

비기환이 신생혈관형성 억제에 미치는 효과

김대준* · 박봉기[†] · 이연월[†] · 유화승[†] · 한성수[†] · 조종관[†]

* 대구한의과대학 내과학교실

[†] 대전대학교 둔산한방병원 동서암센터

Abstract

Effects of Bikihuan (BKH) on anti-angiogenesis

DaeJun Kim*, BongKy Park[†], YeonWall Lee[†], HwaSeung Yoo[†]

SungSoo Han**, ChongGuan Cho**

*Internal Department of Oriental Medicine College, Daegoo University

[†] East-West Cancer Center, Dunsan Oriental Hospital of Daejeon University

Objective: To evaluate the effects of Bikihaun (BKH) on angiogenesis.

Method: We examined the anti-angiogenic effect of BKH in invasion assay model. We performed proliferation assay, migration assay, tube formation assay and Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM) assay.

Results: In proliferation assay, at lower dose under 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-angiogenesis effect of the group treated BKH made no difference with the control group. But, at the dose of 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or more anti-angiogenesis effect of the group treated BKH showed more effective as compared to the control group. In migration assay, BKH did not affect migration of vascular endothelial cell. In tube formation assay, at lower dose under 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ showed mild effect of anti-tube formation. But, at the dose of 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ showed more effective anti-tube formation. In CAM assay, BKH showed anti-angiogenesis effect at the dose of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Conclusion: BKH has antiangiogenetic properties *in vitro*.

Key words : Bikihaun; angiogenesis; human umbilical vein endothelial cells; basic fibroblast growth factor

I. 서 론

종양의 전이는 악성 종양의 대표적 특성으로

암환자에게 가장 흔한 사망원인이며 또 암 치료에도 큰 영향을 미치는 요인이다. 고형 종양의 약 80%에서 전이가 일어나고, 암으로 인한 사

망의 약 70%는 재발암에 의한다¹⁾. 그런데 신생 혈관 생성은 종양의 성장에 필수적일 뿐만 아니라, 종양의 전이에도 밀접하게 관련되어 있다²⁾. 여기서 혈관 신생이란, 기존의 혈관에서 새로운 모세혈관이 생기는 것으로 혈관 내피 세포의 이동, 증식, 및 분화의 과정을 거쳐서 이루어지는데, 정상적인 조건에서는 매우 엄격하게 조절되어, 배아 발생, 조직 재구성, 상처 치료, 여성의 주기적인 생식기 변화에서만 일어나지만³⁾, 암의 전이와 성장, 염증, 세균 감염, 자가 면역 질환 등 질환에서도 비정상적으로 증가한다는 것으로 알려졌다⁴⁾. 따라서 종양의 전이, 재발 방지라는 입장에서는 전이와 혈관 신생은 동전의 양면이라고 할 수 있으며 혈관 신생이 없으면 대부분의 종양은 1 mm 이상 성장할 수 없기 때문에⁵⁻⁶⁾, 혈관 신생의 억제제를 통해 폐암, 간암, 유방암, 전립선암 등 악성 및 전이성 암의 선택적인 증식 억제와 전이 억제 방법의 일환으로 혈관 신생을 억제하는 약제나 방법의 개발이 gelatinase와 전이와의 상관성과, Folkman의 angiostatin, endostatin 연구 이래로 매년 증가하고 있다⁷⁻¹²⁾.

국내에서도 혈관 신생 억제와 관련하여 식물 추출물을 이용한 다양한 연구가 시행되고 있으며¹³⁻¹⁵⁾, 계지, 백출, 원지, 육두구, 인진, 로즈마리, 레몬밤 등의 7종의 한약물에서 혈관 형성을 억제하는 효과가 있다고 보고되었고¹⁶⁾, 울금 등 몇몇의 한약제에서는 혈관 형성을 활성화하는 효과가 있다고 보고되었다¹⁷⁾.

痞氣丸은 脾積의 치료에 사용하는 한약제로 <醫學入門>에 처음 언급되어 있으며, 황련, 후박, 오수유, 황금, 사인, 백복령, 인삼, 택사, 인진, 건강, 육계, 파두, 백출 등 13종의 한약물로 구성되어 있다¹⁸⁾. 여기서 “脾積”이란 <難經>에 처음 언급되었는데, 심하부 우측에 치우쳐 크기가 쟁반을 덮어놓은 것으로 오래 지속되면, 팔다리를 잘 쓰지 못하게 되고 황달이 생기며 음식을 먹어도 살찌지 않는 것으로 오늘날의

췌장 두부암이나 담도암과 유사하다¹⁹⁾. 이런 문헌적 근거를 바탕으로 비기환은 현재 임상에서 소화기계 암, 특히 췌장암에 다 빈도로 활용되고 있다. 실험적으로도 한²⁰⁾ 등과 강²¹⁾ 등은 비기환이 백혈병과 림프종 세포에 대한 실험에서 유의한 항암효과를 보였다고 보고하였으며, 문²²⁾ 등은 마우스를 이용한 실험에서 비기환에 유의한 항종양 면역효과가 있음을 보고 하였다.

