

보정방암탕 에타놀층의 혈관형성 저해작용에 관한 연구

이은옥 · 심범상 · 서영준¹ · 전병훈² · 안규석 · 김성훈*

경희대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 서울대학교 약학대학 생화학교실, 2: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

Study on the Anti-angiogenic Activity of Ethanol Extract of Bojungbangam-tang

Eun Ok Lee, Beom Sang Shim, Young Joon Surh¹, Byung Hun Jeon², Kyoo Seok Ahn, Sung Hoon Kim

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, 1: College of Pharmacy, Seoul National University, 2: Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The anti-angiogenic activity of ethanol extract of Bojungbangam-tang, a new herbal prescription composed of nine crude drugs, was evaluated in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). HPLC profile revealed that five major compounds such as apioliquiritin, narirutin, hesperidin, liquiritin and glycyrrhizin. Ethanol extract of Bojungbangam-tang (EBJT) did not showed any significant cytotoxicity against HUVECs up to 200 ug/ml. EBJT significantly inhibited basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced HUVECs proliferation to 69% at 200 µg/ml. Migration using window scraping method and tube formation in bFGF stimulated HUVECs were also significantly suppressed by EBJT in a dose-dependent manner. Taken together, these results suggest that Bojungbangam-tang can be a potent prescription for angiogenesis related disease.

Key words : Bojungbangam-tang, anti-angiogenic activity, HPLC, HUVECs, bFGF

서 론

혈관형성이란 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 일련의 과정으로 혈관형성의 inhibitor (thrombospondin-1, angiostatin, endostatin etc.)와 activator (VEGF, bFGF, EGF etc.)의 균형에 의해 조절되는 것으로, 배아발달, 생식, 상처치유 등의 과정에서 나타난다^{1,2)}. 암조직은 자신들의 생존을 위해 반드시 신생 혈관형성(angiogenesis)이 필요하며, 이 혈관으로부터 산소와 영양분을 공급받지만, 혈관형성 없이 암조직은 1-2 mm이상 성장할 수 없다^{2,5)}. 또한 혈관은 암세포가 다른 부위나 장기로 확산되는 과정에서의 통로로 작용하여 암치료 실패 및 암 환자 사망 원인⁶⁾이 된다. 즉 암조직의 전이와 성장은 혈관에 의존적으로 이뤄지기때문에^{2,3)} 혈관형성을 저해함으로써 이를 차단할 수 있으므로 혈관형성 저해제는 좋은 항암제가 될 수 있다.

혈관형성 저해제는 기존의 항암제가 암세포를 표적으로 하는 반면 내피세포를 표적으로 하며 기존의 항암제보다 독성이

약하고 내성이 나타나지 않으므로 부작용이 적은 것으로 기대된다. Judah Folkmann은 혈관형성 저해 작용을 통해 암세포 증식을 억제하는 angiostatin과 endostatin을 개발하여 각광을 받았으며⁷⁾, 이외에도 폴리펩타이드 류, 항생제류, 스테로이드류, 폴리양이온 및 폴리음이온류, 암억제유전자류, 폴리사카라이드류 등 여러 가지 신생혈관 억제제가 개발되고 있다.

이와 관련하여 한의학에서도 한약재, 처방, 한약제로부터 분리된 단일물질 등을 이용하여 혈관형성 억제제의 연구가 활발히 진행되고 있고, 저해 활성을 나타낸다는 보고도 많이 나오고 있다. 암에서의 혈관신생은 한의학적으로 '어혈(瘀血)'에 속하며, 많은 종류의 활혈화어(活血化瘀) 약물들이 실험적으로 혈관신생 억제 및 전이 억제 효능을 나타냄을 확인하였다⁸⁻¹⁴⁾.

