

## 數種 補氣補血 韓藥의 血管新生 抑制效果

이진화 · 김한영 · 강희 · 유영범 · 심범상  
김성훈 · 최승훈 · 안규석

경희대학교 한의과대학 병리학교실, 경희대학교 한의학연구소

### Angiogenic Inhibition Effects of Several Herbs Supplementing Qi and Blood

Jin-Wha Lee, Han-Young Kim, Hee Ka,g, Young-Beob Yu, Bum-Sang Shim,  
Sung-Hoon Kim, Seung-Hoon Choi, Kyoo-Seok Ahn

*Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University,  
Institute of Oriental Medicine, Kyunghee University*

Two of the essential processes required for metastasis are neoangiogenesis and tumor cell invasion of basement membranes (BM) and extracellular matrix (ECM). Recently, data showed that herbs removing blood stasis has an anti-angiogenic effects. Tonifying vital Qi and eliminating pathogenic factor was a basic modality in Oriental oncology. In this study, we investigated several Qi and Blood tonics for potent angiogenic inhibitors. Methanol extracts of samples inhibited the proliferation of ECV-304 at the concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Zizyphi Fructus, Glycyrrhizae Radix, Angelicae Gigantis Radix decreased the gelatinolytic activity of MMP-9 from ECV-304, at the concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in gelatin zymography. In in vitro invasion assay, herbs inhibited the invasion activity of ECV-304 by 53% of control (Ginseng Radix), 39% (Zizyphi Fructus), 36% (Angelicae Gigantis Radix), 25% (Glycyrrhizae Radix). Ginseng Radix inhibited the capillary-like tube formation of ECV-304 at the concentration of 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Angelicae Gigantis Radix and Paeoniae Radix Alba inhibited at the concentration of 320  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . These results indicated that

---

교신저자: 안규석, 서울시 동대문구 회기동1번지  
경희대학교 한의과대학 병리학교실  
Tel: 02-961-0335 E-mail: ahnks@khu.ac.kr

Ginseng Radix, Glycyrrhizae Radix, and Angelicae Gigantis Radix could be considered as potent angiogenic inhibitors.

본 논문은 아래의 저자로부터 전재를 허가받고 게재함

원문 : 이진화 외. 數種 補氣補血 韓藥의 血管新生 抑制效果.

동의생리병리학회지 제16권 3호 2002

## I. 序 論

전 세계적으로 암 치료에 대한 의학계의 노력이 활발하게 이루어졌음에도 불구하고 암은 여전히 사망률 수위를 다투는 난치질환인데, 이는 주로 암이 전이된다는 생물학적 특성에서 비롯하는 것이다<sup>1)</sup>. 암으로 인한 사망이 원발암에 의한 것보다는 대부분 전이에 의한 재발암이라는 점에서 암 전이 억제에 관한 연구는 중요한 의미를 가지고 있다<sup>2)</sup>.

전이는 암세포가 침윤성 성장을 하는 행위에서 비롯되지만, 혈관 역시 암세포의 성장을 위한 영양 공급과 전이의 통로를 제공한다. 점에서 중앙 조직내로의 혈관신생을 억제하는 것이 인체에 대한 독성이나 부작용없이 종양의 성장을 막고 전이를 억제할 수 있는 효율적 방법으로 여겨지고 있다. 이와 관련한 연구는 gelatinase와 전이와의 상관성<sup>4)</sup>과, Angiostatin과 Endostatin 연구<sup>5,6)</sup> 이래로 매년 증가하고 있다<sup>7,8,9)</sup>. 최근의 혈관 신생 억제 연구는 MMPs inhibitor 개발, 혈관내피세포의 증식 억제제 개발, 혈관신생 촉진 인자의 활성 저해제 개발, 혈관내피세포 특이적 integrin의 저해제 개발이라는 4가지 측면에서 이루어지고 있는데, 미국 National Cancer Institute에서 진행하는 혈관신생 억제제의 임상시험 프로젝트 17건 중에서 5건이 MMPs의 inhibitor 약제이다<sup>10)</sup>.

한의학 임상에서 암 전이에 대한 치법은 일반적인 한의학적 치료법의 범주를 벗어나지 않

는데, 扶正祛邪를 위주로 변증론치를 적용하는 것이다<sup>3)</sup>. 최근 전이 억제에 관련된 연구가 많이 이루어졌는데, 특히 活血祛瘀 약물을 활용한 혈관신생 관련 연구에서 좋은 성과가 보고되고 있으나<sup>11,12,13,14,15)</sup>, 補氣 혹은 補血 약물의 혈관신생 억제 효과는 아직까지 한의학계에서 보고된 바 없었다.

이에 저자는 6종의 補氣藥物 (人蔘, 黃芪, 白朮, 山藥, 大棗, 甘草)과 3종의 補血藥物 (當歸, 白芍藥, 何首烏)을 선정하여 혈관내피세포인 ECV-304의 세포증식율, *in vitro* invasion activity, gelatin zymogram, tube formation 등을 관찰하여, 補氣補血 藥物의 혈관신생 억제효과를 검토하였는바, 다음과 같이 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗 方法

### 1. 檢液의 準備 및 投與

실험에 사용한 9종의 약제는 아래의 도표와 같다 (Table 1). 약물은 각기 methanol과 물로 추출하여 실험에 사용하였다.

Methanol 추출은 각 약물 200g을 유리병에 넣고, 85% methanol을 시료가 잠기도록 충분히 (1ℓ) 넣고서 5일간 냉침한 다음, 50℃에서 30분간 2회 씩 초음파세척기로 물리적 자극을 가하여 추출물을 얻었다. 추출물을 솜과 거즈로

여과하여 감압농축기로 농축하였다. 농축액은 centrifugal evaporator로 12-24 시간 건조하였고, 20% dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

물 추출물은 각 약물 200g을 분쇄기로 파쇄한 후 1 ℓ의 증류수를 첨가하고 1시간 동안 초음파를 가한 후 실온에 방치하여 침전시킨 후 여과액을 얻고 감압농축기로 농축하였다. 농축액을 동결건조기로 건조한 후, -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

**Table 1.** Several Herbs Supplementing Qi and Blood.

Herb	Latin name	Scientific name
人蔘	Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.
黃芪	Astragali Radix	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	<i>Atractylodes japonica</i> Koidz.
山藥	Dioscoreae Rhizoma	<i>Dioscorea batatas</i> Decne.
大棗	Zizyphi Fructus	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i> Rehd.
甘草	Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.
當歸	Angelicae Gigantis Radix	<i>Angelica gigas</i> Nakai
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.
何首烏	Polygoni Multiflori Caulis	<i>Polygonum multiflorum</i> Thunb.