본 연구는 항종양 약제로 사용되는 비기환의 혈관 신생 억제 효과를 규명하기 위하여, 혈관 내피 세포인 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)에 비기환을 처치하여 proliferation assay와 migration assay, tube assay를 실시하였고, 또 Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM)을 이용한 assay를 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험방법

1. 재 료

1) 약물

본 연구에 사용된 비기환 (Bikihwan, BKH)은 대전대학교 둔산한방병원 약제실에서 제공된 한약물을 이용하여 조제되었다. 3,856g의 비기환 구성약물(황련 1,280g, 후박 640g, 오수유 480g, 황금 320g, 사인 240g, 백복령 160g, 인삼 160g, 택사 160g, 인진 240g, 건강 80g, 육계 64g, 파두 64g, 백출 32g) 중 파두를 제외한 한약물과 파두 64g을 각각 별도로 증류수에 여러 번 세척하고, 80℃로 6시간 동안 끓인 물질을 따로 분리하여 사용하였다. 단단한 고형 물질과 이물질들은 3,000×g, 30분간 원심 분리하여 제거하고 남은 입자들은 동결 건조하였다. 최종적으로 파두를 제외한 13.2g의 비기환 추출물과 0.3g의 파두 추출물을 각각 제조하여 이를 혼합하여 본 연구에 사용하였다. 추출물은 영하

20°C 보관하면서 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약 및 기기는 Gelatin (JUNSEI, Japan), PBS (GIBCO, USA), 96 well plate (SPL, KOREA), BSA (Amersco, USA), bFGF (Sigma, USA), heparin (Cambrex, USA), FBS (GIBCO, USA), XTT (Sigma, USA), 수정란 (폴무원), Intralipid 10% (Fresenius Kabi AB, Sweden), PMS (Phenazine methosulfate, Sigma, USA), EGM media (Cambrex, USA), EGM-2 singlequots (Cambrex, USA), Elisa reader (Mediators PhL, Diagnostics systems, USA), Polycarbonate membranes (8- μ m pore, Neuro Probe, USA), boyden chamber (Neuro Probe, USA), Diff Quik solution (Sysmex, Japan), matrigel (BD Biosciences, USA), 인큐베이터 (SANYO, Japan), thermanox coverslip (Nunc, USA), Image Gange V. 2.54(Fuji, Japan), OriginPro 6.1 (OriginLab Corporation, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

혈관 내피 세포인 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)은 Cambrex (USA)에서 공급받아 Jaffe 방법²³⁾으로 primary culture한 것을 1.5% 젤라틴이 코팅된 플레이트에서 EGM-2 singlequots, 2% FBS (fetal bovine serum)가 첨가된 EGM 배지에서 5% CO₂, 37°C 조건으로 배양하였다.

2) HUVEC proliferation assay

Proliferation assay는 XTT 방법²⁴⁾을 이용하여 실시하였다. 즉, 30분 동안 1.5% 젤라틴을 코팅된 96 well(또는 24 well) plate에 passage 5-7의 HUVEC을 well 당 세포수가 4×10^3 이 되도록 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 PBS로 well plate를 세척한 후 EBM과

1% FBS를 함유한 starvation medium 150 μ l를 가한 뒤 2-3시간 동안 배양하였다. 배지를 다시 제거한 후 starvation medium 150 μ l에 녹인 시료를 농도별로 처리 후 72시간 동안 배양하였다. 1ml XTT (1 mg/ml in PBS) stock solution과 10 μ l PMS (1.53 mg/ml in PBS)를 혼합 후 50 μ l를 각 well당 첨가하여 배양한 뒤 microplate reader 450nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교하여 세포의 증식율을 계산하였다.

3) HUVEC migration assay

Boyden chamber의 upper chamber에는 0.1% BSA/heparin buffer에 HUVEC과 시료를 잘 섞어 분주 하였다. HUVEC을 1% gelatin coating된 filter membrane를 통과해 -/+ basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF)가 들어있는 lower chamber로 8-12시간 동안 이동 시켰다. 이동한 HUVEC을 Diff-Quik stain법²⁵⁾으로 염색하여 시료의 HUVEC의 이동에 미치는 영향을 살펴보았다.

4) Capillary-like Tube formation assay

HUVEC을 1% fetal bovine serum과 25 ng/ml bFGF가 함유된 EGM 배지에서 5% CO₂, 37°C 조건으로 배양하였다. 이 세포를 Capillary-like Tube formation assay²⁶⁾에 사용하기 위하여 16시간 동안 control 배지(0.1% Bovine Serum Albumin (BSA)가 포함된 EGM 배지에서 배양한 후 인공 extracellular matrix (ECM)인 Matrigel을 도포한 24well plate에 3×10^5 개로 가하였다. 동시에 시료도 농도별로 같이 처리하였다. 배지에 bFGF를 넣어서 HUVEC이 tube-like 구조를 형성하도록 유도하였다. 16시간 동안 37°C에서 배양한 후 Diff-Quick solution으로 염색하고, 현미경으로 tube 길이를 측정하였다.

