

가미계격탕의 혈관형성 저해작용에 관한 연구

이효정 · 이은옥 · 오세순¹ · 안규석¹ · 박영두² · 김성훈*

경희대학교 동서의학대학원 동서종양학과, 1: 경희대학교 한의과대학 합방병리학, 2: 경희대학교 생명공학원

Study on the Anti-angiogenic Activity of KMKKTE

Hyo Jeong Lee, Eun Ok Lee, Se Soon Oh, Kyoo Seok Ahn¹, Young Doo Park², Sung Hoon Kim*

Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science,

1: Department of Oriental Pathology, Kyunghee University, 2: Graduate School of Biotechnology, Kyunghee University

Cancer is an intractable disease for humans to overcome. Recently natural products or Oriental prescriptions have been on the spotlight to develop anticancer agents with little side-effects and good efficacy. KamikeKyuktang has been used for the treatment of cancer in Oriental medicine. However, its anti-cancer mechanism still remains unclear. KMKKTE is an ethanol extract of KamikeKyuktang composed of 12 medicinal herbs. Anti-proliferative effects of KMKKTE was investigated on Lewis lung carcinoma cell (LLC) and A549 (human lung cancer cells). Half-maximal inhibition of the LLC and A549 cell proliferation by KMKKTE was found approximately 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. It also effectively inhibited the proliferation of HUVEC cells treated by bFGF and VEGF up to 30 % of control at 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the cell migration to 80 % at 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in concentration dependent manner. Tube formation of HUVEC cells on matrigel also was significantly suppressed from 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of KMKKTE. Taken together, these results demonstrate that KMKKTE has antiangiogenic activity and be applied to angiogenesis dependent cancers.

Key words : KMKKTE, LLC, A549, proliferation, tube formation

서 론

암은 세계적으로 사망원인의 1, 2위를 차지하는 질환으로 이를 정복하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다¹⁾. 대부분의 암 치료는 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등을 적절히 배합하여 시행되어 왔으나, 그 치료효과가 만족스럽지 못할 뿐만 아니라 치료의 부작용이 많아 이를 해결하기 위한 연구가 진행되고 있다. 최근 혈관신생의 정도는 종양의 성장과 전이, 재발과 예후와 많은 상관관계가 있는 것으로 보고되었다²⁾. 이는 혈관신생이 암의 점진적인 성장을 위한 생물학적 과정일 뿐만 아니라 암의 형성과 신생에 있어서 전이와 침윤의 통로로 작용하기 때문이다³⁾. 따라서 신생혈관의 생성을 억제함으로써 암에 대한 산소와 영양소 공급을 차단하여 암의 성장과 다른 장기로의 전이를 막기 위해 신생혈관 생성의 억제가 치료목표로서 연구되고 있다⁴⁾. 이와 관련하여 최근 한의학에서도 다양한 약재와 처방을 이용하여 혈관의 신생을 억제하는 약물에 대한 실험적 연구가 활발히 이루어지고

있다⁵⁻⁷⁾. 특히 한방처방을 이용한 연구로는 한의학계에서 암의 전이 및 혈관신생 억제와 관련한 연구가 활발하여 약물을 중심으로 이루어져 왔으나, 임상적으로 암환자는 부정기시법을 사용해야 하는 경우가 대부분이다. 실험 연구를 통해 항암 효능을 갖는 부정법 계열의 처방 연구는 다수 보고된 바 있으나, 혈관신생 분야에서 연구는 그동안 미진한 편으로 최가 십전대보탕의 혈관신생 억제효과를 관찰한 것⁸⁾, 이가 보기보혈 약물의 혈관신생 억제 선별 연구⁹⁾ 등외에는 많지 않다. 이에 본 실험실에서도 부작용이 적으면서 항암활성을 증강하는 새로운 한방처방을 개발하려는 일환으로 수종의 처방을 스크리닝하는 가운데 가미계격탕이 혈관형성 저해작용 효과가 있음을 발견하고, 이를 구체적으로 평가하기 위해, 사람의 혈관내피세포를 이용하여 세포독성, 증식, 이동능, 튜브형성 등에 대한 저해효과를 살펴보아 유의한 결과가 있기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

가미계격탕의 구성성분은 Table. 1과 같으며, 이들 구성성분

* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 서천리 기흥읍 경희대학교 한의과대학

· E-mail : sungkim@khu.ac.kr, · Tel : 031-201-2179

· 접수 : 2004/04/16 · 수정 : 2004/05/28 · 채택 : 2004/06/21

은 대효제약에서 구입하여 사용하였으며, 에탄올 추출물을 실험에 이용하였다. 가미계격탕의 에탄올 추출물을 KMKKTE라 명명하였다.

