서 전이와 침윤의 통로로 작용하고 있다. 血管新生의 정도는 암 발생 및 전이, 그리고 예후에 이점효과가 된다¹⁾. 이러한 血管新生과 암전이 억제에 관한 한의학계의 실험적 연구로 복합방제를 이용한 연구^{2,3)}, 活血祛瘀 약물을 이용한 연구⁴⁾, 補氣補血 약물을 이용한 연구⁵⁾, 그리고 최근에는 장내 미생물 대사체를 이용한 항전이 연구⁶⁾ 등이 있으며 단일 한약재로는 桂枝, 鬱金, 當歸, 瓜蒌仁 등의 血管新生 및 암전이 연구⁷⁻¹⁰⁾가 보고되었다. 乾薑은 한의학 최고의 본초서인 《神農本草經》에서 中藥으로 분류된 것¹¹⁾으로 보아 아주 오래전부터 한약재로 사용되었다는 것을 알 수 있다. 乾薑의 性味는 辛溫 無毒하여 ‘溫中逐寒, 回陽通脈’의 효능이 있어서 ‘心腹冷痛, 吐瀉, 肢冷脈微, 風寒濕痺, 吐衄血’ 등에 많이 활용되는 약재¹²⁾이다. 그리고 乾薑은 반하와 남성의 독을 해독한다. 또한 脾胃를 치료하는 많은 처방에 생강과 대추(淸三棗二)가 들어가는데 이는 자극성이 강한 약재의 위장자극을 줄여주면서 약맛을 좋게 하는 효능을

가지고 있다. 그리고 脾胃가 虛寒한 증상을 치료하는 방제에서 君藥¹³⁾으로 사용되기도 한다. 姜⁶⁾은 乾薑을 포함하고 있는 異功散의 血管新生과 암전이 억제효능을 보고한 바 있으나 乾薑만의 血管新生 억제연구는 아직까지 이루어진 바 없었다. 따라서 본 연구자는 乾薑의 血管新生 억제효능을 실험적으로 확인하고자 乾薑을 85% 메탄올로 감압농축하여 동결건조한 후 사람혈관내피세포인 ECV-304세포와 사람육종세포인 HT1080을 이용하여 세포생존율과 세포증식률을 알아보고, in vitro tube formation assay, in vitro gelatin zymogram assay를 통하여 血管新生 억제효과를 알아본바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 세포주

인간의 臍帶靜脈 세포를 불멸화시킨 ECV-304 (ATCC CRL-1998; transformed human endothelial cell)와 HT1080 (KCLB 10121; human fibrosarcoma)를 배양하여 실험에 사용하였다. ECV-304는 medium 199 (M199)에 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제 (penicillin 10 units/ml · streptomycin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 배양하였고 HT-1080은 Dulbecco's Modified Eagle

* 교신저자 : 안규석, 서울시 회기동 1 경희대학교 한의과대학 병리학교실

· E-mail : ahnks@khu.ac.kr, · Tel : 061-720-7522

· 접수 : 2004/9/25 · 수정 : 2004/10/23 · 채택 : 2004/11/24

Medium (DMEM)에 10% FBS 및 항생제를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다.

2) 약물

실험에 사용된 건강(Zingiberis Rhizoma)는 경희대학교 부속 한방병원 약재과에서 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 추출물의 조제

乾薑을 유리로 된 추출병에 넣고 물과 85% Methanol을 시료가 잠기도록 충분히 넣어 각각 하루 동안 냉침한 다음 50°C에서 한시간씩 2회 초음파세척기로 물리적 자극을 가하여 시료의 용해를 촉진하였다. 이 용액을 filter paper로 濾過한 다음 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)에서 減壓 濃縮한 뒤 1000ml round flask 에 옮겨 freezing dryer (EYELA, Japan)로 24시간 동안 凍結乾燥하여 건조된 분말을 실험에 사용하였다(yield: 19.2%).