5) In-vivo Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay

1일째 (0일배) : 폴무원에서 구입한 수정란을

incubator에서 부화시켰다. 이때, incubator의 온도는 37-38°C로, 습도는 90% 이상 유지되도록 수시로 확인하였다. 여기에서 0일 배란 수정란이 산란되어 18°C에서 보관된 지 3-4일 이내의 것을 말한다.

3일째 (2일배) : 수정란의 뾰족한 끝부분에 칼로 흡을 내었다. 이후, 수평으로 눕어놓고 5ml syringe로 구멍을 낸 다음 albumin을 5ml 정도 뽑아내었다. 수정란이 건조되지 않고 또 감염되지 않도록 구멍을 유리 테잎으로 봉한 후 구멍이 아래로 향하도록 놓고 다시 incubator 시켰다.

4일째 (3일배) : 수정란의 air sac이 있는 쪽(주사기 구멍의 반대쪽)으로 직경 2-3cm 크기의 원형 window를 내고 수정란으로 확인된 것만 넓은 유리 테잎으로 막고 다시 incubator 시켰다. 참고로, 원형 window를 내는 방법은 날카로운 칼로 수정란의 껍질 위에 원형으로 흡을 낸 뒤 핀셋으로 껍질을 뜯어내었다. 이때 껍질가루가 안쪽으로 떨어지지 않도록 주의하였다. 수정란이란 window를 냈을 때 십자가형의 가는 혈관이 보이는 것을 의미한다.

5일째 (4.5일배) : 이 시기가 되면 CAM이 생성되며, 그 직경이 2-5mm 정도 된다. Sample을 적당한 용매 (ddH₂O)에 녹인 다음 4등분된 Thermanox coverslip 위에 10 μ l 씩 떨어뜨리고 clean bench 안에서 말렸다. 여기서 Thermanox coverslip은 가위로 잘라 4등분하여 clean bench의 UV 아래에서 overnight 시킨 것이다. 수정란의 유리 테잎을 칼로 뜯어내고 CAM을 찾아 확인한 후, 핀셋으로 sample이 처리된 Thermanox를 뒤집어 조심스럽게 올려놓고 다시 유리 테잎으로 막았다. 이때 사용하는 가위, 칼, 핀셋 등은 70% ethanol로 소독하여 사용하고, 핀셋은 sample을 하나하나 loading할 때마다 소독하여 사용하였다. 기타 실험 기구도 수정란이 감염되지 않도록 주의하면서 사용하였다.

7일째 (6.5일배) : 유리 테잎을 칼로 뜯어내었다. Syringe로 Intralipid 10% (fat emulsion)를 1

ml 취하고, 기포를 제거한 뒤 CAM의 바로 아래 부분에 주입하였다. 이때 흰색 바탕에 뚜렷한 혈관을 관찰할 수 있었다. Syringe로 Intralipid 10% 를 주입할 때는 혈관을 다치지 않도록 주의하였다. 관찰이 끝난 수정란은 카메라로 근접 촬영하였다.

6) 통계 처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 GraphPad PRISM[®] version 4 statistical program을 이용하여 Newman-Keuls comparison test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

III. 실험결과

1. BKH의 HUVEC 증식에 미치는 영향

bFGF는 강력한 혈관 형성 촉진제로서 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 다양하게 사용되어지고 있는 물질이다. 본 실험에서는 bFGF를 처리하여 혈관 내피 세포의 증식을 유도한 후 비기환을 여러 가지 농도로 처리한 결과 125 μ g/ml 농도에서부터 유의 있게 HUVEC의 증식을 억제하였으며 비기환의 IC₅₀ 값은 600 μ g/ml였다. (Table 1, Fig. 1)

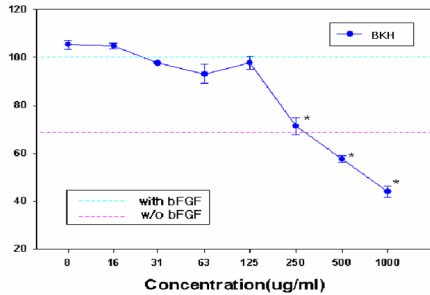
Table 1. Effect of BKH on bFGF-induced proliferation of HUVEC

Concentration (μ g/ml)	% of HUVEC Proliferation
8	105.4 \pm 1.94
16	104.8 \pm 1.08
31	97.7 \pm 0.31
63	93.2 \pm 4.04
125	97.8 \pm 2.69
250	71.3 \pm 3.58*
500	57.5 \pm 1.42*
1,000	44.2 \pm 2.34*

Values represent the mean \pm S.D.*P <0.001

with bFGF	100±8.40	w/o bFGF	67.6±2.48
-----------	----------	----------	-----------

Proliferation



Values represent the mean±S.D.*P<0.001

Fig. 1. Effect of BKH on bFGF-induced proliferation of HUVEC

Lower dose under 125 $\mu\text{g/ml}$ anti-angiogenesis effect of the group treated BKH made no difference with the control group. But, at the dose of 250 $\mu\text{g/ml}$ or more anti-angiogenesis effect of the group treated BKH showed more effective as compared to the control group.

