

# 活血祛瘀藥物이 抗血管新生에 미치는 影響에 關한 研究

김성훈 · 심범상 · 최승훈 · 안규석

## Study on effect of the herbs that invigorate and dispel blood stasis on Angiogenic inhibition

Sung-Hoon Kim, Bum-Sang Shim, Seung-Hoon Choi, Kyoo-Seok Ahn

*Dept. of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University*

### Object

When angiogenesis is excessive, Cancer, RA, Blindness, Psoriasis, Hemangioma, Diabetic retinopathy, Granulation, etc are induced. On the contrary, when it is insufficient, Stroke, Heart disease, Ulcer, Infertility, Scleroderma, arteriosclerosis, delay of the wound recovery, etc occur. In recently, the methods which is control of abnormal angiogenesis are researching actively in relation to anticancer research. This study is search for effective drugs which suppress this angiogenesis, in the ingredients of the herbs that invigorate and dispel blood stasis using to treat intravascular coagulation in the oriental herbal medicine

### Methods

We maked 80% methanole extracts of Cnidii Rhizoma, Olibanum, Myrrha, Corydalis Tuber, Curcumae Radix, Curcumae longe Rhizoma, Zedoariae Rhizoma, Salviae miltiorrhizae Radix, Polygoni cuspidati Rhizoama, Leonuri Herba, Persicae Semen, Carthami Flos, Trogopterorum Faeces, Achyranthis Bidentatae Radix, Manitis Squama, Eupolyphaga, Hirudo, Tabanus, Lycopi Herba, Artemisiae anomalae herba, Vaccariae Semen, Sappan Lignum, Gleditsiae Spina, Draconis Resina, Leonunari Semen, Selaginelliae Folium, Spatholobi Caulis, and these extracts were tested for MTT viabilaty test, BrdU incorporation, Tube foramtion assay on ECV304(immtalized human umbilical vein endothelial cell) at the concentration of 50 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml, 400 $\mu$ g/ml

\* 경희대학교 한의과대학 병리학교실

## Results

All extracts except Draconis Resina have no cytotoxicity at the 100 $\mu\text{g/ml}$ , and in BrdU incorporation test, proliferation rate were reduced below 60% at the concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$  by Zedoariae Rhizoma, Sappan, Lignum Gleditsiae, Spina Draconis Resina Vaccariae Semen. Zedoariae Rhizoma Sappan Lignum Gleditsiae Spina Draconis Resina Vaccariae Semen Olibanum, Achyranthis Bidentatae Radix showed inhibition effects on tube formation of ECV304 at the concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$

## Conclusion

At the concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$  in which cytotoxicity is not found, Zedoariae Rhizoma, Sappan Lignum, Gleditsiae Spina, Vaccariae Semen showed the inhibition effect on proliferation and tubeformation of ECV304.

## I. 緒 論

혈관생성 기전은 거의 연구가 이루어지지 않고 있다. 1991년에 비로소 두 가지 다른 경로로 구분이 되어 혈관형성 개념이 정립되기 시작하였다. 특히 그 두 경로 중 기존의 혈관이 자극 받아 세포의 증식과 분화에 의해 새로운 혈관이 형성되는 혈관신생(angiogenesis)은 중앙치료와 연관되어 각광을 받게 되었다.

혈관신생은 모세혈관 또는 세정맥의 혈관 내피세포(endothelial cell)가 여러 가지 조절인자의 자극을 받아 분화함으로써 새로운 모세혈관을 만드는 현상으로 세포증식에 필요한 영양분과 산소를 공급하는 일종의 파이프 역할을 한다. 이들은 혈관내피세포 증식 촉진인자 및 억제인자에 의해 그 증식이 균형을 유지하며 정상적인 상황에서는 배아, 발생, 상처치료, 여성의 생리등을 조절한다. 그러나 암세포의 이상 증식이나 당뇨등에 의해 체내 대사 균형이 파괴되면 혈관신생이 촉진되어 암세포의 증식을 돕고 특수기관의 마비를 야기하는 것으로 알려져 있다.

혈관신생에는 혈관 tube 형성을 위한 기존혈관 및 조직을 파괴하는 효소활성, 혈관내피세

포의 증식, 이동, 그리고 혈관형성 등이 중요한 과정으로 알려져 있다. 특히, 종양은 일정크기 이상으로 성장하고 또한 전이하기 위해 신생혈관을 필요로 함이 알려짐에 따라 이를 억제하는 치료제의 개발이 암치료법의 새로운 해결책으로 다가오게 되었다. 또한, 혈관신생의 조절 이상은 수많은 질병의 발생과 직결되어 있지만 이러한 질환들의 근원적이 치료방법이 아직 개발되지 않고 있는 상황이다<sup>1)</sup>.

한의학에서 瘀血이란 개념은 외인과 내인의 조건 하에서 인체의 심장기능, 혈관, 혈액발생의 병리적 변화로 인해 혈액의 흐름이 완만 혹은 정체되거나, 혈액이 혈관을 벗어나 瘀積을 이루었을 때 형성되는 것으로서 이를 주로 치료하는 방법을 活血祛瘀法, 또는 活血化瘀라 칭하고 이러한 방법에 적합한 약물들을 活血祛瘀藥이라는 범주로 묶어 사용하고 있다. 이러한 瘀血의 개념은 인체 내 혈액분포 및 응고와 혈관형성의 병리적 현상을 포괄하는 광범위한 개념으로서 혈액의 응고성이 증가하여 혈액의 점조도가 증가하는 증상, 말초순환장애로 인해 혈류가 느려지는 증상, 혈관내 응고나 혈관의 변형으로 인한 폐색, 출혈, 협착 및 폐색등의 증상을 일컫는 병리현상을 지칭하는 것으로 알

려져 있다<sup>67)</sup>. 이러한 측면에서 볼 때, 혈관신생의 과다라는 현대 의학적 병리현상과 연관지어活血祛瘀藥을 구성하는 개개의 한약재의 혈관신생 억제 효과를 비교 분석함과 동시에 그 중 가장 효과적인 약물들을 검색함으로써 항혈관신생(angiogenesis) 약물의 개발을 위한 기초를 만들고자 하는 것이 본 연구의 목적이다.

본 연구에서는 27가지의活血祛瘀藥들이 각각 항혈관신생에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위해 활혈거어약의 구성약재들의 농축액을 ECV-304에 투여하여 Viability assay, BrdU Incorporation assay, Tube Formation assay를 실시하여 다음과 같은 유의한 결과를 얻었으므로 이에 그 내용을 보고하는 바이다.

## II. 實驗 方法

### 1. 檢液 準備

切片한活血祛瘀藥의 구성약물을 15가지를 각각 100 g씩 유리병에 넣고, 85% methanol을 시료가 잠기도록 충분히(1 l) 넣은 후 5일간 냉침한 다음 50℃에서 30분간 2회 씩 초음파세척기로 물리적 자극을 가하여 시료의 용해를 촉진하여 얻은 녹은 용액을 filter paper로 여과한 다음 여과액을 감압농축하여 농축액을 얻었다. 이 농축액에 용액이 가장 잘 녹은 상태가 되도록 40% methanol로 완전히 녹여 농도 10mg/ml로 약물을 준비하여 -20℃에 보관한 후 실험에 사용하였다.