2) Viability assay

乾薑의 세포독성을 파악하기 위하여 각 세포에 시료를 처리한 후 Mosmann의 MTT assay¹⁴⁾를 변형하여 측정하였다. 먼저 모든 암세포를 2×10⁴ cells/100µl/well의 밀도로 96-well cell culture plate에 접종하여 24시간을 배양한 후 배양액을 갈아주었다. 교체한 모든 배양액에는 FBS를 첨가하지 않고 여기에 건강 추출물을 다양한 농도로 처리하여 20시간 배양하였다. 그런 다음 Celltiter 96R Aqueous One Solution Reagent (Promega, U.S.A.)를 10µl/well을 첨가하여 15분 후 색깔의 변색이 나타나면 microplate reader (Molecular Device, U.S.A.)를 이용해 측정과장 490 nm · 참고과장 650 nm로 측정하였다.

$$\text{Viability(\%)} = \frac{\text{average of absorbance of sample}}{\text{average of absorbance of control}} \times 100$$

3) Proliferation assay¹⁵⁾

세포를 96 well plate에 각각 2×10⁴cells/well의 비율로 10% FBS가 함유된 배지 100µl와 함께 seeding하였다. 24시간이 지난 후 乾薑추출물을 다양한 농도로 처리하여 각각의 well에 투여하고 동시에 BrdU labeling solution 10µl/well을 가하였다. 18시간이 지난 후 ethanol 70% in HCl(7ml of 100% ethanol, 2.33ml of distilled water and 0.67ml of hydrochloric acid) 200µl/well을 가하여 -20°C에 30분간 두어 세포를 고정한 후 PBS를 200µl/well로 3회 washing하였다. 다시 nuclease 100µl/well로 가한 후 30분간 37°C waterbath에 넣어 두었다가 PBS 200µl/well로 3회 washing하였다. 다시 anti-BrdU- POD를 100µl/well로 가하고 30 분간 37°C waterbath에 둔 후 washing buffer 200µl/well로 3회 washing하였다. Peroxidase를 100µl/well를 넣고 10분 후에 microplate reader (Molecular Device, U.S.A.)로 측정 과장 405nm, 참고 과장 490nm에서 Optical Density 값을 읽었다.

4) Tube formation assay¹⁶⁾

24-well cell culture plate를 얼음 접시에 놓고 matrigel 200 µl을 가한 후 spatula를 이용해 도포하였다. Matrigel을 바른

plate는 37°C incubator에 3~4시간 방치하고 matrigel이 굳도록 하였다. ECV-304를 matrigel이 도포된 plate에 8×10⁴ cells/well로 접종하고 10% FBS M-199에 한약시료를 첨가하여 18시간 동안 배양하였다. Control well에도 같은 양의 DMSO를 첨가하였다. 18시간 후 control well에 tube가 형성된 것을 확인한 후 20배율로 사진 촬영하였다.

5) Gelatin zymogram assay

세포를 6-well cell culture plate에 1×10⁶ cells/well로 seeding하여 2 ml의 10% FBS가 함유된 배지와 함께 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 그 후 1ml PBS로 1회 세척하고 1ml의 serum이 제거된 배지로 교체한 후 건강 추출물을 농도별로 첨가되 control cell에는 같은 양의 용매로서 DMSO를 투여하여 CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 약물을 투여하고 12시간이 경과한 후에 100ng/ml의 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 투여하였다. 그런 다음 12시간 동안 배양한 후 배양액을 취하여 1000rpm, 4°C, 5분간 원심 분리하여 세포와 세포 조각을 침전시킨 후 상층액을 취하여 4°C에 보관하였다가 gelatin zymo- graphy를 시행하였다.

