

# 加味慈桃丸 構成藥物의 血管新生 抑制效果에 관한 研究

왕덕중 · 강희 · 심범상 · 김성훈 · 최승훈 · 안규석

경희대학교 한의과대학 병리학교실 · 경희대학교 한의학연구소

## Study on the Effects of *Jiaweicitaowan* (加味慈桃丸) Ingredients on Angiogenic Inhibition

Teh-Chung Wang, Hee-Kang, Bum-Sang Shim, Sung-Hoon Kim,  
Seung-Hoon Choi, Kyoo-Seok Ahn

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University,  
Institute of Oriental Medicine, Kyunghee University

*Jiaweicitaowan* (JWCTW) has been used to inhibit recurrence and metastasis of cancer in clinical practice. Further study has shown its anti-metastatic and anti-angiogenic effects. By applying *in vitro* and *in vivo* anti-angiogenic evaluation model, the author assayed the each ingredients of JWCTW. The author performed the following experiments and the results are listed as below: Cell viability assay showed that the viability was almost identical between that of the control and that of the ingredients extract 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated, except of hexane fraction of *Curcuma Radix* (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2.0% of control), ethylacetate fraction (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 26.7%), butanol fraction (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 87.2%; 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 12.5%) of *Cremastrae appendiculatae Tuber*, water fraction of *Persicae Semen* (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 82.7%), ethylacetate fraction of *Hippocampus* (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 85.3%). The results of gelatin zymogram assay showed that the ingredients of JWCTW decreases the gelatinolytic activity of MMP-9 from ECV304, at the concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In *in vitro* invasion assay, the ingredients of JWCTW effectively inhibited the invasion of cancer cells as compared with the control (+PMA) groups. In capillary-like tube formation assay, the hexane and ethylacetate fractions

---

교신저자: 안규석 서울시 동대문구 회기동1번지

경희대학교 한의과대학 병리학교실

Tel: 02-961-0335 E-mail: ahnks@khu.ac.kr

of *Curcumae Radix*, *Cremastrae appendiculatae Tuber* and *Persicae Semen* showed the dramatic inhibition effects on tube formation of ECV304 at the concentration of 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . In *ex vivo* rat aortic ring assay, the hexane and ethylacetate fractions of *Curcumae Radix*, *Cremastrae appendiculatae Tuber* and *Persicae Semen* showed the inhibition effects on angiogenesis of rat aorta at the concentration of 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . According to the above research, the anti-angiogenic effects of the ingredients of JWCTW was proved and it suggested that the more effective prescription for anti-angiogenesis could be developed.

Key words : Jiaweicitaowan, angiogenesis, ECV304

본 논문은 아래의 저자로부터 전재를 허가받고 게재함

원문 : 왕덕중 외. 加味慈桃丸 構成藥物의 血管新生 抑制效果에 관한 研究.

동의생리병리학회지 제15권 2호 2001.

## I. 緒 論

암은 세계적으로 사망원인의 1·2위를 차지하고 있는 발생기전이 불확실한 질병중의 하나로, 암을 정복하기 위한 기초적 및 임상적 연구가 꾸준히 진행되고 있다<sup>1,3,7,12,13,17</sup>.

기존의 암치료는 주로 암세포에 대한 살상을 위주로 한 수술요법·방사선요법·화학요법 및 암의 특성에 따라 이들을 병용하는 방법을 시행하고 있다. 그러나 이와 같은 치료법만으로는 암의 정복에 한계가 있으며, 치료에 있어서도 부작용을 나타내는 경우가 많다<sup>3,5,7,13,52</sup>. 특히 현재 사용되고 있는 항암요법제의 대부분은 조혈 및 면역기능에 부작용을 초래하고 암세포 이외의 정상세포에도 독성을 나타내고 있다<sup>3,10,13</sup>. 따라서 이에 대한 문제점을 극복하기 위해 최근에는 apoptosis·cell differentiatiaion 및 angiogenesis 등을 활용한 다양한 연구가 진행되고 있다<sup>10</sup>.

특히 한국인에게서 자주 발생하는胃癌·肝癌·肺癌과 같은 악성 종양에서 신생혈관은 암세포의 성장을 위한 영양분 및 산소 공급, 암세

포의 전이를 위한 통로를 제공하는 역할을 하고 있다. 따라서 혈관형성을 억제하는 물질을 찾아 내어 암치료제로 개발함으로써 근본적으로 암세포가 성장하기 위해 필수적인 혈관형성을 억제하는 항암제를 개발할 수 있다<sup>1,14,15,60,67,71</sup>. 그러나 신생혈관의 억제 역시 제대로 조절하지 못하면關節炎·糖尿病性網膜症·血管腫·硬皮腫·畸形兒出産과 같은 예기치 못한 부작용을 낳을 수 있다는 문제를 안고 있다<sup>15,55,60</sup>. 따라서 최근에는 양약에 비해 상대적으로 부작용의 위험성이 적고, 인체의 면역증강효과가 있다고 인정되는 한약의 항암효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>8,10,13,16-19,21-27,29,48,49,52</sup>.

본 연구는 慈桃丸 및 그 加味方이 angiogenesis 억제효과를 나타낸다는 기존의 연구보고를 토대로, 혈관신생 억제 활성을 갖는 생리활성 물질 탐색을 하기 위하여 고안되었다. 慈桃丸은 《段鳳舞腫瘤積驗方》에 收載된 처방으로서 山慈姑·桃仁·白芍藥·薏苡仁으로 구성되어 있고, 임상에서 乳房癌이나 腦腫瘍의 치료 후 재발 방지 목적으로 사용되고 있다<sup>45</sup>. 본 연구에 사용된 처방은 기존의 실험연구를 토대

로 白芍藥을 去하고, 鬱金·海馬·鱉甲을 加味한 加味慈桃丸을 실험에 사용하였다<sup>20,28)</sup>.

본 실험에서 加味慈桃丸 구성약물의 혈관신생에 대한 억제효과를 평가하기 위하여 다단계 추출법으로 추출한 후, 이를 인체 정맥혈관 내 피세포로부터 확립된 ECV304세포에 투여하여 세포생존율·gelatin zymogram assay·in vitro invasion assay·capillary-like tube formation assay·aortic ring assay 등을 시행하여 다음과 같이 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

#### 1) 세포주

인간의 臍帶靜脈 세포를 불멸화시킨 ECV304 (ATCC CRL-1998)를 배양하여 실험에 사용하였다<sup>69,70)</sup>. ECV304는 medium 199에 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제 (penicillin 10 units/ml·streptomycin 10 µg/ml)를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다.

#### 2) 약물

실험에 사용된 加味慈桃丸 (Table 1)은 《段鳳舞腫瘤積驗方》<sup>45)</sup>에 수록된 加味慈桃丸에 白芍藥을 去하고, 鬱金·海馬·鱉甲을 加味한

**Table 1.** Composition of *Jiaweicitaowan* (加味慈桃丸)

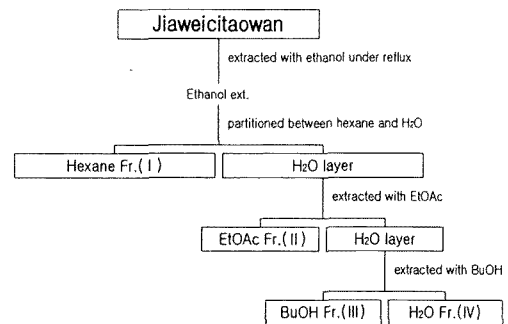
<i>Jiaweicitaowan</i> (加味慈桃丸)		
桃 仁	<i>Persicae Semen</i>	25g
山慈姑	<i>Cremastrae appendiculatae Tuber</i>	25g
薏苡仁	<i>Coisis Semen</i>	10g
海 馬	<i>Hippocampus</i>	3g
鬱 金	<i>Curcumae Radix</i>	3g
鱉 甲	<i>Trionycis Carapax</i>	3g
Total amount		69g

처방으로 경희대학교 한의과대학 부속 한방병원에서 구입하여 실험에 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1)분획과 추출물의 조제

절편한 加味慈桃丸의 구성약물 14.5 첵 분량인 1,000 g을 80% ethanol로 2회에 걸쳐 환류 추출하여 여과하고 60°C에서 감압농축하여 얻은 추출물을 Fig. 1에 따라 물에 녹여 차례로 hexane 분획 (I)·ethylacetate 분획 (II)·butanol 분획 (III) 및 water 분획 (IV) 등의 多段階抽出法으로 유효성분을 추출한 후 감압농축한 다음 동결건조 하여 각 분획의 추출물을 만들었다.