### 2. 細胞 培養

본 실험에서는 人間 血管內皮細胞인 ECV-

Table 1. Ingredients of the herbs that invigorate and dispel blood stasis

Herbs	Latine Name	Herbs	Latine Name
川芎	Cnidii Rhizoma	澤蘭	Lycopi Herba
乳香	Olibanum	劉寄奴	Artemisiae anomalae herba
沒藥	Myrrha	王不留行	Vaccariae Semen
玄胡索	Corydalis Tuber	蘇木	Sappan Lignum
鬱金	Curcumae Radix	角刺	Gleditsiae Spina
薑黃	Curcumae longae Rhizoma	血竭	Draconis Resina
莪朮	Zedoariae Rhizoma	蔚子	Leonuri Semen
丹參	Salviae miltiorrhizae Radix	卷柏	Selaginelliae Folium
虎杖根	Polygoni cuspidati Rhizoama	鷄血藤	Spatholobi Caulis
益母草	Leonuri Herba	穿山甲	Manitis Squama
桃仁	Persicae Semen	蟻蟲	Eupolyphaga
紅花	Carthami Flos	水蛭	Hirudo
五靈脂	Trogopterorum Faeces	虻蟲	Tabanus
牛膝	Achyranthis-Bidentatae Radix		

304 (ATCC, CRL-1998)를 사용하였다.

ECV-304는 혈관신생억제효과를 살피기 위해 사용되는 人間 臍帶靜脈細胞 HUVEC(human umbilical vein endothelial cell)에 발암유전자인 SV-TAg을 transfection시켜서 不滅化시킨 것이다.

ECV-304는 Medium-199 (M-199, Gibco BRL) 배양액에 각각 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL), antibiotics (penicillin 10units/l, streptomycin 10 $\mu$ g/l, GIBCO BRL)을 보충하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다.

### 3. Viability assay

본 실험에는 Mosmann<sup>2)</sup>이 개발한 MTT법을 변형 사용하였다.

ECV-304를 96 well cell culture plate에 각각  $2 \times 10^4$  cells/well이 되도록 seeding하고 100 $\mu$ l 10% FBS M-199/well로 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다. 세포가 90%의 밀도가 되도록 성장한 후 100 $\mu$ l의 serum free M-199에 활혈거여약의 구성약물을 각각 50, 100, 200, 400 $\mu$ g/ml로 가하여 각각의 well에 투여하였다.

20시간이 경과한 후 MTT dye solution (Promega)을 20 $\mu$ l/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. 대조군은 약재를 가하지 않은 100 $\mu$ l serum free M-199를 가하였다. 또한 한약시료의 색깔이 MTT용액과 간섭을 일으킬 수 있으므로 한약시료·배양액·dye solution을 혼합하여 약물 blank로 하여 sample값에서 빼주고, 배양액과 dye solution만을 혼합한 것을 완전 blank로 하여 control값에서 감해 주었다.

이상에 대한 세포생존율은 다음의 식으로 구하였다.

#### Formula. 1.

$$\text{Viability}(\%) = \frac{\text{average of absorbance of sample}}{\text{average of absorbance of control}} \times 100$$

### 4. Proliferation assay

ECV-304에 대하여 BrdU incorporation 실험을 실시하였다. 우선 ECV-304를 96 well plate에 각각  $2 \times 10^4$  cells/well의 비율로 10% FBS·M-199 100 $\mu$ l와 함께 seeding하였다. 24시간이 지난 후 활혈거여약의 구성약물을 각각 50, 100, 200, 400 $\mu$ g/ml로 가하여 각각의 well에 투여하고 동시에 BrdU labeling solution 10 $\mu$ l/well을 가하였다. 18시간이 지난 후 ethanol 70% in HCl(7 ml of 100% ethanol, 2.33 ml of distilled water and 0.67 ml of Hydrochloric acid) 200 $\mu$ l/well을 가하여 -20 $^{\circ}$ C에 30분간 두어 세포를 고정한 후 PBS를 200 $\mu$ l/well로 3회 washing한다. 다시 nuclease 100 $\mu$ l/well로 가한 후 30분간 37 $^{\circ}$ C waterbath에 넣어 두었다가 PBS 200 $\mu$ l/well로 3회 씻는다. 다시 anti-BrdU-POD를 100 $\mu$ l/well로 가하고 30분간 37 $^{\circ}$ C waterbath에 둔 후 washing buffer 200 $\mu$ l/well로 3회 washing한다. Peroxidase를 100 $\mu$ l/well를 넣고 10분 후에 ELISA reader(Molecular Device, U.S.A.)로 측정 파장 405nm, 참고 파장 490nm에서 Optical Density 값을 읽는다.

### 5. Tube Formation assay<sup>3)</sup>

24-well cell culture plate를 얼음 접시에 놓고 matrigel 220 $\mu$ g 을 가한 후 spatula를 이용해 도포하였다. Matrigel을 바른 plate는 37 $^{\circ}$ C incubator에 30분간 방치하고 matrigel이 겔상태가 되도록 하였다. ECV-304를 matrigel이 도포된 plate에  $8 \times 10^4$  cells/well로 접종하고 10% FBS M-199에 한약시료를 첨가하여 18시간동

안 배양하였다. control well에는 한약시료를 첨가하지 않고, 같은 양의 40% methanol을 첨가하였다. 18시간 후 control well에 tube가 형성된 것을 확인한 후 20배율로 사진 촬영하였다.

### Ⅲ. 實驗 成績

#### 1. 細胞生存率에 미치는 影響

活血祛瘀藥 구성약물 각각의 암세포에 미치는 세포독성과 실험용량을 알아 보기 위해 먼저 ECV-304세포를 이용하여 MTT assay를 한 실험 결과,活血祛瘀藥 구성약물 중 紅花, 虻蟲, 沒藥, 五靈脂, 芫蔚自, 玄胡索, 川芎, 水蛭, 鬱金, 桃仁, 牛膝의 경우 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도이하에서 100% 전후이거나 최소한 80% 이상의 세포생

존율을 보여줌으로써 세포생존을 저해하지 않는 것으로 나타났다. 특히, 紅花, 虻蟲, 川芎 등은 120%이상의 생존율을 보여 세포활성을 증가시키는 경향을 보였다.

상기한 11가지 약물을 제외한 16가지의 약물이 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 세포생존율이 떨어지는 것으로 나타났는데 50%이하의 세포생존율을 보이는 것으로는 鷄血藤, 莪朮, 皂角刺, 卷柏, 蟪蟲, 穿山甲, 血竭, 澤蘭, 王不留行, 乳香으로 나타났다.

100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 血竭만이 18%의 세포생존율을 보이고 나머지 약물들은 모두 80% 이상의 세포생존율을 보여주고 있다. 血竭은 특히 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 77%의 세포생존율을 보임으로써 저 농도에서도 강한 독성이 있음을 알 수 있었다.(Table 2., Fig. 1.)

Table 2. Effects of the herbs that invigorate and dispel blood on the Cell Viability of ECV-304 by MTT assay

	Concentration( $\mu\text{g/ml}$ )				
	0	50	100	200	400
Carthami Flos	0.684 $\pm$ 0.117 <sup>1)</sup> 100 <sup>2)</sup>	0.857 $\pm$ 0.082 131	0.915 $\pm$ 0.037 139	0.899 $\pm$ 0.029 133	0.945 $\pm$ 0.034 137
Spatholobi Caulis	0.520 $\pm$ 0.044 100	0.644 $\pm$ 0.064 114	0.711 $\pm$ 0.119 114	0.614 $\pm$ 0.047 69	0.503 $\pm$ 0.032 19
Artemisiae anomalae herba	0.520 $\pm$ 0.044 100	0.737 $\pm$ 0.055 146	0.678 $\pm$ 0.043 127	0.670 $\pm$ 0.032 119	0.465 $\pm$ 0.048 55
Tabanus	0.520 $\pm$ 0.044 100	0.527 $\pm$ 0.033 99	0.618 $\pm$ 0.059 123	0.626 $\pm$ 0.078 124	0.631 $\pm$ 0.100 123
Zedoariae Rhizoma	0.520 $\pm$ 0.044 100	0.623 $\pm$ 0.081 127	0.575 $\pm$ 0.064 112	0.425 $\pm$ 0.043 72	0.217 $\pm$ 0.013 12
Myrrha	0.517 $\pm$ 0.021 100	0.587 $\pm$ 0.020 119	0.0667 $\pm$ 0.070 140	0.654 $\pm$ 0.086 136	0.561 $\pm$ 0.051 101
Léonunari Herba	0.517 $\pm$ 0.021 100	0.582 $\pm$ 0.035 118	0.572 $\pm$ 0.018 113	0.539 $\pm$ 0.046 101	0.388 $\pm$ 0.024 51
Curcumaе longе Rhizoma	0.684 $\pm$ 0.117 100	0.855 $\pm$ 0.027 130	0.907 $\pm$ 0.059 137	0.837 $\pm$ 0.092 120	0.613 $\pm$ 0.026 69

