

和營止痛湯의 血管新生抑制效果에 관한 實驗的 研究

김인석 · 박준혁 · 강희 · 김성훈 · 유명범 · 심범상 · 최승훈 · 안규석

Experimental Study of WhaYoungJiTong Tang(Heyingjitongtang) on the anti-angiogenesis

In-Seok Kim, Joon-Hyuck Park, Hee Kang, Sung-Hoon Kim, Young-Beob Yu
Bum-Sang Shim, Seung-Hoon Choi, Koo-Seok Ahn

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

The purpose of this study is to prove the angiogenesis effects of WhaYoungJiTongTang (hereinafter referred to as the "WYJTT"). For the study, by utilizing liver cancer cell line; SK-HEP-1, lung cancer cell line: A549, stomach cancer cell line: AGS and bovine capillary endothelial cell: BCE, the effects of the WYJTT on toxicity and proliferation ability of cells and the effects on anti-angiogenesis of bovine capillary endothelial cell and of mice's aorta were studied.

1. Cell viability assay

In comparison with the control group, when 100 $\mu\text{g/ml}$ of WYJTT was injected, the viability was reduced in SK-Hep-1, 400 $\mu\text{g/ml}$ in A549 and 200 $\mu\text{g/ml}$ in AGS

2. Cell proliferation assay

In comparison with the control group, when 600 $\mu\text{g/ml}$ of WYJTT was injected, DNA synthesis was reduced to 35.1% in the SK-Hep-1, 56.0% in A549, and 25.8% in BCE (bovine capillary endothelial cell); and when 400 $\mu\text{g/ml}$ was injected, DNA synthesis was reduced to 12.1% in AGS.

3. Tube formation assay

In the event that BCE is injected with WYJTT in each of its content gradient, the anti-angiogenesis was effective in amounts of 400 $\mu\text{g/ml}$ with 6 hours of the treatment.

* 경희대학교 한의과대학 병리학교실

4. Aortic ring assay

In comparison with the control group, the angiogenesis was restricted to the remarkable degree in amount of 200 $\mu\text{g/ml}$; 10% in 400 $\mu\text{g/ml}$; and fully inhibited in each of 800 $\mu\text{g/ml}$ and 1600 $\mu\text{g/ml}$.

As a result of the experiments mentioned above, WYJTT showed its anti-angiogenesis effects against cancer cell line.

I. 緒 論

암의 발생은 최근 급격히 증가하여 국내의 경우는 물론 세계적으로도 가장 중요한 사망 원인 중의 하나가 되고 있다⁵³⁾. 암의 발생원인과 기전은 아직까지 명백히 밝혀져 있지 않고, 또 그 생물학적 성상이 복잡하기 때문에 적절한 정의를 내리기는 어렵지만, 일반적으로 종양이란 조직의 자율적인 과잉성 성장이며, 개체에 대하여 의의가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대하여 파괴적인 것을 말한다²⁵⁾.

특히 악성 종양에 해당하는 암은 주위 조직을 침윤하고 전이를 일으키므로써 결국 개체를 사망에 이르게 한다. 서양의학에서의 암치료는 주로 외과적 수술요법, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법등이 활용되고 있는데, 최근 들어서는 종양역학, 종양면역학, 바이러스종양학, 세포생물학, 분자생물학 등의 발달에 힘입어 보다 근본적인 차원에서 암의 치료에 접근하고 있다²³⁾.

혈관신생은 암의 성장과 전이의 과정에서 반드시 거쳐야만 하는 단계로 암세포의 성장을 위한 영양분 및 산소 공급, 암세포의 전이를 위한 통로를 제공하는 역할을 하고 있다. 그러므로 암세포에 직접적으로 작용하여 암세포를 죽이는 기존의 방법보다는 근본적으로 암세포가 성장하기 위한 필수적인 혈관형성을 억제하여 부작용이 적거나 없는 항암제를 개발한다면

7,20,38,47,52,58) 기존의 화학요법, 방사선요법과 병용 치료시에 더욱 효과를 거둘 것으로 기대되는 방법이다. 또한 기존의 항암제가 갖는 약의 내성 문제 역시 현저히 줄일 수 있을 것으로 전망되고 있다.

한의학은 정체관을 바탕으로 암의 치료에 있어서도 扶正固本, 攻邪 및 扶正祛邪의 방법을 臟腑 陰陽氣血의 虛實緩急의 상황에 따라 시행한다. 그 중 攻邪法으로서 活血化瘀의 방법이 활발히 연구되고 있는데 이는 특히 瘀血과 血管新生の 관련성이 제기되면서 어혈을 치료하는 처방에 抗血管新生效果가 있는 것으로 보고된 최근의 연구성과^{4,7,9,14,29)}에 주목하였다.

이와 관련된 실험적 연구로서, 單味劑로 姜⁴⁾은 散寒活血化瘀作用이 있는 桂枝가 혈관신생의 억제 효과가 있는 것으로 보고하였고, 成²⁷⁾은 理氣活血化瘀作用이 있는 鬱金이 혈관신생 억제효과가 있다고 보고하였다. 복합방으로 羅¹⁹⁾는 活血祛瘀劑인 活絡效靈丹이 세포부착저지 효과를 통해 혈관내피세포(ECV304, ECVPAR)의 apoptosis를 유도하므로써 혈관신생 억제기전에 영향을 미치게 됨을 보고하였고, 李³⁵⁾는 理氣活血劑인 立安散이 세포부착저지 효과를 통해 혈관내피세포(ECV304, ECVPAR)의 apoptosis를 유도하므로써 혈관신생 억제기전에 영향을 미치게 된다는 최근 보고가 있었다. 姜⁵⁾은 軟堅散結 藥物과 배오된 活血祛瘀劑인 加味慈桃丸이 종양의 혈관신생

억제기전에 미치는 영향에 대한 보고가 있었고 이외에도 扶正防癌湯³⁰⁾ · 十全大補湯³⁵⁾ · 桃紅四物湯加減方⁴¹⁾ 등이 혈관신생 억제효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.