2. 비기환의 HUVE migration에 미치는 영향

본 실험에서는 bFGF를 처리하여 혈관 내피 세포의 이동을 유도한 후 비기환을 여러 가지 농도로 처리한 결과 비기환은 HUVEC의 이동을 유의하게 억제하지 않았다. (Table 2, Fig. 2)

Table 2. Effect of BKH on bFGF-induced migration of HUVEC

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	% of HUVEC Migration
10	96.87±11.80
100	91.11±8.00
1000	95.40±3.25

Values represent the mean±S.D.*P <0.001

with bFGF	100±4.39	w/o bFGF	58.33±3.00
-----------	----------	----------	------------

Migration on HUVEC cells

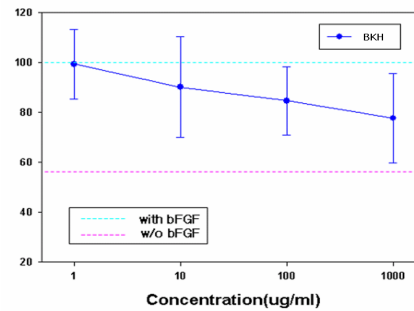


Fig. 2. Effect of BKH on bFGF-induced migration of HUVEC

BKH did not affect migration of vascular endothelial cell.

3. 비기환의 HUVEC tube formation에 미치는 영향

bFGF는 강력한 혈관 형성 촉진제로서 본 실험에서 bFGF를 처리하지 않으면 HUVEC tube 형성이 제대로 이루어지지 않지만 bFGF를 처리하면 HUVEC의 tube 형성이 잘 이루어짐을 알 수 있다. 비기환의 경우는 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 약한 tube 형성 저해효과가 보였고 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 강한 tube 형성 저해효과를 나타내었다. (Fig. 3)

4. 비기환의 CAM 신생혈관에 미치는 영향

본 실험에서는 수정란의 Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM)의 신생혈관 형성 여부를 알아보기 위해 bFGF를 처리하여 혈관 형성을 유도한 후 관찰한 결과 비기환의 경우 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 70%의 혈관 형성 억제 효과를 나타내었다. (Fig. 4)

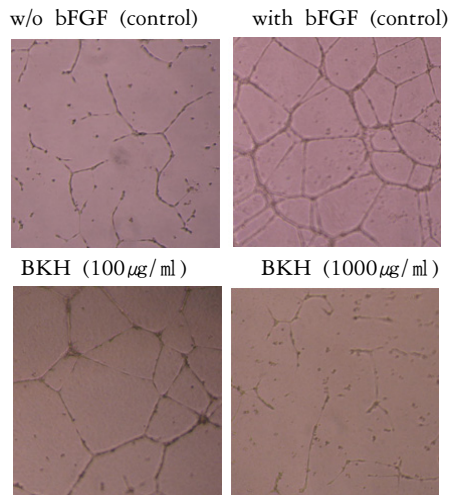


Fig. 3. Effect of BKH on bFGF-induced tube formation of HUVEC

Lower dose under 100 $\mu\text{g/ml}$ of the group treated BKH showed mild effect of anti-tube formation. But, at the dose of 1000 $\mu\text{g/ml}$ showed more effective anti-tube formation.

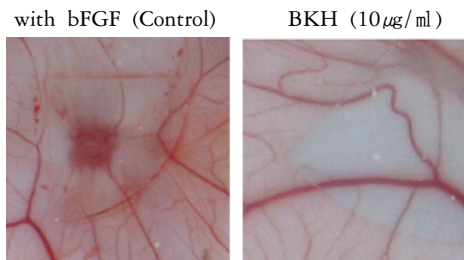


Fig. 4. Effect of BKH on bFGF-induced CAM
BKH showed anti-angiogenesis effect at the dose of 10 $\mu\text{g/ml}$.

IV. 고 찰

혈관 신생은 기존의 혈관에서 새로운 모세혈관이 생기는 것을 말한다. 혈관 신생은 정상적인 조건에서는 매우 엄격하게 조절되고 있으며,

배아 발생, 조직 재구성, 상처 치료, 여성의 주기적인 생식기 변화에서만 일어나지만, 암의 전이와 성장, 안과 질환, 염증, 비만, 자궁 내막증, 세균 감염, 자가 면역 질환 등 많은 질병에서도 비정상적으로 증가한다는 것으로 알려졌다²⁷⁾. 혈관 신생 초기 단계에 기존의 혈관이 확장된 후에 혈관의 투과성이 증가하며 세포외 기질이 분해된다. 그 후에 혈관 내피 세포가 이동하여 증식하면서 새로운 혈관을 구성하게 된다. 이러한 혈관 신생 과정이 진행되는 데 중요한 역할을 하는 MMP (matrix metalloproteinase) 라는 단백질 분해 효소이며, 다른 한 가지는 혈관 내피 세포의 증식을 유도하고 새로운 혈관 생성을 유도하는 VEGF (vascular endothelial growth factor) 이다²⁸⁻²⁹⁾.