Persicae Semen	0.636±0.024 100	0.681±0.014 110	0.671±0.031 103	0.610±0.053 91	0.551±0.077 81
Polygoni cuspidati Rhizoama	0.636±0.024 100	0.769±0.052 114	0.791±0.071 108	0.796±0.055 87	0.818±0.006 66
Sappan Lignum	0.636±0.024 100	0.701±0.034 108	0.783±0.019 102	0.748±0.032 69	0.743±0.057 60
Achyranthis Bidentatae Radix	0.636±0.024 100	0.704±0.117 153	0.698±0.128 152	0.680±0.103 148	0.532±0.019 116
Gleditsiae Spina	0.562±0.052 100	0.689±0.090 111	0.813±0.070 129	0.701±0.041 80	0.522±0.017 14
Trogopterorum Faeces	0.562±0.052 100	0.660±0.092 124	0.625±0.035 113	0.625±0.106 109	0.540±0.054 84
Selaginelliae Folium	0.562±0.052 100	0.536±0.029 106	0.561±0.078 110	0.510± 91	0.298±0.007 24
Eupolyphaga	0.517±0.021 100	0.663±0.026 127	0.558±0.051 98	0.434±0.047 63	0.334±0.045 35
Manitis Squama	0.517±0.021 100	0.594±0.088 110	0.613±0.054 111	0.502±0.051 75	0.366±0.029 38
Leonunari Semen	0.587±0.026 100	0.685±0.019 125	0.718±0.008 131	0.733±0.027 135	0.536±0.021 83
Draconis Resina	0.684±0.117 100	0.585±0.038 77	0.281±0.021 18	0.209±0.002 2	0.213±0.005 1
Corydalis Tuber	0.587±0.026 100	0.741±0.079 138	0.714±0.020 130	0.594±0.080 100	0.566±0.038 92
Salviae multiorrhizae Radix	0.587±0.026 100	0.517±0.056 83	0.605±0.032 104	0.559±0.064 92	0.431±0.078 59
Cnidii Rhizoma	0.587±0.026 100	0.593±0.016 101	0.651±0.044 115	0.644±0.019 113	0.729±0.081 132
Lycopi Herba	0.509±0.046 100	0.726±0.038 152	0.662±0.057 130	0.522±0.084 80	0.344±0.045 20
Vaccariae Semen	0.509±0.046 100	0.476±0.020 89	0.485±0.020 92	0.324±0.034 43	0.213±0.003 8
Olibanum	0.684±0.117 100	0.784±0.073 115	0.641±0.075 83	0.502±0.048 50	0.320±0.006 4
Hirudo	0.509±0.046 100	0.703±0.067 158	0.590±0.009 125	0.620±0.042 133	0.509±0.020 100
Curcumae Radix	0.509±0.046 100	0.626±0.088 133	0.592±0.079 121	0.565±0.092 109	0.474±0.029 80

1) O.D. : Optical Density

2) Percent of control according to Formula. 1.

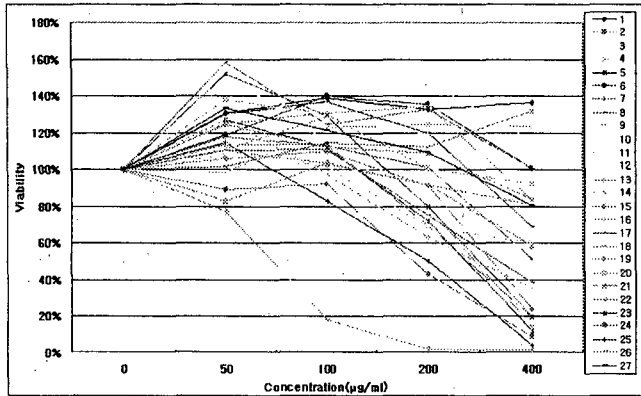


Fig. 1. Effects of the herbs that invigorate and dispel blood stasis on the Cell Viability of ECV-304 by MTT assay

1	Carthami Flos	2	Spatholobi Caulis	3	Artemisiae anomala herba
4	Tabanus	5	Zedoariae Rhizoma	6	Myrrha
7	Leonuri Herba	8	Curcumae longae Rhizoma	9	Persicae Semen
10	Polygoni cuspidati Rhizoma	11	Sappan Lignum	12	Achyranthis Bidentatae Radix
13	Gleditsiae Spina	14	Trogopterorum Faeces	15	Selaginellae Folium
16	Eupolyphaga	17	Manitis Squama	18	Leonuri Semen
19	Draconis Resina	20	Corydalis Tuber	21	Salviae multirostratae Radix
22	Cnidii Rhizoma	23	Lycopi Herba	24	Vaccariae Semen
25	Olibanum	26	Hirudo	27	Curcumae Radix

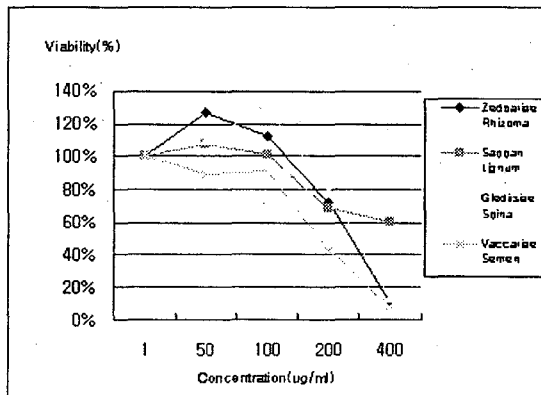


Fig. 2. Effects of Zedoariae Rhizoma, Sappan Lignum, Gleditsiae Spina, Vaccariae Semen on the Cell Viability of ECV-304 by MTT assay

## 2. 細胞增殖에 미치는 影響

실험 결과 50µg/ml의 농도에서 血竭과 王不留行이 각각 72%와 71%의 세포증식율을 보이

는 것 외에 나머지 약물들은 90%이상의 세포 증식율을 보이고 있다. 그러나, 100µg/ml의 농도에서 莪朮, 蘇木, 皂角刺, 血竭, 王不留行은 세포증식율을 60%이하로 저하시키고 있으며

**Table 3.** Effects of the herbs that invigorate and dispel blood stasis on the Cell Proliferation of ECV-304 by BrdU test