**Fig. 1.** Fractionation of extract from *Jiaweicitaowan* (加味慈桃丸)

#### 2) Viability assay

加味慈桃丸 구성 단미제 분획추출물의 세포독성과 실험 용량을 파악하기 위하여 ECV304에 시료를 처리한 후 Mosmann의 MTT assay로 cell viability를 측정하였고, Cell Titer 96<sup>TM</sup> Assay kit (Promega, U.S.A.)를 사용하였다<sup>64)</sup>. 먼저 ECV304를 2×10<sup>4</sup> cells/100 µl/well의 밀도로 96-well cell culture plate에 접종하여 24시간을 배양한 후 배양액을 serum free M-199로 교체하고, 여기에 시료를 각각 5·10·20·40 µg

/ml의 농도로 처리하여 20시간을 배양하였다. 그런 다음 tetrazolium dye solution 15  $\mu$ l/well을 첨가하여 4시간을 더 배양한 후, formazan 용해용액 100  $\mu$ l/well을 첨가하고 CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 12시간 정치시켜 formazan을 완전히 녹인 후, ELISA reader (Molecular Device, U.S.A.)를 이용해 측정과장 570 nm · 참고과장 650 nm로 측정하였다. 또한 한약시료의 갈색이 formazan 용해액의 보라색과 간섭을 일으킬 수 있으므로 한약시료 · 배양액 · dye solution · solubilization solution을 혼합하여 blank로 이용하였다. 세포생존율은 다음의 식으로 구하였다.

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{average of absorbance of sample (570 nm-650 nm-blank)}}{\text{average of absorbance of control (570 nm-650 nm-blank)}} \times 100$$

### 3) Gelatin zymogram assay

加味慈桃丸 구성약물의 분획추출물이 MMP-2 · -9의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 gelatin zymogram assay를 시행하였다.

ECV304를 6-well cell culture plate에  $5 \times 10^5$  cells/well로 seeding하여 2 ml 10% FBS M-199와 함께 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다. 그 후 1 ml PBS로 1회 세척하고 1 ml serum free M-199로 교체한 후 한약 시료를 투여하여 5 · 10 · 20 · 40  $\mu$ g/ml의 농도가 되도록 하였으며, control well에는 같은 양의 용매로서 methanol을 투여하여 CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다. 약물을 투여하고 12시간이 경과한 후에 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 투여하여 100 ng/ml의 농도가 되도록 하였으며, control well에는 같은 양의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 투여하였다. 그런 다음 12시간 동안 배양한 후 배양액을 취하여 1000 rpm, 4°C, 5분간 원심 분리하여 세포와 세포 조각을 침전시킨 후 상등액을 취하여

4°C에 보관하였다가 gelatin zymography를 시행하였다.

Gelatinase zymography는 Heussen과 Dowdle의 실험방법<sup>61)</sup>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 0.4 mg/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 CaCl<sub>2</sub> · 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> · 0.02% NaN<sub>3</sub>)에 담근 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.

### 4) Invasion assay

ECV304의 invasion activity측정은 transwell cell culture chamber를 이용하였다. ECV304를 6-well cell culture plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 세포 수로 접종하여 2 ml 10% FBS M-199와 함께 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음 well을 1 ml PBS로 1회 세척한 후 배양액을 1 ml의 serum free DMEM으로 교체하고, 여기에 한약 시료를 투여하여 최종 농도가 40  $\mu$ g/ml이 되도록 하였으며, control well에는 같은 양의 80% methanol을 첨가하여 12시간 동안 배양하였다.

12시간 후 well을 PBS로 세척하고 trypsin으로 세포를 박리시킨 후 한약 시료 40  $\mu$ g/ml과 PMA 100 ng/ml이 들어 있는 1 ml serum free M-199를 넣어 세포를 균일하게 현탁시켰다. 그

런 다음 세포 현탁액을 뽑아 hemocytometer로 측정하여 세포 수가  $5 \times 10^4$  cells/100  $\mu\text{l}$ 가 되도록 맞춘 후 membrane filter가 부착된 transwell chamber (pore size 8.0  $\mu\text{m}$ , Costar, U.S.A.)로 옮겨서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 24시간을 배양하였다.

Transwell의 membrane은 matrigel 5  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ 와 collagen 10  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ 로 위와 아래를 코팅하여 공기 중에서 건조시킨 후 PBS에 담갔다가 실험 직전에 다시 건조시킨 후 사용하였다.

Transwell chamber에서 24시간 동안 배양한 후 transwell의 upper chamber에 있는 media를 제거하고 transwell의 lower chamber를 70% methanol에 5분간 담가서 membrane을 통과한 세포를 고정시킨 후 1분간 증류수에 담가 methanol을 세척하였다. 그런 다음 다시 hematoxylin에 5분간 담근 후 증류수에 1.5분씩 2회 세척하고 0.5% (w/v) eosin (in 1% glacial acetic acid)에 30초 담근 후 증류수에 1분간 담근 후 95% ethanol에 2분간 2회 담가서 탈수시켰다. 이후 면봉을 이용하여 transwell의 upper chamber에 남아있는 세포를 닦아내고 역상현미경을 이용하여 400배율에서 염색된 세포의 숫자를 세었다.

세포수의 측정은 무작위로 12곳을 선정하여 접안렌즈의 격자 눈금을 기준으로 삼아 동일한 면적 ( $6.25 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ )의 염색된 세포의 수를 세었으며, 동일한 실험을 2회 반복하여 그 평균값을 각 실험군과 비교하였다.

### 5) Tube formation assay

24-well cell culture plate를 얼음 접시에 놓고 matrigel 220  $\mu\text{g}$  을 가한 후 spatula를 이용해 도포하였다. Matrigel을 바른 plate는 37°C incubator에 3~4시간 방치하고 matrigel이 굳도록 하였다. ECV304를 matrigel이 도포된 plate에  $8 \times 10^4$  cells/well로 접종하고 10% FBS M-199에 한약시료를 첨가하여 18시간동안 배양하였다. Control well에도 같은 양의 20% · 80%

methanol을 첨가하였다. 18시간 후 control well에 tube가 형성된 것을 확인한 후 20배율로 사진 촬영하였다.

### 6) Aortic ring assay

냉장실에서 overnight로 해동된 matrigel을 48-well cell culture plate에 120  $\mu\text{l}/\text{well}$  (11.46 mg/ml)로 coating한다. 이때 bubble이 생기지 않도록 조심한다. CO<sub>2</sub> 세포배양기에 coating한 well plate를 30~60 분간 두면 용액상태의 matrigel이 gel로 바뀐다.

Rat를 CO<sub>2</sub> asphyxiation시킨 다음 흉부를 sagittal section하여 diaphragm 위로 흉강이 노출되게 한 뒤 흉강 뒤쪽의 aorta를 찾아, 가위를 사용하여 aorta arch 밑을 자르고, 잘려진 부위를 핀셋으로 잡고 약간 들어주면서 가위로 뒷벽의 조직을 절개하면서 천천히 aorta를 분리시킨 후 3 cm 정도로 잘라낸 뒤 dish속의 Hank's balanced salt solution (HBSS)에 담그고, 잡다한 조직과 aorta 속에 blood를 제거한다.

위에서 준비된 rat의 aorta를 fine scissor를 사용하여 1 mm 미만의 두께로 잘라 ring으로 만든 후, matrigel이 도포된 48-well culture plate 각각의 well에 aorta ring을 하나씩 well 중앙에 놓고 50  $\mu\text{l}$ 의 matrigel을 추가로 주입하여 ring을 완전히 덮어준다. 이때에도 bubble이 생기지 않도록 조심한다. 그런 다음 CO<sub>2</sub> 세포배양기에 30분간 넣어둔다.

CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양한 후, 한약시료와 endothelial cell growth supplement (ECGS)를 함유한 human endothelial-SFM basal growth medium 200  $\mu\text{l}$ 를 넣어준다. 한약시료는 이전 실험에서 유효한 결과를 보인 鬱金 · 山慈姑 · 桃仁의 hexane 및 ethylacetate 분획추출물 총 6가지의 약물을 5 · 10 · 20 · 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 투여하였으며, 각 시료에 대한 실험은 2배수로 실시하였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 5일 동안 배양하였다. 실험 4일째 되는 날 aortic

ring이 불안정한 것 같으면 100  $\mu\text{l}$ 의 fresh media를 더 첨가해 주었다. 5일째 되는 날, 혈관의 형성정도를 관찰한 후, 현미경 (Olympus, Japan)상에서 4배율로 사진 촬영하였다.

### III. 實驗成績

#### 1. 세포 생존능력에 미치는 영향

加味慈桃丸 구성약물의 실험 용량을 결정하기 위하여 먼저 ECV304세포를 이용하여 MTT assay로 세포생존율을 구하였다 (Table 2, Fig. 2).

