

# 생쥐의 동소이식 유방암에서 慈桃丸의 in vivo 전이암 성장 억제 및 혈관신생 억제 효과

심범상\* · 명유진 · 강 희

경희대학교 한의과대학 병리학교실

## Inhibitory Effects of Citaowan on Metastatic Cancer Growth and Angiogenesis in an Orthotopic Model of Breast Cancer

Bum Sang Shim\*, Eugene Myung, Hee Kang

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

To investigate the inhibitory effects of Citaowan (CTW) on the growth and angiogenesis of breast cancer in vivo. Orthotopic breast cancer model was established by injection of MDA-MB-231 cells into mammary fat pad of nude mice. Seven weeks after injection, CTW was orally administered at dose of 50, 100 mg/mouse every day for 40 days. Body weight, tumor volume, tumor apoptosis, microvessel density and tumor proliferation were evaluated, after the mice were sacrificed. The body weight and tumor volume were not significantly changed in CTW group compared with the control group. Tumor apoptosis, proliferation and microvessel density were significantly reduced in CTW group (100 mg /mouse) compared with the control group. These data indicate that CTW has anti-angiogenic and proapoptotic effects on breast cancer.

Key words : Citaowan, angiogenesis, metastastasis, apoptosis, microvessel density, proliferation, orthotopic breast cancer

### 서 론

癌은 세계적으로 사망원인의 1, 2위를 차지하는 질환으로 이를 정복하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다<sup>1)</sup>. 대부분의 암치료는 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 보고되었다<sup>2)</sup>. 이는 혈관신생이 암의 점진적인 성장을 위한 생물학적 과정일 뿐만 아니라 암의 형성과 신생에 있어서 전이와 침윤의 통로로 작용하기 때문이다<sup>3)</sup>. 따라서 新生血管의 生成을 抑制함으로써 암에 대한 酸素와 營養素 공급을 차단하여 암의 成長과 다른 臟器로의 轉移를 막기 위해 新生血管 生成의 억제가 治療目標로서 研究되고 있다<sup>4)</sup>. 이와 관련하여 최근 한의학에서도 다양한 약재와 처방을 이용하여 혈관의 신생을

억제하는 약물에 대한 실험적 연구가 활발히 이루어지고 있다<sup>5,6)</sup>.

慈桃丸은 慈桃丸은 乳房癌이나 腦腫瘍의 치료 후 재발을 예방하거나 수술, 방사선, 화학요법과의 병용치료에 활용되는 처방으로<sup>7)</sup> 이 제까지의 많은 연구가 in vitro에 머물며 따라 연구의 심화를 위해 in vivo 혈관신생 억제 연구가 필요한 실정이다<sup>8-10)</sup>. 유방암의 동소이식 모델에 대하여 Fidler 등은 암전이 동물모델에서 동소이식 (orthotopic transplantation) 방법이 중요함을 제시한 바 있고<sup>11)</sup>, Fu 등은 유방암의 동소이식 모델을 최초로 제시한 바 있다<sup>12)</sup>.

본 연구자는 자도환의 in vivo 종양 성장 억제 및 혈관신생 억제 효과를 평가하기 위하여 BALB/c-nu 마우스에 인간 유방암 세포인 MDA-MB-231세포를 이식후 종양성장 후에 자도환을 투여하여 종양조직의 성장 및apoptosis, microvessel density를 측정하여 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

### 실험방법

#### 1. 약물

실험에 사용한 한약재는 서울 경희의료원에서 구입한 후 정

\* 교신저자 : 심범상, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학

· E-mail : shimbs@khu.ac.kr · Tel : 02-961-9445

· 접수 : 2006/10/27 · 수정 : 2006/11/16 · 채택 : 2006/12/04

선하여 사용하였다. 이들 약재 69g을 3,000ml round flask에 증류수 2,000ml와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 2시간 동안 가열하여 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)에서 감압 농축한 뒤 1000ml round flask 에 옮겨 freezing dryer (Eyela, Japan)로 24시간 동안 동결 건조하여, g 의 분말을 얻어실험에 사용하였다. 처방의 내용과 분량은 아래와 같다.