	Concentration				
	0	50	100	200	400
Carthami Flos	0.503±0.021 <sup>1)</sup> 100 <sup>2)</sup>	0.893±0.063 177	0.679±0.026 135	0.739±0.047 147	0.828±0.084 165
Spatholobi Caulis	0.503±0.021 100	0.919±0.179 183	0.907±0.124 180	0.638±0.104 127	0.395±0.083 78
Artemisiae anomalae herba	0.503±0.021 100	1.048±0.096 208	1.020±0.068 203	0.722±0.086 143	0.188±0.020 37
Tabanus	0.503±0.021 100	0.578±0.055 115	0.532±0.078 106	0.480±0.039 95	0.526±0.014 105
Zedoariae Rhizoma	0.503±0.021 100	0.454±0.008 90	0.311±0.023 62	0.157±0.028 31	0.076±0.011 15
Myrrha	0.869±0.078 100	0.950±0.059 109	1.774±1.523 204	1.215±0.022 140	1.154±0.084 133
Leonunari Herba	0.869±0.078 100	1.244±0.112 143	1.235±0.112 142	1.111±0.167 128	0.923±0.107 106
Curcumae longe Rhizoma	0.869±0.078 100	1.421±0.300 164	1.381±0.363 159	1.123±0.214 129	0.644±0.064 74
Persicae Semen	0.869±0.078 100	0.828±0.023 95	0.798±0.042 92	0.781±0.108 90	0.398±0.087 46
Polygoni cuspidati Rhizoma	0.869±0.078 100	0.955±0.082 110	1.111±0.191 128	0.940±0.159 108	0.489±0.053 56
Sappan Lignum	0.708±0.058 100	0.817±0.095 115	0.485±0.022 69	0.407±0.024 57	0.239±0.022 34
Achyranthis Bidentatae Radix	0.708±0.058 100	0.639±0.027 90	0.653±0.055 92	0.722±0.017 102	0.796±0.058 112
Gleditsiae Spina	0.708±0.058 100	0.773±0.023 109	0.394±0.055 56	0.193±0.025 27	0.120±0.011 17
Trogopterorum Faeces	0.708±0.058 100	0.766±0.123 108	0.764±0.035 108	0.861±0.028 122	0.669±0.073 94
Selaginelliae Folium	0.708±0.058 100	0.760±0.096 107	0.887±0.061 125	0.529±0.038 75	0.136±0.029 19
Eupolyphaga	0.619±0.043 100	0.769±0.042 124	0.952±0.131 154	0.842±0.061 136	0.515±0.096 83
Manitis Squama	0.619±0.043 100	0.707±0.072 114	0.738±0.026 119	0.588±0.066 95	0.629±0.134 102
Leonunari Semen	0.619±0.043 100	0.743±0.094 120	0.756±0.029 122	0.744±0.024 120	0.390±0.047 63



Draconis Resina	0.619±0.043 100	0.447±0.083 72	0.174±0.064 28	0.062±0.011 10	0.049±0.004 8
Corydalis Tuber	0.619±0.043 100	0.681±0.058 110	0.719±0.049 116	0.760±0.011 123	0.525±0.065 85
Salviae multiorrhizae Radix	0.626±0.037 100	0.656±0.054 105	0.653±0.058 104	0.561±0.026 90	0.384±0.020 61
Cnidii Rhizoma	0.626±0.037 100	0.801±0.065 128	0.803±0.028 128	0.834±0.023 133	0.818±0.041 131
Lycopi Herba	0.626±0.037 100	0.993±0.098 159	0.931±0.036 149	0.499±0.014 80	0.288±0.068 46
Vaccariae Semen	0.626±0.037 100	0.444±0.036 71	0.370±0.034 59	0.240±0.057 38	0.166±0.050 27
Olibanum	0.626±0.037 100	0.623±0.052 100	0.474±0.032 76	0.188±0.046 30	0.061±0.022 10
Hirudo	0.792±0.041 100	1.330±0.115 168	1.019±0.045 129	0.938±0.032 119	0.658±0.080 83
Curcumae Radix	0.792±0.041 100	1.091±0.176 138	0.865±0.079 109	0.795±0.027 100	0.538±0.153 68

1) O.D. : Optical Density

2) Percent of control according to Formula. 1.

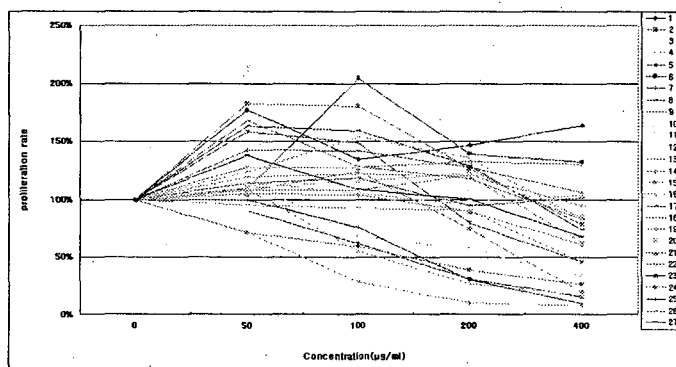


Fig. 3. Effects of the herbs that invigorate and dispel blood stasis on the Cell Proliferation of ECV-304 by BrdU test

1	Carthami Flos	2	Spatholobi Caulis	3	Artemisiae anomalae herba
4	Tabanus	5	Zedoariae Rhizoma	6	Myrrha
7	Leonunari Herba	8	Curcumae longae Rhizoma	9	Persicae Semen
10	Polygoni cuspidati Rhizoma	11	Sappan Lignum	12	Achyranthis Bidentatae Radix
13	Gleditsiae Spina	14	Trogopterorum Faeces	15	Selaginelliae Folium
16	Eupolyphaga	17	Manitis Squama	18	Leonunari Semen
19	Draconis Resina	20	Corydalis Tuber	21	Salviae multiorrhizae Radix
22	Cnidii Rhizoma	23	Lycopi Herba	24	Vaccariae Semen
25	Olibanum	26	Hirudo	27	Curcumae Radix

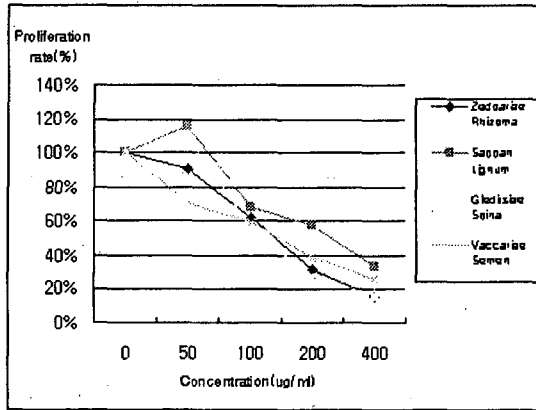


Fig. 4. Effects of Zedoariae Rhizoma, Sappan Lignum, Gleditsiae Spina, Vaccariae Semen on the Cell Proliferation of ECV-304 by BrdU Incorporation assay

그 이상의 농도에서도 지속적인 감소양상을 보인다. 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 이들 약물이외에 乳香이 30%의 증식율을 나타내고 있으며 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 劉寄奴, 桃仁, 虎杖根, 卷柏, 澤蘭이 60%이하의 증식율을 보이고 있다.

紅花, 虻蟲, 沒藥, 益母草, 牛膝, 五靈脂, 穿山甲, 川芎, 益母草, 蟻蟲, 玄胡索, 水蛭은 대조군에 비해 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 전 농도에서 80%에서 130% 이상의 세포증식율을 보여줌으로써 세포증식에 대한 억제효과는 유의하게 나타나지 않는 것으로 드러났다.(Table 3, Fig. 3)

蓬朮, 蘇木, 皂角刺, 王不留行이 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의한 억제 효과가 나타나는지를 알아보기 위해 통계분석을 시행하였다.