이 실험에 사용되는 和營止痛湯은 赤芍藥 · 當歸 · 川芎 · 蘇木 · 桃仁 · 乳香 · 沒藥 · 續斷 · 烏藥 · 陳皮 · 木通 · 甘草 등으로 구성되어 있으며, 기존의 실험된 처방들 보다 活血化瘀 효과가 다소 강화된 방제로써 암전이 억제 효과가 기대된다. 그러므로 이 연구는 和營止痛湯의 혈관신생억제효과를 알아보기 위하여 사람의 간암세포주인 SK-Hep-1(KCLB 30052), 폐암세포주인 A 549(KCLB 10185), 위암세포주인 AGS(KCLB 21739)와 소의 혈관내피세포주인 BCE(bovine capillary endothelial cell)을 사용하여 이에 대한 세포독성과 세포증식능에 대한 영향, 그리고 혈관신생 및 흰쥐 대동맥의 혈관신생에 미치는 영향 등을 연구한 결과, 다음과 같은 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

II. 實驗 方法

1. 檢液의 제조

실험에 사용한 和營止痛湯의 구성 한약재는 서울 경희의료원에서 구입한 후 정선한 뒤 사용하였다. 檢液의 조제는 10첩 분량 480g을 플라스크에 넣고 증류수 3000cc를 넣은 다음 냉각기를 부착하고 2시간 동안 가열하였다. 거어즈와 여과지를 이용하여 여과한 여액을 식힌 후 8,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 찌꺼기를 제거하고, 농축액이 1000cc가 될 때까지 감압농축한 뒤 동결건조 하여 50.68g의 분말을 얻어 실험에 사용하였다(yield; 10.56%).

동결건조된 시료를 증류수를 이용하여 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1600 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 제조하여 사용하였다.

和營止痛湯의 내용과 분량은 아래와 같다 (Table. 1)

Table 1. Composition of Whayoungjitong-tang:(WYJTT)

Herbs	Latine Name	Scientific name	Dose(g)
赤芍	Paeoniae Radix Rubra	<i>Paeonia lactiflora</i> PALL.	4
當歸	Angelica Gigantis Radix	<i>Angelicae gigas</i> NAKAI	4
川芎	Cnidii Rhizoma	<i>Cnidium officinale</i> NAKINO	4
蘇木	Sappan Lignum	<i>Caesalpinia sappan</i> L.	4
桃仁	Persicae Semen	<i>Prunus persica</i> BATCH	4
乳香	Olibanum	<i>Boswellia Carterii</i> BIRDW.	4
沒藥	Myrrha	<i>Commiphora myrrha</i> ENGL.	4
續斷	Dipsaci Radix	<i>Dipsacus asaper</i> WALL.	4
烏藥	Linderae Radix	<i>Lindera strychnifolia</i> VILL	4
陳皮	Citri Pericarpium	<i>Citri unshiu</i> MARKOVICH	4
木通	Akebiae Caulis	<i>Akebia quinaa</i> DECNE	4
甘草	Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH	4
Total amount			48

2. 細胞株 培養

이 실험에는 인간의 간암세포주인 SK-Hep-1(KCLB 30052), 폐암세포주인 A 549(KCLB 10185), 위암세포주인 AGS(KCLB 21739)와 소의 혈관내피세포주인 BCE를 사용하였는데 BCE는 경희대학교 동서의학대학원 동서중앙 학교실에서 분양받아 사용하였다.

SK-Hep-1의 배양은 DMEM 배지에 55℃ 항온조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 牛胎血清(FBS, Gibco. BRL)를 10% 포함시키고 1% 항생제(penicillin/streptomycin)와 NaHCO₃ 2.2 g을 첨가하였고 A549, AGS는 RPMI 배지를 이용하되 위와 동일한 조건으로 첨가하였고 BCE의 배양은 DMEM 배지에 55℃ 항온조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 calf serum(CS, Gibco. BRL)를 10% 포함시키고 1% 抗生劑(penicillin/streptomycin)와 NaHCO₃ 2.2 g을 첨가하였고 basic fibroblast growth factor(Upstate Biotechnology)를 3 ng/ml의 농도로 첨가하였으며 1.5% gelatin으로 도포된 배양접시에 계대배양을 3일 간격으로 실시하였다.

3. MTT assay⁵¹⁾

이 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann이 개발한 방법으로 Promega사의 실험방법에 준하여 실험하였다.

BCE 세포를 96-well cell culture plate에 세포수가 각각 2×10^4 cells/well이 되도록 seeding하여 100 μ l 10% CS-DMEM과 함께 48시간 동안 37℃, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 100 μ l의 serum free DMEM에 검액을 가하여 세포에 투여하였다.

20시간이 경과한 후 MTT dye solution을 20 μ l/well 가한 후 10분 후에 ELISA

reader(Molecular Device, U.S.A.)를 이용하여 측정 파장 490nm, 참조 파장 650nm에서 측정하였다. Blank 값을 측정하기 위하여 대조군에는 검액을 가하지 않은 100 μ l serum free DMEM의 측정값을 blank로 하였고, 실험군은 배양액에 약을 첨가한 측정값으로 정하였다.

4. Proliferation assay

BCE 세포에 대하여 BrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine) incorporation 실험을 실시하였는데 Rocher Molecular Biochemicals사의 방법에 준하였다. 우선 세포를 96-well plate에 각각 2×10^4 cells/well의 비율로 10% FBS-DMEM 100 μ l와 함께 seeding하였다. 48시간이 지난 후 和營止痛湯을 각 농도별로(200, 400, 600 μ g/ml) 가하고 동시에 BrdU labeling solution 10 μ l/well을 가하였다. 18시간이 지난 후 ethanol 70%(in HCl) 200 μ l/well을 가하여 -20℃에 30분간 두어 세포를 고정한 후 PBS 200 μ l/well로 3회 세척한다. 다시 nuclease 100 μ l/well로 가한 후 30분간 37℃ 수욕상에 넣고 PBS 200 μ l/well로 3회 씻는다. 다시 anti-BrdU-POD(peroxidase labeled antibody to BrdU, Fab fragments)를 100 μ l/well에 30분간 37℃ 수욕상에 둔 후 washing buffer 200 μ l/well로 3회 세척한다. peroxidase 100 μ l/well를 넣고 10분 후에 ELISA reader를 이용하여 측정 파장 410nm, 참고 파장 490nm로 하여 측정하였다.