한편 보정방암탕은 보익제로 활용되는 <證治準繩 증치준승>의 삼출탕에 아가리쿠스를 주재료로 하고 당귀와 산약을 가미한 처방으로 모두 식품공전에 등재된 9종의 한약으로 구성되어 있다. 이미 보정방암탕 물층에서는 NK세포와 macrophages를 활성화시켜 면역기능을 증진시킴으로써 항전이 활성을 나타냄을 확인한 바가 있다¹⁵⁾. 이 처방을 실용화 하려는 일환으로 수행된 혈관형성저해 예비실험에서 보정방암탕의 에타놀층은 혈관형성

* 교신저자 : 김성훈, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학

· E-mail : sungkim7@khu.ac.kr, · Tel : 031-201-2179

· 접수 : 2006/01/02 · 수정 : 2006/01/31 · 채택 : 2006/02/08

저해활성이 있음을 확인하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 보정방암탕구성 및 에탄올 추출

보정방암탕의 구성성분은 Table 1과 같이 9종으로 구성하였다. 이 구성분 3첩 분량 (360 g)을 에탄올 3 L에 3일간 3회 추출하여 감압농축 후 분말 44 g을 얻어 수율 12.2%를 나타냈으며, 이를 DMSO에 녹여 사용하였다.

Table 1. The botanical origins and ratio of crude drugs of Bojung-bangam-tang

Crude drug	Botanical origin	Place	weight (g)	Specimen no.
<i>Agaricus mushroom</i>	<i>Agaricus blazei</i> Murill	Korea	40	GSM011
<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz	China	12	GSM012
<i>Ginseng Radix</i>	<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer	Korea	20	GSM013
<i>Polyporus</i>	<i>Polyporus umbellatus</i> (PERS.) Fries	China	12	GSM014
<i>Citri Pericarpium</i>	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	Korea	8	GSM015
<i>Astragali Radix</i>	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	Korea	8	GSM016
<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	<i>Dioscorea japonica</i> Thunb	Korea	8	GSM017
<i>Angelicae gigantis Radix</i>	<i>Angelica gigas</i> Nakai	Korea	8	GSM018
<i>Glycyrrhizae Radix</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	China	4	GSM019

2. 세포배양

혈관 내피 세포인 human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)은 삼성 산부인과에서 공급받아 Jaffe 방법¹⁶⁾으로 primary culture한 것을 0.1% gelatine이 coating된 plate에서 3 ng/ml bFGF, 5 unit/ml heparin, 20% FBS가 첨가된 M199배지에서 5% CO₂, 37 °C 조건으로 배양하였다.

3. HPLC에 의한 보정방암탕의 표준화 연구

보정방암탕의 HPLC패턴 분석은 사진양극분석기기를 이용하여 단극은 220 nm 파장에서, 등고 파장은 190-420 nm에서 측정하여 3차원적인 분석법을 활용하였다. 5종 피크, c, d, e, 및 h 피크는 표준물질의 초음파 스펙트럼과 보존시간과 비교하여 결정되었다.

4. Cytotoxicity assay

세포주를 0.1% gelatin이 코팅된 96-well 플레이트에 1 × 10⁴으로 깔고 24시간 후 시료를 처리하였다. 24시간 더 배양 후 PMS (sigma P-9625, 1.53 mg/ml) 10 µl와 XTT (sigma X-4251, 1 mg/ml) 1ml을 혼합하여 well당 50 µl를 첨가한 후 2시간 후에 microplate reader (Molecular Devices Co.) 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군을 기준으로 세포의 생존비를 계산하였다.

5. HUVECs proliferation assay

Proliferation assay는 XTT 방법¹⁷⁾을 이용하여 실시하였다. 사람의 제대로부터 분리한 혈관내피세포 (HUVECs)를 0.1% gelatin이 코팅된 96-well 플레이트에 5×10³으로 분주하여 24시간 배양시킨 후 5% FBS만 첨가된 M199배지로 6시간 동안 starvation 시켰다. 5% FBS, 10 ng/ml bFGF와 5 units/ml heparin이 첨가된 M199배지로 시료를 농도별로 희석하여 100 µl씩 첨가하여 48시간 동안 배양시켰다. PMS (sigma P-9625, 1.53 mg/ml) 10 µl와 XTT (sigma X-4251, 1 mg/ml) 1ml을 혼합하여 well당 50 µl를 첨가한 후 2시간 후에 microplate reader (Molecular Devices Co.) 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군을 기준으로 세포의 생존비를 계산하였다.