## 2. 細胞株 培養

이 실험에서는 人間 血管內皮細胞인 ECV-304 (ATCC, CRL-1998)를 사용하였다. ECV-304세포는 혈관신생억제효과를 관찰하기

위해 사용되는 人間 臍帶靜脈細胞 HUVEC (human umbilical vein endothelial cell)에 발암 유전자인 SV-TAg을 transfection시켜서 不滅化시킨 것이다.

ECV-304 세포는 Medium-199 (M-199, Gibco BRL) 배양액에 각각 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), antibiotics (penicillin 10 units/ℓ, streptomycin 10μg/ℓ, Gibco BRL)을 보충하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다.

## 3. MTT assay

이 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann<sup>16)</sup>이 개발한 방법으로 Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, #G358/0, I. U.S.A.)를 사용하여 Promega 회사의 방법에 준하여 실험하였다.

ECV-304 세포를 96-well cell culture plate에 세포수가 각각 2×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 하여 100 μℓ 10% FBS M-199와 함께 48시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 배양하였다. 100 μℓ의 serum free M-199에 한약 추출물을 농도별로 (10, 20, 40, 80 μg/ml) 세포에 투여하였다.

20시간이 경과한 후 MTT dye solution을 20 μℓ/well 가한 다음 10분 후에 ELISA reader (Molecular Device, U.S.A.)를 이용하여 測定 波長 490nm, 參照 波長 650nm에서 측정하였다. 대조군은 약제를 가하지 않은 100 μℓ serum free M-199를 가하였다.

Blank 값을 위해서 대조군에는 약제를 가하지 않은 100 μℓ serum free M-199의 측정값을 blank로 하였고 실험군은 배양액에 약을 첨가한 측정값으로 정하였다.

#### 4. Proliferation assay

Proliferation assay는 방사성 동위원소를 대체하는 방법으로 BrdU (5-bromo-2'-deoxy-uridine)의 DNA 함유량을 enzyme immunoassay로 측정<sup>17)</sup>하는 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kit (Roche Molecular Biochemicals, U.S.A.)를 사용하였다. 실험방법은 Roche Molecular Biochemicals 회사의 방법에 준하였다.

우선 세포를 96-well cell culture plate에 각각  $2 \times 10^4$  cells/well의 비율로 10% FBS M-199 100  $\mu$ l와 함께 배양하였다. 48시간이 지난 후 한약 추출물을 농도별로 (100, 200, 400, 800  $\mu$ g/ml) 가하고 동시에 BrdU labeling solution 10  $\mu$ l/well을 가하였다. 18시간이 지난 후 ethanol 70% (in HCl) 200  $\mu$ l/well을 가하여 -20°C에 30분간 두어 세포를 고정한 후 PBS를 200  $\mu$ l/well로 3회 세척하였다. 다시 nuclease 100  $\mu$ l/well로 가한 후 30분간 37°C waterbath에 놓고 나서 PBS 200  $\mu$ l/well로 3회 씻었다. 다시 anti-BrdU-POD (peroxidase labeled antibody to BrdU, Fab fragments)를 100  $\mu$ l/well에 30 분간 37°C waterbath에 둔 후 washing buffer 200  $\mu$ l/well로 3회 세척하였다. Peroxidase를 100  $\mu$ l/well를 넣고 10분후에 ELISA reader를 이용하여 측정 파장 410nm, 참고 파장 490nm로 하여 측정값을 읽었다.

#### 5. Gelatinase assay

ECV304 세포를 6-well cell culture plate에 세포수가  $1 \times 10^6$  cells/well이 되도록하여 2ml 10% FBS M-199와 함께 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다. 배양한 후 1 ml PBS로 1회 세척하고 1 ml serum free M-199로 교체한 후 한약 농축액을 투여하여 100  $\mu$ g/ml의 농도가 되도록 하였으며 control

well에는 동량의 DMSO를 투여하여 세포배양기에서 배양하였다. 약물을 투여하고 12시간이 경과한 후에 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 투여하여 100 ng/ml의 농도가 되도록 하였으며 control well에는 동량의 DMSO를 투여하였다. 12시간 동안 배양한 후 배양액 100  $\mu$ l를 취하여 1000rpm, 4°C, 5분간 원심 분리하여 세포와 세포 조각을 침전시킨 후 상등액을 취하여 4°C에 보관하였다가 gelatin zymography를 시행하였다.

Gelatinase zymography는 Heussen과 Dowdle의 방법<sup>18)</sup>에 따라 시행하였다. 배양액을 sample buffer (10% SDS, 4% sucrose, 0.25M 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 가하여 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 2.5% (v/v) Triton X-100 (Sigma)에 30분씩 3회 세척하여 gel 속의 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 담긴 채 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 10% 메탄올/10% 빙초산/0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma)에 30분간 염색시킨 후 10% 메탄올/10% 빙초산에 3시간 동안 탈염색시켰다. Gelatinase에 의한 gelatinolytic activity는 전체가 靑色으로 염색된 gel에서 깨끗한 無色の 帶域이 검출되는 것으로 증명된다.

#### 6. Invasion assay

보기보혈 약물이 ECV-304 세포의 invasion activity에 미치는 효과의 측정은 Transwell cell culture chamber (pore size 8.0  $\mu$ m, Costar, USA)를 이용하였다. ECV-304세포를 세포수가  $5 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ l가 되도록 serum free DMEM으로 현탁한 후 membrane filter가 부착된

Transwell chamber 로 옮겼다. 여기에 약물을 최종농도 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이 되도록 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  로 하여 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  세포배양기에서 24시간을 배양하였다.