SPSS ver.10을 이용해 students T-test를 실시한 결과 4가지 약물 모두 대조군에 비해 유의적인 차이를 나타내었다.( $p < 0.001$ )

### 3. Tube formation 抑制에 미치는 影響

실험결과 한약 시료의 용매로 쓰인 methanol을 처리한 대조군에서는 capillary tube가 잘 형성되어 있음을 볼 수 있다. 한약을 처리한 실험

군에서는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 모든 약물들이 뚜렷한 Tube network형성 억제가 관찰되지 않았다. 세포생존을 실험결과에서 알 수 있듯이, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 血竭을 제외한 모든 약물들이 80%이상의 생존율로 세포독성이 나타나지 않아 細胞死에 의한 혈관형성저해 가능성을 배제할 수 있으므로 관찰 기준 농도로 삼았다. 그 결과, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 莪朮, 蘇木, 皂角刺, 血竭, 王不留行, 乳香, 牛膝의 경우 다른 약물을 투여한 군에 비해서 현미경사진상으로 불완전한 혈관형성의 모습을 보여주면서 많은 세포들이 공유를 통한 혈관형성을 하지 못하고 따로 떨어져 있는 모습을 볼 수 있다. 그 이상의 농도에서는 더욱 뚜렷이 억제 효과가 나타남을 볼 수 있다. 血竭을 제외한 莪朮, 蘇木, 皂角刺, 王不留行, 乳香, 牛膝은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포생존율이 92%이상이었다는 것으로 미루어 볼 때, 細胞死로 인한 결과는 아님을 알 수 있다. (Fig. 5.)

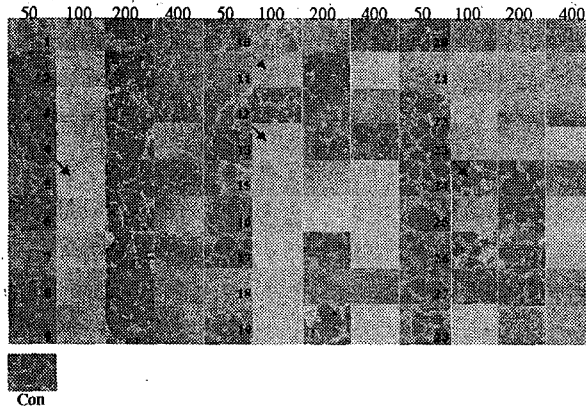


Fig. 3. Effects of the herbs that invigorate and dispel blood stasis on the Tube formation of ECV-304

1	Carthami Flos	2	Spatholobi Caulis	3	Artemisiae anomalae herba
4	Tabanus	5	Zedoariae Rhizoma	6	Myrrha
7	Leonuri Herba	8	Curcumae longae Rhizoma	9	Persicae Semen
10	Polygoni cuspidati Rhizoma	11	Sappan Lignum	12	Achyranthis Bidentatae Radix
13	Gleditsiae Spina	14	Trogopterorum Faeces	15	Selaginelliae Folium
16	Eupolyphaga	17	Manitis Squama	18	Leonuri Semen
19	Draconis Resina	20	Corydalis Tuber	21	Salviae multiorrhizae Radix
22	Cnidii Rhizoma	23	Lycopi Herba	24	Vaccariae Semen
25	Olibanum	26	Hirudo	27	Curcumae Radix

#### IV. 考 察

혈관신생(angio genesis)은 인체 새로운 혈관을 만들기 위한 기본적인 과정으로 생식, 발생, 상처회복에 관여하며 짧은 기간내에 작동하고 종료시 완전히 억제된다. 그러나 신생혈관생성의 조절이 지속적으로 안될 시에는 질병을 유발하게 되는데, 주요질병으로는 모세혈관이 관절에 침입하여 연골조직을 파괴하는 관절염과 망막에 혈관이 생겨 유리체에 침입함으로써 출혈을 일으키고 결국은 실명하게 되며 출혈경향이 있는 비정상적인 혈관이 자라게 되는 Angiofibroma, 혈관으로 이루어진 종양인 Hemangioma, Hypertrophic Scars, 골절의 접합 지연, lupus, 경피증, 건선과 같은 피부질환, 동맥기형, 동맥경화 등 다양한 질환을 유발하는 원인으로 알려져 있다<sup>1,4)</sup>.

그러나 angiogenesis와 연관해 활발히 연구되어지고있는 질환 중의 하나는 바로 종양이다. 종양의 지속적인 성장을 위해서는 모세혈관으로부터의 산소와 영양공급을 받아야 하므로 종양은 계속적으로 모세혈관의 신생을 자극하게 되며 신생된 모세혈관은 또한 종양이 다른 조직으로 전이될 수 있게 하는 통로역할까지 하게 되는 것이다.

1971년 Folkman에 의해서 원발성 종양이 존재할 경우 혈액 속에 혈관형성을 억제하는 물질이 존재한다는 가정하에 처음으로 anti-angiogenic therapy가 암치료를 위한 수단으로 등장한 이래<sup>4)</sup>, 1985년에는 Harvard의대의 Vallee 등에 의해 혈관신생 유도단백질인 angiogenin이 사람의 腺癌細胞의 배양액으로부터 최초로 분리되었고<sup>5)</sup>, 1994년에는 원발성 종양을 갖고 있는 쥐의 혈청과 오줌으로부터 38kDa의 angiostatin을 분리해내어 angiogenesis

억제효과를 확인했으며<sup>6)</sup>, 1997년에는 20kDa의 endostatin이라는 물질을 분리해내어 혈관내피 세포의 성장을 억제하는 효과를 확인하였고, 1998년에는 NCI에서 공식적으로 angiostatin과 endostatin을 동시에 투여하여 쥐에 유발된 종양의 성장을 억제함을 발표함으로써, 종양의 angiogenesis억제가 새로운 종양 치료방법으로 세계적인 관심을 끌게 되었다<sup>6,9)</sup>.

현재까지 알려진 angiogenesis 억제제는 Protamine, Steroids, Platelet Factor-4 Cartilage Derived Inhibitors, Eponemycin, Genistein, Herbinimycin A, Interferon- $\alpha$ , Minocyclin, Radicicol, Depudecin, Carboxyamidotriazole, Interleukin-12, Irsogladin, thalidomide<sup>10-11)</sup>, angiostatin<sup>6)</sup>, endostatin<sup>9)</sup>, 2-methoxyestradiol<sup>12)</sup>, TNP470<sup>12-16)</sup> 등의 화합물이 angiogenesis와 관련하여 임상실험중에 있는 것으로 알려져 있으며, 이중 TNP-470은 이미 동물실험을 끝내고 두 번째 임상실험을 진행 중에 있는데 매우 효과적인 것으로 학계에 보고되고 있다. 그러나 TNP-470을 제외하고는 아직까지 이들 혈관신생 저해제는 체내안정성 및 생산방법에 따른 활성의 변화로 인체 실험에서 일관된 효과를 발휘하지 못하고 있다.

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>17)</sup>. 그러나 신생혈관 억제를 위한 신약개발은 신물질 개발의 어려움과 함께 임상적용 단계에서 예기치 못한 부작용이 발생할 수 있는 문제를 안고 있기 때문<sup>7,18,19)</sup>에 이에 비해 상대적으로 부작용에 대한 위험성이 적고, 인체의 면역증강효과가 있다고 인정되는 한약의 항암효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>20-37)</sup>.

한의학에서는 암이라는 용어로서 모든 신생물을 명명하기보다는 腫塊의 위치나 특성, 주요증상에 따라 다양한 병명을 부여하였다. 물론 현재의 악성종양의 개념과 완전히 일치하는 것은 아니지만 內經에서 언급된 積聚·鼓脹·腸覃·石瘕 등과 이후의 서적에서 나타나는 癥瘕·癰疽·癭瘤·反胃·噎膈·乳癌·石疽·石癰 등이 증상과 병리적인 측면에서 암과 유사한 病證으로 인식되었다<sup>23,39-43)</sup>. 그 원인으로 原發性因子와 續發性因子를 제시하고 있는데, 그 원인 중에서 續發性病因으로 瘀血이 제시되었으며 이에 대한 치료로서 活血祛瘀藥物들을 투여한 것으로 보아<sup>38)</sup> 현재 이루어지고 있는 항혈관신생을 통한 암치료법의 의미와 일맥상통한 것으로 생각된다.