Gelatin zymography는 Heussen과 Dowdle의 실험방법¹⁷⁾에 따라 배양액을 sample buffer (10% SDS · 4% sucrose · 0.25 M Tris · HCl pH 6.8 · 0.1% bromophenol blue)와 3 : 1로 섞은 후 가열하지 않은 채 0.4mg/ml gelatin B (Sigma)를 포함한 8% (w/v) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에 첨가하여 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 2.5% (v/v) Triton X-100 (Sigma)에 30분씩 3회 세척하여 gel속의 SDS를 제거한 후 substrate buffer (0.05 M Tris · HCl pH 7.5 · 0.15 M NaCl · 0.01 M CaCl₂ · 1 µM ZnCl₂ · 0.02% NaN₃)에 담긴 채 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 10% methanol/10% 빙초산/0.1% (w/v) coomassie brilliant blue G-250 (Sigma)에 6시간 동안 염색시킨 후 10% methanol/10% 빙초산에 3시간 동안 탈염색시켰다. Gelatinase에 의한 gelatinolytic activity는 전체가 청색으로 염색된 gel에서 깨끗한 무색의 band가 검출되는 것으로 증명된다.

실험성적

1. 세포 생존능력에 미치는 영향

실험결과 乾薑 알콜 추출물의 0.1µg/ml과 1µg/ml농도에서 ECV-304의 생존률은 대조군과 별 차이가 없었지만, 10µg/ml 농도에서 감소하기 시작하여 50µg/ml의 농도에서는 ECV-304의 생존률이 30%였다(Fig. 1).

HT1080의 경우에는 乾薑 알콜 추출물의 10µg/ml, 50µg/ml 농도에서는 대조군과 별 차이를 보이지 않다가 100µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 30%의 생존률을 보여주었다(Fig. 2).

2. 세포 증식에 미치는 영향

실험 결과 乾薑 메탄올 추출물은 ECV-304의 경우 100µg/ml에서 억제효과를 나타내지 않았지만, 200µg/ml농도에서는 70%의 억제효과를 보여주었다(Fig. 3).

한편 HT1080 세포에서는 乾薑 메탄을 추출물은 ECV-304에 대해서와 마찬가지로 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 억제력을 나타내지 않았지만 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 50%의 억제력을 보여주었다(Fig. 4).

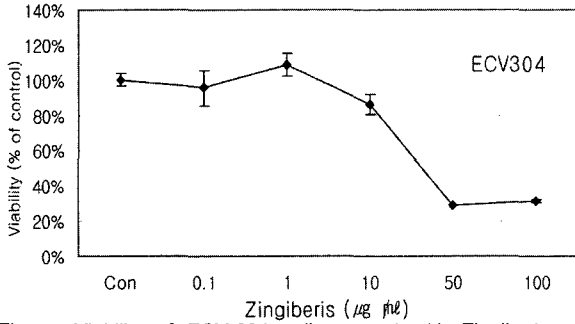


Fig. 1. Viability of ECV-304 cells treated with Zingiberis extract (0.1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively). Cell viability was determined by measurement of the tetrazolium dye MTS. Data were expressed as means \pm S.D. of three independent experiments. Viability of control cells was referred as 100%.

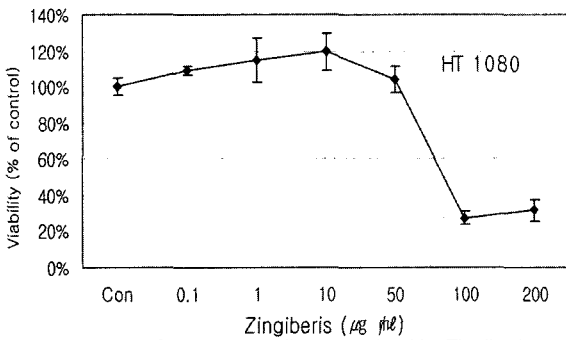


Fig. 2. Viability of HT1080 cells treated with Zingiberis extract (0.1-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively). Cell viability was determined by measurement of the tetrazolium dye MTS. Data were expressed as means \pm S.D. of three independent experiments. Viability of control cells was referred as 100%.