Table 1. 가미계격탕의 구성약물 및 용량

| 한약명 | 학 명 | 용량 |
|-------|---|----|
| 포공영 | <i>Taraxacum mongolicum</i> Hand. | 30 |
| 사삼 | <i>Adenophora triphylla</i> var. <i>japonica</i> HARA | 30 |
| 반지련 | <i>Scutellaria barbata</i> D.Don | 30 |
| 익이인 | <i>Coxi lachryma-jobi</i> var. <i>mayneu</i> | 30 |
| 백화사설초 | <i>Oldenlandia diffusa</i> WILLD. ROXB | 30 |
| 황기 | <i>Astragalus membranaceus</i> BUNGE | 30 |
| 어성초 | <i>Houttuynia cordata</i> THUNG. | 30 |
| 구절초 | <i>Chrysanthemum zawadskii</i> var. <i>latilobum</i> Kitamura | 30 |
| 백합 | <i>Lilium lancifolium</i> THUNB. | 20 |
| 과루인 | <i>Trichosanthes kirilowii</i> MAXIM | 20 |
| 하고초 | <i>Prunella vulgaris</i> var. <i>lilacina</i> NAKAI | 20 |
| 인삼 | <i>Panax ginseng</i> C.A. MEY. | 20 |
| | 합계 | 0 |

2. 방법

1) KMKKTE의 추출

가미계격탕의 구성약물 640 g을 추출 용기에 넣고 EtOH 1000 ml로 3회 환류 추출하여 얻어지는 용액을 농축 동결 건조하여 KMKKTE 분말 (22.43 g)을 얻을 수 있었다. 3.5 %의 수득률을 보였으며, 이를 in vitro 실험을 위해 DMSO에 녹여 사용하였다.

2) 세포 및 배양

사용된 암 세포는 LLC(Lewis lung carcinoma), A549(Human lung cancer)이며, RPMI 1640 과 10 % FBS 배지에서 배양하였고, 혈관 형성 관련 실험은 HUVEC(human umbilical vein endothelial cell) 세포를 일차 배양하여 실험 하였다. HUVEC의 배지는 M199 media와 10 % FBS, 3 ng/ml bFGF, 10 unit heparin 이 포함된 배지에서 배양 하여 사용하였다.

3) 세포독성 측정

Fosmann이 개발한 방법 MTT 방법으로 세포독성¹²⁾을 측정 하였다. LLC, A549 세포를 10 % FBS가 첨가된 RPMI 1640으로 5 % CO₂, 37 °C 배양기에서 배양하였다. 세포를 배양후 Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 배양 용기로부터 분리하고 1×10⁴ cells 를 96 well plate에 분주하고 12시간후 배양 후 약제를 농도별로 계대 희석하여 Well 당 100 µl씩 분주하였다. 이를 24시간 배양 한 후 MTT(5 mg/ml) 10 µl씩 넣고 4시간 동안 반응 시킨 후 DMSO 100 µl를 넣고 상온에서 20분 방치 한 후 ELISA 570 nm 에서 흡광도를 측정하였고, 약제를 처리하지 않은 대조군을 100 %로 하여 사멸률을 계산 하였다¹³⁾.