5. Tube formation assay⁵⁷⁾

24-well cell culture plate를 얼음 접시에 놓고 2.4mg matrigel(12.1mg/ml)을 가한 후 spatula를 이용해 도포하였다. matrigel을 바른 plate는 37℃ 배양기에 30분간 방치하여 matrigel이 gel이

되도록 하였다. BCE 세포를 matrigel이 도포된 plate에 8×10^4 cells/well로 접종하고 10% CS과 bFGF(3ng/ml)이 첨가된 DMEM 배지와 함께 검액을 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하여 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 6, 12, 18시간이 경과한 후 신생 혈관망을 역상현미경(Olympus CK40, Japan)으로 50 배율에서 사진을 촬영하여 BCE 세포의 분화 정도를 관찰하였다.

6. Aortic ring assay¹²⁾

48 well tissue culture plate에 100 μl /well(11.46 mg/ml)의 Matrigel(Beckton-Dik-inson)을 도포한 뒤 CO₂ incubator에 well plate를 30-60분간 두어 용액상태의 matrigel이 gel이 되게 한다. 4-6주 된 무게 200g 미만의 SD(Sprague-Dawley)계 흰 쥐를 CO₂ 가스를 이용하여 질식사시킨 후 흉부를 sagittal section하여 대동맥궁을 중심으로 3cm 정도로 잘라낸 뒤 Hank's balanced salt solution (HBSS)에 담근다. 무균상태에서 주변 조직과 대동맥 속의 혈액을 잘 제거한 뒤 대동맥을 HBSS가 담긴 배양접시에 놓고 메스를 사용하여 0.8mm의 두께의 ring 24개를 잘라낸 다음 matrigel로 도포된 48well tissue culture plate에 대동맥의 ring을 well 중앙에 하나씩 놓고 40 μl 의 matrigel를 추가로 주입하여 ring을 도포하고 그 다음 배양기에 30분간 넣어두었다. 그 후 ECGS(endothelial cell growth supplement) 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 함유한 human endothelial basal growth media에 검액을 첨가하여 각 well에 200 μl 씩을 넣어주고 대조군은 ECGS를 함유한 media 만을 넣어주었다.

5일 동안 CO₂ 배양기에 배양한 뒤 media를 제거하고 역상현미경으로 40배율에서 촬영하였다.

7. 통계분석

Cell viability 억제활성의 유의성 검정은 SPSS를 이용하여 one way ANOVA를 실시하였다. 그리고 각 cell line proliferation의 50%저지 농도(ED₅₀)는 다음과 같이 구하였다. Log dose 값을 X축으로 하고 성장률(%)을 Y축으로 하여 최소 자승법으로 회귀직선을 얻고 그 방정식을 도출하였다.

Ⅲ. 實驗 結果

1. 和營止痛湯의 암세포주에 대한 抗癌活性

和營止痛湯을 사람의 간암세포주 SK-Hep-1, 폐암세포주 A549, 위암세포주 AGS에 투여한 결과, 和營止痛湯은 간암세포에 대하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 대조군에 비교하여 80.8%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 80.2%, 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 33.1%, 600 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 4.9%로 항암활성을 나타내었다. 또한 폐암세포주에 대하여 600 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 대조군에 비교하여 51.6%로 세포수가 줄어들었다. 위암세포주에 대하여 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 대조군에 비교하여 37.8%, 600 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 30.0%로 저하시켰다. 항암활성을 가장 많이 나타낸 것은 간암세포주, 위암세포주, 폐암세포주의 순서였다.

이러한 실험결과에 대하여 통계분석을 하였는데, 먼저 간암세포주의 Cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하고 (F-value 202.228 P-value 0.001, $F_{0.05(5,30)} 2.53$), Sheffe 사후 검정결과 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의적 차이를 나타내었고 (p<0.001), 폐암세포주는(F-value 48.925 P-value 0.001,

$F_{0.05(5,30)} 2.53$) $400\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의적 차이를 나타내었으며 ($p < 0.003$), 위암세포주($F\text{-value } 48.925$ $P\text{-value } 0.001$, $F_{0.05(5,30)} 2.53$)는 $200\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의적 차이를 나타내었다 ($p < 0.003$). (Table 2, Fig.1)

2. 和營止痛湯이 암세포주와 혈관내피세포의 증식에 미치는 영향

和營止痛湯을 암세포주와 혈관내피세포에

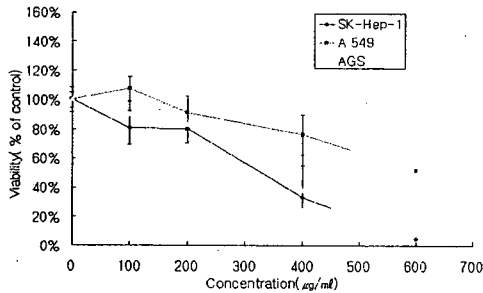


Fig. 1. Effects of WYJTT on viability of SK-Hep-1, AGS, and A549.

Table 2. Effects of WYJTT on viability of SK-Hep-1, AGS, and A549.

	WYJTT ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	100	200	400	600
SK-Hep-1	$1.034 \pm 0.089^*$ (100.0%)	0.836 ± 0.097 (80.8%)	0.830 ± 0.084 (80.2%)	0.342 ± 0.075 (33.1%)	0.050 ± 0.066 (4.9%)
A549	1.251 ± 0.066 (100.0%)	1.345 ± 0.115 (107.5%)	1.138 ± 0.130 (91.0%)	0.951 ± 0.131 (76.0%)	0.645 ± 0.088 (51.6%)
AGS	1.037 ± 0.027 (100.0%)	0.937 ± 0.141 (90.4%)	0.859 ± 0.087 (82.8%)	0.392 ± 0.101 (37.8%)	0.311 ± 0.025 (30.0%)

* represents mean \pm S.D. of measurement in optical density

SK-Hep-1 : Adenocarcinoma of liver

A549 : Carcinoma of lung

AGS : Adenocarcinoma of stomach

투여하여 DNA 합성에 미치는 영향을 살펴보았다.

실험 결과, 和營止痛湯은 간암세포주에 대하여 $600\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군의 DNA 합성율에 비교하여 35.1%로 저하되었으며, 폐암세포주에 대하여 $600\mu\text{g/ml}$ 농도에서 56.0%, 위암세포주에 대하여 $400\mu\text{g/ml}$ 농도에서 12.1%, 소의 혈관내피세포에 대하여 $600\mu\text{g/ml}$ 농도에서 25.8%로 저하시켰다. (Table 3, Fig. 2)

그리고 각 세포주의 50%저지 농도(ED_{50})는 다음과 같이 구하였다. Log dose값을 X축으로 하고 성장률(%)을 Y축으로 하여 최소 자승법으로 회귀직선을 얻고 그 방정식을 도출하였다.