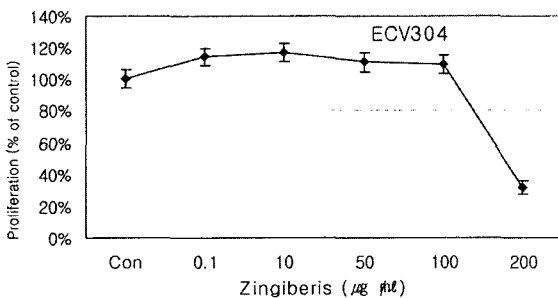


Fig. 3. Proliferation of ECV-304 Cells treated with Zingiberis extract (0.1-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively). DNA synthesis was determined by BrdU incorporation immunoassay. Data were expressed as means \pm S.D. of three independent experiments. Proliferation of control cells was referred as 100 %.

3. Tube formation 억제기전에 미치는 영향

乾薑 메탄을 추출물의 angiogenesis 억제효과를 평가하기 위하여, ECV-304를 matrigel이 도포된 24-well plate에서 배양하여 tube formation을 유도한 후, 접종과 동시에 한약을 처리한 실험

군과 대조군을 비교하여 보았다.

실험결과 처리한 대조군에서는 capillary-like tube가 잘 형성되어 있음을 볼 수 있었다. 乾薑 메탄을 추출물을 처리한 실험군에서 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 tube 형성이 떨어지기 시작하고, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 현저하게 capillary-like tube가 파괴되었다(Fig. 5).

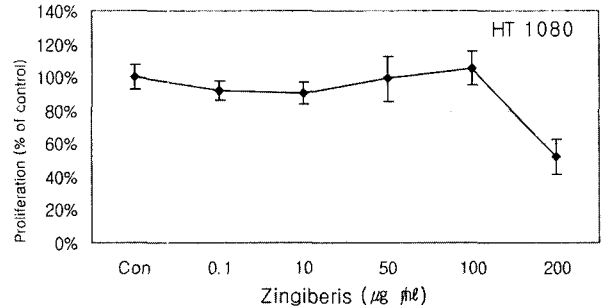


Fig. 4. Proliferation of HT1080 Cells treated with Zingiberis extract (0.1-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively). DNA synthesis was determined by BrdU incorporation immunoassay. Data were expressed as means \pm S.D. of three independent experiments. Proliferation of control cells was referred as 100 %.

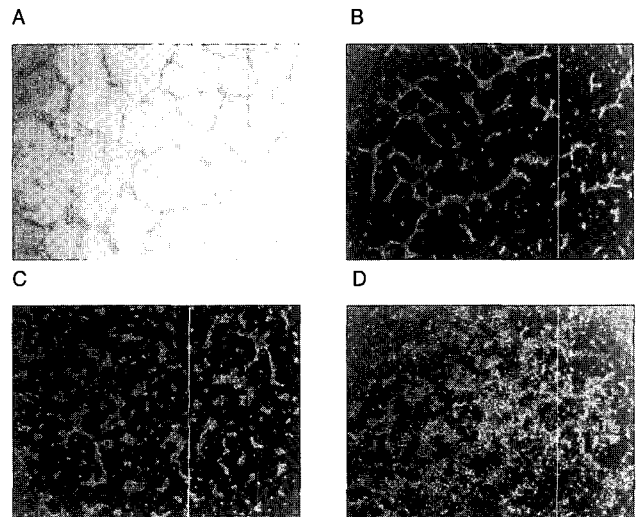


Fig. 5. Capillary-like tube formation on Matrigel. ECV-304 cells were seeded on Matrigel and treated with 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Zingiberis (A, B, C, D) for 18h.

4. Gelatinolytic activity 억제기전에 미치는 영향

실험결과 HT1080의 MMP-9의 band는 乾薑 메탄을 추출물 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 감소하기 시작하여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 현저하게 감소하였다(Fig. 6).