실험결과 加味慈桃丸 구성약물 분획추출물의 대부분이 약물 처리시에 세포생존율이 대조군보다 상승하였거나 대조군과 근사한 측정값을 보여주고 있다. 그러나 鬱金の hexane 분획추출물은 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리시에 대조군 대비 세포생존율 129.6%에서 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리시에 생존율 2.0%로

가장 급격한 저하를 나타내었다. 또한 대조군에 비하여 세포생존율 90%이하로 저하된 것으로는 山慈姑 ethylacetate 분획추출물 26.7% (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 山慈姑 butanol 분획추출물 87.2% (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) · 12.5% (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 桃仁 water 분획추출물 82.7% (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 海馬 ethylacetate 분획추출물 85.3% (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )였다. 이를 제외한 모든 약물의 세포생존율이 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않음에 따라 이후 실험의 용량을 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 진행하여 각 약물의 효과를 비교하여 보았다.

#### 2. Gelatinolytic activity 억제기전에 미치는 영향

ECV304세포에 加味慈桃丸 구성약물의 분획추출물을 24시간 처리하였을 때, 약물이 ECV304세포에서 분비되는 gelatinase의 gelatinolytic activity에 미치는 영향을 평가하기

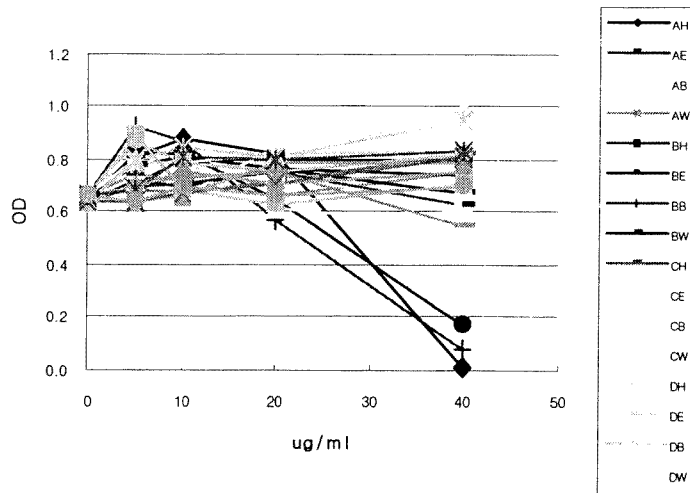


Fig. 2. Effects of the ingredients of JWCTW on the cell viability of ECV304

H: hexane E: ethylacetate B: butanol W: water  
A: *Curcumae Radix* B: *Cremastrae appendiculatae Tuber*  
C: *Persicae Semen* D: *Coisis Semen*  
E: *Hippocampus* F: *Triornycis Carapax*

**Table 2.** Effects of the ingredients of JWCTW on the cell viability of ECV304

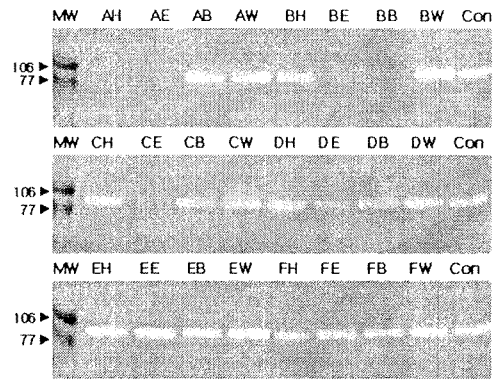
	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	0	5	10	20	40
AH	0.638±0.017*	0.811±0.052	0.884±0.024	0.827±0.044	0.013±0.000
AE	0.638±0.017	0.708±0.024	0.798±0.013	0.796±0.050	0.805±0.057
AB	0.658±0.010	0.822±0.062	0.763±0.018	0.794±0.016	0.989±0.035
AW	0.658±0.010	0.744±0.038	0.715±0.040	0.662±0.016	0.755±0.046
BH	0.638±0.017	0.721±0.088	0.702±0.054	0.762±0.027	0.745±0.085
BE	0.638±0.017	0.822±0.029	0.818±0.028	0.646±0.069	0.170±0.022
BB	0.658±0.010	0.929±0.022	0.870±0.041	0.574±0.069	0.082±0.055
BW	0.658±0.010	0.782±0.066	0.813±0.036	0.769±0.042	0.680±0.129
CH	0.638±0.017	0.687±0.010	0.669±0.089	0.719±0.035	0.819±0.087
CE	0.638±0.017	0.674±0.038	0.668±0.156	0.848±0.047	0.874±0.069
CB	0.658±0.010	0.702±0.037	0.754±0.168	0.733±0.076	0.636±0.043
CW	0.658±0.010	0.803±0.012	0.749±0.079	0.619±0.136	0.545±0.082
DH	0.638±0.017	0.784±0.143	0.794±0.117	0.828±0.022	0.837±0.025
DE	0.638±0.017	0.802±0.070	0.845±0.058	0.815±0.071	0.948±0.108
DB	0.658±0.010	0.873±0.034	0.791±0.058	0.751±0.026	0.820±0.048
DW	0.658±0.010	0.663±0.048	0.675±0.033	0.658±0.026	0.608±0.135
EH	0.638±0.017	0.696±0.024	0.710±0.024	0.759±0.024	0.625±0.030
EE	0.638±0.017	0.705±0.035	0.731±0.018	0.757±0.023	0.544±0.094
EB	0.658±0.010	0.695±0.017	0.758±0.038	0.712±0.023	0.759±0.010
EW	0.658±0.010	0.896±0.041	0.689±0.017	0.624±0.017	0.711±0.023
FH	0.638±0.017	0.645±0.024	0.666±0.029	0.787±0.063	0.790±0.053
FE	0.638±0.017	0.644±0.005	0.679±0.028	0.704±0.040	0.810±0.023
FB	0.658±0.010	0.683±0.035	0.809±0.036	0.798±0.050	0.839±0.022
FW	0.658±0.010	0.638±0.011	0.693±0.036	0.666±0.016	0.695±0.008

\* : O.D.±S.D.

H: hexane E: ethylacetate B: butanol W: water  
 A: *Curcumae Radix* B: *Crematrae appendiculatae Tuber*  
 C: *Persicae Semen* D: *Coisis Semen*  
 E: *Hippocampus* F: *Triornycis Carapax*

위하여 gelatin zymogram assay를 시행하였다 (Fig. 3·4).

실험결과 山慈姑의 hexane·ethylacetate와 山慈姑의 ethylacetate·butanol, 桃仁의 ethylacetate 분획추출물에서 MMP-9의 band가 완전히 사라졌으나 viability를 고려하면 山慈姑와 桃仁의 ethylacetate 분획추출물은 대조군 대비 세포생존율이 각각 126.3%·137.0%로서 MMP-9에 대한 분명한 gelatinolytic activity 저해 효과를 나타내고 있다. 또한 薏苡仁의



**Fig. 3.** Gelatin zymogram of ECV304 cells which was treated with the ingredients (40  $\mu\text{g/ml}$ ) of the Jiaweicitaowan for 24 hours, and 100 ng/ml of PMA for 12 hours.

MW: represents molecular weight marker in kilodalton unit  
 Con: control

H: hexane E: ethylacetate B: butanol W: water  
 A: *Curcumae Radix* B: *Crematrae appendiculatae Tuber*  
 C: *Persicae Semen* D: *Coisis Semen*  
 E: *Hippocampus* F: *Triornycis Carapax*

ethylacetate·蟹甲의 hexane 분획추출물이 대조군의 band에 비하여 약화된 모습을 보여 주고 있어서 일정한 MMP-9 저해 효과가 있는 것으로 평가된다. 그러나 海馬는 모든 분획추출물에서 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았거나 오히려 더욱 진한 band가 나타났다 (Fig. 3).

鬱金·山慈姑·桃仁의 효과를 정확히 평가하기 위하여 각기 hexane·ethylacetate 분획추출물을 농도별로 처리한 후 다시 gelatin zymogram을 시행하였다. 실험결과 (Fig. 4) 鬱金の hexane 분획추출물은 20  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 MMP-9 저해 효과가 나타났고, ethylacetate 분획추출물은 10·20·40  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 MMP-9 band가 사라져서 가장 강한 효과를 나타내었다. 山慈姑의 hexane 분획추출물이 그 다음으로 강한 효과를 보여 주었는데, 10  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 PMA에 의하여 induction된 band가 대조군

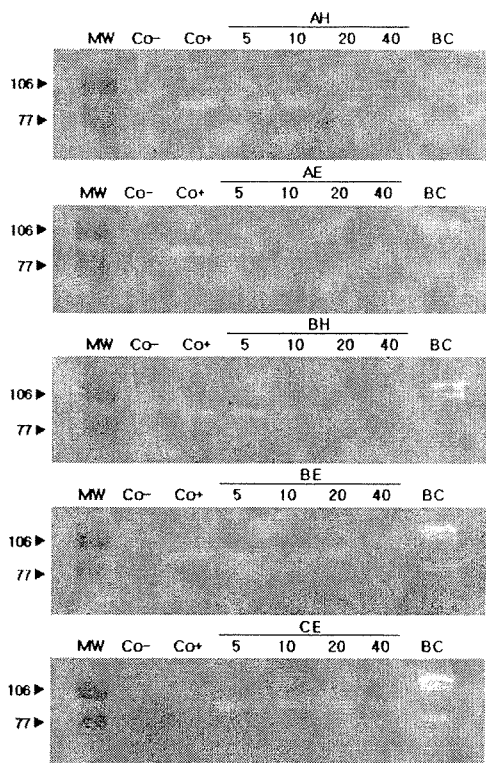


Fig. 4. Gelatin zymogram of ECV304 cells which was treated with the ingredients of the Jiaweicitaowan for 24 hours.