6. HUVECs migration assay¹⁸⁾

0.1% gelatin이 코팅된 6-well에 HUVECs를 3×10⁵으로 seeding 한 뒤 24시간 후에 200 µl tip으로 스크래치 한 후 PBS로 세척하였다. 5% FBS, 10 ng/ml bFGF와 5 units/ml heparin이 첨가된 M199배지로 시료를 농도별로 처리한 후 15시간 배양하였다. PBS로 세척 후 Diff-Quick fixative로 세포를 고정시키고 Diff-Quick Sol.으로 세포를 염색한 후 Axiovert S 100 light microscope (Carl Zeiss, Inc., USA)에서 50배율로 사진을 찍어 이동된 세포의 수를 산출하였다.

7. HUVECs differentiation (Tube formation) assay

Differentiation assay는 Grant등의 방법¹⁹⁾을 이용하여 tube가 형성되는 것을 관찰하였다. Growth factor reduced matrigel 200 µl를 24-well 플레이트에 분주하여 37°C에서 30분간 코팅하였다. 5% FBS, 10 ng/ml bFGF와 5 units/ml heparin이 첨가된 M199배지로 시료와 혈관내피세포 4×10⁴을 혼합하여 500 µl씩 분주하였다. 음성대조군에는 bFGF를 처리하지 않는다. 9시간동안 배양 후 Diff-Quick fixative로 세포를 고정시키고 Diff-Quick Sol.으로 세포를 염색한 후 Axiovert S 100 light microscope (Carl Zeiss, Inc., USA)에서 50배율로 사진을 찍어 형성된 혈관의 수를 산출하였다.

8. 통계처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, student t test를 이용하여 유의성을 평가하였다.

결과 및 고찰

1. 보정방암탕의 HPLC 패턴분석

Fig. 1 I에서는 단극 파형을 보여주고 있으며, Fig. 1 II도 등고선 파형을 보여주고 있어 보정방암탕에는 다수의 구성성분이 배합되었음을 알 수 있으나 특징적인 HPLC 파형을 제시하여 주고 있다. 그중 a피크는 당귀+ 황기+ 백출의 파형이고, b피크는 미지물질, c, d 및 h피크는 감초의 apioiquiritin, liquiritin 및 glycyrrhizin의 피크를 말하고, e와 f피크는 진피의 narirutin과

hesperidin성분을 지칭하고 있다. 이와 같이 보정방암탕의 피크는 보정방암탕의 표준화 작업으로 활용 가능할 것으로 사료된다.

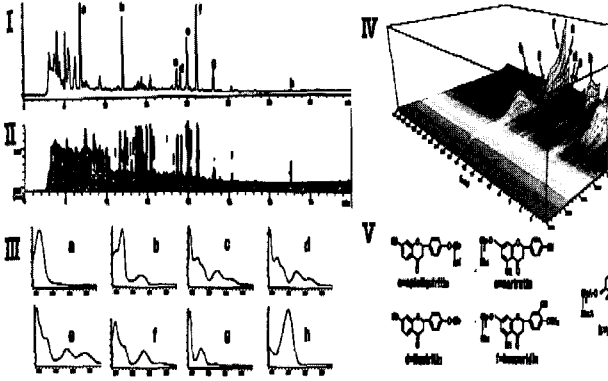


Fig. 1. HPLC profile of EBJT for quality control

2. 보정방암탕의 세포독성

혈관내피세포는 혈관형성을 주도하는 대표적인 세포이므로 혈관형성에 대한 실험에는 혈관내피 세포가 가장 많이 활용되고 있다⁴⁾. Fig. 2에서 보이는 바와 같이 혈관내피세포를 이용하여 보정방암탕의 독성을 살펴보았다. 농도 400 µg/ml에서는 독성을 나타내었지만 200 µg/ml이하에서는 독성을 나타내지 않아 이후 모든 실험은 독성이 없는 200 µg/ml부터 실험을 하였다.