4) Endothelial cell proliferation assay

일차 배양된 혈관내피세포를(M199 media + 20 % FBS + 3 ng/ml + 10 unit heparin) 배양 하여 0.1 % gelatin으로 96 well plate 표면에 처리 한 plate에 5 × 10³/well의 세포를 분주하고 12시간 후 KMKKTE를 bFGF 10 ng/ml 또는 VEGF 20 ng/ml이 포함된 배지와 포함되지 않은 배지에서 각각 약제를 농도별로 계대 희석하여 배양된 세포에 100 µl씩 분주하였다. 다시 48시간 배양 한 후 XTT를 넣고 2시간동안 반응 시킨 후 흡광도 450 nm

에서 측정하였으며 약제를 처리하지 않은 대조군을 100 %로 간주하여 사멸률을 계산하였다.

5) Migration assay

일차 배양 된 혈관내피세포를 M199 media + 20 % FBS + 3 ng/ml + 10 unit heparin에 5 % CO₂, 37 °C 배양기에서 배양하였다. Polycarbonate membrane(pore size ; 12 µm)을 0.1 % gelatin으로 표면 처리 한 후 boyden blind chemotaxis chamber의 아랫 칸에 혈관내피 세포 (1×10⁶/ml)를 50 µl씩 분주 하고 membrane의 거친면을 세포와 부착시킨 후 2 시간동안 배양 한 후 48 well boyden chamber의 위의칸에 bFGF 5 ng/ml이 포함된 배지에 약제를 농도별로 처리하였다. 양성 대조군으로 bFGF 5 ng/ml을 처리하였으며 음성대조군으로는 bFGF가 포함되지 않은 배지를 사용하였다. 다시 2시간동안 배양 시킨 후 membrane을 꺼내어 methanol로 고정 시킨 후 Diff Quic 용액으로 염색한 후 현미경으로 관찰 한 후 이동한 혈관내피세포를 세었다.

6) Tube Formation assay

24well plate에 matrigel을 표면 처리한 후 일차 배양된 혈관내피세포를 2×10⁴/well 개의 세포를 분주하고 KMKKTE를 bFGF 10 ng/ml 또는 VEGF 20 ng/ml이 포함된 M199 media로 농도 희석 계대하여 처리 한 후 12시간 배양 후 고정, Diff Quic 용액으로 염색한 후 현미경으로 관찰하였으며 사진을 다양한 필드에 찍고 tube 가 완전히 형성된 것만을 측정하고, NIH Scion image program을 이용하여 정량하였다.

7) 통계처리

실험결과들은 Mean ± SD와 Mean ± SE로 나타내었고, 통계 처리는 student t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 하여 유의성 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

1. KMKKTE의 세포독성

KMKKTE를 A549와 LLC 세포주에 대해 세포독성을 검정한 결과 농도 의존적인 세포독성효과를 나타냈으며, LLC의 경우 125 µg/ml과 A549의 경우 250 µg/ml의 IC₅₀를 나타내었다(Fig. 1.)

2. 혈관내피세포의 증식 억제효과

혈관형성을 억제하는 방식은 세 가지로 분류된다. 첫째, 암 세포로부터 분비되는 angiogenic factor의 분비를 억제 혹은 이미 분비된 angiogenic factor를 중화시키거나, 둘째로 vascular endothelial cell proliferation 혹은 migration을 억제하거나, 셋째로 vessel basement membrane의 합성을 억제하는 방법이 가능하다¹⁷⁾. 그리하여 혈관신생인자들로 유도한 HUVEC에서의 KMKKTE 처리시 증식억제효과를 보기위해 먼저 HUVEC에서의 세포독성을 바탕으로 검정하였다. HUVEC 세포에서 KMKKTE의 세포독성을 확인한 결과 300 µg/ml의 농도에서 IC₅₀가 나타났다(미계재). 이 세포독성을 바탕으로 독성이 없는 250 µg/ml부터 검정하였다. VEGF로 유도한 HUVEC에서의 증식억제효과는 KMKKTE의 농도 125 µg/ml부터 60 %이상의 억제율을 보였으며 bFGF로 유

도된 HUVEC에서의 증식억제 효과는 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 30 % 이상의 억제율을 보였다.(Fig. 2, 3.)

