

十全大補湯이 血管新生 抑制에 미치는 效果

최훈 · 강희 · 심범상 · 김성훈 · 최승훈 · 안규석

경희대학교 한의과대학 병리학교실, 경희대학교 한의학연구소

Anti-angiogenic Effects of Shiquandabutang

Xun Cui, 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*

Shiquandabutang is very famous prescription for tonifying vital energy. We examined the anti-metastatic effect of Shiquandabutang with in vitro invasion assay model. We performed the following experiments and the results are listed below: Cell viability assay was carried to determine the dose of Shiquandabutang. At lower dose under 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (89.6%) viability was very high. But, viability downed as dose grows. At the dose of 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (54.2%) viability was almost half of that of control. And at high dose of 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (15.8%) viability was very pure. In BrdU incorporation assay, Shiquandabutang treated groups showed the decreased DNA synthesis rate compared with control group. (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (64.4%), 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (7.3%)) The results of gelatinase assay showed that Shiquandabutang decreases the gelatinolytic activity of MMP-9. We examined tube formation assay and the result was that Shiquandabutang inhibits the tube formation at the dose of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$. We examined rat aortic ring assay and the result was that Shiquandabutang inhibits the angiogenesis of the rat aortic ring at the dose of 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$. From our research, part of the mechanism underlying anti-metastatic effect of Shiquandabutang was proven in vitro. Moreover, we knew that Shiquandabutang is more effectively inhibits the angiogenesis at high dose.

Key words : Shiquandabutang, angiogenesis, BCE

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

본 논문은 아래의 저자로부터 전재를 허가받고 게재함
원문: 최훈 외. 十全大補湯이 血管新生 抑制에 미치는 效果.
동의생리병리학회지 제15권 3호 2001

I. 緒 論

최근에는 분자생물학적 연구의 발달로 가까운 시일 내에 암 정복이 가능하리라는 전망을 낳고 있음에도 불구하고 암은 여전히 다루기 힘든 질병이다. 이러한 난점은 주로 암이 전이된다는 생물학적 특성에서 비롯하는 것이다.¹⁾

실제 임상에서 암의 재발은 매우 중요한 문제인데, 고형 종양의 약 80%에서 전이가 일어나고, 암으로 인한 사망의 약 70%는 재발암에 의한다. 따라서 종양의 재발을 방지하는 것이 임상적으로 큰 의의를 지니게 되며, 이와 관련한 연구는 gelatinase와 전이와의 상관성²⁾과, Folkman의 angiostatin, endostatin 연구^{3,4)} 이래로 매년 폭증하고 있는데, medline으로 1998년, neoplasm metastasis 관련 논문을 검색하면 195편인 반면, 혈관신생(angiogenesis) 관련 논문은 1046편으로서 최근에는 신생혈관 억제를 통한 항암, 항전이 연구가 주류를 이루고 있다.

종양의 전이와 혈관신생의 과정은 세포가 종양세포인가, 혈관내피세포인가의 차이와 서로의 방향성에 차이가 있을 뿐 그 과정(local invasion)은 근본적으로 동일하다. 따라서 종양의 재발방지라는 입장에서는 전이와 혈관신생은 동전의 양면이라고 할 수 있으며, 혈관신생이 없으면 대부분의 종양은 1 mm 이상 성장할 수 없기 때문에^{5,6)} 혈관 신생의 억제를 통해 폐암, 간암, 유방암, 전립선암 등 악성 및 전이성 암의 선택적인 증식억제와 전이 억제 방법의 일환으로 혈관신생을 억제하는 약제나 방법의 개발이 세계적으로 활발히 이루어지고 있다.^{7,8,9)}

최근 연구되고 있는 혈관 신생 억제 연구는 MMPs inhibitor 개발, 혈관내피세포의 증식 억제제 개발, 혈관신생 촉진 인자의 활성 저해제 개발, 혈관내피세포 특이적 integrin의 저해제 개발이라는 4가지 측면에서 접근하고 있는데, NCI에서 진행하는 혈관신생 억제제의 임상시험 프로젝트 17건 중에서 5건이 MMPs의 inhibitor 약제이다.¹⁰⁾

본 연구는 한약재의 암재발 방지 효과를 측정, 평가하는 일련의 연구과정의 한 단계로서, human fibrosarcoma HT1080에 十全大補湯을 처치한 경우, 암세포의 전이에 중요한 역할을 담당하는 MMPs family의 발현이 저해되었다는 연구 결과를 바탕으로¹¹⁾, 十全大補湯이 혈관신생 억제에 미치는 효과를 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗 方法

1. 檢液의 準備 및 投與

切片한 十全大補湯의 構成藥物 18貼 분량, 972 g을 유리로 된 抽出瓶에 넣고 80% methanol을 試料가 잠기도록 충분히(4 l) 넣은 후 還流冷却裝置를 하고 60℃ 水浴槽에서 4시간 동안씩 2회 추출하여 솜과 거즈로 濾過한 후 濾過液을 濃縮器로 減壓濃縮하여 427 ml의 濃縮液을 얻었다(濃度 637 mg/ml, 收率 27.1%). 이 濃縮液에 66% dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 용액이 가장 잘 녹은 상태

Table 1. Composition of Sipjeondaebotang
(Shiquandabu-tang; SJDBT)

SJDBT	용량(g)
人蔘 <i>Panax ginseng</i> C. A. MEY.	108
白朮 <i>Attractylodes macrocephala</i> KOISZ.	108
白茯苓 <i>Poria cocos</i> (SCHW.) WOLF	108
熟地黄 <i>Rehmannia glutinosa</i> (GAERTNER) LIBOSCH.	108
白芍藥 <i>Paeonia lactiflora</i> PALL.	108
當歸 <i>Angelica gigas</i> NAKAI	108
川芎 <i>Ligusticum chuanxiong</i> HORT.	72
甘草 <i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH.	72
黃芪 <i>Astragalus membranaceus</i> BUNGE	72
肉桂 <i>Cinnamomum cassia</i> PRESL	72
total amount	972

가 되도록 한 후 100 mg/ml, 200 mg/ml의 농도가 맞추어 실험에 사용하였다.

2. 細胞株 培養

본 실험에는 牛 血管內皮細胞株인 Bovine Capillary Endothelial Cell(BCE)을 사용하였다. BCE의 培養은 DMEM 培地에 55℃ 恒溫槽에서 30분간 加溫하여 불활성화시킨 Calf Serum (CS, Gibco. BRL)를 10% 포함시키고 1% 抗生劑 (penicillin/streptomycin)와 NaHCO₃ 2.2 g 을 첨가하였고 basic fibroblast growth factor (Upstate Biotechnology)를 3 ng/ml의 농도로 첨가하였으며 1.5% gelatin으로 도포된 배양접시에 繼代培養을 3일 간격으로 실시하였다.

3. MTT Assay

本 實驗에 사용한 MTT법은 Mosmann¹²⁾이 개발한 방법으로 Promega사의 실험방법에 준하여 實驗하였다.