Co-: control treated without PMA

Co+: control treated with PMA

BC: bacterial collagenase

H: hexane E: ethylacetate

A: *Curcumae Radix*

B: *Crematastrae appendiculatae Tuber*

C: *Persicae Semen*

(Co<sup>+</sup>)에 비하여 약화되었고, 20·40 μg/ml 농도에서는 역시 band가 사라졌다. 또한 山慈姑의 ethylacetate 분획추출물은 10·20 μg/ml 농도에서 대조군에 비하여 band가 약화되었고, 40 μg/ml 농도에서는 band가 사라졌으나 40 μg/ml에서의 세포생존율이 26.7%에 불과해 별 의의는 없는 것으로 생각된다. 桃仁의 ethylacetate 분획추출물은 20 μg/ml 농도까지는 대조군과 비슷한 정도의 band가 나타나다가 40 μg/ml 농도에서는 약화된 band가 나타나고 있다.

### 3. Invasion 억제기전에 미치는 영향

혈관내피세포에 의하여 혈관신생이 이루어지는 과정은 암세포가 전이되기 위한 과정과 유사하다. 특히 혈관내피세포가 혈관벽을 구성하는 기저막을 통과해야 하는 것은 암세포가 혈관 내로 들어가기 위한 과정과 그 방향에서 차이가 있을 뿐 본질적으로 동일한 과정이다.

加味慈桃丸 구성약물의 혈관신생 과정에서 혈관내피세포의 침윤 억제효과를 평가하기 위하여 ECV304세포를 matrigel로 도포한 transwell에 접종하여 24시간 동안 배양한 후 transwell을 통과한 세포의 수를 측정하였다. 침윤 세포의 수를 증폭시키기 위하여 PMA 100 ng/ml을 사용하였다.

실험결과 아무 것도 처리하지 않은 대조군 (Con<sup>-</sup>)의 침윤 세포수는 14.5±5.9이며, PMA를 첨가한 대조군 (Con<sup>+</sup>)의 침윤 세포수는 39.9±13.3으로서 275%가 증가하였다. PMA를 첨가한 대조군 (Con<sup>+</sup>)을 기준으로 할 때, 침윤 세포수가 대조군과 비슷한 정도를 나타내는 것은 鱉甲의 water 분획추출물 (39.7±9.6) 뿐이고 전체적으로 일정하게 침윤 세포수가 감소된 것을 보여주고 있다.

특히 대조군의 50%이하로 감소한 것은 鬱金の hexane 분획추출물 14.1±5.8 (35% of control+PMA), 山慈姑의 water 분획추출물 18.8±12.2 (47%), 桃仁의 hexane 분획추출물 12.0±6.5 (30%), 桃仁의 ethylacetate 분획추출물 11.7±4.2 (29%), 桃仁의 butanol 분획추출물 12.2±7.3 (31%), 薏苡仁의 hexane 분획추출물 13.4±6.9 (34%), 薏苡仁의 butanol 분획추출물 19.5±4.5 (49%), 鱉甲의 ethylacetate 분획추출물 14.0±3.8 (35%)이었다 (Table 3, Fig. 5·6).



**Table 3.** Effects of the ingredients (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of JWCTW on the invasive activity of ECV304

	Con-	40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of JWCTW ingredients			
	14.5 $\pm$ 5.9 <sup>a)</sup>	hexane	ethylacetate	butanol	water
Con+	39.9 $\pm$ 13.3				
<i>Curcumae Radix</i>		14.1 $\pm$ 5.8	21.1 $\pm$ 9.0	20.6 $\pm$ 7.7	22.2 $\pm$ 5.8
<i>Cremastrae appendiculatae Tuber</i>				34.7 $\pm$ 7.7 <sup>b)</sup>	18.8 $\pm$ 12.2
				22.9 $\pm$ 6.6 <sup>c)</sup>	
<i>Persicae Semen</i>	29.8 $\pm$ 24.4		12.0 $\pm$ 6.5	11.7 $\pm$ 4.2	12.2 $\pm$ 7.3
<i>Coisis Semen</i>	13.4 $\pm$ 6.9		20.1 $\pm$ 12.8	19.5 $\pm$ 4.5	21.1 $\pm$ 12.7
<i>Hippocampus</i>	19.9 $\pm$ 6.0		21.1 $\pm$ 11.4		30.9 $\pm$ 9.7
<i>Trionycis Carapax</i>	28.8 $\pm$ 7.6		14.0 $\pm$ 3.8	23.1 $\pm$ 6.6	39.7 $\pm$ 9.6

a): mean $\pm$ S.D.

b): 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of butanol extract

c): 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of butanol extract

A: *Curcumae Radix*

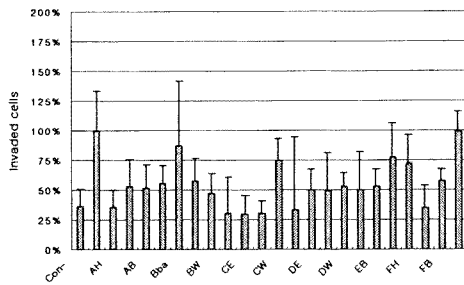
B: *Cremastrae appendiculatae Tuber*

C: *Persicae Semen*

D: *Coisis Semen*

E: *Hippocampus*

F: *Trionycis Carapax*



**Fig. 5.** Effects of the ingredients of JWCTW on the invasive activity of ECV304

H: hexane E: ethylacetate B: butanol W: water

BBa: 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of butanol extract

BBb: 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of butanol extract

A: *Curcumae Radix*

B: *Cremastrae appendiculatae Tuber*

C: *Persicae Semen*

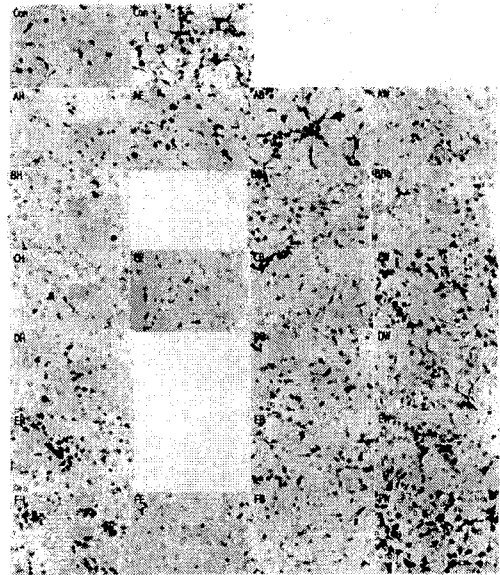
D: *Coisis Semen*

E: *Hippocampus*

F: *Trionycis Carapax*

#### 4. Tube formation 억제기전에 미치는 영향

혈관신생은 혈관내피세포가 원격부위로 이동한 후, 세포의 외기질에 부착하여 capillary tube를 형성함으로써 완성된다. 加味慈桃丸 구성약물의 angiogenesis 억제효과를 평가하기 위하여,



**Fig. 6.** Effects of the ingredients of JWCTW on the invasive activity of ECV304

Con-: control treated with PBS

Con+: control treated with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of PMA

H: hexane E: ethylacetate B: butanol W: water

A: *Curcumae Radix*

B: *Cremastrae appendiculatae Tuber*

C: *Persicae Semen*

D: *Coisis Semen*

E: *Hippocampus*

F: *Trionycis Carapax*

ECV304를 matrigel이 도포된 24-well plate에서 배양하여 tube formation을 유도한 후, 접종과

동시에 한약을 처리한 실험군과 대조군을 비교하여 보았다.

실험결과 한약 시료의 용매로 쓰인 methanol을 처리한 대조군에서는 capillary tube가 잘 형성되어 있음을 볼 수 있다. 한약을 처리한 실험군에서 鬱金の hexane · ethylacetate, 山慈姑의 hexane · ethylacetate 분획추출물 투여군에서는 capillary tube가 완전히 degradation 되었고, ECV304의 형태학적 변화는 한약 처리에 의한 cell death 소견을 보여주고 있다. 加味慈桃丸 구성약물 중에서는 鬱金 · 山慈姑 · 桃仁의 tube formation 억제효과가 뛰어나고, 특히 鬱金の ethylacetate, 山慈姑의 hexane 분획추출물 투여군에서 가장 우수한 효과를 나타내고 있으며, 각 한약물의 분획추출물은 대체로 hexane ·

ethylacetate 분획추출물이 tube formation 억제 효과가 있음을 보여 주고 있다 (Fig. 7).