Transwell의 membrane은 Matrigel (12.1 mg/ml; Collaborative Biomedical Products. #40234. U.S.A.) 5  $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ , collagen 10  $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$  로 위와 아래를 코팅하여 공기 중에서 건조시킨 후 PBS에 담겼다가 다시 공기 중에서 건조시킨 후 실험에 사용하였다.

Transwell chamber에서 24시간 동안 배양한 후 Transwell의 upper chamber에 있는 media를 제거하고 Transwell의 lower chamber를 70% 메탄올에 5분간 담가서 membrane을 통과한 세포를 고정시킨 후 1분간 증류수에 담가 메탄올을 세척하였다. 다시 Hematoxylin solution (Sigma, USA)에 5분간 담근 후 증류수에 1.5분씩 2회 세척하고 0.5% (w/v) eosin (in 1% glacial acetic acid, Sigma, USA)에 30초 담근 후 증류수에 1분간 담근 후 95% 에탄올에 2분간 2회 담가서 탈수시켰다. 이후 면봉을 이용하여 Transwell의 upper chamber에 남아있는 세포를 닦아내고 역상현미경을 이용하여 400배율에서 염색된 세포의 숫자를 세었다.

세포수의 측정은 무작위로 4곳을 선정하여 접안렌즈의 격자 눈금을 기준으로 삼아 동일한 면적의 염색된 세포의 수를 세어 그 평균값과 표준편차를 비교하였다.

### 7. Tube formation assay<sup>19)</sup>

96-well cell culture plate를 얼음 접시에 놓고 Matrigel 30  $\mu\text{l}$ 를 well 마다 도포하여 상온에서 15분간 방치한 후 37 $^{\circ}\text{C}$  incubator에 30분간 정치하여 Matrigel이 gel화 되도록 한 후 세포를 접종하였다. ECV-304 세포를 Matrigel이 도포된 96-well plate에  $2 \times 10^4$  cells/well 로 접종하고 10% FBS M-199 배양액과 함께 한약

추출물을 40, 80, 160, 320, 640  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하여  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하였다. 24시간이 경과한 후 50 배율로 사진을 촬영하여 ECV304 세포의 분화 정도를 관찰하였다.

## III. 實驗 結果

### 1. 數種 補氣補血 韓藥의 ECV-304 세포에 대한 세포 독성

수종 보기보혈 한약 추출물이 혈관내피세포인 ECV-304 세포에 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 시행한 결과, 물 추출물은 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대

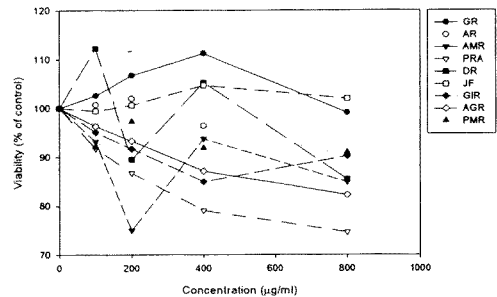


Fig. 1. Cell viability of human immortalized HUVE cells, ECV-304, treated with water extracts of several herbs supplementing Qi and Blood. Each point represents the mean of 4 replicates. GR is water extract of Ginseng Radix. AR is Astragali Radix, AMR is Atractylodis Rhizoma Alba, DR is Dioscoreae Rhizoma, JF is Zizyphi Fructus, GIR is Glycyrrhizae Radix, AGR is Angelicae Sinensis Radix, PRA is Paeoniae Radix Alba, PMR is Polygoni Multiflori Caulis.

조군에 비하여 人蔘은 102.5%, 106.7%, 111.2%, 99.1%를 나타내었고, 黃芪 (100.7%, 101.9%, 96.4%, 90.4%), 白朮 (93.2%, 75.0%, 93.7%, 84.9%), 山藥 (91.7%, 86.7%, 79.1%, 74.6%), 大棗 (112.2%, 89.5%, 105.3%, 85.5%), 甘草 (99.4%, 100.6%, 104.7%, 102.0%), 當歸 (95.1%, 91.7%, 85.0%, 90.2%), 白芍藥 (96.3%, 93.3%, 87.1%, 82.3%), 何首烏 (92.1%, 97.3%, 91.9%, 91.0%)의 생존율을 나타내었다.

Methanol 추출물은 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군에 비하여 人蔘 (112.8%, 102.0%, 75.1%, 59.5%), 黃芪 (102.0%, 116.9%, 107.1%, 95.3%), 白朮 (114.3%, 90.7%, 56.5%, 50.0%), 山藥 (119.7%, 125.4%, 125.1%, 102.8%), 大棗 (159.6%, 147.9%, 151.6%, 159.4%), 甘草 (124.3%, 131.7%, 130.7%, 138.1%), 當歸 (101.6%, 75.0%, 76.0%, 84.2%), 白芍藥 (101.2%, 68.5%, 74.5%, 86.2%), 何首烏 (143.8%, 95.1%, 116.6%, 64.5%)의 생존율을 나타내었다 (Fig. 1, 2).

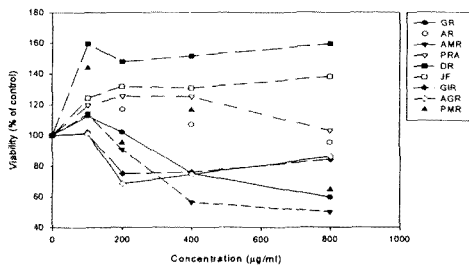


Fig. 2. Cell viability of human immortalized HUVE cells, ECV-304, treated with methanol extracts of several herbs supplementing Qi and Blood.