한의학에서 인식한 종양의 續發性病因중 瘀血은 독특한 한의학적 병리개념으로, 각종 원인에 의하여 정상적인 생리기능을 상실한 혈액이 체내 일정부위에 凝滯되어 형성한 일종의 병리적 산물로서<sup>44-45)</sup> 氣血運行에 영향을 미쳐 臟腑機能을 失調시킴으로써 다양한 疾病을 야기하는 중요 發病因子의 하나로 인식되고 있다<sup>46-48)</sup>. 瘀血證은 血液循環障礙, 血液流變性(血行速度減少), 血液粘度異常 및 이로 인한 組織器官의 水腫 變性 炎症 增殖 潰瘍 壞疽 萎縮 血栓形成 血管狹窄 혹은 閉塞 등 일련의 病理變化狀態를 포괄한 證候概念이다<sup>49-50)</sup>. 이와 관련하여 王清任<sup>51)</sup>은 '肚腹結塊 必有形之血'라 하여 복부의 腫物은 대개 瘀血로 인한 것이므로 活血化瘀法이 종양을 치료하는 주요 법칙 가운데 하나라고 보았다. 活血祛瘀藥은 血行을 촉진시키고 瘀滯를 疏散시키는 것을 주요 목적으로 하는 약물들을 일컫는 것으로서 血行이 不暢하거나 혹은 血分에 瘀血이 停滯되어 된 病症, 예를 들어 血滯經閉, 經痛, 產後瘀血腹痛, 癥瘕痞塊, 跌打損傷, 骨折, 瘀腫疼痛 및 血行

不暢으로 인한痺症과 그밖에癰腫瘡瘍에도 활용된다<sup>52)</sup>.

이러한 배경에 따라 본 연구에서는 한의학에서 규정하고 있는活血祛瘀藥들<sup>52)</sup> 중 현재 사용되어지고 있는 약물 27가지(紅花, 鷄血藤, 劉寄奴, 虻蟲, 莪朮, 沒藥, 益母草, 薑黃, 皂角刺, 五靈脂, 卷柏, 蟪蟲, 穿山甲, 芫薺自, 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 실험을 진행하였다.

이에 속한 약물 개개의 효능을 살펴보면, 川芎은活血行氣, 祛風止痛의 작용이 있으며, 乳香은活血止痛, 消腫生肌하며, 沒藥은散血祛瘀, 消腫定痛의 효과가 있다. 玄胡索은活血散瘀하고利氣止痛하며, 鬱金은行氣散瘀하고清心解鬱, 利膽退黃하며, 薑黃은破血行氣하고通經止痛의 작용이 있다. 蓬朮은行氣破血하며, 消積止痛의 효과가 있고, 丹參은活血祛瘀, 涼血消癥하며除煩安神의 작용을 갖고있으며, 虎杖根은祛風利濕, 散瘀定痛, 止咳化痰의 효과가 있다. 益母草는活血調經하며, 利水退腫하며, 桃仁은活血祛瘀, 潤腸通便의 효능이 있으며, 紅花는活血通經, 散瘀止痛의 작용을 갖고 있다. 五靈脂는活血散瘀하면서止痛의 효과가 있고, 牛膝은散瘀血, 消癰腫하며, 穿山甲은活血通經, 下乳, 消腫排膿의 효능을 갖는다. 蟪蟲은破血逐瘀하고續筋接骨하며, 水蛭은破血逐瘀하면서通經한다. 虻蟲은破血逐瘀, 通經消癥의 효과가 있고 澤蘭은活血祛瘀, 行氣消腫의 효능을 갖는다. 王不留行은活血通經, 下乳消腫하며, 劉寄奴는破血通經, 散瘀止痛의 효능을 갖는다. 蘇木은行血破瘀, 消腫止痛의 효과를 가지며, 皂角刺는消腫排膿, 祛風殺蟲의 작용이 있으며, 血竭은散瘀定痛, 止血生肌한다. 芫薺子是活血調經, 消風清熱하며, 卷柏은生用破瘀, 炒用止血的 효과가 있으며 鷄血

藤은行血補血하며, 舒筋活絡의 작용이 있다<sup>52)</sup>.

항혈관신생과 관련되어 최근까지 발표된 실험적 연구로서 桂枝<sup>25)</sup> · 鬱金<sup>53)</sup> 등單味제가 angiogenesis의 억제효과가 있는 것으로 보고되었으며, 처방으로는扶正防癌湯<sup>29)</sup> · 沒藥散<sup>24)</sup> · 活絡效靈丹<sup>27-28)</sup> · 加味慈桃丸<sup>26,30,54)</sup> · 立安散<sup>32)</sup> · 桃紅四物湯加減方<sup>55)</sup> 등의活血祛瘀藥들이 가미된 처방들이 angiogenesis의 억제효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.

또한 많은 실험에서 어혈은혈액응고와 밀접한 관련이 있으며, 이에 따른活血祛瘀 방제의혈액응고 억제효과에 대한 논문 또한 다수 보고되어 왔는데<sup>56-59)</sup>, 더욱이혈액응고가 종양의혈관신생의 과정과 연관이 있다는 보고<sup>60-61)</sup>로부터活血祛瘀의方劑가 또한혈관신생을억제하는 효과가 있을 것으로 추정되었다.

따라서 본 연구에서는 이러한 어혈에 대한 치료제로서 한의학에서 제시한活血祛瘀藥 구성 약물 개개의혈관 세포 생존율과 증식에 대한 억제 작용과혈관 tube 생성 억제 작용에 대한 연구를 통해 효과를 나타낸 약물들에 대한 집중적인 연구의 토대를 마련하는 것을 목표로 하였다.

상기한 27개의 약물들 각각을 메탄올로 추출한 뒤 ECV-304에 대한 세포독성을 알아 보기 위해 MTT assay를 실시하였다. 세포의 생존율과 세포독성 등을 colorimetric한 방법으로 측정하는 것이다. MTT assay는 yellow tetrazolium salt, MTT의 형성정도를 측정하는 것으로 이 salt는 오직 살아있는 세포의 mitochondria 내에 존재하는 succinate-dehydrogenase와 반응하여 일반적으로 물에는 녹지 않는 dark blue formazan crystals을 형성한다<sup>62)</sup>. 생성된 formazan을 isopropanol 또는 유기용매에 녹이고 이를 분광흡도계로 측정함으로써 세포의

metabolically activity를 측정, 분석할 수 있다.

실험 결과, 紅花, 虻蟲, 沒藥, 五靈脂, 芫蔚自, 玄胡索, 川芎, 水蛭, 鬱金, 桃仁, 牛膝의 경우 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도이하에서 100% 전후이거나 최소한 80% 이상의 세포생존율을 보여주었으며 특히, 紅花, 虻蟲, 川芎 등은 120%이상의 생존율을 보여 세포활성을 증가시키는 경향을 보였다(Fig. 1.)

상기한 11가지 약물을 제외한 16가지의 약물이 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 세포생존율이 떨어지는 것으로 나타났는데 50%이하의 세포생존율을 보이는 것으로는 鷄血藤, 莪朮, 梔角刺, 卷柏, 蟪蟲, 穿山甲, 血竭, 澤蘭, 王不留行, 乳香으로 나타났다.