Fig. 6. MMP-9 expression of HT1080 cells by zymography. Col: Bacterial collagenase, M: Marker, -: PMA negative, +: PMA positive. 1 ~100: concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of Zingiberis.

고 찰

통계청의 자료에 의하면 2002년 인구 10만명당 신생물로 인한 사망자가 131.9명으로 1위를 차지하고 있으며 2위인 순환기계통의 사망자 127.8명보다 많다. 신생물로 인한 사망자가 2000년 124.2명, 2001년 125.5명으로 점점 증가하고 있는 추세이다.¹⁸⁾ WHO에서도 전 세계적으로 암환자는 향후 2020년까지 50%증가하여 1500만명에 이를 것으로 추정했다. 2000년에 전 세계적으로 암으로 사망한 사람은 전체 사망자 5600만명의 12%에 해당되며, 많은 나라에서 25%이상이 암으로 사망한다고 보고하고 있다. 암이 미래세계에 가장 큰 공중보건의 과제가 될 것으로 예상했다. 그리고 암 발생을 줄이기 위해서 금연, 건강한 삶과 다이어트, 조기발견을 강조했다.¹⁹⁾

신생물인 종양은 일반적으로 임상 및 병리 형태학적으로 양성과 악성종양으로 구분하는데 그 기준은 침입성과 확산성이다. 양성종양은 비교적 서서히 성장하면서 주변조직으로 확산되지 않기 때문에 수술에 의해 치유될 수 있다. 반면에 악성종양은 빠른 성장을 주된 특징으로 하며, 국소적으로 발생한 상태 그대로 있지 않고 주위조직으로 침투하거나 체내 순환기관으로 침투하여 본래 발생부위로부터 먼 부위까지 확산된다. 이러한 이차적인 암을 유발하는 현상을 전이(metastasis)라고 하는데, 이에는 혈관형성 작용이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁰⁾

암전이 억제제 혈관형성 저해작용을 통해 수행하려는 연구가 다양하게 진행되고 있는데, 최근 活血祛瘀 약물이 혈관신생 관련 연구로서 金⁴⁾은 活血祛瘀 약물 27가지를 선정하여 혈관신생 억제효과를 검색하는데, 실험결과 대부분의 약물에서 혈관신생 억제효과가 관찰되었고, 특히 莪朮, 蘇木, 兪薊刺, 王不留行之 효과가 우수한 것으로 보고하였다. 또한 王^{21,22)}은 암전이를 억제하는 加味慈桃丸의 구성약물에 대한 연구에서 鬱金, 桃仁, 山慈姑가 혈관내피세포의 혈관신생을 억제함을 밝혔는데, 이 연구는 加味慈桃丸의 암 재발방지효과가 혈관신생억제효과에 일부 기인하며, 이러한 효과는 처방 중 活血祛瘀 약물에 의한 것임을 밝힌 것이다.

乾薑(Zingiberis Rhizoma)은 生薑과(Zingiberaceae)에 속한 다년생 초본인 生薑(Zingiberis officinale Rosc.)의 根莖을 건조한 것으로 정유성분으로 zingiberene, zingiberone, phellandrene, camphene 등이 있고, 매운 맛으로 gingerol, shogaol, gingerone 등을 함유하고 있다. 乾薑의 性味는 辛溫 無毒하여 '溫中逐寒, 回陽通脈'의 효능이 있어서 '心腹冷痛, 吐瀉, 肢冷脈微, 風寒濕痺, 吐衄血' 등에 다용한다¹²⁾. 乾薑은 임상에서 활용빈도가 높은 한약재일뿐만 아니라 매운 맛을 즐기는 한국음식문화에서 많이 활용되는 음식이면서 또한 차로써도 많이 음용되고 있다. 姜⁶⁾은 乾薑이 함유된 異功散의 혈관신생과 암전이 억제효능이 보고하였다. 하지만 乾薑의 특성상 단일 약재로서 또한 음식으로써 많이 활용되는 것을 착안하여 乾薑 단독으로 혈관신생 억제효능을 확인하고자 본 연구를 시도하였다.