이러한 신생 혈관 형성은 악성 종양의 성장과 전이에 밀접한 연관성이 있으며, 이를 바탕으로 외국의 경우에 항암제 및 여러 질환의 치료제로 이용하기 위한 혈관 신생 억제제 연구가 활발히 진행되고 있다. 1971년 Folkman에 의해서 원발성 종양이 존재할 경우 혈액 속에 혈관 형성을 억제하는 물질이 존재한다는 가정 아래 처음으로 anti-angiogenic therapy가 암치료를 위한 수단으로 등장한 이래³⁰⁾, 하버드 대학교 의과 대학의 Vallee 등에 의해 혈관 신생 유도 단백질인 angiogenin이 사람의 腺癌細胞의 배양액으로부터 최초로 분리되었고³¹⁾, 1994년에는 원발성 종양을 갖고 있는 쥐의 혈청과 오줌으로부터 38kDa의 angiostatin을 분리해내어 angiogenesis 억제효과를 확인했으며³²⁾, 1997년에는 20kDa의 endostatin이라는 물질을 분리해내어 혈관 내피 세포의 성장을 억제하는 효과를 확인하였고³³⁾, 1998년에는 NCI에서 공식적으로 angiostatin과 endostatin을 동시에 투여하여 쥐에 유발된 종양의 성장을 억제함을 발표함으로써, 종양의 혈관 신생 억제가 새로운 종양 치료방법으로 세계적인 관심을 끌게 되었다³⁴⁾. 현재까지 알려진 angiogenesis 억제제는 thalidomide³⁵⁾.

angiostatin³⁶⁾ · endostatin³⁷⁾ · 2-methoxyestradiol³⁸⁾ · TNP-470³⁹⁾ 등으로 angiogenesis와 관련한 연구들이 있었고, 최근 미국에서 Avastin (Anti-VEGF mAb)가 2004년 FDA허가 취득하여 시판 중에 있으며, vitaxin, EMD 121974 등이 임상 시험 중에 있다.

이와 같이 혈관 신생을 조절하는 물질을 찾아내어 항암제로 개발하려는 가장 큰 이유는 암세포에 대하여 직접적으로 작용하여 암세포를 죽이기보다는 암세포가 성장하기 위해서 필수적인 혈관 신생을 원천적으로 억제함으로써 부작용이 없는 이상적인 항암제를 개발할 수 있다는 점이다. 그러나 신생 혈관 억제를 위한 신약 개발은 신물질 개발의 어려움과 함께 임상적용 단계에서 예기치 못한 부작용이 발생할 수 있는 문제를 안고 있기 때문에 이에 비해 상대적 부작용에 대한 위험성이 적고, 인체의 면역 증강 효과가 있다고 인정되는 한약의 항암효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

최근까지 발표된 실험적 연구로서 桂枝⁴⁰⁾, 鬱金⁴¹⁾ 등 단미제가 angiogenesis의 억제효과가 있는 것으로 보고되었으며, 처방으로는 扶正防癌湯⁴²⁾ 외에도 沒藥散⁴³⁾, 活絡效靈丹⁴⁴⁾ 등이 혈관 신생의 억제효과가 있는 것으로 보고된 바 있다. 그 밖에 암환자를 대상으로 항암단을 투여하여 유의한 혈관 신생의 억제효과가 있음이 보고된 바 있으며⁴⁵⁻⁴⁶⁾, 여러 식물 추출물들 - 플라보노이드, 카테킨, 폴리페놀 등의 물질들이 혈관 신생 억제활성을 가지고 있다는 연구결과들이 발표되고 있다⁴⁷⁻⁴⁹⁾.

한의학에서 腫瘍에 대한 치료는 扶正培本法, 祛邪法, 扶正祛邪法 등의 세가지 방법을 응용하는데, 이는 주로 면역 기능의 활성화 및 종양 성장 억제를 기대하는 치료법이다⁵⁰⁾. 痞氣丸은 <醫學入門>에 脾積의 치료하는 한약재로 언급 되었으며¹⁸⁾, 이는 황련, 후박, 오수유, 황금, 사인, 백복령, 인삼, 택사, 인진, 건강, 육계, 파두, 백출 등의 13종의 한약물로 구성되어 있다.

그 중 인삼은 항암 효과가 인정되어 다빈도로 사용되고 있으며⁵¹⁻⁵³⁾, 파두는 마우스를 대상으로 한 실험을 통해서 종양 성장을 억제하고 마우스에 있는 종양의 크기를 감소시켰으며, Natural Killer cell을 활성화 시키는 작용이 있음이 보고되었다⁵⁴⁾. 육계에는 증식 억제 인자인 retinoid acid를 증식시켜 F9 embryonal carcinoma cells의 자연사를 유도하여 항암 효과를 지닌다고 보고되었고⁵⁵⁾, 황금은 고환암과 소세포폐암, 급성 골수성 백혈병에 유의한 효과가 있다는 사실이 실험적으로 밝혀졌다^{56, 21)}.