BCE 細胞를 96-well cell culture plate에 細胞數가 각각 2×10⁴cells/well이 되도록 seeding

하여 100 μl 10% CS-DMEM과 함께 48시간 동안 37℃, 5% CO₂ 細胞 培養基에서 培養하였다. 100 μl의 10% CS DMEM에 十全大補湯의 濃縮液을 가하여 細胞에 투여하였다.

20시간이 경과한 후 MTT dye solution을 20 μl/well 가한 후 10분 후에 ELISA reader (Molecular Device, U.S.A.)를 이용하여 測定 波長 490nm, 參照 波長 650nm에서 측정하였다. Blank 값을 위해서 대조군에는 약재를 가하지 않은 100 μl serum free DMEM의 측정값을 blank로 하였고 실험군은 배양액에 약을 첨가한 측정값으로 정하였다.

4. Proliferation assay

BCE 세포에 대하여 BrdU (5-bromo-2'-deoxy-uridine) incorporation 實驗을 실시하였는데 Roche Molecular Biochemicals社의 방법에 준하였다. 우선 細胞를 96-well plate에 각각 2×10⁴ cells/well의 비율로 10% CS-DMEM 100 μl 와 함께 seeding하였다. 48시간이 지난 후 十全大補湯 농축액을 가하고 동시에 BrdU labeling solution 10 μl/well을 가하였다. 18시간이 지난 후 ethanol 70% (in HCl) 200 μl/well을 가하여 -20℃에 30분간 두어 세포를 고정한 후 PBS 200 μl/well로 3회 세척하였다. 다시 nuclease 100 μl/well로 가한 후 30분간 37℃ water bath 에 놓고 나서 PBS 200 μl/well로 3회 씻었다. 다시 anti-BrdU-POD (peroxidase labeled antibody to BrdU, Fab fragments)를 100 μl/ well 에 30 분간 37℃ water bath에 둔 후 washing buffer 200 μl/well로 3회 세척하였다. Peroxidase 100 μl/well를 넣고 10분 후에 ELISA reader를 이용하여 측정 파장 410nm, 참고 파장 490nm로 하여 측정값을 읽었다.

5. Gelatinase assay

BCE 세포를 6-well cell culture plate에 1×10^6 cells/well로 seeding하여 2 ml 10% CS DMEM과 함께 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 十全大補湯 농축액을 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 μ 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 방법¹³⁾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 추가하여 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 CaCl₂, 1 μ M ZnCl₂, 0.02% NaN₃)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青色으로 염색된 gel에서 깨끗한無色の帶域이 검출되는 것으로 증명된다.

6. Tube formation assay¹⁴⁾

24-well cell culture plate를 얼음 접시에 놓고 2.4 mg matrigel (12.1 mg/ml)을 가한 후

spatula를 이용해 도포하였다. Matrigel을 바른 plate는 37°C incubator에 30분간 방치하여 matrigel이 gel화 되도록 하였다. BCE 세포를 matrigel이 도포된 plate에 8×10^4 cells/well로 접종하고 10% CS과 bFGF (3 ng/ml)이 첨가된 DMEM 배지와 함께 한약 추출물을 50, 100, 200, 400 μ g/ml의 농도로 첨가하여 CO₂ incubator에서 배양하였다. 6, 12, 18 시간이 경과한 후 신생 혈관망을 역상 현미경(Olympus CK40, Japan)으로 50 배율에서 사진을 촬영하여 BCE 세포의 분화 정도를 관찰하였다.

7. Aortic ring assay^{15,16)}

48-well tissue culture plate에 100 μ l/well (11.46 mg/ml)의 matrigel (Beckton-Dickinson)을 4°C를 유지하면서 도포한 뒤 CO₂ incubator에 well plate를 30~60분간 두어 溶液狀態의 matrigel이 gel이 되게 하였다.

4-6주 된 무게 200g 미만의 SD (Sprague-Dawley) rat을 CO₂ 가스를 이용하여 질식사시킨 후 胸部를 sagittal section하여 大動脈弓을 중심으로 3cm 정도로 잘라낸 뒤 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)에 담겼다. 無菌상태에서 주변 組織과 대동맥 속의 혈액 및 血餅 조각을 잘 제거한 뒤 대동맥을 HBSS가 담긴 배양접시에 놓고 메스를 사용하여 0.8mm의 두께의 ring 24개를 잘라낸 다음 matrigel로 도포된 48-well tissue culture plate에 대동맥의 ring을 well 중앙에 하나씩 놓고 40 μ l의 matrigel를 추가로 注入하여 ring을 도포하고 그 다음 incubator에 30분간 넣어두었다. 그 후 ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement) 200 μ g/ml를 함유한 human endothelial basal growth media에 한약 抽出物을 첨가하여 각 well에 200 μ l씩을 넣어주고 대조군은 ECGS를 함유한 media 만을 넣어주었다.

5일 동안 CO₂ incubator에 培養한 뒤

media를 제거하고 역상 현미경으로 40배율에서 촬영하였다.

III. 實驗 結果

1. 十全大補湯의 BCE 세포에 대한 세포 독성

十全大補湯의 BCE 세포에 대한 세포독성을 알아 보기 위하여 MTT assay를 시행하였다.

血管內皮細胞에 의한 血管新生은 細胞의 分化能을 測定하는 것이므로 韓藥의 投與에 의해 細胞毒性이 나타나서는 안된다. 이러한 韓藥의 投與 濃度를 결정하기 위하여 細胞 生存率을 測定할 필요가 있으며 cell titer 96 kit (Promega)를 이용, MTT assay를 하였다. MTT는 細胞內로 吸收되어 mitochondria의 加水分解酵素에 의해 formazan 結晶으로 還元된다. 이 結晶物이 보라색을 띠고 있는데, 그 색의 양을 정량적으로 測定하게 되면 살아있는 細胞의 數를 代表하는 것으로 看做하고 있다.

實驗結果 (Table 2), 十全大補湯은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度에서 세포 생존율 89.6%로서 대조군과 비슷한 생존율을 나타내고 있으나 이후로는 점차 생존율이 감소하여 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 약 절반이 사멸하며 1 mg/ml 농도에서는 약 15%만이 생존하고 있다. 따라서 이후의 tube

Table 2. Inhibition Effects of the SJDBT on Proliferation of BCE.

SJDBT($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Proliferation (%)		
0	0.86	± 0.19	(100.0)
50	0.86	± 0.35	(98.6)
100	0.69	± 0.16	(80.2)
200	0.57	± 0.20	(64.4)
400	0.11	± 0.01	(7.3)
600	0.06	± 0.00	(2.2)
800	0.07	± 0.01	(1.4)
1000	0.06	± 0.01	(1.4)

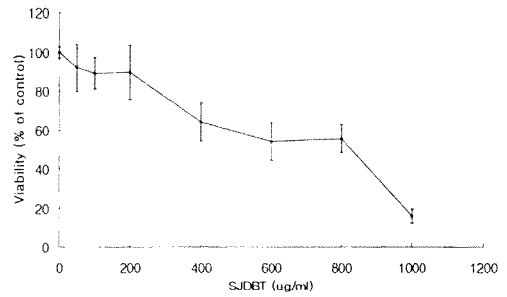


Fig. 1. Effect of SJDBT on viability of BCE cells.

formation assay에서는 十全大補湯 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지의 농도를 선택하였다.(Fig. 1)

2. 十全大補湯이 BCE 세포의 세포증식에 미치는 영향

血管新生은 血管內皮細胞의 增殖이 필수적으로 선행되어야 하므로 혈관내피세포에 한약을 투여하여 세포증식능을 살펴보는 것은 한약이 혈관신생을 억제하는가의 여부를 판단할 수 있는 지표가 된다. 방사선 동위원소를 대체하면서 DNA 합성율을 측정할 수 있는 BrdU assay를 시행하였다.