## 5. Rat aortic ring의 신생혈관 억제기전에 미치는 영향

加味慈桃丸 구성약물의 angiogenesis 억제효과를 *in vivo*에서 평가하기 위해 rat aortic ring의 신생혈관 억제에 미치는 영향에 대해 실험하였다.

생체의 혈관은 상처를 받으면 스스로 혈관을 형성하여 치유하는 능력이 있다. 여기서는 rat aorta를 적출하여 1 mm 이하의 두께로 잘라 생체내부환경과 비슷하게 하기 위해 matrigel 속에 매립하여 배양하였다. 또한 angiogenesis 억제효과를 실험하는 것이므로 human endothelial-SFM basal growth medium에 ECGS를 추가하여 혈관신생을 촉진하였다. 신생혈관은 대동맥의 剖面에서 자라난다.

실험결과 (Fig. 8) ECGS를 처리한 대조군 (+control)에서는 모세혈관이 잘 형성되어 있고, ECGS를 처리하지 않은 대조군(-control)에서는 모세혈관의 형성이 빈약함을 관찰할 수 있다.

실험군에서는 鬱金 · 山慈姑 · 桃仁의 hexane 및 ethylacetate 분획추출물 총 6가지 약물을 5 · 10 · 20 · 40  $\mu\text{g/ml}$  농도로 투여하였는데, 40  $\mu\text{g/ml}$  농도로 투여한 군에서는 모두 대조군(-control) 보다 모세혈관의 형성이 더 억제되어 있었다. 5 · 10 · 20  $\mu\text{g/ml}$  농도로 투여한 실험군에서는 약물에 따라 혈관신생 억제효과가 서로 차이를 보이는데, 鬱金の hexane 및 ethylacetate 분획추출물, 山慈姑의 ethylacetate 분획추출물에서 혈관신생 억제효과가 나타났다. 특히 鬱金の ethylacetate 분획추출물은 5  $\mu\text{g/ml}$  농도를 투여한 실험군에서부터 그 효과가 나타나며 다른 약물에 비해 혈관신생 억제효과가 현저함을 관찰할 수 있었다.

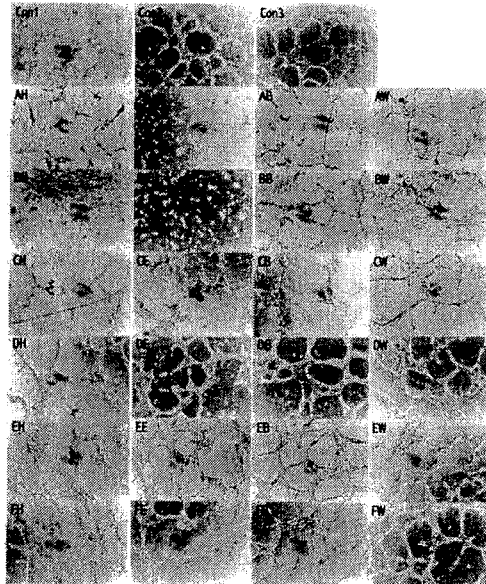


Fig. 7. Effects of the ingredients of JWCTW on capillary tube formation of ECV304

Con1: control treated with PBS

Con2: control treated with 8  $\mu\text{g}$  of methanol

Con3: control treated with 32  $\mu\text{g}$  of methanol

H: hexane E: ethylacetate B: butanol W: water

A: *Curcumae Radix* B: *Cremastrae appendiculatae Tuber*

C: *Persicae Semen* D: *Coisus Semen*

E: *Hippocampus* F: *Trionycis Carapax*

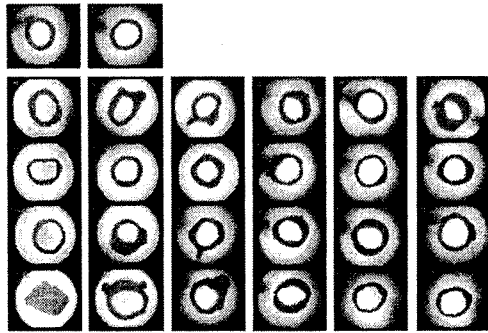


Fig. 8. Effects of the ingredients of JWCTW on Rat Aortic Ring Assay

Con+: control treated with ECGS  
 Con-: control treated without ECGS  
 H: hexane E: ethylacetate B: butanol W: water  
 A: *Curcumae Radix* B: *Cremastrae appendiculatae Tuber*  
 C: *Persicae Semen* H: hexane  
 E: ethylacetate  
 Dose: 5 · 10 · 20 · 40 μg/ml of ingredients, and 200μg/ml ECGS

#### IV. 考 察

한의학에서는 종양에 대해 이미 오래 전부터 인식해 왔으며, 암이라는 용어로서 명명하기보다는 腫塊의 위치나 특성·주요증상에 따라 다양한 병명을 부여하였다. 한의학적으로 종양의 원인은 원발성과 속발성으로 분류되는데, 원발성 병인은 風·寒·濕·燥·火의 外感원인과 情志·飲食의 內傷원인을, 속발성 병인은 痰飲과 瘀血을 포함한다.<sup>7,17)</sup>

이러한 六淫·七情·飲食·痰飲·瘀血 등 병인이 인체에 작용하여 종양을 형성하는 病機는 氣滯血瘀·痰結濕聚·熱毒內蘊·臟腑失調·氣血虧虛·經絡瘀阻 등으로 개괄되며<sup>7,17)</sup>, 치료법으로는 辨證論治에 근거한 扶正과 祛邪의 輕重緩急을 조절하는 이론을 바탕으로 正氣의 補養을 위주로 하면서 破積·活血·解鬱·行氣 등의 治法을 겸용하고 있다. 특히 최근에는 健脾益氣法을 위주로 한 扶正祛邪法과 扶正培本法이 많이 이용되고 있으며, 祛邪의 방

법으로는 活血化癥法·清熱解毒法·軟堅散結法 등이 활용되고 있다.<sup>7,31,33,39)</sup>

慈桃丸은 《段鳳舞腫瘤積驗方》에 乳房癌이나 腦腫瘍의 치료 후 재발을 예방하거나 수술·방사선·화학요법과의 병용치료에 활용되어 지고 있는 것으로 收載되어 있으며<sup>45)</sup>, 실험적 연구에서도 유의성 있는 항암 및 면역증강효과가 있는 것으로 보고된 바 있다<sup>20,28)</sup>. 본 처방은 그 加味方으로 山慈姑·薏苡仁·桃仁·鬱金·鱉甲·海馬의 6가지 活血化癥·清熱解毒·軟堅散結작용이 있는 약물로 구성되어 있다.

加味慈桃丸 구성약물의 효능을 살펴보면, 山慈姑는 清熱解毒·消癰散結하여, 각종 癰疽나 惡瘡·癩癧·結核 등에 효과가 있으며<sup>6,46)</sup>, 山慈姑의 활성성분인 colchicine은 tubulin의 활성을 저해하고, 적당한 농도에서 방추체의 형성을 억제하며 염색체의 단축화를 유도하는 세포주기 특이성 약물로서 종양의 성장을 억제시킨다<sup>30,37)</sup>. 또한 肝癌·위저종양에 약 60%의 억제율을 보였으며, 乳房癌 및 子宮癌의 치료에서도 일정한 효과를 거두었다<sup>34,35,41,42)</sup>. 桃仁은 活血祛瘀·潤腸通便하여 癥瘕痞塊 등에 효과가 있고<sup>6,46)</sup>, 알콜 추출물에서는 항혈액응고작용과 약한 용혈작용이 있다<sup>20)</sup>. 활성성분인 amygdalin은 종양환자의 貧血을 개선시키고 疼痛을 완화한다. 다른 藥物과 配伍하여 사용하였을 때에는 腦腫瘍·骨腫瘍·鼻咽腔癌 등에 유효한 것으로 보고된바 있다<sup>34,35,40,41)</sup>. 薏苡仁은 利濕健脾·清熱排膿하여 水腫·脚氣·肺癰·腸癰 등에 효과가 있고<sup>6,46)</sup>, 활성성분인 coixenolide는 암세포에 대해 살상 및 억제작용이 있어 肺癌·腸癌·胃癌·子宮頸部癌·絨毛膜上皮癌 등에 유효한 것으로 보고된 바 있다<sup>34,35,37,40,41)</sup>. 鬱金은 行氣化癥·清心解鬱·利膽退黃하여<sup>6,34,46)</sup>, 肝癌·乳房癌·胃癌·食道癌·膀胱癌 등에<sup>34,35,41)</sup>, 海馬는 補腎壯陽·調氣活血하여 癥瘕積聚·疔瘡腫毒 등에 효과가 있고<sup>6,46)</sup>, 다른 항암약물과

配伍하여 肝癌·大腸癌·乳房癌·皮膚癌에 활용되고 있다<sup>41,44</sup>). 鱉甲은 滋陰潛陽·軟堅散結하여, 陰虛發熱이나 癥瘕의 치료에 활용되고<sup>6,46</sup>), 부인과의 양성종양을 연화하고 축소시키기 때문에 子宮筋腫·卵巢囊腫에 사용된다<sup>34,35,41</sup>).