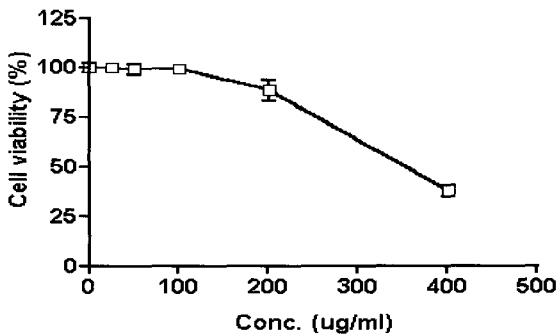


Fig. 2. Effect of EBJT on cell viability of HUVECs

3. 보정방암탕의 혈관내피세포 증식 억제효과

혈관형성에 관여하는 대표적인 성장인자는 VEGF, bFGF, erythropoietin, IL-8 등이 있다^{1,4)}. 그중 bFGF는 강력한 혈관형성 촉진제로서 in vitro와 in vivo실험에서 많이 사용되어지고 있다^{8,20)}. 본 실험에서도 bFGF를 이용하여 혈관내피세포의 증식, 이동, 튜브형성을 유도하였다. Fig. 3에서 보이는 바와 같이 먼저 bFGF로 유도된 혈관내피세포의 증식은 보정방암탕을 처리한 결과 농도에 의존적으로 증식을 저해하였으며, 100, 200 µg/ml 농도에서 유의적으로 각각 24 % 및 69%의 억제율을 보였다.

4. 보정방암탕의 혈관내피세포 이동 억제효과

보정방암탕이 혈관내피세포의 이동을 저해하는지 확인하기

위하여 200 µl tip으로 스크래치를 낸 후 bFGF처리에 의한 화학주성적 이동을 관찰하였다. Fig. 4에서 보이는 바와 같이결과 bFGF는 혈관내피세포의 이동을 유도하였고 이를 보정방암탕 100 µg/ml, 200 µg/ml에서 농도에 의존적으로 저해하였다.

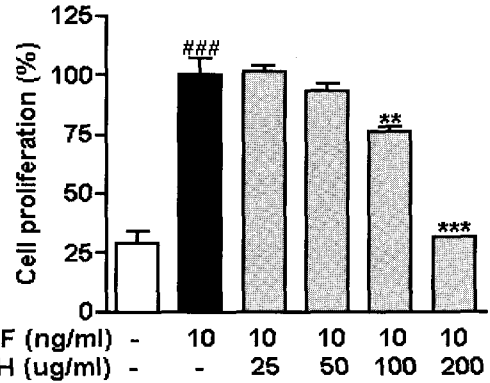
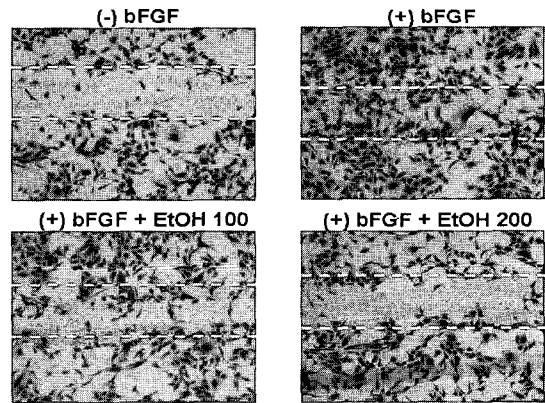


Fig. 3. Effect of EBJT on the proliferation of bFGF treated HUVECs

(A)



(B)

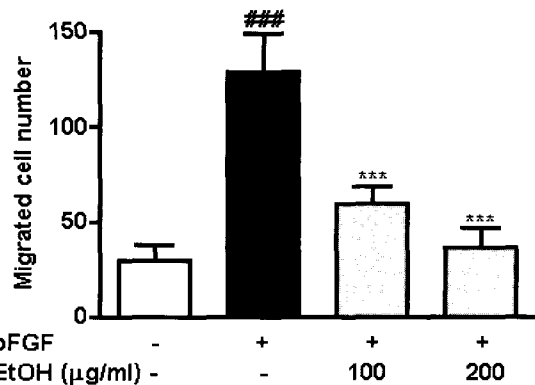


Fig. 4. Effect of EBJT on the migration of HUVECs. (A): Photographs of migrated cells using window scrape assay (B): Graph of inhibitory effect of EBJT on the migration of HUVECs