脾積의 증상은 <難經>에 “名曰痞氣, 在胃完, 覆大如盤. 久不愈, 令人四肢不收, 發黃疸, 飲食不爲肌膚.” 라 하여 위상복부 종괴와 황달, 소화 불량 등 현대 의학적으로 두부 췌장암이나 담도암 등 소화기계 암과 유사한 증상을 가져, 여러 소화기계 암 - 특히 췌장암 - 에 사용되어 왔다. 그러나 실제 비기환의 항암 효과에 대한 연구는 비교적 적으며 이 또한 주로 혈액 종양에 관련된 것이었다²⁰⁻²²⁾.

본 연구에서는 비기환의 혈관 신생 억제 능력과 이를 통한 비기환의 항암 효과를 규명하기 위하여 비기환 추출물을 HUVEC 에 처치하여 HUVEC의 증식능과 이동능에 미치는 영향을 측정하였고, 혈관 내피 세포의 분화 과정인 tube formation 형성 및 *In-vivo*상의 Chicken Chorioallantoic Membrane의 신생 혈관 형성에 비기환 추출물이 미치는 영향을 측정하였다.

혈관 신생을 위해서는 혈관 내피 세포가 증식된 후 침윤성 성장을 통해 암조직을 향해 자라나고, 혈관 내피 세포들이 분화하여 혈관을 형성하게 된다. 이러한 과정 중 비기환이 혈관 내피 세포인 HUVEC에 대한 증식 및 이동에 미치는 영향을 알아보기 위하여 proliferation assay와 migration assay를 시행하였다. 측정 결과 proliferation assay에서 저농도(125 µg/ml 이하)에서는 HUVEC에 대한 증식이 대조군과 유사하고 250 µg/ml 농도부터는 HUVEC에 대한 증식은

이 유의성 있게 억제되어 혈관 내피 세포 증식 억제 효과가 인정되었다. 비기환의 IC₅₀ 값은 600 μ g/ml로 관찰되었다. 그러나 migration assay에서 혈관내피 세포의 이동을 유도한 후 비기환을 여러 가지 농도로 처리한 결과 비기환은 HUVEC의 이동을 억제하는 경향을 나타내었지만 통계적으로 유의한 효과를 보이지는 않았다.

혈관 내피 세포의 분화도에 대하여 알아보는 tube formation assay에서는 비기환의 경우 100 μ g/ml 농도에서 약한 tube 형성 저해효과가 보였고 1000 μ g/ml의 농도에서는 강한 tube 형성 저해효과를 나타내었다. 이 과정은 분화와 관련된 매우 특수한 현상으로서 비기환이 혈관 내피 세포의 분화 과정 및 cytoskeleton의 재배열에 특이적인 작용을 하고 있음을 보여주었다.

마지막으로 비기환의 혈관 형성 억제능력을 보기위해 Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay를 시행한 결과 10 μ g/ml의 농도에서 70%의 혈관 형성 억제 효과를 보여 비기환이 혈관 형성 억제 작용이 있음을 *in vivo* 상에서도 관찰할 수 있었다.

결과적으로 비기환은 250 μ g/ml 이상의 농도에서부터 유의성있는 HUVEC의 세포 증식 억제 효과를 보였고, 100 μ g/ml의 저농도 및 1000 μ g/ml의 고농도에서 모두 농도 의존적 tube 형성 억제능을 보였으며, 10 μ g/ml의 저농도에서도 *in vivo* CAM에 대해 70% 정도의 혈관 형성 억제 효과를 보였다. 이는 비기환이 실험적으로 혈관 신생억제 효과가 있으며, 임상적으로 종양치료에 있어서 혈관 신생 억제 등의 기전을 통한 치료효과를 기대할 수 있는 기초 근거를 제시해 주고 있다. 이는 투여 목적에 따라 농도 및 용량을 변화시킬 수 있는 가능성을 제시하는 것으로 실제 임상에서 비기환을 암치료에 사용할 때에는 비교적 고용량이 투여될 때 좋은 예후를 나타내는 것이 암진이와 혈관 신생을 억제하는 결과에 의한 것일 수도 있다는 근거로 삼을 수 있는 실험 결과라고 생각된다.

향후 이에 대한 세포 분자 기전 연구(세포 생물학적으로 세포내 신호 전달 단백질의 변화 관찰), 프로테오믹스 연구(세포내 단백질 발현 패턴 연구-항체 칩을 이용한 프로파일 분석), 분자 생물학적 연구(RT-PCR 등), Apoptosis 관련 단백질 연구, Proliferation 억제 기전 연구 등이 계획 중에 있으며 보다 진일보한 기전 탐색이 이루어지기를 기대하는 바이다.

이상의 실험 결과로 볼 때 혈관 신생 억제 효과를 기초적인 *in vitro* 및 *in vivo* 수준에서 검증된 것으로 생각되며, 본 연구는 임상에서 고형암종의 치료에 다빈도로 활용되는 한약 처방에 대한 실험적 근거를 통해 향후 진일보한 연구가 이루어질 수 있는 기초 자료를 제공했다는 의의가 있다고 할 수 있다.