## 2. 數種 補氣補血 韓藥이 ECV-304 세포의 세포증식에 미치는 영향

수중 보기보혈 한약 추출물이 ECV-304 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여

BrdU incorporation assay를 시행한 결과, 물 추출물은 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군에 비하여 人蔘은 141.5%, 155.7%, 143.1%, 161.0%의 증식율을 나타내었고, 黃芪 (150.8%, 105.5%, 236.5%, 299.0%), 白朮 (110.3%, 87.1%, 90.4%, 110.1%), 山藥 (126.1%, 160.9%, 445.6%, 439.3%), 大棗 (410.3%, 397.3%, 260.2%, 263.5%), 甘草 (106.0%, 95.9%, 68.2%, 82.9%), 當歸 (88.2%, 95.3%, 116.1%, 148.4%), 白芍藥 (99.5%, 103.7%, 85.0%, 59.5%), 何首烏 (94.8%, 91.6%, 134.9%, 118.0%)의 증식율을 나타내었다.

Methanol 추출물은 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군에 비하여 人蔘은 67.7%, 55.1%, 34.4%, 21.7%를 나타내었고, 黃芪 (62.9%, 56.3%, 51.0%, 48.9%), 白朮 (72.6%, 43.3%, 28.5%, 20.9%), 山藥 (61.2%, 52.9%, 56.7%, 38.9%), 大棗 (44.9%, 49.6%, 38.1%, 28.4%), 甘草 (63.9%, 32.6%, 31.3%, 30.7%), 當歸 (37.4%, 30.6%, 31.5%, 36.8%), 白芍藥 (84.2%, 91.7%, 61.1%, 30.4%), 何首烏 (83.8%, 56.9%, 34.0%, 28.2%)의 증식율을 나타내었다(Fig. 3, 4).

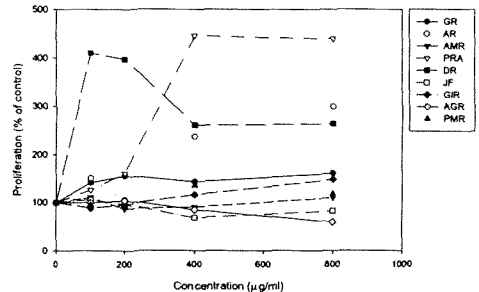


Fig. 3. Proliferation rate of human immortalized HUVE cells, ECV-304, treated with water extract of several herbs supplementing Qi and Blood.

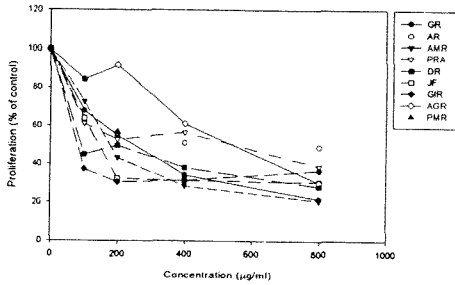


Fig. 4. Proliferation rate of human immortalized HUVE cells, ECV-304, treated with methanol extract of several herbs supplementing Qi and Blood.

### 3. 數種 補氣補血 韓藥이 ECV-304 세포의 MMP-2, MMP-9 활성에 미치는 영향

수중 보기보혈 한약이 혈관내피세포에서 분비되는 MMP-2와 MMP-9의 gelatinolytic activity에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 ECV-304 세포에 한약 methanol 추출물을 투여하여 gelatin zymography를 시행하였다.

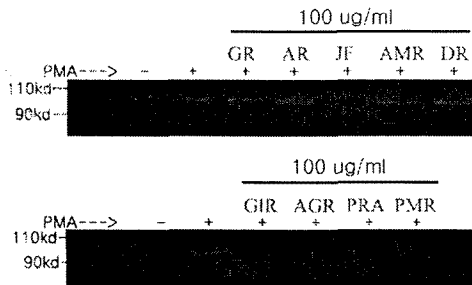


Fig. 5. Gelatin zymogram of conditioned media of ECV-304 cells treated with or without PMA (100 ng/ml), methanol extract of several herbs supplementing Qi and Blood. The conditioned media were electrophoresed on 8% SDS-polyacrylamide gel containing 0.4 mg/ml of gelatin B. Magnification, 50 $\times$ .

실험결과 大棗, 甘草, 當歸의 methanol 추출물 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 MMP-9의 발현이 감소하였다(Fig. 5).

### 4. 數種 補氣補血 韓藥이 ECV-304 세포의 invasion activity에 미치는 영향

수중 보기보혈 한약이 혈관내피세포의 invasion activity에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 ECV-304 세포에 한약 methanol 추출물 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  을 투여하여 invasion assay를 시행하였다.

실험결과 PMA 100 ng/ml을 첨가한 control은 단위면적당 209 $\pm$ 36개의 세포가 invasion되었다. 반면에 人蔘은 98 $\pm$ 18개의 세포가 invasion하여 대조군 대비 53% 감소하였다. 黃芪는 184 $\pm$ 49, 12% 감소하였으며, 大棗는 128 $\pm$ 48, 39% 감소하였으며, 甘草는 157 $\pm$ 24, 25% 감소하였으며, 白朮는 156 $\pm$ 18, 25% 감소하였으며, 當歸는 134 $\pm$ 41, 36% 감소하였으며, 芍藥는 170 $\pm$ 37, 19% 감소하였으며, 山藥는 179 $\pm$ 44, 15% 감소하였으며, 何首烏는 173 $\pm$ 28, 17% 감소하였다(Fig. 6, 7).

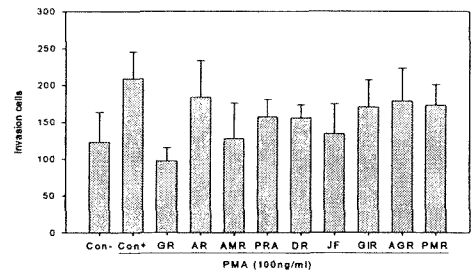


Fig. 6. Invasion assay of ECV-304 cells treated with or without PMA (100 ng/ml), methanol extract (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of several herbs supplementing Qi and Blood. Cells were cultured on Matrigel coated Transwell for 24 hours, then invasion cells were counted in four different fields at magnification, 50 $\times$ .

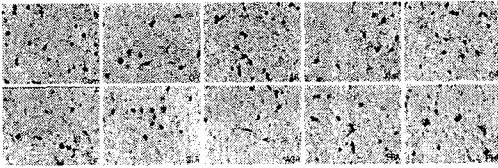


Fig. 7. Invasion assay of ECV-304 cells treated with or without PMA (100 ng/ml), methanol extract (100 µg/ml) of several herbs supplementing Qi and Blood. Cells were cultured on Matrigel coated Transwell for 24 hours, then invasion cells were counted in four different fields at magnification, 50×.