5. 보정방암탕의 혈관내피세포 튜브형성 억제효과

혈관내피세포는 매트릭셀이 코팅된 플레이트에서 bFGF의 촉진제로 자극하면 혈관모양의 튜브가 형성된다. 이를 이용하여 보정방암탕의 튜브형성 억제효과를 살펴보았다. Fig. 5에서 보이

는 바와 같이 음성대조군에 비해 bFGF를 처리한 양성대조군에서는 튜브의 형성이 활발하였고, 이는 보정방암탕의 처리에 의해 현저히 감소됨을 확인하였다. 이상의 결과로 보아 보정방암탕에 타놀충은 혈관형성저해 효과가 있는 것으로 보이지만 앞으로 분자생물학적인 기전연구와 동물실험 연구가 필요할 것으로 사려된다.

제시하는 것이며, 앞으로 더 많은 기전연구와 동물실험을 통해 효능을 입증함으로써 임상에서 암의 전이와 예방 및 치료에 활용 가능성을 타진해야 할 것으로 사료된다.

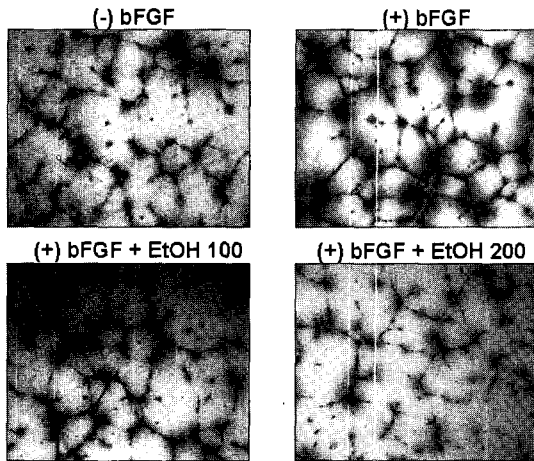
감사의 글

이 논문은 보건복지부 한방치료기술연구개발사업 바이오퓨전 (B050007)의 지원에 의해 수행되었기에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Griffioen, A.W., Molema, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol. Rev.* 52(2):237-268, 2000.
2. Bergers, G., Benjamin, L. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 401-410, 2002.
3. Folkman, J. Angiogenesis and apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* 13, 159-167, 2003.
4. Carmeliet, P., Jain, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 407, 249-257, 2000.
5. Folkman, J., Siegel, Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 267, 10931-10934, 1992.
6. Boyd, D. Invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 15(1):77-89, 1996.
7. Plate, K.H., Breier, G., Risau, W. Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol.* 4, 207-218, 1994.
8. Huh, J.E., Lee, E.O., Kim, M.S., Kang, K.S., Kim, C.H., Cha, B.C., Surh, Y.J., Kim, S.H. Penta-O-galloyl-beta-D-glucose suppresses tumor growth via inhibition of angiogenesis and stimulation of apoptosis: roles of cyclooxygenase-2 and mitogen-activated protein kinase pathways. *Carcinogenesis.* 26(8):1436-1445, 2005.
9. Lee, J.H., Shim, B.S., Ahn, K.S., Choi, S.H. Anti-metastatic effects of Xuefuzhuyutang. *J Korean Oriental Oncology.* 5, 61-75, 1999.
10. Kang, D.I., Kim, S.H., Shim, B.S., Choi, S.H., Ahn, K.S. Study on the angiogenic inhibition effects of Molyaksan. *Korean J. Oriental Medical Pathology.* 14, 91-107, 2000.
11. Sohn, J.G., Kim, S.H., Seok, D.S., SHim, B.S., Choi, S.H., Ahn, K.S. Effect of Huoluoxiaolindan on anti-metastasis. *Korean J. Oriental Medical Pathology.* 14, 182-198, 2000.
12. Choi, H., Park, J.H., Yu, Y.B., Shim, B.S., Choi, S.H., Ahn, K.S. Anti-angiogenic effects of Sipjeondaabo-tang. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 15, 403-411, 2001.
13. Lee, J.W., Kim, H.Y., Kang, H., Yu, Y.B., Shim, B.S., Choi, S.H., Ahn, K.S. Angiogenic inhibition effects of several