Table 1. Composition of Citaowan

Chinese Name	Latin Name	Amount
山慈菇	<i>Cremastrae Appendiculatae Tuber</i>	25g
桃仁	<i>Persicae Semen</i>	25g
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	10g
海馬	<i>Hippocampus</i>	3g
鱉甲	<i>Trionycis Carapax</i>	3g
莪朮	<i>Zedoariae Rhizoma</i>	3g
Total amount		69g

2. 세포주

MDA-MB-231 인간 유방암 세포(한국세포주은행, 한국)를 10% FBS-DMEM, 5% CO<sub>2</sub>, 37℃에서 배양하였다. 세포가 80% confluent 해지면 0.25% Trypsin-0.02% EDTA로 수거한 후 10% FBS-DMEM으로 trypsin을 중화시키고 PBS로 3회 세척한 후 계대배양하였다.

3. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 4주된 BALB/c-nu 마우스이며 멸균상태로 관리되어온 것을 오리엔트(주)(CHARLES RIVER)에서 구입하였다. 실내온도 21-22℃, 실내습도 50%, 12시간의 명암주기, 멸균환경을 갖는 한외대 동물실험실에서 1주일간 적응시켰다. 사료는 방사선 멸균 처리한 실험동물용 사료를 정도산업(주)에서 구입하여 공급하였으며, 음용수는 멸균 처리한 증류수를 사용하였다. 사료와 음용수는 충분히 공급하여 자유롭게 섭취시켰다. 실험동물은 각각 대조군(control group, con), 자도환 50mg/mouse 투여군 및 자도환 100mg/mouse으로 분류하였다.

4. 유방암의 Orthotopic model

MDA-MB-231 세포를 trypan blue 염색을 통해 90% 이상의 viability를 확인한 후 동물에 주사하기 위하여 3×10<sup>6</sup>cells/ml로 PBS에 현탁시켰다. 마취하에 세포를 유두 바로 아래의 mammary fat pad에 30-gauge 바늘을 이용하여 주사하였다. 주사후 7일에 1회씩 원발암의 크기를 vernier caliper를 이용하여 측정하고, 체중을 측정하였다. 종양의 직경 (tumor diameter; TD)은 Pulaski의 방법<sup>13)</sup>에 준하여 계산하였다. 평균 TD 8.5±0.5 mm에 달한 시점에서 폐에 미세전이암이 발생한다는 Connolly의 보고<sup>14)</sup>를 참조하여 주사후 7주 경과한 시점에서 자도환 약물을 구강투여하였다. 약물투여 후 40일째, 동물을 희생하여 관류 고정시켰다. 실험동물을 깊게 마취시킨 다음 0.05M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 심장을 통해 혈액을 빼낸 뒤, 4℃ 0.1 M phosphate buffer에 녹인 4% paraformaldehyde (PFA, pH 7.4)로 관류 고정한 뒤 종양조직과 장기조직을 적출하

였다. 적출한 조직을 PFA에 담가 2일 동안 후고정 한 뒤, 30% sucrose 용액으로 탈수하여 freezing microtom (Shandon, England)을 사용하여 40μm두께로 절편 하였다.

5. Microvessel density의 측정

절편을 PBS에 세정하고 blocking solution (5% normal rabbit serum in PBS)로 30분간 blocking하였다. 절편을 1:100 비율로 희석한 goat anti CD31 (PECAM1-M20; Santa Cruz, USA) 항체 용액과 실온에서 90분간 반응시켰다. Blocking solution으로 10분간 세정후 PBS로 세정하였다. 2차 항체(Vectastain anti-goat kit, Vector labs)와 반응시킨 후 PBS로 세정하고 3,3'-diaminobenzidine (DAB)로 발색하였다. 흐르는 물에 수세한 후 대조염색으로 hematoxylin을 사용하고, 알콜로 탈수시킨 후 크실렌으로 투명하고 DPX로 봉입하였다. 각각의 절편은 200 배율 (×20 대물, ×10 접안)로 5곳을 측정하고 평균±표준편차로 표시하였다.