### 5. 數種 補氣補血 韓藥이 ECV-304 세포의 tube formation에 미치는 영향

수종 보기보혈 한약의 혈관신생 억제효과를 평가하기 위하여, ECV-304 세포를 Matrigel이 도포된 96-well plate에서 배양하여 tube formation을 유도한 후, 한약을 처리한 실험군과 대조군을 비교하여 보았다 (Fig. 8).

실험결과, 人蔘 methanol 추출물은 160 µg/ml 농도에서 분화된 세포에 의한 tube network가 붕괴되어 혈관형성 저해가 뚜렷하게 나타나고 있다. 當歸, 白芍藥은 320 µg/ml 농도에서 혈관형성 저해가 관찰되며 黃芪, 白朮, 山藥, 甘草, 何首烏는 640 µg/ml 농도에서 혈관형성 저해가 관찰되었다. 大棗는 혈관신생 억제효과가 없는 것으로 관찰되었다. 또한 640 µg/ml 농도에서 가장 강한 혈관신생 억제효과는 白朮, 甘草, 當歸로 관찰되었다. 이러한 결과가 세포사에 의한 것인지를 확인하기 위하여 trypan blue dye exclusion method에 의한 cell viability를 관찰한 결과, 세포핵은 염색되어 있으나 세포질은 염색되어 있지 않았다.

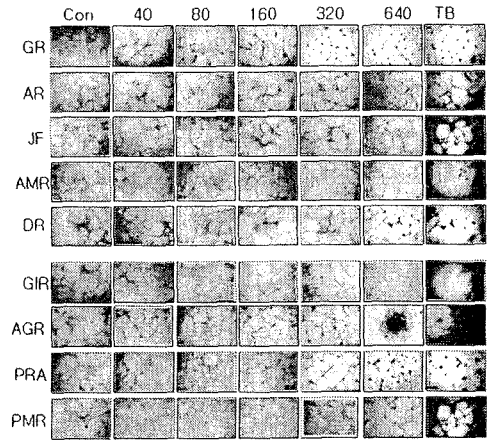


Fig. 8. Capillary-like tube formation assay. ECV-304 cells were cultured in Matrigel coated microtiter plates for 24 hours with methanol extract of several herbs supplementing Qi and Blood (40, 80, 160, 320, 640 µg/ml; TB is trypan blue stain of 640 µg/ml of extracts). Magnification, 50×.

## IV. 考 察

한의학 문헌에서 腫瘍과 관련된 내용은 각종 病證에 포함되어 있으며, 서양의학에서의 癌症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을 기대하는 치료법이다<sup>20)</sup>. 또한 최근 암치료에 있어서 화학요법과 한약치료를 병행하는 것이 효과적임을 보고하는 사례는 매우 많으며<sup>21,22)</sup>, 우리나라에서는 주로 正氣를 보강할 수 있는 藥物과 處方에 대한 연구가 많이 이루어져 왔다<sup>23,24)</sup>.



최근에는 암의 전이를 억제하여 종양의 재발을 막기 위한 연구가 폭 넓게 이루어지고 있다<sup>2)</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<sup>3)</sup>, 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, 活血祛癥 약물이 혈관신생 관련 연구에서 좋은 성과를 거두고 있다.

왕<sup>25,26)</sup>은 암의 전이를 억제하는 加味慈桃丸의 구성약물에 대한 연구에서 鬱金, 桃仁, 山慈菇가 혈관내피세포의 혈관신생을 억제함을 밝혔는데, 이 연구는 加味慈桃丸의 암 재발 방지 효과가 혈관신생 억제효과에 일부 기인하며, 이러한 효과는 처방 중 活血祛癥 약물에 의한 것임을 밝힌 것이다. 또 박<sup>27)</sup>은 *in vitro*에서 human fibrosarcoma cell, HT1080의 전이를 억제하는 扶正防癌湯의 구성약물을 대상으로 혈관신생 억제효과를 연구한 결과, 草河車와 破故紙의 혈관신생 억제효과가 가장 뛰어남을 밝혔다.

또 김<sup>28)</sup>은 현재 사용되어지고 있는 活血祛癥 약물 27가지(紅花, 鷄血藤, 劉寄奴, 虻蟲, 莢朮, 沒藥, 益母草, 薑黃, 皂角刺, 五靈脂, 卷柏, 蟻蟲, 穿山甲, 芫蔚子, 血竭, 玄胡索, 丹

參, 川芎, 澤蘭, 王不留行, 乳香, 水蛭, 鬱金, 桃仁, 虎杖根, 蘇木, 牛膝)를 선정하여 혈관신생 억제효과를 검색하였는데, 실험결과 대부분의 약물에서 혈관신생 억제효과가 관찰되었고, 특히 莢朮, 蘇木, 皂角刺, 王不留行의 효과가 우수한 것으로 보고하였다.

그 동안 한의학계에서 암의 전이 및 혈관신생 억제와 관련한 연구가 活血祛癥 약물을 중심으로 이루어져 왔으나, 임상적으로 암환자는 扶正祛邪法을 사용해야 하는 경우가 대부분이다. 扶正法에 속하는 복합처방의 항암 연구는 많이 보고된 바 있으나, 補虛藥의 혈관신생 억제 효과는 보고된 바 없었다. 扶正祛邪에 의한 치료가 임상에서 빈용되는 것을 감안하면 活血化癥 약물 뿐만 아니라 補虛藥의 혈관신생 억제 연구 역시 매우 중요한 것으로 파악된다. 한의학적으로 비슷한 효능을 나타내는 補虛藥물 중에서 특별히 혈관신생 억제효과가 있는 약물로 구성된 처방이라면 항암치료후 암의 재발을 억제할 수 있는 효능이 더욱 강화될 것으로 기대되며, 또한 재발 방지 목적으로 복용되고 있는 한약물의 과학적 근거를 뒷받침할 수 있다는 점이 이 연구의 기대 효과이다.