이와 같은 효능을 가진 약물들로 구성된 加味慈桃丸은 대체적으로 氣滯로 인한 瘀血에 대하여 活血·祛瘀·理氣·止痛하는 치료효과가 있음을 알 수 있다. 또한 최근의 연구 보고에 의하면 악성종양의 angiogenesis에는 혈액의 응고가 관여한다는 보고가 있으며<sup>9,11,68,73</sup>), 혈액의 응고와 악성종양은 한의학의 어혈에 해당한다는 기존의 연구보고<sup>2,13,32,36,39,43</sup>)가 있기 때문에 活血祛瘀효과가 있는 加味慈桃丸이 angiogenesis 억제효과가 있을 것으로 사료된다.

1971년 Folkman에 의해서 원발성 종양이 존재할 경우 혈액 속에 혈관형성을 억제하는 물질이 존재한다는 가정아래 처음으로 anti-angiogenic therapy가 암치료를 위한 수단으로 등장한 이래<sup>58</sup>), 1985년에는 Harvard의대의 Vallee 등에 의해 혈관신생 유도단백질인 angiogenin이 사람의 腺癌細胞의 배양액으로부터 최초로 분리되었고<sup>10</sup>), 1994년에는 원발성 종양을 갖고 있는 쥐의 혈청과 오줌으로부터 38kDa의 angiostatin을 분리해내어 혈관신생 억제효과를 확인했으며<sup>63</sup>), 1997년에는 20kDa의 endostatin이라는 물질을 분리해내어 혈관내피세포의 성장을 억제하는 효과를 확인하였고, 1998년에는 NCI에서 공식적으로 angiostatin과 endostatin을 동시에 투여하여 쥐에 유발된 종양의 성장을 억제함을 발표함으로써, 종양의 angiogenesis 억제가 새로운 종양 치료방법으로 세계적인 관심을 끌게 되었다<sup>15,59,63,65</sup>).

현재까지 알려진 혈관신생 억제제는 thalidomide<sup>56,57</sup>)·angiostatin<sup>63</sup>)·endostatin<sup>65</sup>)·2-methoxyestradiol<sup>53</sup>)·TNP-470<sup>53,54,62,66,72</sup>) 등 11종 화합물이 angiogenesis와 관련하여 임상실험 중에 있는 것으로 알려져 있으며, 이중

TNP-470은 이미 동물실험을 끝내고 두 번째 임상실험을 진행 중에 있는데 매우 효과적임 것으로 학계에 보고되고 있다<sup>53,54,62,66,72</sup>).

이와 같이 혈관신생을 조절하는 물질을 찾아내어 항암제로 개발하려는 가장 큰 이유는 암세포에 대하여 직접적으로 작용하여 암세포를 죽이기보다는 암세포가 성장하기 위해서 필수적인 혈관신생을 원천적으로 억제함으로써 부작용이 없는 이상적인 항암제를 개발할 수 있다는 점이다<sup>14</sup>). 그러나 신생혈관 억제를 위한 신약개발은 신물질 개발의 어려움과 함께 임상적용 단계에서 예기치 못한 부작용이 발생할 수 있는 문제를 안고 있기 때문<sup>15,55,60</sup>)에 이에 비해 상대적 부작용에 대한 위험성이 적고, 인체의 면역증강효과가 있다고 인정되는 한약의 항암효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>8,10,13,16-19,21-27,29,48,49,52</sup>).

최근까지 발표된 실험적 연구로서 桂枝<sup>19</sup>)·鬱金<sup>22</sup>) 등 단미제가 angiogenesis의 억제효과가 있는 것으로 보고되었으며, 처방으로는 加味慈桃丸<sup>20</sup>) 외에도 沒藥散<sup>18</sup>)·活絡效靈丹<sup>21</sup>)·扶正防癌湯<sup>24</sup>)·立安散<sup>26</sup>)·桃紅四物湯加減方<sup>29</sup>) 등이 혈관신생 억제효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.

기존의 연구보고된 加味慈桃丸의 구성약물 및 복합처방에 대한 항암 및 신생혈관 억제효과를 살펴보면, 成<sup>22</sup>)은 鬱金の angiogenesis 억제효과를 관찰하기 위하여 MTT방법에 의한 세포 생존을 측정·세포 부착 저지 효과 측정·DNA fragmentaion analysis·nuclear condensation assay·FACScan assay·angiogenesis inhibition assay·immunocytochemistry analysis·RT-PCR for mRNA expression·western blot analysis에 대한 실험을 시행한 결과, 鬱金으로 인해 ECM와 integrin αvβ3의 발현이 저해되고, 세포막의 ras-raf-MAPK cascade를 통해 fos/jun의 발현 및 dimer형성에 영향을 미치게 되며, 이로 인해 증식이 억제되면서 p53의 활성화로 apoptosis됨으로써 angiogenesis의 억제기전에 영향을 미칠

수 있다고 보고하였고, <sup>28)</sup>은 MTT 검색법에 의한 암세포의 생존능력과 L1210을 복강에 이식한 腹水癌 생쥐의 생존기간·sarcoma 180을 근육에 이식하여 유도한 固型癌의 종양성장 억제작용 및 체중변화에 대한 실험과 면역효과에 대한 지연형 과민반응 적혈구 응집소값과 용혈소값·rosette 형성세포·자연살해세포 활성화·임파구 증식능력·IL-2 생산능력·carbon clearance에 의한 탐식능력 등을 측정하였는데, 그 결과 加味慈桃丸이 직접적인 독성효과는 약하지만, 면역기구의 활성화를 통한 간접적인 항암효과가 있는 것으로 평가되었다. <sup>20)</sup>은 angiogenesis 억제 검색시스템을 혈관내피세포의 일종인 ECV304를 이용 tube formation의 형성 상태·MTT assay를 통한 viability 측정·proliferation assay·aortic ring assay·CAM assay를 통해 angiogenesis를 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

특히 姜의 加味慈桃丸에 대한 연구보고<sup>20)</sup>를 자세히 살펴보면, ECV304를 이용한 세포독성실험에서 加味慈桃丸이 400 µg/ml까지는 세포독성을 갖고 있지 않는 것으로 측정되었고, tube formation 억제효과에 대한 실험에서 matrigel coated plate에서 加味慈桃丸은 200 µg/ml·400 µg/ml의 농도에서 모두 강한 ECV304의 혈관 network 형성을 억제하는 효과가 있음이 관찰되었으며, proliferation assay에서는 加味慈桃丸은 세포의 독성을 갖지 않은 농도에서 세포의 DNA replication을 억제함으로써 ECV304세포의 분화와 증식을 억제하는 cytostatic effect를 나타내면서 혈관신생을 억제하는 것으로 판단된다. aortic ring assay에서도 400 µg/ml의 농도에서부터 혈관내피세포의 분포 면적과 숫자가 현저히 저하되었으며, 그 이상 농도가 높아지면 혈관내피세포의 성장은 더욱 더 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. CAM assay에서도 실험 결과 加味慈桃丸 1 mg/egg 투여군에서는 혈관신생 억제효과가 50%의 유정란에서 나타났고, 2

mg/egg 투여군에서는 100%의 유정란에서 나타나 매우 양호한 결과를 보여주었다.

이에 저자는 기존의 연구를 통해 항암 및 암전이 억제효과가 있었던 加味慈桃丸의 구성약물을 hexane 분획·ethylacetate 분획·butanol 분획 및 물 분획 등의 多段階 抽出法으로 유효성분을 추출한 후, 이를 혈관내피세포인 ECV304에 투여하여 MTT assay로 세포생존율을 측정하였고, MMP-2·-9의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 gelatin zymogram assay를 시행하였으며, matrigel을 coating한 transwell을 이용하여 in vitro invasion assay를 시행하였고, 혈관형성의 여부를 확인할 수 있는 capillary-like tube formation assay와 aortic ring assay를 시행하여 혈관신생에 대한 억제효과에 대한 유의성 있는 실험결과가 나왔다.

MTT assay를 통한 세포독성 측정결과, 加味慈桃丸 구성약물 분획추출물의 대부분이 약물 처리시에 세포생존율이 대조군보다 상승하였거나 대조군과 근사한 측정값을 보여주고 있다. 그러나 鬱金의 hexane 분획추출물은 20 µg/ml 처리시에 대조군 대비 세포생존율 129.6%에서 40 µg/ml 처리시에 생존율 2.0%로 가장 급격한 저하를 나타내었다. 또한 대조군에 비하여 세포생존율 90% 이하로 저하된 것으로는 山慈姑 ethylacetate 분획추출물 26.7% (40 µg/ml), 山慈姑 butanol 분획추출물 87.2% (20 µg/ml)·12.5% (40 µg/ml), 桃仁 water 분획추출물 82.7% (40 µg/ml), 海馬 ethylacetate 분획추출물 85.3% (40 µg/ml)로 나타났다. 이를 제외한 모든 약물의 세포생존율이 40 µg/ml 농도에서 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않음에 따라 이후 실험의 용량을 40 µg/ml 농도로 진행하여 각 약물의 효과를 비교하여 보았다.