6. Tumor apoptosis 측정

절편 조직(40 μm)의 apoptotic cells는 in situ cell death detection kit (Boehringer Mannheim, UK)를 이용하여 염색하였다. DAB로 발색하고 hematoxylin으로 대조염색하였다. Apoptotic cells는 청색의 background에서 갈색으로 염색되며 과사한 세포는 쉽게 구별된다. Apoptosis의 측정은 400 배율에서 5 곳을 선정하여 염색된 세포의 수로 측정하였다.

7. Tumor proliferation 측정

세포증식은 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 면역 염색으로 측정하였다. 절편을 TBS에 세정하고 1:800 비율로 TBS에 희석한 mouse monoclonal anti PCNA antibody (Santa Cruz, USA) 용액과 실온에서 40분간 반응시켰다. 절편을 TBS로 세정 후 biotinylated goat anti mouse/rabbit immunoglobulin 과 반응시킨 후 DAB로 발색하였다. Hematoxylin으로 대조염색하고, 알콜로 탈수시킨 후 크실렌으로 투명하고 DPX로 봉입하였다. 세포증식 비율은절편당 400 배율에서 3곳을 측정하여 PCNA positive, negative 세포의 수를 측정하여 구하였다.

8. 통계

데이터는 평균±표준편차로 표시하였다. 데이터의 유의한 차이는 P<0.05 수준으로 하였다.

결과 및 고찰

한의학 문헌에서 腫瘍과 관련된 내용은 각종 病證에 포함되어 있으며, 서양의학에서의 癌癥과 어느 정도 그 표현이 일치하고 있다. 한의학에서는 암의 원인을 따로 다루는 것이 아니라, 일반적 질병발생의 원인인 六淫, 七情, 飲食傷, 痰飲, 瘀血 등으로 분류하고 있다. 암에 대한 한의학적 치료는 扶正培本法, 祛邪法, 扶正祛邪法의 세가지 방법을 응용하는데 이는 주로 免疫機能의

活性化 및 腫瘍成長抑制를 기대하는 치료법이다<sup>15)</sup>. 또한 최근 암 치료에 있어서 화학요법과 한약치료를 병행하는 것이 효과적임을 보고하는 사례는 매우 많으며, 우리나라에서는 주로 正氣를 보강할 수 있는 藥物과 處方에 대한 연구가 많이 이루어져 왔다.

최근에는 암의 전이를 억제하여 종양의 재발을 막기 위한 연구가 폭 넓게 이루어지고 있다<sup>16)</sup>. 전이에 대한 한의학적 치법은 活血化癥法, 清熱解毒法, 化痰軟堅法, 扶正培本法 등이 있는데, 이는 종양에 대한 한의학적 치법에서 벗어나지 않는다. 扶正祛邪를 통해 正氣를 강화하고 邪氣를 배출시키는 것이 종양의 전신적 확산을 막는 요체가 되는 것이며, 이러한 원칙하에 환자의 상태에 따른 辨證論治를 엄격히 적용하는 것이 재발을 방지하고 환자의 생존기간 중 삶의 질을 제고하는 방법이 된다.

전이는 암세포가 침윤성 성장을 하는 행위에서 비롯되지만, 혈관 역시 암세포의 성장을 위한 영양 공급과 전이의 통로를 제공한다는 점에서 종양 조직내로의 혈관신생을 억제하는 것이 인체에 대한 독성이나 부작용없이 종양의 성장을 막고 전이를 억제할 수 있는 효율적 수법으로 여겨지고 있다. 특히 한약은 인체에 대한 부작용이 거의 없기 때문에 이 부문 연구에서 관련 연구자들의 주목을 받고 있으며, 活血祛瘀 藥물이 혈관신생 관련 연구에서 좋은 성과를 거두고 있다.