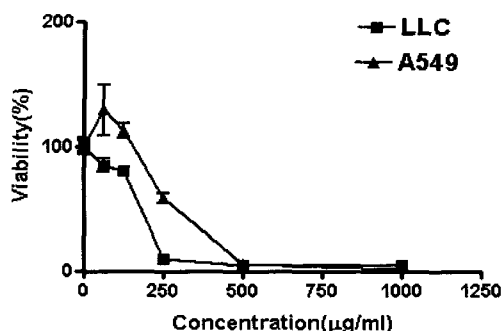


Fig. 1. Effect of KMKKTE on the cytotoxicity of LLC and A549 cells.

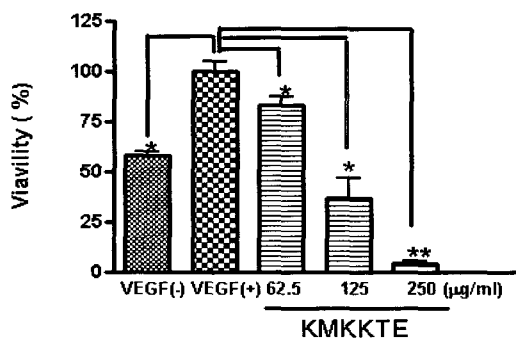


Fig. 2. Effect of KMKKTE on VEGF-induced proliferation in HUVEC cells. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)

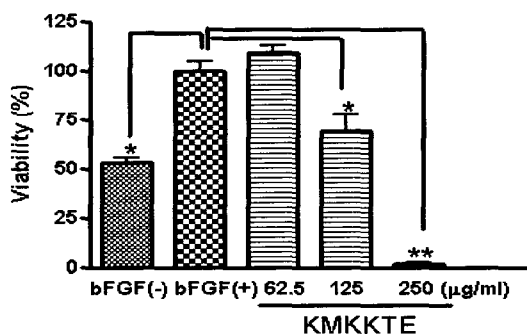


Fig. 3. Effect of KMKKTE on bFGF-induced proliferation in HUVEC cells. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)

3. 혈관내피세포의 이동억제 효과

KMKKTE가 혈관내피세포의 이동을 억제하는지를 알아보기 위하여 48well boyden chemotaxis chamber를 사용하였다. 혈관내피세포가 부착된 후 KMKKTE의 농도를 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하여 bFGF에 의한 화학주성적 이동이 저해되는지를 알아보았다. 양성대조군의 혈관내피세포의 이동수는 89개였으나 KMKKTE를 처리한 것은 65개부터 38개로 농도에 의존적으로 이동한 혈관내피세포의 숫자가 감소했음을 확인하였다.(Fig. 4.)

4. 혈관 내피세포의 Tube 형성 억제효과

KMKKTE가 혈관내피세포의 tube형성을 억제하는지를 알아

보기 위해 Matrigel로 표면처리된 plate에 KMKKTE를 농도별로 계대희석한 후 혈관 내피세포를 $2 \times 10^4/\text{well}$ 를 분주하고 12시간 후 염색하여 관찰하였더니, 대조군에서는 혈관튜브 형성이 뚜렷하였으나 KMKKTE를 처리한 군에서는 tube형성이 현저히 억제되는 것을 확인하였다.(Fig. 5, 6.)

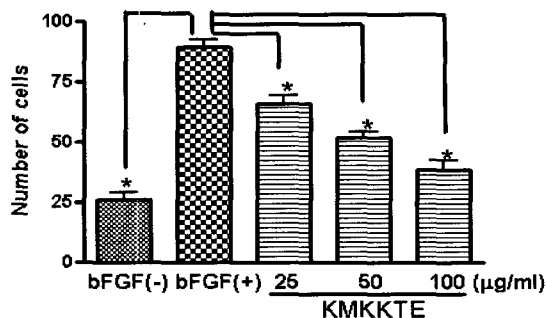


Fig. 4. Effect of KMKKTE on the migratory activity of bFGF-induced HUVEC cells. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)