加味慈桃丸 구성약물이 암세포에서 분비되는 MMPs의 gelatinolytic activity에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 위하여 시행한 gelatin zymogram assay에서는 山慈姑의 hexane·

ethylacetate와 山慈姑의 ethylacetate·butanol, 桃仁의 ethylacetate 분획추출물에서 MMP-9의 band가 완전히 사라져, 분명한 gelatinolytic activity에 대한 저해 효과를 나타내고 있다. 또한 薏苡仁의 ethylacetate, 鳖甲의 hexane 분획추출물이 control의 band에 비하여 약화된 모습을 보여 주고 있어서 일정한 MMP-9 저해 효과가 있는 것으로 평가된다.

아울러 鬱金·山慈姑·桃仁의 효과를 보다 정확히 평가하기 위하여 각기 hexane·ethylacetate 분획추출물을 농도별로 처리하여 다시 gelatin zymogram을 시행한 결과, 鬱金の ethylacetate 분획추출물은 10·20·40  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 MMP-9 band가 사라져서 가장 강한 효과를 나타내었고, 山慈姑의 hexane 분획추출물이 그 다음으로 강한 효과를 보여 주었다.

Gelatin zymogram assay 결과에서 加味慈桃丸 구성약물이 MMP-9의 발현량과 그 activity를 억제함을 알 수 있는데, 이는 다음의 *in vitro* invasion assay에서 加味慈桃丸 구성약물이 암전이 억제 효과에 대한 해석의 근거로 가능하다고 생각된다.

암세포가 원격 부위로 전이되기 위하여 거쳐야 하는 basement membrane을 인공적으로 재구성한 matrigel을 이용해 *in vitro* invasion 실험을 하였다. 실험결과 PMA를 첨가한 대조군 (Con+)의 침윤 세포수가 아무 것도 처리하지 않은 대조군 (Con-)의 침윤 세포수보다 275%가 증가하였으며, PMA를 첨가한 대조군 (Con+)을 기준으로 할 때, 모든 분획추출물에서 침윤세포수가 감소하였다. 특히 대조군의 침윤세포수가 50%이하로 감소한 것은 鬱金の hexane 분획추출물 14.1±5.8 (35% of control+PMA), 山慈姑의 water 분획추출물 18.8±12.2 (47%), 桃仁의 hexane 분획추출물 12.0±6.5 (30%), 桃仁의 ethylacetate 분획추출물 11.7±4.2 (29%), 桃仁의 butanol 분획추출물 12.2±7.3 (31%), 薏苡仁의 hexane 분획추출물 13.4±6.9 (34%), 薏苡仁

의 butanol 분획추출물 19.5±4.5 (49%), 鳖甲의 ethylacetate 분획추출물 14.0±3.8 (35%)로 나타났다.

ECV304세포의 tube formation 억제효과를 살펴본 결과 加味慈桃丸 구성약물의 분획추출물 중에서는 鬱金·山慈姑·桃仁의 tube formation 억제효과가 뛰어나고, 특히 鬱金과 山慈姑의 ethylacetate 분획추출물 투여군에서 가장 우수한 혈관신생 억제효과를 나타내고 있다.

Rat aortic ring assay는 완전히 분화와 발생이 끝난 성숙한 SD rat의 대동맥 혈관 내피세포를 배양하여 대조군에 비해 혈관내피세포 분열과 증식에 어떠한 영향을 미치는가 약물을 투여한 실험군의 세포를 관찰하는 것이다. 실험결과 ECGS를 처리한 대조군 (+control)에서는 capillary가 잘 형성되어 있고, ECGS를 처리하지 않은 대조군 (-control)에서는 capillary형성이 빈약함을 볼 수 있다. 또한 실험군에서는 鬱金·山慈姑·桃仁의 hexane·ethylacetate 분획추출물 6가지를 5·10·20·40  $\mu\text{l}$ 씩 투여하였는데, 40 $\mu\text{l}$  투여군에서 모두 대조군 (-control) 이하의 현저한 혈관신생 억제효과를 나타냈다. 그 외의 5·10·20  $\mu\text{l}$ 씩 투여한 well에서는 약물의 효과가 서로 차이를 보였는데, 鬱金の hexane·ethylacetate 및 山慈姑의 ethylacetate 분획추출물에서 억제효과가 나타났다. 특히 鬱金の ethylacetate 분획추출물은 5 $\mu\text{l}$ 를 투여한 well에서부터 그 효과가 나타났으며, 다른 약물에 비해 혈관신생 억제효과가 현저함을 관찰할 수 있다.

이상의 실험을 통해 加味慈桃丸 구성약물의 혈관신생에 대한 억제효과가 있음을 알 수 있었으며, 구성약물 중에서 억제효과가 있는 한약을 선별하여 그 작용기전을 객관적으로 규명하고, 새로운 조합을 통하여 혈관신생을 보다 효율적으로 제어할 수 있는 가능성을 제시함으로써 부작용이 없는 항암제 개발에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 結 論

加味慈桃丸의 혈관신생 억제기전을 실험적으로 규명하고자 구성약물에 대한 성분 분획의 多段階 抽出法으로 유효성분을 추출한 후, 이를 혈관내피세포인 ECV304에 투여하여 MTT assay로 세포생존율을 측정하였고, MMP-2·-9의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 gelatin zymogram assay를 시행하였으며, matrigel을 coating한 transwell을 이용하여 *in vitro* invasion assay를 시행하였고, 혈관형성의 여부를 확인 할 수 있는 capillary-like tube formation assay와 aortic ring assay를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 加味慈桃丸 구성약물의 세포독성은 鬱金の hexane (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 분획추출물, 山慈姑의 ethylacetate (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )·butanol (20·40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 분획추출물, 桃仁의 water (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 분획추출물, 海馬의 ethylacetate (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 분획추출물이 대조군에 비해 세포생존율이 저하로 나타났고, 이외에 모든 약물의 세포생존율이 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았다.
2. Gelatinolytic activity 억제기전에 미치는 영향에서 鬱金の hexane 분획추출물은 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ·ethylacetate 분획추출물은 10·20·40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 山慈姑의 hexane 분획추출물은 10·20·40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ·ethylacetate 분획추출물은 10·20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 桃仁의 ethylacetate 분획추출물 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 MMP-9의 활성 저해 효과가 나타났다.
3. Invasion 억제기전에 미치는 영향에서는 대조군의 50% 이하로 감소한 것은 鬱金の hexane 분획추출물 14.1 $\pm$ 5.8 (35% of control+PMA), 山慈姑의 water 18.8 $\pm$ 12.2 (47%), 桃仁의 hexane 12.0 $\pm$ 6.5 (30%)·

ethylacetate 11.7 $\pm$ 4.2 (29%)·butanol 12.2 $\pm$ 7.3 (31%), 薏苡仁의 hexane 13.4 $\pm$ 6.9 (34%)·butanol 19.5 $\pm$ 4.5 (49%), 鱉甲의 ethylacetate 분획추출물 14.0 $\pm$ 3.8 (35%)로 나타났다.

4. Tube formation 억제기전에 미치는 영향에서는 鬱金·山慈姑·桃仁의 억제효과가 뛰어나고, 특히 鬱金과 山慈姑의 ethylacetate 분획추출물 투여군에서 가장 우수한 효과를 나타내고 있다.
5. Rat aortic ring을 이용한 혈관신생 억제효과 실험에서는 鬱金·山慈姑·桃仁의 hexane·ethylacetate 분획추출물은 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 모두 ECGS를 처리하지 않은 대조군 보다 모세혈관 형성이 더 많이 억제되어 있었다. 특히 鬱金の ethylacetate 분획추출물은 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도를 투여한 실험군에서부터 그 효과가 나타났으며, 다른 약물에 비해 혈관신생 억제효과가 현저함을 관찰할 수 있었다.

이상의 실험결과로 보아 加味慈桃丸 구성약물이 혈관신생을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었으며, 구성약물들의 새로운 조합을 통하여 혈관신생을 보다 효율적으로 제어할 수 있는 가능성이 제시될 수 있을 것으로 사료된다.