측정한 결과(Table 3.), 十全大補湯은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지는 대조군과 비슷한 정도의 혈관내피세포 증식율을 나타내었으며, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 대조

Table 3. Effects of the SJDBT on Viability of BCE.

SJDBT ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Viability(%)	
0	0.308 \pm 0.009	(100.0)
50	0.284 \pm 0.038	(92.1)
100	0.275 \pm 0.025	(89.2)
200	0.276 \pm 0.043	(89.6)
400	0.198 \pm 0.031	(64.1)
600	0.167 \pm 0.030	(54.2)
800	0.172 \pm 0.022	(55.7)
1000	0.049 \pm 0.012	(15.8)

군의 증식율에 비하여 64.4%로 저하되었다. 특히 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 증식율이 7.3%에 불과한 반면 생존율은 64.1%에 달하였다.(Fig. 2)

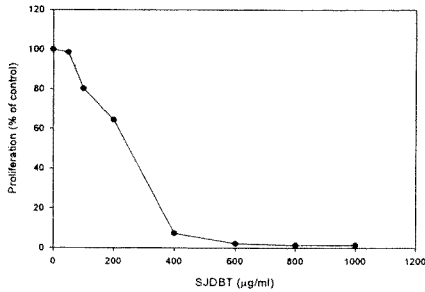


Fig. 2. Inhibition effect of SJDBT on proliferation of BCE

3. 十全大補湯이 MMP-2, MMP-9 활성에 미치는 영향

血管內皮細胞가 血管新生을 하여 癌組織을 향해 자라나기 위해서는 암세포가 혈관을 향해 침윤하는 것과 마찬가지로 細胞外基質 (extracellular matrix, ECM)을 分解하고 移動하는 段階를 거쳐야 한다.

ECM은 여러 가지 成分으로 構成되어 있는데, 이 중에서 collagen type IV가 주요 成分 중의 하나이며, 癌細胞는 ECM을 分解하기 위하여 여러 가지 蛋白分解 酵素를 분비하는데, 이들은 共通的으로 Zn 이온이 있어야 蛋白質을 분해할 수 있기 때문에 matrix metalloproteinases (MMPs)라고 부르며, 현재까지 16 종류가 알려져 있다.

MMPs family 가운데 collagen type IV를 基質로 하는 것은 MMP-2, -9 두가지가 알려져 있으며 이들은 각기 72KD, 92KD의 크기를 갖고 있다. Gelatin zymogram은 이들 MMP-2, -9의 發顯과 그 活性를 알아보는 방법이다.

실험결과 (Fig. 3) zymogram에서는 MMP-2의 basal level 만이 나타나고 있으며, MMP-9의 band는 확인되지 않고 있다.

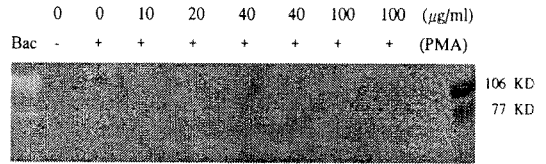


Fig. 3. Gelatin zymogram of conditioned media with or without SJDBT, PMA (100ng/ml) from BCE. Bacterial collagenase(Bac.) was served as positive marker. Molecular weight maker was indicated. The conditioned media were electrophoresed on 8% SDS polyacrylamide gel containing 0.4mg/ml of gelatin B.

4. 十全大補湯이 BCE 세포의 血管新生에 미치는 영향

十全大補湯이 BCE 세포의 血管新生에 미치는 영향을 알아보기 위하여 BCE 세포를 이용한 tube formation assay를 시행하였다. 배양중인 혈관내피세포를 세포외기질과 같은 구성성분으로 만들어진 matrigel에서 혈청이 첨가된 배양액으로 배양하면, 혈관내피세포가 분화를 하여 세포와 세포간에 혈관을 형성하고 이 혈관들은 다시 문합되어 혈관망을 형성하게 된다. 분화를 시작하는 혈관내피세포에 十全大補湯을 투여하여 일정한 시간 동안 관찰하면 혈관신생, 혈관망 형성에 미치는 영향을 파악할 수 있다.

실험 결과(Fig. 4), 대조군은 6시간이 경과하면서 세포들이 분화하여 모세혈관을 형성하기 시작하고 12, 18시간이 경과하면 이러한 정도가 더욱 분명해지고 있으나, 18시간 쯤에는 일부 분화되지 않고 세포가 바닥에서 탈락되려는 상

태에 있는 것이 일부 관찰되고 있다. 十全大補湯을 투여한 경우, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여군에서는 대조군과 비슷한 정도의 혈관신생을 보여주고 있으나, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여군에서는 세포와 세포간의 혈관 신생과 혈관망 형성이 대조군에 비하여 저조하며, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여군에서는 6, 12, 18 시간 투여군 모두 대조군에 비하여 혈관신생이 억제된 소견이 관찰된다. 이러한 억제 양상은 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 가장 분명해지고 있다. 이러한 소견이 세포사에 의한 것인지를 확인하기 위하여 사진 촬영 직후 trypan blue를 이용하여 염색한 결과 대조군에서는 세포사가 관찰되지 않으나 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 18 시간 투여군에서는 약 10%에 달하는 세포사가 관찰된다. 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서의 세포 생존율이 64.1% 였으므로 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여군의 관찰 소견 중 일정 부분은 세포사에 의한 것으로 추정할 수 있으나, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서의 세포 생존율은 89.6%로서 대조군과 유사하므로 이 농도에서의 관찰 소견은 十全大補湯이 BCE 세포의 분화과정 중 중요한 부분 혹은 cytoskeleton 등에 유의한 영향을 미치고 있을 것임을 시사해 준다.

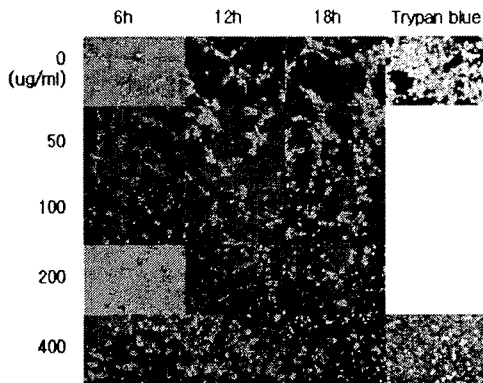


Fig. 4. Effect of SJDBT on tube formation of BCE cells.

5. 十全大補湯이 Rat Aortic Ring의 血管新생에 미치는 영향

十全大補湯이 생체조직의 血管新생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 白鼠 대동맥의 절편을 이용하여 rat aortic ring assay를 시행하였다.