이와같은 방법으로 각 세포주에 대한 값을 구하면, SK-Hep-1에 대한 $ED_{50}=512.86\mu\text{g/ml}$, A549($Y=-37.16X+157.5$, $r^2=0.9310$)에 대한 $ED_{50}=776.24\mu\text{g/ml}$, AGS($Y=-146.8X+405.5$, $r^2=0.9245$)에 대한 $ED_{50}=263.02\mu\text{g/ml}$, BCE($Y=-130.1X+392.0$, $r^2=0.9589$)에 대한 $ED_{50}=416.869\mu\text{g/ml}$ 을 각각 구하였다.

SK proliferation : $ED_{50}=512.86\mu g/ml$

A549 proliferation : $ED_{50}=776.24\mu g/ml$

AGS proliferation : $ED_{50}=263.02\mu g/ml$

BCE proliferation : $ED_{50}=416.869\mu g/ml$

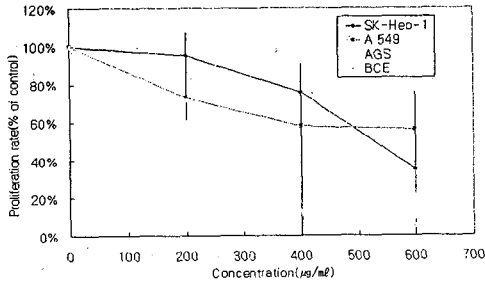


Fig. 2. Inhibition effects of WYJTT on proliferation of SK-Hep-1, AGS, A549, and BCE.

3. 和營止痛湯이 BCE 세포의 血管新生에 미치는 영향

이 실험에서는 matrigel이 도포된 plate에 BCE 세포를 접종한 후 和營止痛湯을 0, 50, 100, 200, 400 $\mu g/ml$ 의 농도로 처리하여 검액이 BCE 세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하였고 6, 12, 18시간 후에 사진을 촬영하였다.

실험 결과, 대조군은 6시간이 경과하면서 세포들이 분화하여 모세혈관을 형성하기 시작하고 12, 18시간이 경과하면 이러한 정도가 더욱 분명해지고 있으나, 18시간째에는 일부 분화되지 않고 세포가 바닥에서 탈락되려는 상태에 있는 것이 일부 관찰되고 있다. 검액을 투여한 경우 50, 100 $\mu g/ml$, 18시간 투여군의 경우 바닥에서 이탈되어 있는 BCE 세포의 수가 대조군보다 현저히 증가되어 있고, 200 $\mu g/ml$ 투여군에서는 혈관망 형성이 대조군보다 저해 되어있는 소견이 관찰되며, 400 $\mu g/ml$ 투여군은 6시간 경

Table 3. Inhibition effects of WYJTT on proliferation of SK-Hep-1, AGS, A549, and BCE.

	WYJTT ($\mu g/ml$)			
	0	200	400	600
SK-Hep-1	0.857 \pm 0.029 * (100.0%)	0.817 \pm 0.101 (95.3%)	0.651 \pm 0.099 (76.0%)	0.301 \pm 0.040 (35.1%)
A549	0.944 \pm 0.063 (100.0%)	0.692 \pm 0.082 (73.3%)	0.547 \pm 0.103 (58.0%)	0.529 \pm 0.108 (56.0%)
AGS	1.081 \pm 0.058 (100.0%)	0.776 \pm 0.083 (71.8%)	0.131 \pm 0.040 (12.1%)	0.055 \pm 0.002 (5.1%)
BCE	0.243 \pm 0.015 (100.0%)	0.218 \pm 0.015 (89.8%)	0.148 \pm 0.057 (60.8%)	0.063 \pm 0.010 (25.8%)

* represents mean \pm S.D. of measurement in optical density

Sk-Hep-1 : Adenocarcinoma of liver

A549 : Carcinoma of lung

AGS : Adenocarcinoma of stomach

BCE : Bovine capillary endothelial cell

과 후부터 18시간 투여군까지 혈관망 형성의 부진과 바닥에서 이탈되는 세포의 수가 증가하는 소견이 잘 나타나고 있다. 분화를 포기한 채 바닥으로부터 이탈되는 세포의 현상이 細胞死에 의한 것인지를 확인하기 위하여 사진 촬영 직후 trypan blue를 이용하여 염색한 결과 대조군과 검액투여군에서 모두 세포사가 관찰되지 않았다. 따라서 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여군의 관찰 소견은 和營止痛湯이 BCE 세포의 분화과정 중 중요한 부분 혹은 cytoskeleton 등에 유의한 영향을 미치고 있을 것임을 시사해 준다. (Fig. 3)

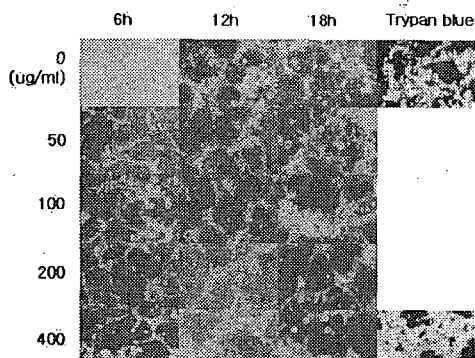


Fig. 3. Effects of WYJTT on capillary tube formation of bovine capillary endothelial cells (BCE).

4. 和營止痛湯이 白鼠 大動脈 血管內皮 細胞의 血管新生에 미치는 영향

실험 결과, 和營止痛湯은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지는 대조군에 비교하여 혈관신생 정도에서 별다른 차이를 나타내고 있지 않으나, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 대조군에 비교하여 혈관신생의 정도가 현저히 저하되어 있음이 관찰되고, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 대조군의 약 10%, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 혈관신생이 완전히 억제되어 있는 소견을 보이고 있다. (Fig. 4)

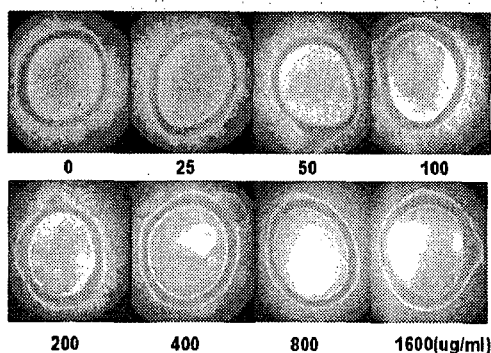


Fig. 4. Effects of WYJTT on angiogenesis of rat aortic endothelial cells.