(A)



(B)

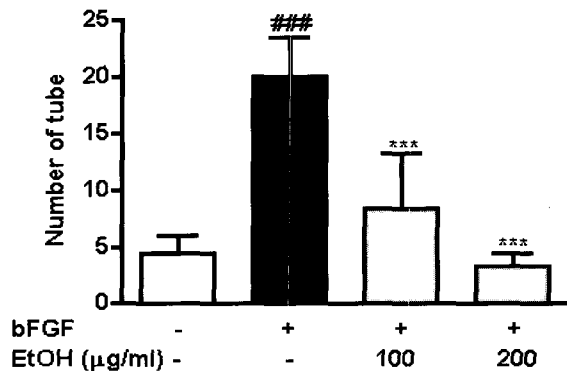


Fig. 5. Effect of EBJT on tube formation of HUVECs. (A): Photographs of tube formation of HUVECs (B): Graph of inhibitory effect of EBJT on tube formation of HUVECs

결론

혈관형성은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 일련의 과정으로 촉진제와 저해제의 균형에 의해 조절된다. 종양의 성장과 전이는 혈관에 의존적으로 일어나므로 혈관형성 저해제는 좋은 항암제가 될 수 있다. 따라서 보정방암탕의 에탄올 추출물로 혈관형성 저해작용을 실험을 하였다. 보정방암탕은 200 μg/ml이하에서는 혈관내피세포에 대한 독성을 나타내지 않고, 그 이하 농도에서 실험하였다. 본 실험에서는 혈관형성 촉진제로 잘 알려진 bFGF를 이용하여 혈관형성을 유도하였다. 결과 bFGF는 혈관내피세포의 증식, 이동, 튜브형성을 유도하였으며, 이는 보정방암탕의 처리에 의하여 모두 유의적으로 저해하는 것을 확인하였다. 이는 보정방암탕이 혈관형성의 저해제로서의 가능성을

- herbs supplementing Qi and blood. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 16, 499-506, 2002.
14. Lee, H.J., Lee, E.O., Oh, S.S., Ahn, K.S., Park, Y.D., Kim, S.H. Study on the anti-angiogenic activity of KMCKTE. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 18, 990-994, 2004.
 15. Lee, S.J., Saiki, I., Hayakawa, Y., Nunome, S., Yamada, H., Kim, S.H. Antimetastatic and immunomodulating properties of a new herbal prescription, Bojung-bangam-tang. Int. Immunopharmacol. 3(2):147-157, 2003.
 16. Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Minick, C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest. 52, 2745-2756, 1973.
 17. Jost, L.M., Kirkwood, J.M., Whiteside, T.L. Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. J Immunol Methods. 147, 153-165, 1992.
 18. Reynolds, A.R., Reynolds, L.E., Nagel, T.E., Lively, J.C., Robinson, S.D., Hicklin, D.J., Bodary, S.C., Hodivala-Dilke, K.M. Elevated Flk1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) Signaling Mediates Enhanced Angiogenesis in β 3-Integrin - Deficient Mice. Cancer Res. 64, 8643-8650, 2004.
 19. Grant, D.S., Kinsella, J.L., Fridman, R., Auerbach, R., Piasecki, B.A., Yamada, Y., Zain, M., 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. 153, 614-625, 1992.
 20. Hasan, J., Shnyder, S.D., Clamp, A.R., McGown, A.T., Bicknell, R., Presta, M., Bibby, M., Double, J., Craig, S., Leeming, D., Stevenson, K., Gallagher, J.T., Jayson, G.C. Heparin octasaccharides inhibit angiogenesis in vivo. Clin. Cancer Res. 11(22):8172-8179, 2005.