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 血竭 만이 18%의 세포생존율을 보이고 나머지 약물들은 모두 80% 이상의 세포생존율을 보여주고 있다. 血竭은 특히 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서도 77%의 세포생존율을 보임으로써 저 농도에서도 강한 독성이 있음을 나타내고 있다.

活血祛瘀藥 구성약물이 세포증식에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 ECV-304에 대하여 BrdU Incorporation assay를 실시하였다.

이 실험은 세포가 분열, 증식할 때 DNA 합성에 필요한 thymidine에 동위원소를 부착시켜 배지에 넣어준 뒤 24시간 배양하고 나서 이들 세포의 방사능을 측정하여 배지에서 세포내로 흡수된 [methyl-3H]-thymidine의 양을 비교하여 검액이 각 세포주의 분열, 증식에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보는 실험이다.

실험 결과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 血竭과 王不留行이 각각 72%와 71%의 세포증식율을 보이는 것 외에 나머지 약물들은 90%이상의 세포증식율을 보이고 있다. 그러나, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 莪朮, 蘇木, 梔角刺, 血竭, 王不留行은 세포증식율을 60%이하로 저하시키고 있으며

그 이상의 농도에서도 지속적인 감소양상을 보인다. 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 이들 약물 이외에 乳香이 30%의 증식율을 나타내고 있으며 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 劉寄奴, 桃仁, 虎杖根, 卷柏, 澤蘭이 60%이하의 증식율을 보이고 있다.(Fig. 3, 4.)

紅花, 虻蟲, 沒藥, 益母草, 牛膝, 五靈脂, 穿山甲, 川芎, 益母草, 蟪蟲, 玄胡索, 水蛭은 대조군에 비해 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 전 농도에서 80%에서 130% 이상의 세포증식율을 보여줌으로써 세포증식에 대한 억제효과는 유의하게 나타나지 않는 것으로 드러났다.

活血祛瘀藥이 암세포의 혈관 신생을 억제할 수 있는지 확인하기 위해 Tube Formation assay를 실시하였다. matrigel을 이용한 혈관내피세포의 배양을 관찰하였다. 정상적으로는 1주에서 수주가 걸리는 혈관내피세포의 분화 과정을 하루만에 관찰할 수 있기 때문에 혈관신생을 연구하는데 matrigel을 이용한 혈관내피세포의 배양은 유용한 모델이 될 수 있다.

실험결과 한약 시료의 용매로 쓰인 methanol을 처리한 대조군에서는 capillary tube가 잘 형성되어 있음을 볼 수 있다. 한약을 처리한 실험군에서는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 모든 약물들이 뚜렷한 Tube network형성 억제가 관찰되지 않았다. 세포생존율 실험결과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 혈갈을 제외한 모든 약물들이 80%이상의 생존율로 세포독성이 나타나지 않아 細胞死에 의한 혈관 tube 형성저해 가능성을 배제할 수 있으므로 관찰 기준 농도로 삼았다. 그 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 莪朮, 蘇木, 梔角刺, 血竭, 王不留行, 乳香, 牛膝의 경우 다른 약물을 투여한 군에 비해서 현미경사진 상으로 불완전한 혈관형성의 모습을 보여주면서 많은 세포들이 공유를 통한 혈관형성을 하지 못하고 따로 떨어져 있는 모습을 볼 수 있다. 그 이상의 농

도에서는 더욱 뚜렷이 억제 효과가 나타남을 볼 수 있다.(Fig. 5.) 血竭을 제외한 莪朮, 蘇木, 皂角刺, 王不留行, 乳香, 牛膝은 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 세포생존율이 92%이상이었다 것으로 미루어 볼 때, 細胞死로 인한 결과는 아님을 알 수 있다.(Fig. 2.)

이상 3가지 실험을 통해 혈관세포에 대한 독성이 나타나지 않으면서 증식과 분화(혈관 tube 형성)을 억제하는 조건을 만족하는 약물과 농도는 100 $\mu$ g/ml에서 莪朮, 蘇木, 皂角刺, 王不留行인 것으로 나타났다. 그 이외의 약물들은 이 농도에서 세포생존율과 증식이 대조군 보다 증가되는 경향을 보이고 있으며 tube형성에 있어서는 큰 차이를 보이지 않았다. 蓬朮, 蘇木, 皂角刺, 王不留行이 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 세포증식 억제 효과가 나타나는지를 알아보기 위해 통계분석(students T-test)을 실시한 결과에서도 4가지 약물 모두 대조군에 비해 유의적인 차이(p<0.001)를 나타내는 결과를 볼 때, 27가지 活血祛瘀약물들 중에서 항혈관신생작용이 있는 약물은 蘇木, 莪朮, 皂角刺, 王不留行인 것으로 결론지을 수 있었다.

이들 4가지 약물들 중 蘇木은 임상에서의 효과를 토대로 항암제로서 주목을 받고 연구가 진행되고 있는데<sup>63)</sup>, 최근 蘇木의 메탄올 추출물이 구강암 및 골육종 세포주에 대해 telomerase활성을 저해함으로써 세포증식 억제 효과가 있음이 보고된 바가 있으며<sup>64)</sup>, Erlich 복수암에 걸린 생쥐에 복강 주사하여 생존기간 연장의 효과가 있는 것으로 밝혀졌다<sup>67)</sup>. 또한 莪朮에서 추출된 Elemene은 HL-60, K562과 같은 leukemia 세포에 대해 세포주기와 관련되어 증식억제를 유발함으로써 apoptosis를 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>65-66)</sup>.

따라서 본 실험결과를 토대로 항혈관신생 제재의 개발을 위해 蘇木, 莪朮과 더불어 皂角刺,

王不留行에 대한 분석을 실시하고 그에 대한 집중적인 분자생물학적 검증과 In vivo 실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## V. 結 論

活血祛瘀藥 구성약물이 항혈관신생에 미치는 영향을 알아보기 위해 活血祛瘀藥 구성약물 27가지(紅花, 鷄血藤, 劉寄奴, 虻蟲, 莪朮, 沒藥, 益母草, 薑黃, 皂角刺, 五靈脂, 卷柏, 蟪蟲, 穿山甲, 羌蘗自, 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) 각각의 농축액을 ECV-304에 투여하여 Viability assay, BrdU Incorporation assay, Tube Formation assay를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 活血祛瘀藥 구성약물의 ECV-304에 대한 세포독성 실험결과, 100 $\mu$ g/ml의 농도에서, 17%로 세포생존율이 떨어지는 血竭을 제외한 그 외의 약물들은 모두 83%이상의 세포생존율을 보였다.
2. 活血祛瘀藥 구성약물의 ECV-304에 대한 세포증식 억제에 대한 실험 결과, 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 莪朮, 蘇木, 皂角刺, 血竭, 王不留行은 세포증식율을 60%이하로 저하시켰으나, 이를 제외한 약물들은 대조군과 비슷하거나 증가시켰다.
3. 活血祛瘀藥 구성약물의 ECV-304의 Tube Formation에 대한 억제효과를 보는 실험 결과 한약 시료의 용매로 쓰인 methanol을 처리한 대조군에서는 capillary tube가 잘 형성되었으나, 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 세포독성이 없는 莪朮, 蘇木, 皂角刺, 王不留行은 tube형성 저해가 현저하게 나타났으며 이를 제외

한 약물들은 뚜렷한 저해효과가 관찰되지 않았다.

이상의 실험결과로 보아 活血祛瘀藥 구성약물 중 莪朮, 蘇木, 皂角刺, 王不留行은 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 혈관신생을 억제하는 효과가 가장 탁월함을 알 수 있었다. 이를 통해 이 4가지 약물에 대하여 좀더 집중적인 연구와 더불어 다른 혈관신생 억제 한약 처방과 연계하여 보다 나은 혈관신생 억제 효과를 거둘 수 있을 것으로 기대된다.