실험 결과, ECGS(Endothelial Cell Growth Supplement)만을 투여한 대조군에서는 혈관 형성이 잘 되어 있는 것을 볼 수 있다. 十全大補湯을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여한 경우는 대조군과 별다른 차이를 보이지 못하고 있다. 차이를 보이기 시작하는 농도는 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터이며, aortic ring의 내외의 혈관형성이 어느 정도 억제되는 것을 보여주며, 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 이러한 현상이 현저하게 나타난다. 따라서, 十全大補湯은 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 白鼠 大動脈의 혈관 신생을 억제하는 것으로 나타났다.(Fig. 5)

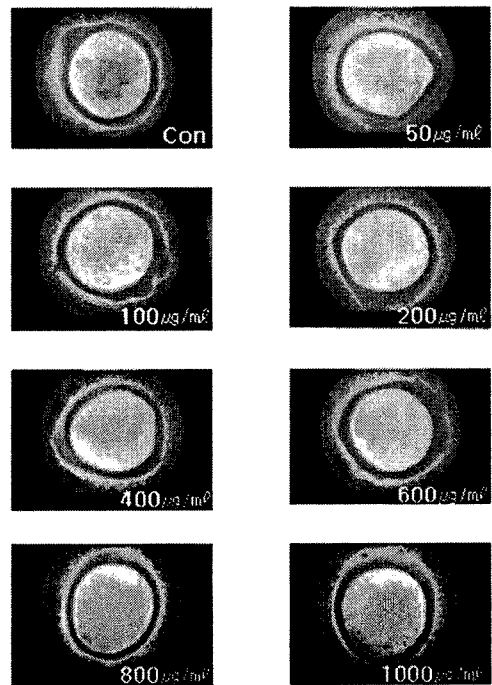


Fig. 5. Effect of SJDBT on Aortic Ring Assay

IV. 考 察

종양에 관한 기록은 오래전부터 전해져 내려왔다. 일찍이 殷墟의 갑골문에 ‘瘤’라고 하는 병명이 나타나고, 2천여 년 전의 『周禮』에는 종양만을 전문적으로 치료하는 ‘瘍醫’라는 명칭이 등장하는 것으로 보아 종양에 대한 인식이 이미 오래 전부터 시작되었음을 알 수 있다.⁸⁾ 또한 종양의 원인으로 原發性因子와 續發性因子를 제시하고 있는데 原發性病因에는 風·寒·暑·濕·燥·火의 外感因子와 情志·飲食·過勞에 의한 內傷病因이 있고, 續發性病因에는 痰飲과 瘀血을 들고 있다.⁸⁾

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^{8,18)}, 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 방법으로는 活血化瘀法·清熱解毒法·軟堅散結法 등이 활용되고 있다.^{8,32,34,40)} 특히 중국에서는 양방의 수술 및 방사선·화학요법과 결합이나, 수술 및 방사선·화학요법의 치유기나 후유증의 치료를 위해 한약을 함께 처방하는 방법이 많이 쓰이고 있다.⁸⁾

1971년 Folkman에 의해서 원발성 종양이 존재할 경우 혈액 속에 혈관형성을 억제하는 물질이 존재한다는 가정 아래 처음으로 anti-angiogenic therapy가 암치료를 위한 수단으로 등장한 이래⁶¹⁾, 1985년에는 Harvard의대의 Vallee 등에 의해 혈관신생 유도단백질인 angiogenin이 사람의 腺癌細胞의 배양액으로부터 최초로 분리되었고¹¹⁾, 1994년에는 원발성 종양을 갖고 있는 쥐의 혈청과 오줌으로부터 38kDa의 angiostatin

을 분리해내어 angiogenesis 억제효과를 확인했으며⁶⁷⁾, 1997년에는 20kDa의 endostatin이라는 물질을 분리해내어 혈관내피세포의 성장을 억제하는 효과를 확인하였고, 1998년에는 NCI에서 공식적으로 angiostatin과 endostatin을 동시에 투여하여 쥐에 유발된 종양의 성장을 억제함을 발표함으로써, 종양의 혈관신생억제가 새로운 종양 치료방법으로 세계적인 관심을 끌게 되었다.^{16,63,67,69)}

최근 연구되고 있는 혈관 신생 억제 연구는 MMPs inhibitor 개발, 혈관내피세포의 증식 억제제 개발, 혈관신생 촉진 인자의 활성 저해제 개발, 혈관내피세포 특이적 integrin의 저해제 개발이라는 4가지 측면에서 접근하고 있는데, NCI에서 진행하는 혈관신생 억제제의 임상시험 프로젝트 19건 중에서 5건이 MMPs의 inhibitor 약재이다.

혈관내피세포가 세포외 기질 (extracellular matrix: ECM)을 분해하여 관통하는 기전은 MMP 유전자가 발현되어⁶²⁾, 주변 조직으로 MMPs 효소가 분비⁵⁹⁾되어 ECM의 구성 성분을 절단, 분해하면 그 빈자리에 혈관내피세포가 침윤성장하여 통과하게 되는 것이다.⁵⁰⁾

ECM은 조직 용적의 상당 부분을 차지하고 있으며, 불용성이면서 연속적으로 짜여져 큰 단백질이 통과할 수 없는 연성구조로 되어 있다. Fibrous structural protein (collagen, elastin), adhesive glycoprotein, proteoglycan으로 나뉘며 이중 type IV collagen은 ECM의 주요 구성 성분으로 그물망과 같은 조직을 형성하고 있다.³⁸⁾

MMP에는 14 종류가 알려져 있는데 이들은 모두 Zn⁺⁺를 갖고 있으며, 활성화되기 위해서는 Ca⁺⁺이 필요하며, 세포에서 proenzyme 형태로 분비되었다가 N-terminal domain의 아미노산 잔기 일부가 잘려 나가면서 활성화된다. 주로 작용하는 基質의 종류에 따라 collagenase, gelatinase, stromelysine, membrane bound type 및 기타의 5가지로 분류한다.⁴⁴⁾

본실험에서는 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 基質로 하며, MMP-9은 gelatin, collagen type IV · V, elastin, proteoglycan core protein을 基質로 한다.

Gelatinase의 분비는 cell type specific하여 MMP-9은 monocyte/macrophage 및 fibroblast에서 분비되며, MMP-2는 normal human skin fibroblast에서 분비된다⁶⁴). PMA, epidermal growth factor, interleukin-1 β , tumor necrosis factor α (TNF- α)는 MMP-9의 발현을 증가시키고^{58,60}, transforming growth factor β 는 대부분의 MMP를 down-regulation하지만 MMP-2와 MMP-9의 발현은 증가시킨다⁶³). MMP-2와 MMP-9을 down-regulation하는 것으로는 retinoic acid, dexamethasone, interferon- β , - γ , vitamin D3가 보고되었다^{45,48,54}). Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)는 MMP의 강력한 억제제로서 활성형뿐만 아니라 불활성형의 type IV collagenase와도 결합하여 그 gelatinolytic activity를 억제한다. TIMP는 연골이나 뼈와 같은 정상조직에서 만들어질 뿐만 아니라 많은 암세포에 의해서도 형성된다⁶¹). 따라서 암세포의 ECM 침투는 활성형 type IV collagenase와 TIMP간의 평형에 의해 조절되는 것으로 이해되고 있다.