본 연구에서는 乾薑이 혈관신생에 미치는 영향을 평가하기 위하여 암세포 및 혈관내피세포의 증식에 미치는 효과, 세포의

기질 분해에 미치는 효과, 침윤에 미치는 효과, capillary-like tube formation에 미치는 효과를 살펴보았다. 우선 세포의 기질 분해 및 침윤에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT를 이용한 cell viability assay를 시행하였다. 실험결과 乾薑 추출물은 ECV-304에서는 50 μ g/ml에서 30%의 생존율을, HT1080에서는 100 μ g/ml의 농도에서 30% 생존율을 보여주었다. ECV-304에서 더 민감하게 반응하였다.

乾薑 메탄올 추출물이 세포의 DNA증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 BrdU incorporation assay를 시행하였다. 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)는 증식하는 세포의 DNA에 thymidine 대신 incorporation됨으로써 immunoassay에 의해 BrdU가 측정된다. 실험결과 乾薑 메탄올 추출물은 ECV-304의 경우 200 μ g/ml농도에서 70%세포증식 억제효과가 나타났으며, HT1080에 대해서는 50% 억제효과를 보였다. 血管新生의 억제효과를 평가하기 위하여 ECV-304를 matrigel이 도포된 24-well plate에서 배양하여 tube formation을 유도한 후 접종과 동시에 한약을 처리한 실험군과 대조군을 비교해 보았다. 시행한 결과 乾薑 메탄올 추출물은 10 μ g/ml농도에서 capillary-like tube가 파괴되기 시작하였고, 50 μ g/ml농도에서 현저하게 파괴되었다. 암세포 혹은 혈관내피세포가 국소침윤을 하기 위해서는 ECM을 분해하는 단계를 필수적으로 거쳐야 한다. ECM은 여러 가지 성분으로 구성되어 있는데 이 중에서 collagen typeIV이 주요 성분 중의 하나이며 암세포는 ECM을 분해하기 위하여 여러 가지 단백질 분해효소를 분비하는데 이들은 공통적으로 Zn이온이 있어야 단백질을 분해할 수 있기 때문에 matrix metalloproteinase (MMPs)라고 부르는데 이들 MMP family중에서 collagen typeIV를 기질로 하는 것은 MMP-2, MMP-9 두가지가 알려져 있으며, 이들은 각각 72kDa, 92kDa의 크기를 갖고 있다. Gelatin zymogram은 이들 MMP-2, MMP-9의 발현과 활성을 알아보는 방법이다. 실험결과 HT1080의 MMP-9의 band는 10 μ g/ml 농도에서 감소하기 시작하여 50 μ g/ml농도에서 현저하게 감소하였다. 이상의 결과로 乾薑은 血管新生억제에 유효한 효능이 있음을 알 수 있으며, 암전이 억제효과에 대해서도 더 연구해볼 가치가 있는 것으로 추정된다.

결 론

乾薑의 血管新生 억제효능을 실험적으로 확인하기 위하여 ECV-304세포와 섬유모세포인 HT1080을 이용하여 viability assay, proliferation assay, tube formation assay, gelatin zymogram assay를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

MTS법을 이용한 viability assay에서 乾薑은 ECV-304의 경우 50 μ g/ml에서 30%의 생존율을 보여주었으며, HT1080의 경우 100 μ g/ml에서 30%의 생존율을 보여 주었다. BrdU incorporation assay를 통해 DNA증식을 측정한 결과 ECV-304의 경우 200 μ g/ml에서 70%의 억제율을 보여주었고, HT1080의 경우 50%의 억제율을 보여주었다. ECV-304 cell의 혈관형성 능력을 측정한 결과 10 μ g/ml의 농도부터 capillary-like tube formation이 감소하