IV. 考 察

종양은 일반적으로 임상 및 병리 형태학적으로 양성과 악성종양으로 구분되는데 그 기준은 침입성과 확산성이다. 악성종양은 빠른 성장을 주된 특징으로 하며 국지적으로 발생한 상태 그대로 있지 않고 주위의 조직으로 침투하거나, 체내 순환기관으로 침투하여 본래 발생부위로부터 먼 부위까지 확산된다. 이러한 이차적인 암을 유발하는 현상을 전이라고 부르며 종양이 몸 전체에 퍼지면 생명에 위협을 초래한다²⁶⁾.

암환자 사망의 주된 원인은 전이이며⁵⁷⁾, 암의 전이는 임파성, 혈행성, 파종성전이에 의하는데 임파관은 결국 혈관과 연결되어 있기 때문에 대부분의 암종과 육종은 혈관을 통해서 전이된다고 할 수 있다. 파종성전이는 악성종양이 복강이나 흉막강 같은 체내의 자연적인 공간부위에 관통하였을 때 일어나며, 복강내 장기에서는 주로 위장관이나 간장 특히 난소에서 빈번히 관찰된다²⁶⁾.

혈행성전이가 이루어지기 위해서는 복잡한 기전이 수반되는 여러 과정을 거쳐야 하는데

이 과정의 순서는 다음과 같다⁴⁸⁾. ① 암세포로의 형질전환, 성장. ② 기저막 침투, 신생혈관 형성. ③ 혈관벽 침투 및 관통. ④ 혈관 내에서 혈류압과 면역세포로부터의 생존. ⑤ 혈소판과 결합, 기저막에 부착. ⑥ 혈관벽 침투. ⑦ 원격 부위에서의 성장이다. 이러한 여러 단계에서 한가지라도 실패하면 전이는 이루어질 수 없다.

이러한 과정중의 한 단계인 혈관신생은 모세혈관 또는 세정맥의 혈관내피세포가 여러 가지 조절인자의 자극을 받아 분화함으로써 새로운 모세혈관을 만드는 현상으로서 암세포증식에 필요한 영양분과 산소를 공급하는 일종의 파이프와 같은 기능을 한다. 이들은 혈관내피세포 증식 촉진인자 및 억제인자에 의해 그 증식이 균형을 유지하며 정상적인 상황에서는 배아, 상처치료, 여성의 생리 등을 조절한다. 그러나 암세포의 이상증식이나 당뇨 등에 의해 체내 대사 균형이 파괴되면 혈관신생이 촉진되어 암세포의 증식을 돕고 특수기관의 마비 (예, 당뇨병에 의한 시력 상실)를 야기하는 것으로 알려져 있다. 특히 악성 암의 증식과 전이에 혈관신생이 매우 중요하다. 따라서 혈관신생의 억제를 통해 폐암, 간암, 유방암, 전립선암 등 악성 및 전이성 암의 선택적인 증식억제 방법의 일환으로 혈관신생을 억제하는 약제나 방법의 개발이 세계적으로 활발히 이루어지고 있다.

Folkman은 원발성 종양이 제거되면 전이된 암의 성장이 빨라진다는 보고로부터 원발성 종양이 존재할 경우 혈액 속에 혈관형성을 억제하는 물질이 존재한다고 가정하고 1994년에 원발성 종양이 존재하는 쥐의 혈청과 소변으로부터 38kDa의 angiostatin이라는 물질을 분리해내어 이의 혈관형성 억제효과를 확인했으며⁵⁰⁾, 1997년에는 20kDa의 endostatin이라는 물질을 분리해내어 혈관내피세포의 성장을 억제하는

효과를 확인하였고⁵³⁾, 1998년에는 미국 National Cancer Institute(NCI)에서 공식적으로 angiostatin과 endostatin을 동시에 투여하여 쥐에 유발된 종양의 성장을 억제함을 발표함으로써 종양의 혈관신생 억제가 새로운 종양치료방법으로 부각되었다.

현재까지 혈관신생을 저해하는 물질로 TNP-470, thalidomide, marimastat, platelet factor 4, interleukin-12, batimastat, inteferon α -2a, angiostatin, endostatin 등이 알려졌다. 그러나 아직까지 이들 혈관신생 저해제는 체내안정성 및 생산방법에 따른 활성의 변화로 인해 실험에서 일관된 효과를 발휘하지 못하고 있다.

한편 한의학에서의 종양에 대한 인식은 이미 오래 전부터 시작되었으며, 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 인식되고 있으며^{2,18,28,39,42,45)}, 따라서 우리는 積聚, 癥瘕 등에 대한 치료법으로부터 이러한 악성종양의 치료법을 찾아볼 수 있는데, 한의학에서는 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 치법을 겸용하고 있다. 특히 扶正法으로써는 健脾益氣를 위주로 한 扶正培本의 방법이 많이 이용되고 있으며, 祛邪의 방법으로는 活血化癥, 清熱解毒, 軟堅散結 등의 방법이 활용되고 있다⁴⁴⁾.

특히 어혈은 독특한 한의학적 병리개념으로, 각종 원인에 의하여 정상적인 생리기능을 상실한 혈액이 체내 일정부위에 응취되어 형성한

일종의 병리적 산물로서¹³⁾¹⁷⁾ 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 있다²¹⁾³¹⁾⁴³⁾. 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이다⁶⁾²²⁾. 이와 관련하여 王清任³³⁾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.

또한 많은 실험에서 어혈은 혈액응고와 밀접한 관련이 있으며, 이에 따른 活血祛瘀 방제의 혈액응고 억제효과에 대한 논문 또한 다수 보고되어 왔는데⁴⁾⁷⁾⁹⁾¹⁴⁾²⁹⁾, 더욱이 혈액응고가 종양의 혈관신생의 과정과 연관이 있다는 보고⁵⁶⁾⁵⁹⁾로부터 活血祛瘀의 方劑가 또한 혈관신생을 억제하는 효과가 있을 것으로 추정되었다. 다만 活血化瘀法을 부적당하게 장기적으로 사용하면 실험동물에 있어서의 종양의 성장과 전이를 촉진한다는 보고²⁴⁾가 있으므로 活血化瘀藥의 응용은 반드시 血瘀證의 지표범위 안에서 사용해야 할 것이다.