慈桃丸은 『段鳳舞腫瘤積驗方』에 수록된 처방으로 乳房癌이나 腦腫瘍의 치료 후 재발을 예방하거나 수술, 방사선, 화학요법과의 병용치료에 활용되며 桃仁, 山慈菇, 白芍藥, 薏苡仁으로 구성되어 있다<sup>7)</sup>. 慈桃丸은 직접적인 항암효과는 약하지만 면역기구의 활성화를 통한 간접적인 항암효과가 있으며<sup>17)</sup>, 慈桃丸이 HT1080 등의 MMP-9 gelatinolytic activity, in vitro invasion을 저해한다<sup>18)</sup>. 慈桃丸에서 白芍藥을 去하고 鬱金, 海馬, 鱉甲을 더 하였을 때 혈관내피세포인 ECV304의 tube formation을 억제하고, 생쥐 대동맥, 닭의 유정란 등에서 혈관신생을 억제하는 결과<sup>8)</sup>에 근거하여 慈桃丸 구성약물의 혈관신생 억제효과를 평가한 결과 鬱金, 山慈菇, 桃仁의 억제효과가 뛰어나며 薏苡仁, 海馬, 鱉甲은 별다른 효과를 나타내지 못하였다<sup>9,10)</sup>. 다만 이러한 결과가 in vitro 연구에 그침으로써 in vivo 연구의 필요성이 높음에 따라 본 연구를 기획하게 되었다.

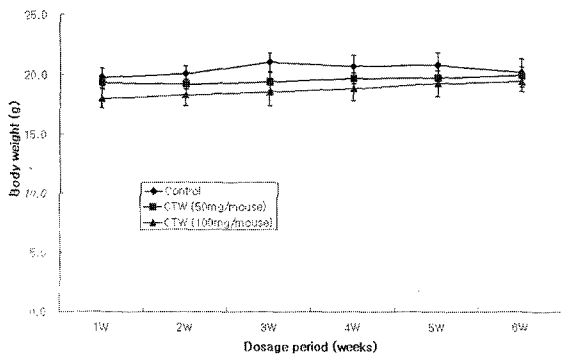


Fig. 1. Effect of CTW on body weight of mice injected with MDA-MB-231 cells.

BALB/c-nu 마우스에게 MDA-MB-231 이식후 7주 경과한

시점에서 40일간 약물을 투여하며 체중을 측정 한 결과, 대조군은 측정 1주의 체중이 19.8±0.7 g, 6주의 체중이 20.2±1.2 g, 자도환 50 mg 투여군은 측정 1주의 체중이 19.3±0.4 g, 6주의 체중이 20.0±0.7 g, 자도환 100 mg 투여군은 측정 1주의 체중이 18.0±0.8 g, 6주의 체중이 19.4±0.8 g으로 큰 차이를 보이지 않았다. 자도환은 in vitro 연구를 통해 독성이 없음이 밝혀진 바 있으나, 본 실험 결과 역시 자도환 투여 후 생쥐의 체중에 변화가 없어 자도환의 독성이 없음을 입증하는 자료로 생각된다.

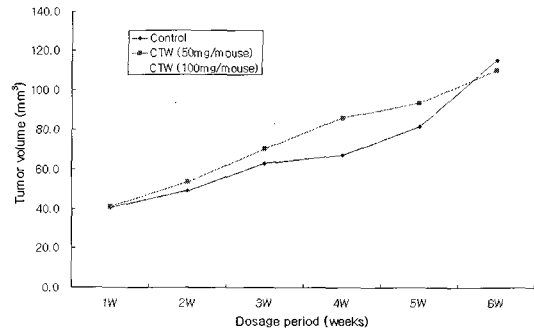


Fig. 2. Effect of CTW on tumor volume of mice injected with MDA-MB-231 cells.

BALB/c-nu 마우스에게 MDA-MB-231 이식후 7주 경과한 시점에서 40일간 자도환 투여후, 생쥐를 희생하여 종양의 크기를 측정 한 결과, 대조군은 측정 1주의 용적이 40.5±12.4 mm<sup>3</sup>, 6주의 용적이 115.4±36.9 mm<sup>3</sup>, 자도환 50 mg 투여군은 측정 1주의 용적이 41.0±30.9 mm<sup>3</sup>, 6주의 용적이 110.2±57.6 mm<sup>3</sup>, 자도환 100 mg 투여군은 측정 1주의 용적이 37.9±21.5 mm<sup>3</sup>, 측정 6주의 용적이 106.8±61.5 mm<sup>3</sup>로서 실험군의 유의한 차이가 인정되지 않았다. 이러한 결과는 종양이 생체에 완전히 자리 잡힌 후 약물을 투여했으며, 자도환의 in vitro 연구에서 독성 및 항암성이 없는 것으로 나타난 결과와 같은 것으로 생각된다.