補虛藥물은 補氣, 補陽, 補血, 補陰藥으로 구분되며, 이 연구에서는 補氣약물 6종(人蔘, 黃芪, 白朮, 山藥, 大棗, 甘草), 補血약물 3종(當歸, 白芍藥, 何首烏)을 선정하여 실험에 이용하였다. 약물의 선정은 국내 산지가 명확하여 이후의 연구에서 재료의 동일성을 유지할 수 있는 약재와 임상적 빈용도를 고려하여 이루어졌다.

이들 약물 중에서 혈관신생 관련 연구가 보고된 것은 人蔘, 甘草, 當歸인데, 人蔘은 大補元氣, 補脾益肺, 生津止渴, 安神益智하는 효능이 있으며, 약리학적으로는 중추신경계에 대한 흥분과 억제작용, 학습과 관련된 益智 작용, 면역증강 작용, 심혈관계에 대한 강심, 항심근허혈 작용, 혈액 및 조혈계통에 대한 작용, 내분비계

통에 대한 작용, 물질대사에 대한 작용, 항스트레스 및 항 쇼크, 항노화, 항암작용 등이 알려져 있다<sup>29)</sup>. 항암작용에 관해서는 肺癌, 原發性肝癌, 胃癌, 白血病, 甲狀腺癌 등에 유효한 것으로 보고되어 있다<sup>30)</sup>. 특히 혈관신생과 관련하여 Morisaki 등<sup>31)</sup>은 紅蓼에서 추출된 saponin이 10-100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 인간제대정맥 혈관내피세포인 HUVEC cell에 의한 tube formation을 증가시킨다고 보고하였으며, Sato 등<sup>32)</sup>은 B16-BL6 melanoma를 이식한 생쥐에 人蓼에서 추출된 ginsenoside-Rb2를 투여한 결과, 10-50  $\mu\text{g/mouse}$ 의 농도에서 혈관신생과 폐장전이를 억제한다고 보고하였다. 또한 Mochizuki 등<sup>33)</sup> 역시 B16-BL6 melanoma와 colon 26-M3.1 carcinoma cell을 이식한 생쥐에 紅蓼 추출물인 ginsenoside-Rb2, 20(R)-, 20(S)-ginsenoside-Rg3를 투여한 결과 암세포의 부착과 invasion을 저해하므로써 암전이 억제효과를 나타내는 것으로 보고하였다.

甘草는 補中益氣, 清熱解毒, 潤肺止咳, 緩急止痛, 調和諸藥의 효능이 있으며, 약리학적으로 부신피질호르몬 유사작용, 항위궤양, 평활근 이완 및 간기능보호 작용, 소염 및 항알러지 작용, 항바이러스 작용, 해독 작용, 진해거담 작용, 진통 작용, 항균, 항지방간 작용 등이 알려져 있다<sup>29)</sup>. 특히 Kobayashi 등<sup>34)</sup>은 甘草의 glycyrrhizin은 in vitro에서 tube formation을 증가시키며, flavonoid 성분 중 isoliquiritin은 tube formation을 억제하는데, isoliquiritin의 작용이 더욱 강력하여 甘草 추출물에서 혈관신생억제 효과가 나타난다고 보고하였다.

當歸는 補血, 活血調經, 潤腸通便의 효능이 있으며, 약리학적으로 혈액 및 조혈계통에 대한 작용, 자궁에 대한 수축과 이완작용, 심혈관계에 대한 작용, 면역계에 대한 작용, 진통 작용, 소염 작용, 항균작용, 간기능보호작용, 항암 작용 등이 알려져 있다<sup>29)</sup>. Kojima 등<sup>35)</sup>은 생쥐의 adjuvant induced chronic inflammation에 四物

湯을 투여한 결과 angiogenesis, granuloma formation, inflammatory cell의 migration 등이 감소하였다고 보고하였으나, 當歸 자체의 혈관신생 관련 연구는 이루어진 바 없었다.

혈관신생은 모세혈관 또는 세정맥의 혈관내피세포가 여러 가지 조절인자의 자극을 받아 분화함으로써 새로운 모세혈관을 만드는 현상으로, 혈관내피세포의 activation, sprouting, tube formation, vessel network 형성의 4가지 단계를 거치게 된다<sup>36)</sup>. Activation은 혈관내피세포가 VEGF 등 혈관신생인자들의 감각을 받는 단계이고, sprouting 단계에서는 혈관내피세포가 증식하는 한편, 세포외기질 (ECM; Extracellular Matrix)을 분해하여, 침윤 (invasion)하는 일이 벌어진다. Tube formation은 혈관내피세포가 분화하여 인접 혈관내피세포끼리 협동으로 모세혈관을 형성하는 단계이며, 최종적으로 이렇게 형성된 모세혈관이 vessel network를 형성하여 암 조직에 영양을 공급하게 된다.

이 실험에서는 數種 補氣補血 韓藥이 혈관신생에 미치는 영향을 평가하기 위하여 혈관내피세포의 증식에 미치는 효과, 세포외 기질 분해에 미치는 효과, 침윤에 미치는 효과, tube formation에 미치는 효과를 살펴보았다. 또한 약재의 추출물을 열수 추출물과 메탄올 추출물로 구분하여 세포 증식에 미치는 효과를 검토한 후 보다 효능이 좋은 추출물을 이후 실험에 사용하였다.

우선 세포의 기질 분해 및 침윤에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT를 이용한 cell viability assay를 시행하였다. 세포의 기질 분해 및 침윤 현상은 모두 혈관내피세포의 behavioural activity에 해당하므로 세포 개체수가 약물에 의해 영향 받아서는 안되며, 따라서 생존율이 대조군과 유의한 차이가 없는 농도에서 시행되어야 한다.

실험 결과, 열수 추출물은 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군에 비해 112.1% (山藥)부터 92.1%

(何首烏) 사이의 세포 생존율을 나타내었으며, 메탄올 추출물은 159.6% (山藥)부터 101.2% (當歸)의 세포 생존율을 나타내었다.