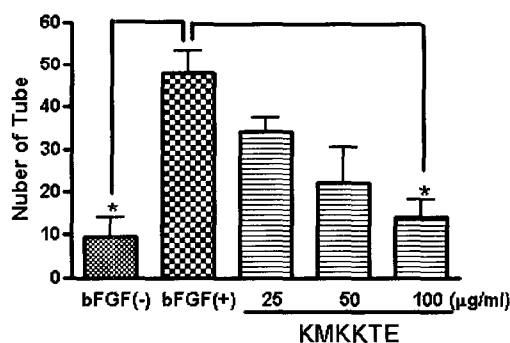
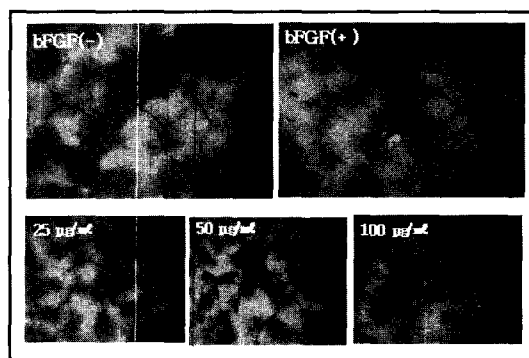


Fig. 5. Effect of KMKKTE on bFGF-induced tube formation in HUVEC cells. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)

결론

가미계격탕의 혈관형성 저해작용을 실험적으로 입증하고자, 가미계격탕 에탄올층(KMKKTE)이 암세포에 대한 세포독성, bFGF, VEGF의 혈관형성 인자를 처리한 사람의 내피세포의 증식능, 이동능, 분화능 등을 평가한바 다음과 같은 결론을 얻었다.

A549(Human lung cancer cells), LLC(lewis lung carcinoma cells) 암주에 대한 세포독성의 결과 두 세포주 모두에서 KMKKTE 농도에존적 처리에 따라 세포독성 효과를 보였으며,

그 IC₅₀의 값이 A549의 경우 250 µg/ml이며 LLC의 경우 125 µg/ml로 나타났다. 또한 악성종양일 경우 체내에서 2mm³ 이상의 크기가 되면 압 종양 내의 산소분압이 극히 낮아서 저산소증이 유발되며 이를 극복하기 위해 압 종양은 혈관형성 인자들을 분비시켜 주변의 정상조직의 혈관을 유도하는 것이 이미 알려져 있다. 이에 따라 in vitro에서 혈관형성인자인 bFGF와 VEGF로 유도한 HUVEC cell의 세포증식능과 이동능 분화능을 검정한 결과 HUVEC cell에서 독성이 없는 125 µg/ml에서부터 유의성 있게 양성대조군 보다 30 %이상의 억제율을 보였으며, 이동능, 분화능에서도 25 µg/ml에서부터 30 % 이상의 억제율을 보였다.

이상의 결과를 보아 가미계격탕의 에타놀층은 임상에서 암의 전이 예방 및 치료에 활용가능할 것으로 사료된다.

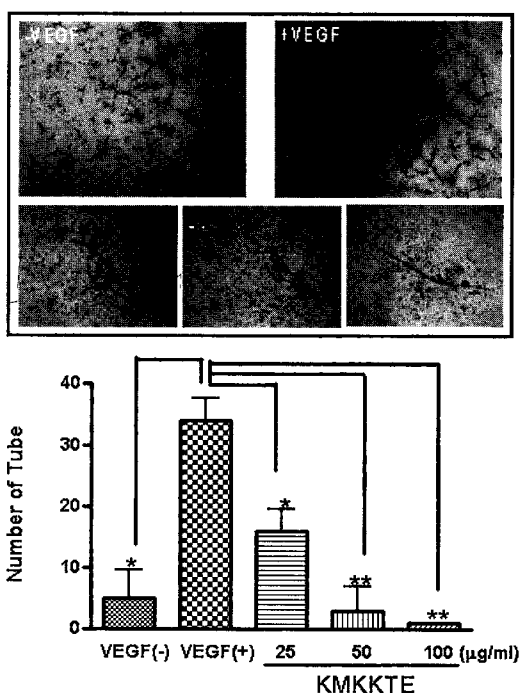


Fig. 6. Effect of KMKKTE on VEGF-induced tube formation in HUVEC cells. (* p<0.05, ** p<0.001)

감사의 글

이 논문은 보건복지부 한방치료기술 중점공동연구과제 연구비(01-PJ9-PG1-01C005-004)의 지원으로 수행되었기에 감사드립니다.