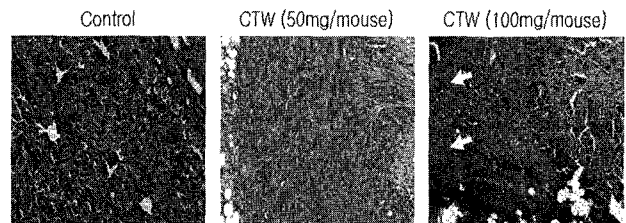


Fig. 3. Tumor apoptosis in orthotopic MDA-MB-231 breast cancer tumors. Microsections were stained with H&E and immunostained by in situ TUNEL method. X200 magnifications.

BALB/c-nu 마우스에게 MDA-MB-231 이식후 7주 경과한 시점에서 40일간 자도환 투여후, 생쥐를 희생하여 종양조직을 적출후 절편을 제작하고 PECAM-1 (CD31)을 면역염색하였다. 실험결과 대조군에 비해 CTW 50 mg/mouse 군에서는 PECAM-1의 발현이 현저히 억제되었고, CTW 100 mg/mouse 군에서는 50 mg 투여군에 비해 증가하였으나 대조군에 비해서는 감소된 소견이 관찰되었다.

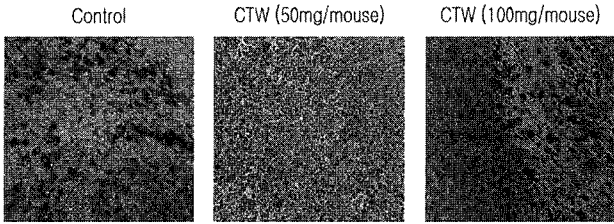


Fig. 4. Microvessel density in orthotopic MDA-MB-231 breast cancer tumors. Microsections were immunostained by PECAM. Brown color stained cells indicate endothelial cells. X400 magnification.

BALB/c-nu 마우스에게 MDA-MB-231 이식 후 7주 경과한 시점에서 40일간 자도환 투여 후, 생쥐를 희생하여 종양조직을 적출 후 절편을 제작하고 in situ TUNEL 방법으로 암세포의 apoptosis를 관찰하였다. 실험결과 대조군과 CTW 50 mg/mouse 군에서는 apoptosis가 관찰되지 않으나 CTW 100 mg/mouse 군에서는 apoptotic cell이 관찰되었다.

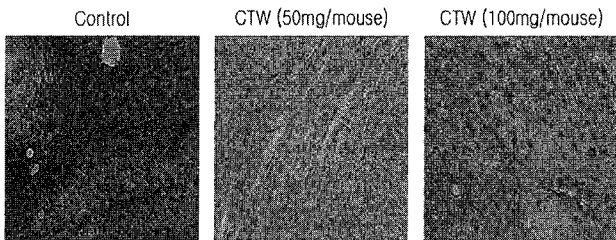


Fig. 5. Tumor proliferation in orthotopic MDA-MB-231 breast cancer tumors. Microsections were immunostained by PCNA. Brown color stained cells indicate proliferating cells. X400 magnification.

BALB/c-nu 마우스에게 MDA-MB-231 이식 후 7주 경과한 시점에서 40일간 자도환 투여 후, 생쥐를 희생하여 종양조직을 적출 후 절편을 제작하고 PCNA를 면역염색하였다. 실험결과 대조군에 비해 CTW 50 mg/mouse 군에서는 PCNA의 발현이 현저히 억제되었고, CTW 100 mg/mouse 군에서는 50 mg 투여군에 비해 더욱 발현이 억제된 소견이 관찰되었다.

위의 면역염색 실험결과들은 자도환이 암세포의 apoptosis를 유발하고 미세혈관 형성 및 암세포의 증식을 억제하는 것으로서 기존 임상 및 in vitro 연구 성과와 상응하는 결과로 여겨진다. 다만 이러한 효과는 약물의 투여 경로, 투여 시점, 다른 약제와의 비교 검토 등 앞으로 많은 과제를 시사해주고 있다.