MMP-2의 cis-acting element로는 CREB, AP-1, -2, PEA3, c-myc, p53, Sp1이 있으며⁴³, MMP-9의 transcription factor로는 NF κ B, PEA3, AP-1이 있다⁵²). 특히 AP-1 site는 PMA에 의한 signal이 DNA에 전달되는 장소로서 대부분의 MMP 유전자의 전사 조절에서 중요한 비중을 차지하고 있다.

현재까지 알려진 angiogenesis 억제제는 thalidomide^{59,60} · angiostatin⁶⁷ · endo-statin⁶⁹ · 2-methoxyestradiol⁵⁶ · TNP-470^{56,57,66,70,77}) 등 11종 화합물이 angiogenesis와 관련하여 임상실험 중에 있는 것으로 알려져 있으며, 이중 TNP-470은 이미 동물실험을 끝내고 두 번째 임상실험을 진행 중에 있는데 매우 효과적인 것으로 학계에 보고되고 있다^{56,57,66,70,77}).

이와 같이 혈관신생을 조절하는 물질을 찾아 내어 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 점이다¹⁵). 그러나 신생혈관 억제를 위한 신약개발은 신물질 개발의 어려움과 함께 임상적용 단계에서 예기치 못한 부작용이 발생할 수 있는 문제를 안고 있기 때문에^{16,58,64}) 이에 비해 상대적 부작용에 대한 위험성이 적고, 인체의 면역증강 효과가 있다고 인정되는 한약의 항암효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{9,11,14,17-20,22-29,31,51,52,55}).

최근까지 발표된 실험적 연구로서 桂枝²⁰ · 鬱金²³) 등 단미제가 angiogenesis의 억제효과가 있는 것으로 보고되었으며, 처방으로는 扶正防癌湯²⁵)외에도 沒藥散¹⁹ · 活絡效靈丹²²) · 加味慈桃丸^{21,26,30}) · 立安散²⁸) · 桃紅四物湯加減方³¹) 등이 혈관신생의 억제효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.

1997년 韓國韓醫學研究院의 설문조사 결과, 87%의 한의사가 암 치료경험을 갖고 있고, 이중 치료 후 호전율이 80%라고 응답하였다¹⁷). 또한 1990~97년 사이 학회지에 발표된 腫瘍 및 免疫에 관한 논문이 138편에 달해 90년대 이전에 발표된 36편에 비하여 폭증하고 있으며^{18,19}), 이러한 양상은 慶熙醫療院과 大田大學校 部屬韓方病院에 한방종양클리닉 등이 개설되는 것으로 발전하고 있다.

한의학 문헌에서 腫瘍에 대한 내용은 각종 病證에 포함되어 있으며 서양의학에서의 癌症과 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 등의 세가지 방법을 응용하는데 이는 주로 免疫機能의 活性化 및 腫瘍成長抑制를 기대하는 치료법이다. 면역학적 관점에서 扶正은 人體의 抗病力을 調節하고 免疫效能을 높이는 것이고, 祛邪는 免疫效能을 파괴하는 인자를 배제시키는 것이다. 따라서 扶正 뿐만 아니라 祛邪法을 통해 六淫, 瘀血, 痰濁 등 면역반응을 방해하는 인자를 제거함으로써 陰陽의 平衡을 維持하여 免疫力를 增強시킬 수 있다²⁰. 또한 암치료에 있어서 화학요법과 한약치료를 병행하는 것이 효과적임을 보고하는 사례는 매우 많으며^{21,22}, 우리 나라에서는 주로 正氣를 보강할 수 있는 藥物과 處方들에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다^{23,24}.

十全大補湯은 太平惠民和劑局方에 수재된 처방으로서 그 공효는 氣血雙補, 助陽固衛하며 主治는 氣血不足, 虛勞咳嗽, 面色萎黃, 脚膝無力, 食少遺精 及 瘡瘍不斂, 婦女崩漏, 五心煩熱, 時發潮熱^{25,26} 등이다.

人蔘은 大輔元氣, 生津止渴하는 대표적인 보약재이다. 독성이 매우 적고 암을 억제하며 면역기능을 제고하는 효능이 있다²⁷. 항암작용에 관해서는 肺癌, 源發性 肝癌, 胃癌, 白血病, 甲狀腺癌 등에 유효한 것으로 보고되고 있다. 白朮은 補脾燥濕하는 약재로서 食道癌, 骨髓癌, 惡性 淋巴腺癌, 肝癌 등에 유효한 것으로 보고되고 있다^{28,29}. 白茯苓은 滲濕利水, 益脾和胃하는 약재로서 脾臟癌, 鼻咽癌 등에 유효하다. 胃癌과 肝癌 환자에게서는 식욕이 증진되고 증상이 개선되며, 화학요법의 부작용을 경감시키고 면역기능을 어느정도 향상시키는 것으로

나타났다³⁰. 아울러 환자의 骨髓를 어느 정도 보호하는 작용도 갖고 있다. 熟地黃은 滋陰補血의 대표적 약재이다. 子宮 頸部癌, 骨癌, 陰虛型 肺癌, 肺癌, 白血病, 食道癌 등에 효과가 있다³¹. 특히 食道癌의 경우에는 熟地黃이 主材로 되어 있는 六味地黃丸을 투여하여 암의 轉變이 뚜렷이 억제되는 것으로 나타났다³². 白灼藥은 養血柔肝, 緩中止痛하는 약재로서 화학요법, 방사선요법으로 인한 白血球의 감소를 치료하는 효과가 있다. 그리고 肝癌, 甲狀腺 腫瘍, 腦腫瘍, 鼻咽癌, 白血病 등에 유효한 것으로 보고되고 있다. 특히 腦腫瘍에는 芪龍天麻湯을 써서 1년 후에 CT촬영상 음영의 뚜렷한 축소를 보였다³³. 當歸는 補血和血, 調經止痛, 潤腸通便시키는 약재이다. 白血病, 乳腺癌, 肝癌 등에 효과가 있으며 기관지염, 복강염, 비염 등에도 응용되고 있다³⁴. 白血病의 경우에 當歸를 主材로 한 한약 처방과 화학요법을 병행하여 급성 백혈병 18례 중 10례를 완전완해하고 6례를 부분완해시키는 뛰어난 결과를 보였다. 川芎은 活血止痛하는 血中之氣藥이다. 舌癌, 甲狀腺癌에 뛰어난 효과가 있으며 白血病에도 당귀등과 함께 응용되고 있다³⁴. 甘草는 緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥하는 약재이다. 舌癌, 鼻咽癌, 胃癌, 嬰兒血管腫 등에 효과가 있다. 이의 효천이나 폐결핵 등의 질환에도 이용되고 있다^{36,37}. 黃芪는 生用으로 益衛固表, 托毒, 生肌하며 炙用으로 補中益氣하는 약재이다. 방사선요법, 화학요법으로 야기된 백혈구 감소를 치료한다. 그리고 源發性 肺癌, 胃癌에 유효하며 혈관 질환에도 이용된다^{38,39}. 肉桂는 補元陽 暖脾胃, 除積冷 通血脈하는 약재이다. 十二指腸 淋巴肉腫, 胃淋巴肉腫에는 주로 破瘀活血제를 同用하여 환자에게 투여한다^{40,41}. 또한 白血病, 子宮癌, 卵巢腫瘍 등에 어느정도의 효과를 나타낸다^{42,43}.