참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사; 1991.
2. Wilhelm 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 264:17213-17221, 1989.
3. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell Jan 24;88(2):277-85, 1997.
4. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell Oct 21;79(2):315-28, 1994.
5. Lee JH, Shim BS, Ahn KS, Choi SH. Anti-metastatic effects of Xuefuzhuyutang. Journal of Korean Oriental Oncology 5:61-75, 1999.
6. Kang DI, Kim SH, Shim BS, Choi SH, Ahn KS. Study on the Angiogenic Inhibition Effects of Molyaksan. Korean Journal of Oriental Medical Pathology 14:91-107, 2000.
7. Sohn JG, Kim SH, Seok DS, Shim BS, Choi SH, Ahn KS. Effects of Huoluoxiaolindan on Anti-metastasis. Korean Journal of Oriental Medical Pathology 14:182-98, 2000.
8. Choi H, Park JH, Yu YB, Shim BS, Choi SH, Ahn KS. Anti-angiogenic effects of Sipjeondaebotang. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology 15:403-11, 2001.
9. 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.
10. Ata, N; Oku, T; Hattori, M; Fujii, H; Nakajima, M; Saiki, I. : Inhibition by galloylglucose(GG6-10) of tumor invasion through extracellular matrix and gelatinase-mediated degradation of type IV collagens by metastatic tumor cells. Oncology Research, 8, pp.503-511, 1996.
11. Mosmann T.:Rapid colormetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assay, J Immunol Method, 65, pp.55-63, 1983.
12. Scudiero, D.A., Shoemaker, RH, Pall : Evaluation of a soluble tetrazolium/ formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, Cancer Res., 48, pp.4827-4833, 1988.
13. O' Reilly, M.. S., Holmgren, L., Chen C., Rosental, R. A., Moses, M., Lane, W.S Cao, Y., Sage, E., H., and Folkman, J. : Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediate the suppression of metastasis by a Lewis lung carcinoma cell, 79, pp.315-328, 1994.
14. Koch, A. E., Halloran, M. M., Haskell, C. J., Shah, M R., and Polverini, P. J : Angiogenesis mediated by soluble forms E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. Nature, 376, pp.517-519, 1995.
15. Grant, D.S., Kinsella, J. L., Fridman, R., Auerbach, B., Piasecki, A., Yamada, Y., zain, M., nad Kleinman, H. K. : Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) in vitro and induction of angiogenic

- behavior in vivo. *J. cell physiol.* 13, pp.614-625, 1992.
16. Caine GJ, Lip GY, Stonelake PS, Ryan P, Blann AD.: Platelet activation, coagulation and angiogenesis in breast and prostate carcinoma. *Thromb Haemost.* 92(1), pp.185-90, 2004.
 17. Taraboletti G, Poli M, Dossi R, Manenti L, Borsotti P, Faircloth GT, Broggin M, D'Incalci M, Ribatti D, Giavazzi R.: Antiangiogenic activity of aplidine, a new agent of marine origin. *Br J Cancer.* 90(12), pp.2418-24. 2004.
 18. Trikha M, Zhou Z, Nemeth JA, Chen Q, Sharp C, Emmell E, Giles-Komar J, Nakada MT.: CNTO 95, a fully human monoclonal antibody that inhibits alphav integrins, has antitumor and antiangiogenic activity in vivo. *Int J Cancer.* 110(3), pp.326-35, 2004.
 19. Kim SI, Kim KS, Kim HS, Choi MM, Kim DS, Chung KH, Park YS.: Inhibition of angiogenesis by salmosin expressed in vitro. *Oncol Res.* 14(4-5), pp.227-33, 2004.
 20. Kim Y, Kim SB, You YJ, Ahn BZ.: Deoxypodophyllotoxin; the cytotoxic and antiangiogenic component from *Pulsatilla koreana*. *Planta Med.*, 68(3), pp.271-4, 2002.