## 결론

자도환의 in vivo 종양 성장 억제 및 혈관신생 억제 효과를 평가하기 위하여 BALB/c-nu 마우스에 인간 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포를 이식 후 종양성장 후에 자도환을 투여하여 종양조직의 성장 및 apoptosis, microvessel density를 측정하였다. 실험결과 자도환 투여군은 생쥐의 체중 및 종양조직의 크기에서 대조군에 비해 유의한 변화가 관찰되지 않았다. In situ TUNEL, PECAM-1 및 PCNA에 대한 면역염색 결과 자도환은 암세포의 apoptosis를 유발하고 미세혈관 형성 및 암세포의 증식

을 억제하는 것으로 나타났다. 다만 이러한 효과는 약물의 투여 경로, 투여 시점, 다른 약제와의 비교 검토 등 앞으로 많은 과제를 시사해주고 있다.

## 감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 신진교수연구과제 지원 (krf-2003-003-E00272)에 의하여 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학, 서울, 고문사. 1991.
2. Wilhelm, S.M., Collier, I.E., Marmer, B.L., Eisen, A.Z., Grant, G.A., Goldberg, G.I. 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(29):17213-17221, 1989.
3. O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79(2):315-328, 1994.
4. O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S. et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88(2):277-285, 1997.
5. Kang, D.I., Kim, S.H., Shim, B.S., Choi, S.H., Ahn, K.S. Study on the Angiogenic Inhibition Effects of Molyksan. *Korean Journal of Oriental Medical Pathology*, 14(2):91-107, 2000.
6. Sohn, J.G., Kim, S.H., Seok, D.S., Shim, B.S., Choi, S.H., Ahn, K.S. Effects of Huoluoxiaolindan on Anti-metastasis. *Korean Journal of Oriental Medical Pathology*, 14(2):182-198, 2000.
7. 趙建威. 段鳳舞腫瘤積驗方. 合肥: 安徽科學技術出版社, 1991.
8. Kang, H.S., Kim, S.H., Shim, B.S., Choi, S.H., Ahn, K.S. Study on the Angiogenic Inhibition Effects of Kamijadowhan. *Korean Journal of Oriental Medical Pathology*, 4(2):168-181, 2000.
9. Wang, T.C., Park, J.H., Yu, Y.B., Shim, B.S., Ahn, K.S., Choi, S.H. Study on the effects of Jiaweicitaowan ingredients on angiogenic inhibition. *Korean Journal of Oriental Medical Pathology*, 14(2):155-167, 2000.
10. Wang, T.C., Park, J.H., Yu, Y.B., Shim, B.S., Choi, S.H., Ahn, K.S. Study on the effects of Jiaweicitaowan ingredients on angiogenic inhibition (II). *Korean Journal of Oriental Medical Pathology*, 15(2):235-240, 2001.
11. Fidler, I.J., Naito, S., Pathak, S. Orthotopic implantation is essential for the selection, growth and metastasis of human renal cell cancer in nude mice [corrected]. *Cancer Metastasis Rev*, 9(2):149-165, 1990.

12. Fu, X., Le, P., Hoffman, R.M. A metastatic orthotopic-transplant nude-mouse model of human patient breast cancer. *Anticancer Res*, 13(4):901-904, 1993.
13. Pulaski, B.A. Ostrand-Rosenberg S. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. *Cancer Res*, 58(7):1486-1493, 1998.
14. Connolly, E.M., Harmey, J.H., O'Grady, T., Foley, D., Roche-Nagle, G., Kay, E. et al. Cyclo-oxygenase inhibition reduces tumour growth and metastasis in an orthotopic model of breast cancer. *Br J Cancer*, 87(2):231-237, 2002.
15. 최승훈. 동의종양학. 서울, 행림출판. 1995.
16. Shim, B.S., Park, K.K., Choi, S.H. Anti-metastatic effects of fuzhengfangaitang on human fibrosarcoma cells HT1080. *Am J Chin Med*, 31(2):235-246, 2003.
17. 全英秀. 加味慈桃丸의 항암 및 면역증강효과에 관한 실험적 연구. 서울: 경희대학교, 1998.
18. 최승훈, 정세영, 박건구. inventors; 암전이 억제 조성물. 대한 민국patent 291630. 14 March, 2001.