V. 결 론

비기환의 혈관 신생 억제 능력과 이를 통한 비기환의 항암 효과를 규명하기 위하여 비기환 추출물을 HUVEC에 투여하여 혈관내피세포 증식에 미치는 영향을 알기 위하여 proliferation assay를 시행하였고, 혈관내피세포의 이동에 미치는 영향을 알기 위하여 migration assay를 시행하였고, 혈관내피세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 tube formation assay를 시행하였고, *in vivo*에서의 혈관 형성 억제능력을 보기위해 CAM assay를 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 비기환은 proliferation assay에서 125 μ g/ml 이하의 저농도에서는 혈관 내피 세포에 대한 증식 억제 능력이 대조군과 별 차이가 없으나 250 μ g/ml 이상의 농도부터는 혈관 내피 세포의 증식이 유의성 있게 억제되었다.
2. 비기환은 migration assay에서 여러 가지

농도에서 혈관 내피 세포의 이동에 별다른 영향이 미치지 않았다.

3. 비기환은 tube formation assay에서 100 μ g/ml의 농도에서는 약한 tube 형성 저해 효과가 보였지만 1000 μ g/ml 농도에서는 강한 tube 형성 저해 효과를 나타내었다.
4. 비기환은 CAM Assay에서 10 μ g/ml의 농도에서 70%정도 혈관 형성 억제 효과를 나타내었다.

이상의 결과에서 비기환은 일정 정도 혈관신생 억제효과를 가지고 있음을 알 수 있었으며 향후 진일보한 관련 연구가 진행되길 바라는 바이다.

참고문헌

1. 서울대학교 의과대학. 개정판 종양학. 서울, 서울대학교 출판부, 1989.
2. 박재갑, 박찬일, 김노경. 종양학. 1판. p.53-72. 서울, 일조각, 2003.
3. Folkman J, Cotan R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 16:207-248, 1976.
4. Timar J, Dome B, Fazekas K, Janovics A, Paku S. Angiogenesis-dependant diseases and angiogenesis therapy. *Pathol. Oncol.* 2001;7:85-94.
5. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. *Nature Medicine* 1:27-31, 1995.
6. Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmac Ther.* 63:265-311, 1994.
7. Jones A, Harris AL. New developments in angiogenesis: a major mechanism for tumor growth and target for therapy. *Cancer J Sci Am.* 4:209-217, 1998.
8. Harris AL. Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet.* 1997;349(S II):13-15.
9. Fidler IJ. Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer J.* 6(2):134-141, 2000.
10. 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.* 264:17213-17221, 1989.
11. 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* 79(2): 315-28, 1998.
12. 최훈. 십전대보탕이 혈관신생에 미치는 영향. *대한동의생리병리학회지* 15(3):403-411, 2001.
13. Nam NH, Kim HM, Bae KH, Ahn BZ. Inhibitory effects of Vietnamese medicinal plants on tubelike formation of human umbilical venous cells. *Phytother. Res.* 17:107-111, 2003.
14. Lee KH, Choi HR, Kim CH. Anti-angiogenic effect of the see extract of *Benincasa hipida* Cogniaux. *J. Ethnopharmacol.* 97:509-513, 2005.
15. Song YS, Kim SH, Sa JH, Jin C, Lim CJ, Park EH. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *J. Ethnopharmacol.* 88:113-116, 2003.
16. 김준식, 박병영, 박은규, 이희석, 함중천, 배기환, 김민영. 식물 추출물의 혈관신생 억제 효능 검색. *생약학회지* 37(4):

- 253-257, 2006.
17. 허정은, 백용현, 이재동, 최도영, 박동석. 수종의 한약재에서 신생혈관형성 활성 검색 및 기전 연구. *대한침구학회지* 24(5):23-32, 2007
 18. 허준. *동의보감*. p490. 서울, 남산당, 1987.
 19. Kasper D. *Harrison's Principles of Internal medicine*. 16th edition. p. 546-559. Seoul, MIP, 2006.
 20. Han SI, Kang BK. Antitumor effects of BKH on cancer cell lines from human leukemia and lymphoma. master thesis in WonKwang university. p. 9-10. WonKwang university, 1990
 21. 강대근, 강병기, 한재수, 오태환. 식분환 및 비기환이 백혈병과 임파종 환자에서 추출한 암세포에 미치는 항암효과. *대한한방내과학회지* 12(2):96-112, 1991
 22. 문구, 문병하, 문석재. 비기환이 항종양 면역반응에 미치는 영향. *대한한방종양학회지* 1(1):167-190, 1995
 23. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52(11):2745-2756, 1973
 24. Jost LM, Kirkwood JM, Whiteside TL. Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J Immunol Methods* 147(2):153-65, 1992
 25. Jörundsson E, Lumsden JH, Jacobs RM. Rapid staining techniques in cytopathology: a review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, Papanicolaou and Romanowsky stains. *Vet Clin Pathol.* 28(3):100-108, 1998
 26. Watanabe J, Endo Y, Shimada N, Natsume T, Sasaki T, Kobayashi M. Antiangiogenic activity of TZT-1027 (soblidotin) on chick chorioallantoic membrane and human umbilical vein endothelial cells. *In Vivo.* 21(2):297-304, 2007
 27. Timar J, Dome B, Fazekas K, Janovics A, Paku S. Angiogenesis-dependant diseases and angiogenesis therapy. *Pathol. Oncol.* 7:85-94, 2001
 28. Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activatoes and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* 49:117-137, 1996
 29. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol.* 9:211-220, 1999.
 30. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med* 285:1182-1186, 1971.
 31. Vallee BL, Riordan JF. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 53(10):803-815, 1997
 32. Koshida R, Ou J, Matsunaga T, Chilian WM, Oldham KT, Ackerman AW, Pritchard K. Angiostatin: A Negative Regulator of Endothelial-Dependent Vasodilatation. *Circulation.* 107(6):803-806, 2003
 33. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: And endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88:277-285, 1997
 34. Sim BK, MacDonald NJ, Gubich ER. Angiostatin and Endostatin: Endogenous Inhibitors of Tumor Growth. *Cancer and*