### 參 考 文 獻

1. Werner Risau : Mechanism of angiogenesis. Nature 386. 671-674 (1997).
2. 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.
3. Sugarbaker EV, Weingard DN, Roseman JM. : Cancer Invasion and Metastases (L.A. Liotta and I.R. Hart ed.). Boston, Nijhoff, pp. 427-465. 1982.
4. Folkman, J and Shing, Y. : Angiogenesis. J Bio Chem, 267;10931-10934 (1992)
5. 金聖勳 : 한의학계의 암연구동향과 연구 전략에 대한 연구, 대한한의학회지, 19 (1):470-499, 1998.
6. 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.
7. 이준우 · 최승훈 · 안규석: Angiogenesis의 한의학적 치료전략, 제3의학, 3 (1):21~31, 1998.
8. Folkman, J.: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent, J Natl Cancer Inst., 82:4-6, 1990.
9. 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.
10. Dixon SC, et al : Thalidomide up regulates prostate specific antigen secretion from LNCaP cells, Cancer Chemother Pharmacol, 43 Suppl:S78-84, 1999.
11. Figg WD, et al : Pharmacokinetics of thalidomide in an elderly prostate cancer population, J Pharm Sci, Jan;88 (1):121-125, 1999.
12. 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.
13. 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.
14. 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.



15. 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.
16. 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.
17. 윤성수 : Angiogenesis inhibitors-clinical applications, Angiogenesis 연구회 창립기념 심포지엄, pp.4~13, 1998.
18. 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.
19. 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, Italian 1964.
20. 한국한의학회연구원 : 암예방 및 치료를 위한 한의학적 연구, 서울, (주)다우문화사, pp.13~14 · 78~80, 1998.
21. 金賢兒 · 林成祐 · 李源哲 : 한약을 이용한 항암 실험연구의 경향에 관한 고찰, 대한한방종양학회지, 4 (1):213~226, 1998.
22. 전원경 · 이태희 · 윤유식 · 김연옥 · 성현제 : 한약재의 신생혈관생성 억제 활성화에 관한 연구, 한국한의학회지 논문집, 4:129~138, 1998.
23. 崔昇勳 : 한의학의 종양에 대한 인식과 병리론, 대한한방종양학회지, 1 (1):11~28, 1995.
24. 姜大寅 : 沒藥散이 혈관신생 억제에 미치는 효과에 대한 연구, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
25. 姜玠熙 : 桂枝가 Angiogenesis의 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1998.
26. 姜顯淑 : 加味慈桃丸의 angiogenesis 억제효과에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
27. 羅琪煥 : 活絡效靈丹이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
28. 孫宗坤 : 活絡效靈丹이 암전이 억제에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 2000.
29. 沈範相 : 扶正防癌湯이 암전이 억제에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 2000.
30. 王德仲 : 加味慈桃丸 構成藥物의 血管新生抑制效果에 관한 研究, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 2000.
31. 尹在鎬 : 十全大補湯이 암전이 억제에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1998.
32. 李紀龍 : 立安散이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
33. 李眞華 : 血府逐瘀湯이 癌轉移 抑制에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1999.
34. 趙漢震 : 桃紅四物湯加減方의 항암 및 항전이 효과에 관한 연구, 대전대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
35. 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.
36. 于爾辛 : 中醫中藥治療癌症38年的探索-경희대학교 제1회 동양의학 국제심포지움, pp. 3~40, 1995.

37. 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.
38. 崔昇勳：東醫腫瘍學, 서울, 杏林出版, pp.13~14·19·32~36·78~80·147~155, 1995.
39. 康命吉：濟衆新編. 서울, 행림서원, p.12, 87, pp.136~137, 150~151
40. 金韓燮 등：암의 치료, 치방에 관한 문헌적 고찰, 대한한의학회지, 10: pp.161~166, 1989.
41. 宋炳基：韓方婦人科學, 서울, 행림출판사, pp.249~262, 1980.
42. 전병욱·유봉하·박동원·유기원：중양의 병인병리에 대한 문헌적 고찰. 대한한방중앙학회지 1995;1(1): pp.83~101
43. 周命新：醫門寶鑑, 서울, 행림서원, p.93, 1971.
44. 金完熙 崔達永：臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, pp.59, 371~375, 1985.
45. 金昌種：病態生理學, 서울, 癸丑文化社, pp.72~74, 1988.
46. 文濬典 安圭錫 崔昇勳：東醫病理學, 서울, 高文社, pp.74~76, 1990.
47. 安徽中醫學院：中醫臨床手冊, 香港, 商務印書館, pp.151~153, 257, 263, 278, 340, 975.
48. 中山醫學院：病理學, 北京, 人民衛生出版社, pp.53~59; 1978.
49. 龔延賢：增補 萬病回春, 서울, 醫文社, p.250, 1975.
50. 文濬典 安圭錫 崔昇勳：東醫病理學(1), 서울, 慶熙大學校 韓醫科大學 病理學教室, p.166~169, 304~306, 1985.
51. 王清任：醫林改錯, 臺北, 力行書局有限公司, pp.34~37, 1986.
52. 全國韓醫科大學 本草學教授：本草學, 서울, 영림사, pp.228~229·306~308·408·414~415·423~424·575~576·603~604, 1991.
53. 成熙根：鬱금이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1998.
54. 全英秀：加味慈桃丸의 항암 및 면역증강 효과에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
55. 趙漢震：桃紅四物湯加減方의 항암 및 항전이 효과에 관한 연구, 대전대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
56. 金東秀：Endotoxin으로 誘發된 白鼠의 血栓症에 身痛逐瘀湯이 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校 大學院, pp.13~17, 1988.
57. 金聖洙：Hydrocortisone acetate로 誘發된 瘀血病態model에 關한 研究 서울, 大大韓韓醫學會誌. 8(2): pp.133~138, 1987.
58. 김정범외：도인승기탕 및 그 구성약물이 어혈병태모형에 미치는 영향. 대한동의학회지 제11권 1호, pp.65~76. 1997.
59. 申鎮湜：實驗의 肝瘀血에 미치는 桂枝茯苓丸 및 그 加味方의 效果에 關한 研究, 서울, 경희대학교 대학원, 1988.
60. Zucher S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, Jesty J Vaschular 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): pp.780~786, 1998.
61. Shoji M, et al : Activation of coagulation and angiogenesis in cancer: immuno

- histochemical localization in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer. *Am J Pathol* 152(2): pp.399~411, 1998.
62. Postel, E. H. Berberich, S. J. Flint, S. J. and Ferrone, C. A. : Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science*, vol. 261, 1993.
  63. Ren L, Xu J, Ma J, Zhang H, Zhuang B, Zhang L. : Antitumor action of lignum sappan. Antitumor action of lignum sappan. Shanxi Provincial Institute for Drug Control, Taiyuan.
  64. Jong-Su Lee, Yeo Gab Kim. : Studies on anticancer effect of extracts *Caesalpinia Sappan* on or and Osteosarcoma cells. Department of Oral and Maxillofacial Surgery Division of Dentistry. Graduate School, Kyunghee University.
  65. Yang H, Wang X, Yu L. : The antitumor activity of elemene is associated with apoptosis. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 1996 May;18(3):169-72. Chinese.
  66. Zheng S, Yang H, Zhang S, Wang X, Yu L, Lu J, Li J. : Initial study on naturally occurring products from traditional Chinese herbs and vegetables for chemoprevention. Cancer Institute, Zhejiang Medical University, Hangzhou, China.
  67. 김호철 : 한약약리학, 서울, 집문당, pp.313-342, 2001.