十全大補湯에 관한 실험적 연구로는尹의 암전이 억제에 미치는 영향과 가토 간손상의 회

복⁴⁴⁾, 백서의 성장과 체중증가 등에 효과가 있다는 보고⁴⁵⁾가 있고, 항암제 mitomycin C (MMC)의 부작용을 회복시켜 준다는 보고⁴⁶⁾가 있으며, in vivo 상에서 colon carcinoma cell이 간으로 전이되는 것을 억제하였으며, 역시 in vivo 상에서 B16-BL6 melanoma cell이 폐로 전이 되는 것을 현저히 억제하였다는 보고가 있다⁴⁷⁾. 또한, sarcoma-180을 이식한 닭암생쥐의 생존기간과 연장과 지연형 과민반응, 적혈구 용혈소가, rosette 형성 세포 수, 세망내피계의 탐식능 등에서 유의성있는 면역증강효과가 인정되었다는 보고⁴⁸⁾가 있었다.

十全大補湯이 MMP-9의 발현을 억제한다는 실험결과는十全大補湯이 암전이 억제 뿐만 아니라 혈관신생에서도 이와 비슷한 효과를 나타내리라고 추측할 수 있게 하는 근거가 된다. 따라서 이전의 실험 결과를 바탕으로十全大補湯이 혈관내피세포의 혈관신생에 미치는 영향을 실험적으로 연구하게 되었다.

본 연구에서는十全大補湯이 혈관신생에 미치는 영향을 규명하기 위하여十全大補湯 농축액을 BCE 세포에 투여하여細胞毒性和 세포증식능에 미치는 영향을 측정하고, gelatinolytic activity의 변화를 측정하기 위하여 zymography를 시행하였으며, 혈관내피세포의 분화과정인 tube formation 과 ex vivo 상의 혈관신생 실험인 白鼠의 aortic ring assay를 시행하였다.

혈관신생을 위해서는 혈관내피세포가 증식된 후 침윤성 성장을 통해 암조직을 향해 자라나고, 혈관내피세포들이 분화하여 혈관을 형성하게 된다. 이러한 과정 중十全大補湯이 혈관세포인 BCE 세포에 대한 세포독성 및 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay와 proliferation assay를 동시에 시행하였다. 측정결과, 저농도(200 μ g/ml이하)에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 별다른 차이가 없었으며 1 mg/ml 농도에서는 15% 만이 생존하는 결과를 나타내었다. 세포증식능에 미치는 영향을 알아

보기 위하여 BrdU assay를 시행하였는데, 저농도(50 μ g/ml이하)에서는 세포증식능이 대조군과 유사하고 200 μ g/ml 농도에서는 대조군에 비하여 저하되기 시작하였으며 400 μ g/ml 농도에서부터는 대조군에 비하여 현격한 세포증식능 저해가 인정되었다.

위의 실험 결과에서 볼 때,十全大補湯은 BCE 세포에 대한 세포독성이 없는 농도(50 μ g/ml 이하)에서는 증식이 대조군과 유사한 결과를 나타내었다. 이는十全大補湯의 유사분열촉진(mitogenic activity)작용의 결과로 추정된다.^{49,50,51,52,53)}

혈관 내피세포의 분화도에 대하여 알아보는 tube formation assay에서는 100 μ g/ml이상의 농도에서부터 tube 형성이 억제되고 있는 것이 육안적으로 확인되었다. 이 과정은 분화와 관련된 매우 특수한 현상으로서十全大補湯이 혈관내피세포의 분화과정 및 cytoskelton의 재 배열에 특이적인 작용을 하고 있음을 시사해 준다.

쥐의 대동맥(aorta)을 적출하여 1mm 두께로 절편하여 ring을 만든 후 배양액과 검액을 투여하여 절단된 대동맥 벽에서의 혈관내피 세포의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위한 Aortic ring assay에서는 100 μ g/ml에서부터 농도의존적으로 억제효과가 나타남을 육안으로 확인할 수 있었다.

정리해 보면,十全大補湯은 50 μ g/ml의 농도에서는 세포독성이 없고, 세포증식은 대조군과 유사하며, tube 형성과 rat aorta의 내피세포 성장은 대조군과 별차이가 없었다. 100 μ g/ml에서부터 200 μ g/ml 농도까지는 세포독성은 거의 없고 세포증식은 대조군과 유사하며, tube 형성과 rat aorta의 내피세포의 성장은 억제하는 것이 확인되었다. 따라서 세포독성이 나타나지 않는 50 μ g/ml의 농도에서 혈관세포증식을 촉진시키는 결과가 나타나기는 하지만 혈관형성의 마지막 단계라 볼 수 있는 분화와 관련된 억제 효과가 나타나므로 혈관 신생 억제 효과가 있다고 생

각된다.

Tube formation assay의 결과들 중 분화 억제 효과가 가장 현저히 나타났던 400 μ g/ml 농도에서의 소견이 단순히 세포사에 의한 것인지를 알아보기 위해 trypan blue을 이용해 염색한 결과 약 10%의 세포사가 관찰되었다. 즉 400 μ g/ml 농도에서 세포 생존율이 64.1%였던 MTT assay와 비교해서 다소 차이가 나는 것인데, 이는 matrigel 첨가된 tube formation assay가 MTT assay와 비교해서 좀더 생체 내에 근접한 환경에서 이루어진 실험이었기 때문으로 생각된다. 임상적으로 혈관신생억제의 목적으로 十全大補湯을 대체로 적용할 때, 환자에 대한 부작용을 최소화시키면서 효과는 극대화를 꾀할 수 있는 용량이 있을 것임을 시사해 주는 점이다. 이는 투여목적에 따라 농도 및 용량을 변화시킬 수 있는 가능성을 제시하는 것이기도 하다. 예를 들어, 혈관신생을 위해서는 세포의 증식이 1차적으로 일어나야 하는데, 저농도에서 세포의 증식이 대조군보다 활발하게 나타나는 것은 허혈 상태가 문제가 되는 많은 혈관성 질환들에서 十全大補湯이 적용가능하다는 사실을 의미한다. 또한 고농도에서는 세포의 증식이 억제되면서 세포독성을 나타내고 있으나, 종양피 내에 존재하는 기존의 혈관망이 파괴될 수 있음을 시사한다. 또한 이미 이루어진 十全大補湯의 암전이에 미치는 영향에 대한 실험에서도 400 μ g/ml 이상의 고농도에서 유의한 결과를 얻었음을 고려해 볼 때⁵⁴⁾, 실제 임상에서 十全大補湯이 암치료에 사용될 때는 비교적 고용량이 투여되는 것이 암전이와 혈관신생을 억제하는 바람직한 결과를 유도할 수 있다는 근거로 삼을 수 있는 실험결과라고 생각된다. 물론 위의 결과들은 종양에 존재하는 기타 여러 혈관망에 미치는 영향에 대한 동물실험 등의 추가 연구가 진행되어야 할 것이다.