이 연구에서 사용한 和營止痛湯의 構成藥物에 대해 살펴보면 赤芍藥은 血中의 滯를 行하여 瀉肝散瘀·清熱涼血의 要藥이 되어 月經不調·腹痛 등 一切氣滯로 인한 疼痛症과 血滯로 인한 血痺·堅積·疝瘕를 치료하고, 當歸는 養血·補血·行血·益血·活血하여 一切의 血虛證과 癥瘕·癰腫瘡瘍·血氣凝滯等症과 血閉·月經不調·胎前產後 등 一切血症을 치료하며, 川芎은 開鬱·潤肝燥而 補肝虛 하여 上行頭目·下行血海하여 止痛調經·氣鬱血鬱·癰疽瘡瘍·男婦一切血證을 치료하고, 蘇木은 行血祛瘀·止痛消腫·和血破血하여 血

瘀血痛·經閉氣壅·癰腫撲傷을 다스리는 消瘀行血의 要藥이고, 桃仁은 活血·通經·祛瘀潤燥하므로써 血滯經閉·痛經·癥瘕積聚·跌打損傷 등의 瘀血症을 치료하며, 乳香은 十二經을 通行하고 調氣活血·生肌止痛하여 心腹諸痛·口噤耳聾·癰疽瘡瘍·產難折傷을 치료하고, 沒藥은 散瘀消腫·定痛生肌의 要藥이 되고, 續斷은 強壯鎮痛의 작용과 止血排膿작용이 있어 調血潤燥·血枯經閉를 치료하고, 烏藥은 順氣止痛의 良藥으로 行氣止痛하고 血凝氣滯를 다스려서 一切의 諸氣를 通利하고 氣가 理한 즉 散寒行瘀하며 腹痛이 止하고 疝疝이 치료하게 되며, 陳皮는 理氣·消痰의 藥物로 脘腹滿悶·消化不良·痰涎停滯·嘔吐噦逆를 치료하며, 木通은 心·肝·膀胱·小腸으로 들어가 通利시키는 藥物로 止痛排膿·下血催生·行經下乳의 효능도 있으며, 甘草는 十二經을 通行시키고 諸藥을 調和하는 효능이 있고, 生用하면 氣가 平하여 脾胃의 虛를 補하고 心火를 瀉하며 外科症과 清火咽喉·解毒에 사용하고, 灸用하면 氣가 溫하여 三焦元氣를 補하거나 表寒을 散하고 瀉熱을 除하고 咽痛을 去한다³⁷⁾.

和營止痛湯은 위와 같은 효능의 藥物들로 구성되어 있어 암에 대한 효과가 충분히 있을 것으로 추정되지만 이에 대한 실험연구가 없었기에 이 연구는 和營止痛湯의 血管新生抑制效果를 알아보기 위하여 in vitro assay로서 SK-Hep-1(KC-LB 30052), A 549(KCLB 10185), AGS(KCLB 21739)와 BCE를 사용하여 이에 대한 세포독성과 세포증식능에 대한 영향, 그리고 BCE의 혈관신생 및 흰쥐 대동맥의 혈관신생에 미치는 영향 등을 연구하였다.

In vitro에서 세포수를 측정하는 방법중의 하나인 MTT assay는 세포의 증식, 생존율, 그리고 세포독성 등을 colorimetric한 방법으로 측정

하는 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 형성한다⁵⁴⁾. 생성된 formazan을 isopropanol 또는 유기용매에 녹이고 이를 분광흡도계로 측정함으로써 세포의 metabolically activity를 측정, 분석할 수 있는데 그 결과 간암세포에 대하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 대조군에 비교하여 80.8%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 80.2%, 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 33.1%, 600 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 4.9%로 항암활성을 나타내었다. 다시 말하면 간암세포주의 cell viability 억제활성의 유의성 검정을 ANOVA 분석을 실시하였을 때 Sheffe 사후 검정결과 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의적 차이를 나타내었고, 또한 폐암세포주에 대하여 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의적 차이를 나타내었으며, 위암세포주에 대하여는 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의적 차이를 나타내었다. 세포독성을 가장 많이 나타낸 것은 간암세포주, 위암세포주, 폐암세포주의 순서였다.

이러한 결과는 동일한 세포주에 대한 실험이 아니어서 단순 비교하기는 어렵지만, 姜의 加味慈桃丸이나⁵⁾ 十全大補湯³⁵⁾ 沒藥散¹⁾, 加味金匱腎氣丸¹¹⁾ 등이 모두 400 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 세포독성을 나타낸 것에 비교하면 비교적 높은 편이며, 王의 加味慈桃丸³⁴⁾이 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포독성을 나타낸 것에 비하면 적은 수치이다. 다만 동일한 加味慈桃丸에 있어서의 王³⁴⁾과 姜⁵⁾의 이러한 세포독성의 차이는 검액의 분획추출이라는 제조과정의 차이에서 오는 것이라 보여진다.

암세포주와 혈관 내피세포의 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 증식실험을 하였다.

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. 즉 검액을 암세포주와 혈관내피세포에 투여하여 DNA 합성에 미치는 영향을 실험한 결과 간암세포주에 대하여 600 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군의 DNA 합성율에 비교하여 35.1%로 저하되었으며, 폐암세포주에 대하여 600 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 56.0%, 위암세포주에 대하여 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 12.1%, 소의 혈관내피세포에 대하여 600 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 25.8%로 저하시켰다. 이와 같은 결과로 볼 때 본 실험에 사용된 검액은 비교적 세포독성이 강한 것으로 나타났지만 암세포의 증식억제효과 역시 그만큼 강한 것으로 나타났다. 특히 위암세포주에서는 세포독성을 갖지 않는 200 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서도 세포의 DNA replication을 억제함으로써 암세포의 분열, 증식을 막을 수 있는 cytostatic effect를 나타내는 것으로 판단되며 이는 和營止痛湯의 항암제로서의 활용 가능성을 시사해준다고 하겠다.