- metastasis reviews 19(1);181-190, 2000
35. Tosi P, Tura S. Antiangiogenic Therapy in Multiple Myeloma. *Acta haematologica.* 106(4):208-213, 2000
 36. Moser TL, Stack MS, Wahl ML, Pizzo SV. The Mechanism of Action of Angiostatin: Can You Teach an Old Dog New Tricks? *Thrombosis and haemostasis* 87(3):394-401, 2002
 37. 강영숙, 이나영. 암세포 표적지향화를 위한 항체-엔도스타틴 융합단백질의 체내동태 및 종양으로 이행성. *약제학회지* 33(4):287-292, 2003
 38. Bu S, Blaukat A, Fu X, Heldin NE, Landström M. Mechanisms for 2-methoxyestradiol-induced apoptosis of prostate cancer cells. *FEBS letters* 531(2):141-151, 2002
 39. Sou J. Experimental study of TNP-470 united 5-Fu in inhibiting metastasis of rats' colon cancer. *Chineses Journal of Gerontology* 25(12):1513-1515, 2005.
 40. 최승훈. 동의종양학. 서울 행림출판; 1995
 41. 강윤호. 수종의 한약물이 백서의 자연살해세포활성에 미치는 영향, *대한한의학회지* 8(1):53-74, 1987
 42. 王云凱 主編. 中國名醫名著名方. pp.1261-1292. 河北, 河北科學技術出版社, 1993
 43. 김현아, 임성우, 이원철, 한약을 이용한 항암 실험연구의 경향에 관한 고찰. *대한한방중양학회지* 4(1):211-232, 1998.
 44. 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
 45. 이남헌, 윤담희, 유화승, 조정효, 손창규, 이연월, 조종관. 항암단으로 치료한 암환자 100례의 혈청 VEGF, bFGF 및 platelet 수치변화. *대한한방내과학회지* 26(4):753-760, 2005
 46. 송기철, 최병렬, 이용연, 유화승, 서상훈, 최우진, 조정효, 이연월, 손창규, 조종관. 항암단을 투여한 유방암 환자 60례에 대한 임상보고. *대한한방내과학회지* 23(4):669-674, 2002
 47. Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Aldercreutz H, Wahala K, Montesano R, Schweigerer L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res.* 57:2916-2921, 1997.
 48. Jung YD, Ellis LM. Inhibition of tumor invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *Int. J. Exp. Pathol.* 82: 309-316, 2001
 49. McCaty MF. Polyphenol-mediated inhibition of AP-1 transactivating activity may slow cancer growth by impeding angiogenesis and tumor invasiveness. *Med. Hypotheses* 50:511-514, 1998
 52. 정종미, 조종관. 현대 중국의 암치료 연구 현황. *대한한방내과학회지* 6(2):9-16, 1995.
 53. Yance DR Jr, Sagar SM. Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies. *Integr Cancer Ther.* 5(1):9-29, 2006
 54. Kiefer D, Pantuso T. Panax ginseng. *Am Fam Physician* 15;68(8):1539-42, 2003
 55. Chang YS, Seo EK, Gyllenhaal C, Block KI. Panax ginseng: a role in cancer therapy? *Integr Cancer Ther.* 2(1):13-33, 2003
 56. HJ No, BH Jeon, G Moon, SJ Moon : Trial study about the cytotoxic and antitumor effects and activity of Natural

- Killer cells and tumor cells of Semen Tiglii with Rizoma Rhei. J. of Kor. Oriental. Oncology 2(1):86-87, 1996
57. Baek EK, Kim DG, JW Lee, WS Kim, BH Jeon, WH Woo, WY Jeong, Antitumor effects of Cinnamaldehyde in Cortex Cinnamomi extracts on F9 embryonal carcinoma cell line. Korean J. Oriental Medical Pathology, 13(2):105, 1999
58. Adrienne C Scheck, Krya Perry, Nicole G Hank, W Dennis Clark. Anticancer activity of extracts derived from the mature roots of Scutellaria baicalensis on human malignant brain tumor cells. BMC Complementary and Alternative Medicine 6(27):1-9, 2006