혈관신생을 위해 혈관내피세포가 증식되어 숫자가 증가하면 곧 이어 혈관내피세포가 암조

직을 향해 침윤성 성장을 하게 되는데, 이때 MMPs family의 혈관벽을 구성하는 기저막과 세포외기질에 대한 분해 작용이 필수적으로 수반된다. 따라서 혈관내피세포에서 MMPs family를 분비하는 기전이 내재해 있는데, 十全大補湯이 이에 미치는 영향을 알아보기 위하여 gelatinase assay를 시행하였다. 실험결과 gelatinase zymography 상에 MMP-2의 band 만이 검출되었고, MMP-9은 발현되지 않고 있었다. PMA에 의한 자극은 MMP-2를 제외한 MMPs family의 공통적인 전사인자이면서 가장 주된 역할을 하는 AP-1 binding site로 신호가 전달된다. PMA의 투여에 의해 MMP-9 signal을 증폭시킨 후 한약의 투여에 의해 MMP-9 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였으나, 실험결과로는 BCE 세포에서는 MMP-9이 발현되지 않는 것으로 생각된다. MMP-2의 발현 정도는 대조군이나 약물 투여군이나 모두 비슷한 정도를 나타내고 있으므로 BCE 세포에서는 十全大補湯이 MMP-2의 발현에 미치는 영향이 없는 것으로 생각된다. 그러나 HT-1080 세포를 이용한 gelatinase assay에서의 실험결과로는 十全大補湯이 400, 800 μ g/ml 농도에서 MMP-9, -2의 발현을 저해한 것으로 보고되어 있는데, 이러한 결과에 비추어 十全大補湯이 MMPs family의 발현 조절 작용이 없는 것은 아니며, BCE 세포에서는 MMP-9의 발현이 검출되지 않을 정도로 매우 낮은 수준인 것으로 생각된다.

十全大補湯이 BCE 세포의 血管新生에 미치는 영향을 알아보기 위하여 BCE 세포를 이용한 tube formation assay를 시행한 결과, 대조군은 6시간이 경과하면서 세포들이 분화하여 모세혈관을 형성하기 시작하고 12, 18시간이 경과하면 이러한 정도가 더욱 분명해지고 있으나, 18시간 쯤에는 일부 분화되지 않고 세포가 바닥에서 탈락되려는 상태에 있는 것이 일부 관찰되고 있다. 十全大補湯을 투여한 경우, 50 μ g/ml 투여군에서는 대조군과 비슷한 정도의 혈관신생을

보여주고 있으나, 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서는 세포와 세포간의 혈관 신생과 혈관망 형성이 대조군에 비하여 저조하며, 200 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서는 6, 12, 18 시간 투여군 모두 대조군에 비하여 혈관신생이 억제된 소견이 관찰된다. 이러한 억제 양상은 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 가장 분명해지고 있다. 이러한 소견이 세포사에 의한 것인지를 확인하기 위하여 사진 촬영 직후 trypan blue를 이용하여 염색한 결과 대조군에서는 세포사가 관찰되지 않으나 400 $\mu\text{g/ml}$ 18 시간 투여군에서는 약 10%에 달하는 세포사가 관찰된다. 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서의 세포 생존율이 64.1% 였으므로 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군의 관찰 소견 중 일정 부분은 세포사에 의한 것으로 추정할 수 있으나, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서의 세포 생존율은 89.6%로서 대조군과 유사하므로 이 농도에서의 관찰 소견은 十全大補湯이 BCE 세포의 분화과정 중 중요한 부분 혹은 cytoskeleton 등에 유의한 영향을 미치고 있을 것임을 시사해 준다.

十全大補湯의 白鼠 大動脈의 혈관생성 억제에 대한 실험 결과, ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement)만을 투여한 대조군에서는 혈관 형성이 잘 되어 있는 것을 볼 수 있다. 十全大補湯을 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 투여한 경우는 대조군과 별다른 차이를 보이지 못하고 있다. 차이를 보이기 시작하는 농도는 400 $\mu\text{g/ml}$ 부터이며, aortic ring의 내외의 혈관형성이 어느 정도 억제되는 것을 보여주며, 600 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 이러한 현상이 현저하게 나타난다. 따라서, 十全大補湯은 400 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 白鼠 大動脈의 혈관 신생을 억제하는 것으로 나타났다.

이상의 실험 결과로 미루어 十全大補湯의 혈관신생 억제 효과는 *in vitro* 수준에서 검증된 것으로 생각되며, 본 연구는 암의 전이를 억제한다는 기존의 연구 결과와 함께 十全大補湯의 항암효과와 전이억제 연구에 있어서 일정한 기

여와 함께 향후의 연구 방향에 대하여 제시하였다고 생각된다.

V. 結 論

十全大補湯이 혈관내피세포의 혈관신생에 미치는 영향을 규명하기 위하여 十全大補湯 농축액을 BCE 세포에 투여하여 MTT assay로 세포독성을 측정한 후, 세포 증식능에 미치는 영향을 알기 위하여 BrdU assay를 시행하였으며, gelatinolytic activity의 변화를 측정하기 위하여 zymography를 시행하였고, 혈관내피세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 tube formation assay와 Aortic ring assay를 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 十全大補湯은 200 $\mu\text{g/ml}$ 濃度이하에서는 세포 생존율 89.6%로서 대조군과 비슷한 생존율을 나타내고 있으나 그 이상의 농도에서는 점차 생존율이 감소하여 600 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약 절반이 사멸하며 1 mg/ml 농도에서는 약 15% 만이 생존하였다.
2. 十全大補湯은 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군과 비슷한 정도의 증식율을 나타내었으며, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군의 증식율에 비하여 64.4%로 저하되었고, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 증식율이 7.3%로 억제되었다.
3. Gelatinase assay에서는 MMP-2의 basal level 만이 나타나고 있으며, MMP-9의 band는 확인되지 않고 있다.
4. Tube formation assay에서는 十全大補湯을 투여한 경우, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서는 대조군과 비슷한 정도의 tube 형성을 보여주고 있으나, 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서는 세포와 세포간의 tube 형성이 대조군에 비하여 저조하며, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서

는 6, 12, 18 시간 투여군 모두 대조군에 비하여 tube 형성이 억제된 소견이 관찰된다.

5. Aortic ring assay에서는 400 μ g/ml에서부터 농도의존적으로 억제효과가 나타남을 육안으로 확인할 수 있었다.

이 실험결과를 보았을 때, 十全大補湯은 저농도(200 μ g/ml이하)에서는 BCE 세포에 대해서 세포독성은 거의 없고, tube 형성을 억제하는 것이 확인되었다. 고농도(400 μ g/ml)에서는 세포독성은 나타나지만, 세포증식, tube 형성, 그리고 rat aorta의 내피세포의 성장이 모두 억제되었다.