또한 tube formation assay로 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. matrigel이 도포된 plate에 BCE 세포를 접종한 후 검액을 0, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 검액이 BCE 세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하였고 6, 12, 18시간 후에 사진을 촬영하였다.

실험 결과 대조군은 6시간이 경과하면서 세

포들이 분화하여 모세혈관을 형성하기 시작하고 12, 18시간이 경과하면 이러한 정도가 더욱 분명해지고 있으나, 18시간째에는 일부 분화되지 않고 세포가 바닥에서 탈락되려는 상태에 있는 것이 일부 관찰되고 있다. 검액을 투여한 경우 50, 100 $\mu\text{g/ml}$, 18시간 투여군의 경우 바닥에서 이탈되어 있는 BCE 세포의 수가 대조군보다 현저히 증가되어 있고, 200 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서는 혈관망 형성이 대조군보다 저해되어 있는 소견이 관찰되며, 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군은 6시간 경과 후부터 18시간 투여군까지 혈관망 형성의 부진과 바닥에서 이탈되는 세포의 수가 증가하는 소견이 잘 나타나고 있다. 분화를 포기한 채 바닥으로부터 이탈되는 세포의 현상이 細胞死에 의한 것인지를 확인하기 위하여 사진 촬영 직후 trypan blue를 이용하여 염색한 결과 대조군과 검액 투여군에서 모두 세포사가 관찰되지 않았다. 따라서 400 $\mu\text{g/ml}$ 투여군의 관찰 소견은 검액이 BCE 세포의 분화과정 중 중요한 부분 혹은 cytoskeleton 등에 유의한 영향을 미치고 있을 것임을 시사해 준다.

Aortic ring assay는 증식과 분화가 끝난 성숙한 SD계 흰쥐의 대동맥 혈관내피세포를 배양하여 검액이 대조군에 비해 혈관내피세포의 증식과 분화에 어떤 영향을 미치는가에 대해 알아보는 실험이다. Fig. 4에서 알 수 있듯이 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 대조군에 비교하여 혈관신생에 별다른 차이를 나타내고 있지 않으나, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군에 비교하여 혈관신생이 현저히 저하되어 있음이 관찰되고, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군의 약 10%, 800 $\mu\text{g/ml}$ 과 1600 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 혈관신생이 완전히 억제되어 있는 소견을 보이고 있다. 이와 같은 결과는 沒藥散이나 加味慈桃丸 등이 400 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$, 1600 $\mu\text{g/ml}$ 등의 농도에서 혈관내피세포의 증식과 분화를 억제한 것과 비교해볼 때 상당히 강

한 효과를 나타낸다고 할 수 있다.

이와 같은 실험 결과로부터 검액은 다른 처방들보다 세포독성이 비교적 강하게 나타났지만 특히 위암세포주의 경우에는 세포독성이 없는 농도에서 세포의 증식과 분화를 억제하는 작용을 보이고 있으며, 또 검액을 개체발생의 경우와 상처회복의 경우에 의한 혈관내피세포에 처리시 혈관신생을 강력하게 억제하는 것을 관찰할 수 있었다.

그러므로 대부분 活血化癥 약물들로 配伍된 和營止痛湯은 신생혈관의 생성을 억제함으로써 종양의 성장과 타 장기로의 전이를 막아 항암 및 암 재발방지 치료에 많이 활용될 수 있으리라 사료된다.

V. 結 論

和營止痛湯의 혈관신생억제효과를 알아보기 위하여 사람의 간암세포주인 SK-Hep-1(KCLB 30052), 폐암세포주인 A 549(KCLB 10185), 위암세포주인 AGS(KCLB 21739)와 소의 혈관내피세포주인 BCE(bovine capillary endothelial cell)을 사용하여 이에 대한 세포독성과 세포증식능에 대한 영향, 그리고 혈관내피세포의 혈관신생 및 흰쥐 대동맥의 혈관신생에 미치는 영향 등을 연구한 결과 다음과 같은 유의한 결과를 얻었다.

1. 암세포주에 대한 세포독성의 연구 결과 和營止痛湯은 간암세포주에 대하여 100 $\mu\text{g/ml}$, 폐암세포주에 대하여 400 $\mu\text{g/ml}$, 위암세포주에 대하여 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과의 유의적 차이를 나타내었다.
2. 암세포주와 소의 혈관내피세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DNA량을 측

정한 결과, 和營止痛湯은 간암세포주에 대하 600 μ g/ml 농도에서 대조군의 DNA 합성율에 비교하여 35.1%로 저하되었으며, 폐암세포주에 대하여 600 μ g/ml 농도에서 56.0%, 위암세포주에 대하여 400 μ g/ml 농도에서 12.1%, 소의 혈관내피세포에 대하여 600 μ g/ml 농도에서 25.8%로 저하시켰다.

3. 혈관내피세포의 혈관신생에 미치는 영향을 알아본 결과 400 μ g/ml 농도의 6, 12, 18시간 관찰 소견에서 혈관신생이 억제되었다.
4. Aortic ring assay에서는 200 μ g/ml 농도에서는 대조군에 비교하여 혈관신생 정도가 현저히 저하되어 있음이 관찰되고, 400 μ g/ml 농도에서는 대조군의 약 10%, 800 μ g/ml과 1600 μ g/ml 농도에서는 혈관신생이 완전히 억제되어 있는 소견을 보이고 있다.

이상의 실험결과로 보아 和營止痛湯이 혈관신생에 대해 억제효과를 가지고 있음을 알 수 있었다.