## 參考文獻

1. 대한병리학회: 병리학, 서울, 고문사, p.222·225·232, 1991.
2. 文濬典·安圭錫·崔昇勳: 동의병리학, 서울, 고문사, pp.74~76, 1994.
3. 朴在甲: 인간생명과학, 서울, 서울대학교 출판부, pp.621~622·642~645·663~664, 1993.
4. 서울대학교 의과대학: 종양학, 서울, 서울

- 대학교 출판부, pp.137~143 · 193~205 · 214~215 · 225~234, 1996.
5. 예방의학과 공중보건 편찬위원회: 예방의학과 공중보건, 서울, 계축문화사, p.435, 1993.
  6. 전국한의과대학 본초학교수: 본초학, 서울, 영림사, pp.228~229 · 306~308 · 408 · 414~415 · 423~424 · 575~576 · 603~604, 1991.
  7. 崔昇勳: 東醫腫瘍學, 서울,杏林出版, pp.13~14 · 32~36 · 78~80, 1995.
  8. 한국한의학회: 암예방 및 치료를 위한 한의학적 연구, 서울, (주)다우문화사, pp.13~14 · 78~80, 1998.
  9. 康舜洙: 한의학에서의 어혈에 대한 개념, 대한한의학회지, 5 (1):138~140, 1994.
  10. 金聖勳: 한의학계의 암연구동향과 연구전략에 대한 연구, 대한한의학회지, 19 (1):470~499, 1998.
  11. 김정범: 桃仁承氣湯 및 그 구성약물이 어혈병태 모형에 미치는 영향, 대한동의학회지, 11 (1) pp.65~76, 1997.
  12. 김정순: 우리 나라 사망원인의 변천과 현황, 대한의학협회지, 36 (3):271~284, 1993.
  13. 金賢兒 · 林成祐 · 李源哲: 한약을 이용한 항암 실험연구의 경향에 관한 고찰, 대한한방종양학회지, 4 (1):213~226, 1998.
  14. 윤성수: Angiogenesis inhibitors-clinical applications, Angiogenesis 연구회 창립기념 심포지엄, pp.4~13, 1998.
  15. 이준우 · 최승훈 · 안규석: Angiogenesis의 한의학적 치료전략, 제3의학, 3 (1):21~31, 1998.
  16. 전원경 · 이태희 · 윤유식 · 김연옥 · 성현재: 한약재의 신생혈관생성 억제 활성화에 관한 연구, 한국한의학회원논문집, 4:129~138, 1998.
  17. 崔昇勳: 한의학의 종양에 대한 인식과 병리론, 대한한방종양학회지, 1 (1):11~28, 1995.
  18. 姜大寅: 沒藥散이 혈관신생 억제에 미치는 효과에 대한 연구, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
  19. 姜玗熙: 桂枝가 Angiogenesis의 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1998.
  20. 姜顯淑: 加味慈桃丸의 angiogenesis 억제 효과에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
  21. 羅琪煥: 活絡效靈丹이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
  22. 成熙根: 鬱金이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1998.
  23. 孫宗坤: 活絡效靈丹이 암전이 억제에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 2000.
  24. 沈範相: 扶正防癌湯이 암전이 억제에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 2000.
  25. 尹在鎬: 十全大補湯이 암전이 억제에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1998.
  26. 李紀龍: 立安散이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
  27. 李眞華: 血府逐瘀湯이 癌轉移 抑制에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1999.
  28. 全英秀: 加味慈桃丸의 항암 및 면역증강 효과에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
  29. 趙漢震: 桃紅四物湯加減方の 항암 및



- 항전이 효과에 관한 연구, 대전대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
30. 孟琳升: 中醫治癌大成, 北京, 北京科學技術出版社, p.15 · 96 · 143 · 235, 1995.
  31. 潘敏求: 中華腫瘤治療大成, 天津, 河北科學技術出版社, pp.51~65, 1996.
  32. 潘鴻鴻: 中醫藥抗癌學, 北京, 中國古籍出版社, pp.24~25, 1998.
  33. 史宇歷 · 單書健: 腫瘤專輯, 北京, 中國古籍出版社, pp.18~22, 1993.
  34. 盛展能: 抗癌治驗本草, 北京, 重慶出版社, p.119 · 389 · 499 · 655 · 672, 1994.
  35. 王冰 · 許世: 抗癌中藥方選, 北京, 人民軍醫出版社, p.24 · 39 · 46 · 54 · 60, 1994.
  36. 王守章: 中西醫結合臨床腫瘤內科學, 天津, 天津科技翻譯出版公司, pp.150~155, 1994.
  37. 王浴生: 中藥藥理與應用, 北京, 人民衛生出版社, pp.107~113 · 1240~1244, 1991.
  38. 郁仁存: 中醫腫瘤學 (上), 北京, 北京科學技術出版社, pp.1~25 · 95~106 · 123~124, 1991.
  39. 郁仁存 · 姜廷良 · 于爾辛: 腫瘤研究, 上海, 上海科學技術出版社, pp.103~104 · 123~124, 1991.
  40. 劉春安 · 彭明: 抗癌中草藥大辭典, 洪湖, 湖北科學技術出版社, pp.91~94 · 322~326 · 811~813 · 1120~1124, 1994.
  41. 李宇彬: 抗癌中藥藥理與應用, 黑龍江科學技術出版社, p.158 · 986 · 995 · 1042 · 1285 · 1319, 1999.
  42. 李俊德 · 楊通禮: 中醫藥方治腫瘤特技集成, 北京, 北京科學技術出版社, p.42, 1997.
  43. 李佩文: 癌症的中西醫最新對策, 北京, 中國中醫藥出版社, p.393, 1991.
  44. 張民慶 · 龔惠明: 抗腫瘤中藥的臨床應用, 北京, 人民衛生出版社, p.402, 1998.
  45. 趙建成: 段鳳舞腫瘤積驗方, 合肥, 安徽科學技術出版社, pp.537~538, 1997.
  46. 中山醫學院《中藥臨床應用》編寫組: 中藥臨床應用, 廣州, 廣東人民出版社, p.227 · pp.147~148 · 282~283 · 292~294 · 407~408 · 562~563 · 595~596, 1976.
  47. 梁富義: 中西醫結合防治腫瘤新進展, 中西醫結合雜誌, 5 (2):123, 1985.
  48. 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.
  49. 于爾辛: 中醫中藥治療癌症38年的探索-경희대학교 제1회 동양의학 국제심포지움, pp. 36~40, 1995.
  50. 應榮多: 活血化瘀治則抗腫瘤實驗研究進展, 中西醫結合雜誌, 5 (2):76, 1985.
  51. 陳建中: 中西藥配合化療在胃癌治療中對白細胞的影響, 中西醫結合雜誌, 10 (12): 717~719, 1990.
  52. 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.
  53. Arbiser 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.
  54. 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.
  55. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J: Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci,

- Apr 26;91 (9):4082~4085, 1994.
56. Dixon SC, et al: Thalidomide up regulates prostate specific antigen secretion from LNCaP cells, *Cancer Chemother Pharmacol*, 43 Suppl:S78~84, 1999.
  57. Figg WD, et al: Pharmacokinetics of thalidomide in an elderly prostate cancer population, *J Pharm Sci*, Jan;88 (1):121~125, 1999.
  58. Folkman, J. and Shing, Y.: Angiogenesis. *J Bio Chem*, 267:10931~10934, 1992.
  59. Folkman, J.: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent, *J Natl Cancer Inst.*, 82:4~6, 1990.
  60. Franceschini M, et al: [Action of thalidomide on the growth of the chick-embryo tibia in organotypic cultures], *Boll Soc Ital Biol Sper*, Jul 15;40 (13):761~763, 1964.
  61. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 1980;102:196-202.
  62. 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.
  63. 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 Angiostatin: A Novel angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung Carcinoma cell, p.79 · pp.315~328, 1994.
  64. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65 (1-2):55-63, 1983.
  65. 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, 1977.
  66. 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.
  67. Oikawa T., Hasegawa M., Shimamura M., Ashino-Fuse H., Murota S. I., Morita I.: Eponemycin, a novel antibiotic, is a highly powerful angiogenesis inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, p.181 · pp.170~176, 1991.
  68. Shoji M, Hnacock WW, Abe K, Micko C, Casper KA, Baine RM, Wilcox JN, Danave I, Dillehay DL, Matthews E, Contrino J, Morrissey JH, Gordon S, Edgington TS, Kudryk B, Kreutzer DL, Rickles FR: Activation of coagulation in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer, *Am J Pathol*, 152 (2):399~411, 1998.
  69. Takahashi K. Sawasaki Y. Hata J. Mukai K. Goto T. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cellular*

- & Developmental Biology. 26 (3 Pt 1):265-74, 1990.
70. Takahasi K. Sawasaki Y. Rare spontaneously transformed human endothelial cell line provides useful research tool [letter]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 28A (6):380-2, 1992.
71. Tanaka N. G., Sakamoto N., Tohgo A., Nishiyama Y., Ogawa H.: Inhibitory effects of antiangiogenic agents on neovascularization, *Exp. Pathol*, p.30 · pp.143~150, 1986.
72. 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.
73. 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, 1988.