따라서, 十全大補湯은 저농도에서보다는 고농도에서 강력한 혈관신생억제 효과가 있음을 알 수 있었다.

參考文獻

1. 서울대학교 의과대학. 개정판 종양학. 서울: 서울대학교 출판부; 1989
2. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 1989;264:17213-17221.
3. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997 Jan 24;88(2):277-85.
4. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994 Oct 21;79(2):315-28.
5. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. *Nature Medicine*. 1995;1:27-31.
6. Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmac Ther*. 1994;63:265-311.
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. 윤재호, 최승훈, 안규석. 十全大補湯이 癌轉移 抑制에 미치는 影響. 대한한방종양학회지 1998;4:131-146.
12. Mosmann T Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 65(1-2): 55-63, 1983.
13. Heussen, C., Dowdle, E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.*, 102: 196-202, 1980.
14. 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* 156(2): 235-246, 1993.
15. Zhu WH. Guo X. Villaschi S. Francesco NR. Regulation of vascular growth and regression by matrix metalloproteinases in the rat aorta model of angiogenesis. *Laboratory Investigation*. 2000;80(4): 545-55.
 16. 김우호 : Invasion and angiogenesis assay, 제2차 세포주 연구 워크숍, pp 63-64, 1999.
 17. 성현제, 신현규, 박갑주, 강봉주, 은영아, 김은해, 정세영. 암치료에 있어서 체질과 항암효과에 관한 한의학적 연구. *한국한의학연구원논문집*, 1997; 3(1):85-104
 18. 문구, 정병학, 김병주. 암 동서의 결합치료 1. *원광대학교 출판국*; 1999
 19. 김현아, 임성우, 이원철, 한약을 이용한 항암 실험연구의 경향에 관한 고찰. *대한한방종양학회지*, 1998; 4(1):211-232
 20. 최승훈. *동의종양학*. 서울: 행림출판; 1995
 21. 안문생. 항암제 mitomycin C와 수종 보익제의 병용투여효과에 대한 연구. *대한한방내과학회지*, 15(1): 60-80, 1994.
 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. 강윤호. 수종의 한약물이 백서의 자연살해세포활성에 미치는 영향, *대한한의학회지*, 1987; 8(1):53-74.
 24. 한주석, 고병희, 송일병. 태음인 갈근해기탕이 면역반응 및 NK세포활성도에 미치는 영향. *대한한의학회지*, 11(2): 106-114, 1990.
 25. 王云凱 主編, 中國名醫名著名方, 河北, 河北科學技術出版社, pp.1261-1292, 1993.
 26. 陳師文, 太平惠民和劑局方 卷五, 北京, 旋風出版社, p.152, 18987.
 27. 張宗顯等: *中華醫學雜誌*, 44(11):1040, 1958.
 28. 劉國性等: 1978年度 上海地區性藥學學術會議 <醫藥論文摘要>(中國藥學會北京分會篇), p.269, 1978
 29. 張鴻翔等: *腫瘤防治通訊*, (2):40, 1976.
 30. 宋芳吉等: *新醫藥學雜誌*, (6):61, 1979.
 31. 張樹臣等: *生理學報*, 23(1):1, 1959.
 32. 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, pp. 20, 342, 712, 1117, 324, 442, 102, 263, 906, 449, 1994.
 33. 北京大學生物系: *北京醫藥工業*, (2):21-24, 1976.
 34. 張紹宗: *福建醫藥衛生*, (5):50, 1978.
 35. 四川中藥研究所: *四川中草藥通訊*, (1):44, 1974.
 36. 孫文靜摘譯: *中醫藥研究參考*, (1): 37, 1978.
 37. Longeman W et al: *Nature*, 187(13): 609, 1960.
 38. 黔南三十二醫院上海醫療隊: *貴州藥訊* (2): 21-24, 1976.
 39. 中國醫學技術院基礎醫學研究所等: *中華醫學雜誌*(1):23, 1979.
 40. 細野史郎: *韓方臨床*, 23(9):3, 1976.
 41. 中山醫學院<中藥臨床應用>編寫組: *中藥臨床應用*, 第 1版, 廣東人民出版社, p.8, 1975.
 42. 第四軍醫大學: <放射醫學與防護> 資料匯編, (2):31, 1974.
 43. 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, pp. 20, 342, 712, 1117, 324, 442, 102, 263,

- 906, 449, 1994.
44. 김한석,十全大補湯액을 투여하여 가토 간손상의 회복에 관한 실험적 연구, 대한한방내과학회지, 1: 8, 1976.
 45. 김길현외,十全大補湯 extract 투여가 rat의 성장 및 장기중량에 미치는 영향, 경희한의대논문집, 1: 101-104, 1978.
 46. 안문생 외, 항암제 mitomycin C와 수중보익제의 병용투여효과에 대한 연구, 대한한방내과학회지, 15(1): 60-80, 1994.
 47. Onishi Y, Yamaura T, Tauchi K, Sakamoto T, Tsukada K, Nunome S, Komatsu Y, Saiki I, "Expression of the anti-metastatic effect induced by Juzen-taiho-to is based on the content of Shimotsu-to constituents.", *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1998 Jul;21(7):761-5 Herbal/ch [Chemistry] Herbal/tu [Therapeutic Use]
 48. 황규동외,十全大補湯 와송 및十全大補湯가와송의 항암효과와 면역반응에 관한 연구, 대한한방종양학회지, 2(1): 1-24, 1996.
 49. Kiyohara H, Takemoto N, Komatsu Y, Kawamura H, Hosoya E, Yamada H, "Characterization of mitogenic pectic polysaccharides from kampo (Japanese herbal) medicine "juzen-taiho-to".", *Planta Med* 1991 Jun;57(3):254-9
 50. Yamada H, Kiyohara H, Takemoto N, Zhao JF, Kawamura H, Komatsu Y, Cyong JC, Aburada M, Hosoya E, "Mitogenic and complement activating activities of the herbal components of juzen-taiho-to.", *Planta Med* 1992 Apr;58(2):166-70
 51. Yamada H, "[Chemical characterization and biological activity of the immunologically active substances in Juzen-taiho-to (Japanese kampo prescription)]. [Japanese]", *Gan To Kagaku Ryoho* 1989 Apr;16(4 Pt 2-2): 1500-5
 52. Takemoto N, Kiyohara H, Maruyama H, Komatsu Y, Yamada H, Kawamura H, "A novel type of B-cell mitogen isolated from juzen-taiho-to (TJ-48), a Japanese traditional medicine.", *Int J Immunopharmacol* 1994 Nov;16(11): 919-29
 53. Yamada H, Kiyohara H, Cyong JC, Takemoto N, Komatsu Y, Kawamura H, Aburada M, Hosoya E, "Fractionation and characterization of mitogenic and anti-complementary active fractions from kampo (Japanese Herbal) medicine "juzen-taiho-to".", *Planta Med* 1990 Aug;56(4):386-91
 54. 윤재호, 안규석, 최승훈.十全大補湯이 암전이 억제에 미치는 영향. 대한한방종양학회지, 근간 1999.