參 考 文 獻

1. 姜大寅 : 沒藥散이 혈관신생 억제에 미치는 효과에 대한 연구, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
2. 康命吉 : 濟衆新編. 서울, 행림서원, p.12, 87, pp.136~137, 150~151
3. 康舜洙 : 韓醫學에서의 瘀血에 對한 概念, 서울, 大韓韓醫學會誌. 5(1) : pp.138~140, 1984.
4. 姜琬熙 : 桂枝가 Angiogenesis의 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1998.
5. 姜顯淑 : 加味慈桃丸의 angiogenesis 억제효과에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
6. 龔延賢 : 增補 萬病回春, 서울, 醫文社, p.250, 1975.
7. 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.
8. 金東集 : 암의 면역요법의 현재와 장래, 카톨릭의대논문집, 33 : pp.719~720, 1980.
9. 金聖洙 : Hydrocortisone acetate로 誘發된 瘀血病態model에 關한 研究 서울, 大韓韓醫學會誌. 8(2): pp.133~138, 1987.
10. 金聖勳, 김동희 : 수중어혈약물의 배합에 의한 抗癌 및 癌轉移 효과에 대한 연구, 97 국제어혈심포지움 논문집, pp.105~134, 1997.
11. 김용태, 김성훈의 : 加味金匱腎氣丸의 抗癌 및 抗轉移 效果에 關한 研究, 경희대학교 동서의학대학원, 1999.
12. 김우호: Invasion and angiogenesis assay, 제 2차 세포주 연구 워크숍, pp.63~64, 1999.
13. 金完熙 崔達永 : 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, pp.59, 371~375, 1985.
14. 김정범의 : 도인승기탕 및 그 구성약물이 어혈병태모형에 미치는 영향. 대한동의학회지 제11권 1호, pp.65~76. 1997.
15. 金鎮福 : 암면역학, 연세의대논문집, 11(1) : pp.55~58, 1978.
16. 金鎮福 : 장기이식면역학 및 종양면역학, 대한의학회지, 21(7) : pp.599~607, 1978.
17. 金昌種 : 病態生理學, 서울, 癸丑文化社, pp.72~74, 1988.
18. 金韓燮 등 : 암의 치료, 치방에 관한 문헌적 고찰, 대한한의학회지, 10: pp.161~166, 1989.
19. 나기환 : 활락효령단이 Angiogenesis억제기

- 전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1998.
20. 대한병리학회 : 병리학, 서울, 고문사, p.222, 225, 232, 1991.
 21. 文濬典 安圭錫 崔昇勳 : 東醫病理學, 서울, 高文社, pp.74~76, 1990.
 22. 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, pp.166~169, 304~306, 1985.
 23. 박재갑 : 인간생명과학, 서울, 서울대학교 출판부, pp.662~673, 1994.
 24. 傅乃武 : 丹蔘이 腫瘤의 生長과 轉移에 미치는 迎香과 그 원리에 대한 초보적 探討에 관한 실험, 中華腫瘤雜誌, 3(3) : p.165, 1981
 25. 서울대학교 의과대학 : 腫瘍學, 서울, 서울대학교 출판부, p.1, pp.1~2, 19~22.23~42, 137~143, 225~234, 303~311, 337~344, 345~351, 1992.
 26. 서울대학교 의과대학 편, 개정판 중앙학, 서울, 서울대학교 출판부, pp.1~2, 19~22. 1989.
 27. 成熙根 : 鬱금이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1998.
 28. 宋炳基 : 韓方婦人科學, 서울, 행림출판사, pp.249~262, 1980.
 29. 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 관한 研究, 서울, 경희대학교 대학원, 1988.
 30. 沈範相: 扶正防癌湯이 암전이 억제에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 2000.
 31. 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, 1975.
 32. 楊維益 : 八十年代中醫藥物治療腫瘤進展, 中國醫藥學報, 2(1):pp. 45~49 1987.
 33. 王清任 : 醫林改錯, 臺北, 力行書局有限公司, pp.34~37, 1986.
 34. 王德仲, 朴俊赫, 劉永法, 沈範相, 安圭錫, 崔昇勳 : 加味慈桃丸 構成藥物의 血管新生抑制效果에 관한 研究, 慶熙大學校 대학원 박사학위논문. 1999.
 35. 윤재호:十全大補湯이 癌轉移 抑制에 미치는 영향, 경희대학교, 1998.
 36. 이기룡 : 입안산이 Angiogenesis억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1998.
 37. 李尙仁 : 本草學, 서울, 修書院, pp.58~60, 101~103, 261~263, 348~349, 371~372, 407~409, 430~431, 436~438, 440~441, 444~445, 466~467, 1981.
 38. 이준우, 최승훈, 안규석 : Angiogenesis의 한의학적 치료전략, 제3의학, 3(1): pp.21~31, 1998.
 39. 전병욱. 유봉하. 박동원. 유기원. 중앙의병인병리에 대한 문헌적 고찰. 대한한방중앙학회지 1995;1(1): pp.83~101
 40. 錢秀昌 : 傷科補要 卷三 湯歌. 北京, 中國書店. pp.202~203 1986.
 41. 趙漢震: 桃紅四物湯加減方의 항암 및 항전이 효과에 관한 연구, 대전대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
 42. 周命新 : 醫門寶鑑, 서울, 행림서원, p.93, 1971.
 43. 中山醫學院 : 病理學, 北京, 人民衛生出版社, pp.53~59, 1978.
 44. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 서울, 행림출판, pp.13~14, 25~27, 32~36, 32~41, 78~80, 1995.
 45. 崔昇勳 : 한의학의 腫瘍에 대한 인식과 병리론. 대한한방중앙학회지 1995;1(1): pp.11~28

46. 한국한의학연구원: 암예방 및 치료를 위한 한의학적 연구, 서울, (주)다우문화사, pp.13~14 · 78~80, 1998.
47. Folkman, J. and Shing, Y. Angiogenesis. *J Bio Chem*, 267;10931~10934, 1992.
48. Hart. I.R., Saini, A., Biology of tumor metastasis, *Lancet* 339: p.1453, 1992.
49. Itoh K. et al : Lysis of human solid tumor cell by lymphokine-activated natural killer cells, *J. Immuno.* 134 : pp.802~907, 1985.
50. Michael S. et al : Angiostatin: A Novel Angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung Carcinoma. *Cell*. 79; pp.315~328 (1994).
51. 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.
52. Oikawa T. et al : Eponemycin, a novel antibiotic, is a highly powerful angiogenesis inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, p.181, pp.170~176, 1991.
53. O'Reilly, et al : an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88: p.277, 1997.
54. 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.
55. Schnaper HW, et al : Type IV collagenase and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro. *J Cell Physiol* 156(2): 235~246, 1993.
56. 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.
57. Sugarbaker EV, Weingard DN, Roseman JM., *Cancer Invasion and Metastases* (L.A. Liotta and I.R. Hart ed.), Boston, Nijhoff, pp. 427~465. 1982.
58. Tanaka N. G., Sakamoto N., Tohgo A., Nishiyama Y., Ogawa H.: Inhibitory effects of antiangiogenic agents on neovascularization, *Exp. Pathol*, p.30, pp.143~150, 1986.
59. 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.