또한 세포증식율을 알아보는 proliferation assay에서 열수 추출물은 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 대조군에 비해 山藥이 최고로 439.3%, 人蔘이 161.0% 증가한 반면, 대조군에 비해 세포증식이 감소한 것은 甘草 (82.9%), 芍藥 (59.5%)이었다. 그러나 메탄올 추출물은 이보다 저농도인 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 대조군에 비해 50% 이하로 저하되었으며, 白朮이 20.9%로 세포증식이 가장 많이 억제되었다. 이상 2가지의 실험 결과에 따라 이후 실험에서는 메탄올 추출물을 사용하였으며, 그 농도는 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 제한하였다.

열수 추출물에서 일반적으로 혈관내피세포의 증식이 증가한 결과는 일반적인 보기 보혈약물의 효능에 비추어 예상되는 결과라고 할 수 있으나, 메탄올 추출물은 이와 반대로 세포증식이 억제되는 결과로 나타나 향후 이와 관련된 보다 깊은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

數種 補氣補血 韓藥이 세포외 기질의 분해에 미치는 영향을 평가하기 위하여 gelatin zymography를 실시하였다. 세포외 기질을 분해하는 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)에는 14 종류가 알려져 있는데<sup>37)</sup>, 이 실험에서는 ECM의 주요 구성성분인 collagen type IV를 基質로 하는 gelatinase의 gelatinolytic activity에 대하여 살펴보았다. Gelatinase는 72-kDa (MMP-2), 92-kDa (MMP-9)의 두가지 type이 있으며, MMP-2는 gelatin, collagen type IV · V · VII · X · XI, elastin, proteoglycan core protein을 기질로 하며, MMP-9은 gelatin, collagen type IV · V, elastin, proteoglycan core protein을 기질로 한다<sup>4,38)</sup>. 실험에서는 gelatin을 첨가한 SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 ECV-304의 배양액을 전기영동하여 실험하였다. 배양액 중에 MMP-2와 MMP-9이 있으면 gel

속에 있는 gelatin을 분해하여 coomassie blue stain 상에서 염색되지 않는 밴드로 표시되게 된다. 실험결과, 大棗, 甘草, 當歸의 메탄올 추출물은 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 MMP-9의 발현을 감소시킨 것이 확인되었다. 따라서 이들 약제는 혈관신생의 단계에서 sprouting을 억제할 수 있을 것임을 시사한다.

혈관내피세포가 혈관에서 자라나 종양조직으로 나아가기 위해서는 침윤성 성장을 하며, 여기에는 세포외기질의 분해 및 세포의 이동이 동시에 이루어진다. In vitro invasion assay는 실험적으로 이와 유사한 환경을 조성하기 위하여 basement membrane과 같은 조성으로 구성된 Matrigel을 8- $\mu\text{m}$  직경의 구멍이 다수 뚫려 있는 다공성 필터에 바른 후 혈관내피세포를 배양하여 반대편으로 이동된 세포의 수를 비교하는 실험이다. 실험 결과, 人蔘이 대조군 대비 53%로 가장 많이 억제되었으며, 大棗는 39%, 當歸 36%, 甘草 白朮이 각 25% 감소되었다. 따라서 이들 약제 역시 혈관신생에서 sprouting의 단계를 잠재적으로 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

Tube formation assay는 혈관내피세포를 Matrigel 상에서 10% 혈청 배지로 배양하면 세포가 분화하여 모세혈관과 비슷한 tube를 형성하게 되며, 여기에 한약을 투여하여 대조군 대비 tube의 형성 정도를 비교하였다. 실험 결과, 약제별로 농도에 따른 tube 형성 저해 정도가 달랐는데, 人蔘이 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 tube 형성 저해가 가장 뛰어났고, 當歸, 白芍藥은 320  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 tube 형성의 저해가 관찰되었다. 大棗를 제외한 기타 약은 640  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 tube 형성의 저해가 관찰되었고, 大棗는 tube 형성 억제효과가 전혀 없는 것으로 나타났다. Trypan blue stain에 따라 640  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서의 결과가 세포사에 의한 것은 아닌 것으로 판단되지만, 약물의 과량 투여는 삼투압의 변화를 일으켜 tube formation에 영향을 줄 수 있음을

고려할 때, 이 농도에서의 결과에 유의성을 두는 것은 곤란하며, 人蔘과 當歸, 白芍藥의 혈관신생 억제효과를 받아들이는 것이 타당하다고 생각된다.

이상의 세포 증식을, 세포외 기질 분해 및 침윤, 혈관신생 억제 실험결과를 고려할 때, 補氣藥物 중에서는 人蔘과 甘草, 補血藥物 중에서는 當歸의 혈관신생 억제효과가 우수한 것으로 볼 수 있다.

## V. 結 論

數種 補氣補血 韓藥의 혈관신생 억제효과를 평가하기 위하여 ECV-304 세포를 대상으로 MTT assay, proliferation assay, gelatinase assay, in vitro invasion assay, tube formation assay를 시행하였는데, 실험결과는 아래와 같다.

1. MTT assay에서 물 추출물은 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군에 비해 112.1% (山藥)와 92.1% (何首烏) 사이의 생존율을 나타낸 반면, 메탄올 추출물의 경우 100% 이상의 생존율을 나타내었다.
2. Proliferation assay에서 물 추출물은 혈관 내피세포의 세포증식을 저해함이 없이 오히려 증가하는 경향을 나타내는 경우가 많았다. 반면에 메탄올 추출물은 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서부터 혈관내피세포의 증식을 억제하는 경향을 나타내었다.
3. Gelatinase assay에서는 大棗, 甘草, 當歸의 메탄올 추출물이 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 MMP-9의 발현을 억제하였다.
4. In vitro invasion assay에서는 人蔘 메탄올 추출물이 ECV-304 세포의 invasion activity를 대조군에 비해 53% 저해하였고, 大棗 39%, 當歸 36%, 甘草 白朮 각 25% 저해하였다.
5. Tube formation assay에서는 人蔘 메탄올

추출물의 경우 160  $\mu\text{g/ml}$ , 當歸, 白芍藥은 320  $\mu\text{g/ml}$  농도에서부터 혈관신생 억제효과를 나타내었다.