기 시작하고, 50 μ g/ml에서 capillary-like tube formation이 현저하게 감소하였다. HT1080 cell의 전이능력과 이때 주위조직을 분해하는데 중요한 역할을 하는 MMP-9은 10 μ g/ml에서 감소하여 50 μ g/ml에서는 현저하게 감소하였다. 이상의 결과로 보아 乾蘘은 血管新生 억제효능이 있음을 알 수 있으며, 압전이 억제 등에 활용할 수 있을 것으로 추정된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (01-PJ9-PG1-01co05-0004)

참고문헌

1. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. S40-transformed human lung fibroblasts secret a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264:17213-17221, 1989.
2. Lee JH, Shim BS, Ahn KS, Choi SH. Anti metastatic effects of Xuefuzhuyutang. *Journal of Korean Oriental Oncology* 5:61-75, 1999.
3. Shim BS, Park KK, Choi SH. Anti metastatic effects of fuzhengfangaitang on human fibrosarcoma cells. *HT1080. Am J Chin Med* 31:235 46, 2003.
4. Kim SH, Shim BS, Choi SH, Ahn KS. Study on effect of the herbs that invigorate and dispel blood stasis on angiogenic inhibition. *Journal of Korean Oriental Oncology* 7:19-37, 2001.
5. Lee JW, Kim HY, Kang H, Yu YB, Shim BS, Choi SH, Ahn KS. Angiogenic inhibition effects of several herbs supplementing Qi and blood. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology* 16:499-506, 2002.
6. Kang CH. Anti-metastatic and anti-angiogenic activities of Ekongsan and its metabolites by human intestinal bacteria. Dept. of Oriental Medicine Graduate School Kyung Hee University Seoul, Korea, 2003.
7. 강윤희. 계지가 angiogenesis에 억제기전에 미치는 영향. *경희대학교 대학원* 1998.

8. 성희근, 최승훈, 안규석. 울금이 angiogenesis의 억제기전에 미치는 영향. *동의병리학회지*, 13(2):66-78, 1999.
9. 오하식. 당귀류 한약제가 혈관신생에 미치는 영향에 대한 비교연구. *경희대학교 대학원* 2001.
10. Yang JN. Anti angiogenic Effects of Trichoanthis fructus. Dept. of Oriental Medicine Graduate School Kyung Hee University Seoul, Korea, 2003.
11. 심연생주편. 신농본초경채색도보. 중국중의약출판사. p238-p240, 1996.
12. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학. 영림사. p334-p335 1991.
13. 이제마. 사상의학원론. 행림출판. p231, 1989.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63, 1983.
15. Portmann T, Ternynck T, Avrameas S. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods* 82(1):169-179, 1985.
16. Schnaper HW, Grant DS, Stetler-Stevenson WG, Fridman R, D'Orazi G, Murphy AN, et al. TypeIV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro. *J Cell Physiol* 156(2):235-246, 1993.
17. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 102:196-202, 1980.
18. 통계청. 통계자료(<http://www.nso.go.kr>). 사망원인. 2002.
19. WHO. The World Cancer Report. Geneva 2003.
20. 서울대학교 의과대학. 종양학(전정판). 서울대학교출판부. p2-p3 1993.
21. Wang TC, Park JH, YU YB, Shim BS, Ahn KS, Choi SH. Study on the effects of Jiaweicitaowon ingredients on angiogenic inhibition. *Korean Journal of Oriental Medical Pathology* 14:155-67, 2000.
22. Wang TC, Park JH, YU YB, Shim BS, Ahn KS, Choi SH. Study on the effects of Jiaweicitaowon ingredients on angiogenic inhibition(II). *Korean Journal of Oriental Medical Pathology* 15:235-40, 2001.