이러한 실험 결과를 통하여, 補氣藥物은 人蔘과 甘草, 補血藥物은 當歸의 혈관신생 억제효과가 우수한 것으로 사려된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (HMP-00-O-0-0000)

## 參考文獻

1. 서울대학교 의과대학. 개정판 중양학. 서울: 서울대학교 출판부; 1989
2. 심범상. 부정방암탕이 암전이 억제에 미치는 영향. 서울. 경희대학교 대학원. 2000.
3. 조종관. 한방임상중양학. 대전: 주민출판사; pp. 480-488. 2001.
4. 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 1989; 264: 17213-17221.
5. 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 1997; 88(2): 277-85.
6. 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* 1994; 79(2): 315-28.
7. Jones A, Harris AL. New developments in angiogenesis: a major mechanism for tumor growth and target for therapy. *Cancer J Sci Am.* 1998; 4: 209-217.
  8. Harris AL. Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet.* 1997;349(S II):13-15.
  9. Fidler IJ. Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer J* 2000; 6(suppl 2): S134-S141.
  - 10) NCI. Angiogenesis Inhibitors in Clinical Trials. Available from: URL: <http://cancertrials.nci.nih.gov/news/angio/table.html> last updated 10/16/00.
  11. 강대인, 심범상, 김성훈, 최승훈, 안규석. 沒藥散이 血管新生(Angiogenesis) 抑制에 미치는 效果에 對한 研究. *동의병리학회지* 2000; 14(2): 91-107.
  12. 강현숙, 심범상, 김성훈, 최승훈, 안규석. 加味慈桃丸의 angiogenesis억제효과에 관한 實驗的 研究. *동의병리학회지* 2000; 14(2): 168-181.
  13. 손종근, 심범상, 김성훈, 석동신, 최승훈, 안규석. 活絡效靈丹이 癌轉移 抑制에 미치는 效果. *동의병리학회지* 2000; 14(2): 182-198.
  14. 이진화, 심범상, 최승훈, 안규석. 혈부축어탕이 암전이 억제에 미치는 영향. *대한한방종양학회지* 1999; 5: 61-75.
  15. 이기룡, 최승훈, 안규석. Study on the Effect of Yipahnsan on Angiogenic Inhibition, *中韓日血瘀及活血化瘀研究學術大會論文摘要集*, p13, 1999, 10
  16. Mosmann T Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 1983; 65(1-2): 55-63.
  17. Porstmann 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* 1985; 82(1): 169-179.
  18. 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.
  19. Schnaper HW, Grant DS, Stetler-Stevenson WG, Fridman R, D'Orazi, Murphy. AN, Bird RE, Hoythya M, Fuerst TR, French DL, et al : Type IV collagenase and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro. *J Cell Physiol* 1993; 156(2): 235-246.
  20. 최승훈. *동의종양학*. 서울: 행림출판; 1995
  21. 안문생. 항암제 mitomycin C와 수종 보익제의 병용투여효과에 대한 연구. *대한한방내과학회지*, 1994; 15(1): 60-80.
  22. 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*, 1990; 10(12): 717-719.
  23. 강윤희. 수종의 한약물이 백서의 자연살해세포활성에 미치는 영향, *대한한의학회지*, 1987; 8(1): 53-74.
  24. 한주석, 고병희, 송일병. 태음인 갈근해기탕이 면역반응 및 NK세포활성도에 미치는 영향. *대한한의학회지*, 1990; 11(2): 106-114.
  25. 왕덕중, 박준혁, 유영범, 심범상, 최승훈,

- 안규석. 가미자도환 구성약물의 혈관신생 억제효과에 관한 연구Ⅱ. 동의생리병리학 회지 2001; 15: 235-240.
26. 왕덕중, 박준혁, 유영법, 심범상, 최승훈, 안규석. 가미자도환 구성약물의 혈관신생 억제효과에 관한 연구 I. 동의병리학회지 2000; 14(2): 155-167.
27. 박준혁. 부정방암탕 구성 약물의 암전이 억제에 대한 연구. 서울. 경희대학교 대학원. 2001
28. 김성훈. 活血祛瘀藥物이 抗血管新生에 미치는 影響에 關한 研究. 서울. 경희대학교 대학원. 2001.
29. 김호철. 한약약리학. 서울: 집문당; pp. 422-427. 2001.
30. 劉春安, 彭明 主編, 抗癌中草藥大辭典, 湖北, 湖北科學技術出版社, 1994.
31. Morisaki N, Watanabe S, Tezuka M, Zenibayashi M, Shiina R, Koyama N, Kanzaki T, Saito Y. Mechanism of angiogenic effects of saponin from ginseng *Radix rubra* in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 1995; 115(7): 1188-93.
32. Sato K, Mochizuki M, Saiki I, Yoo YC, Samukawa K, Azuma I. Inhibition of tumor angiogenesis and metastasis by a saponin of *Panax ginseng*, ginsenoside-Rb2. *Biol Pharm Bull*. 1994; 17(5): 635-9.
33. Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, Sato K, Saiki I, Tono-oka S, Samukawa K, Azuma I. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg3, of red ginseng. *Biol Pharm Bull*. 1995; 18(9): 1197-202.
34. Kobayashi S, Miyamoto T, Kimura I, Kimura M. Inhibitory effect of isoliquiritin, a compound in licorice root, on angiogenesis in vivo and tube formation in vitro. *Biol Pharm Bull*. 1995; 18(10): 1382-6.
35. Kojima S, Inaba K, Kobayashi S, Kimura M. Inhibitory effects of traditional Chinese medicine Shimotsu-to and its included crude fractions on adjuvant-induced chronic inflammation of mice. *Biol Pharm Bull*. 1996; 19(1): 47-52.
36. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000; 6(4): 389-95.
37. Borden P, Heller RA. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1997; 7(1-2): 159-78.
38. Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, Lohi J, Keski-Oja J, Tryggvason K. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase, *J Biol Chem* 1991; 266: 16485-16490