

清離滋坎湯의 폐암 세포주 A549의 invasion acitivity 억제 효과

沈範相 · 金聖勳 · 崔昇勳 · 安圭錫

Inhibition Effect of Chunglijagam-Tang on Invasion Activity of Human Lung Adenocarcinoma, A549

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

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

By applying in vitro invasion assay model, we examined the anti-metastatic effect of Chunglijagam-Tang (CLJGT). In 3H-thymidine incorporation assay, CLJGT treated groups showed the decreased DNA synthesis rate compared with control group. Gelatin zymogram assay showed that CLJGT decreases the gelatinolytic activity of MMP-9 from A-549, at the concentration of 800 $\mu\text{g/ml}$. We examined whether CLJGT inhibits the invasion of A-549 cells through the matrigel precoated transwell chamber. The results showed that CLJGT effectively inhibited the invasion of A-549 as compared with the control (+PMA) groups. From our research, part of mechanism underlying anti-metastatic effect of CLJGT was proven in vitro.

Key word : Chunglijagam-Tang, MMP-9, anti-metastasis

I. 서 론

惡性 腫瘍은 조직의 자율적인 過剩 成長이
며, 개체에 대해서 의의가 없거나 이롭지 않을
뿐더러 정상조직에 대해서 破壞的인 것을 말한

다¹⁾. 癌은 진행과정 중에 주위로 부단히 浸潤
하고 擴大되어 주위 조직을 직접 침범하는 외
에, 각종 경로를 통하여 하나의 암세포나 작은
그룹의 세포가 일차 종양괴로부터 分離되어 원
격부위의 조직이나 장기에 着床하여 成長하는

* 경희대학교 한의과대학 병리학교실

데, 이것은 암세포의 특징 가운데 하나로서 이러한 현상을 轉移라 한다. 실제로 암환자 사망의 주요 원인은 轉移이다²²⁾.

癌의 轉移는 크게 세 종류로 대별되어 淋巴性, 血行性, 播種性으로 나뉘는데, 임파관은 혈관과 연결되어 있기 때문에 대부분의 癌腫과 肉腫은 결국 혈관을 통해서 전이된다고 할 수 있다. 血行性 癌轉移 과정은 암세포의 細胞外基質(extracellular matrix: ECM) 着床, 分解, 移動 및 血管內 移動, 암세포의 遠隔部位 着床으로 나눌 수 있으며, 특히 ECM의 분해는 암세포가 轉移되기 위해 반드시 거쳐야 하는 관문이다. 암세포는 細胞外基質 分解酵素인 matrix metalloproteinase (MMP) 遺傳子가 자극을 받아 발현되어, 그 주변 조직을 향해 MMP를 분비²⁶⁾하여 ECM의 구성 성분을 절단하고 그 빈자리에 암세포가 浸潤成長하여 移動하게 된다.

암 치료에는 서양의학에서 현재 手術, 放射線, 化學療法 등이 사용되고 있으나 각종 副作用을 야기하는 문제점이 있다. 한의학에서는 암의 치료에 있어 扶正祛邪法을 사용하되 그 輕重緩急의 균형을 유지해야 하는 것으로 보고 있다²⁾. 또한 암치료에 있어서 화학요법과 한약 치료를 併行하는 것이 효과적임을 보고하는 사례는 매우 많으며^{13,21)}, 한국에서는 주로 正氣를 보강할 수 있는 약물과 처방들에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다^{4,19)}. 현재까지의 연구결과로 보아 한약이 항암제로서 뛰어난 효능을 발휘하는 경우는 거의 없으나, 수술, 방사선, 화학요법과의 併用治療時에 治療效果를 上升시키고 生命延長率을 提高시키며 生活의 質을 높인다는 것으로 요약된다. 특히, 생명연장율을 높인다는 것은 종양에 의한 사망의 70%를 점하는 再發癌을 억제할 수 있음을 포괄하고 있기 때문에 한약이 암세포의 轉移를 억제할 수 있다는 의미로 여겨진다²⁾.

최근 韓藥의 癌轉移抑制 效果에 관한 연구가 많이 이루어지고 있으나^{3,5-12,14-18,23-25)}, 아직까지 정확한 作用機轉, 轉移의 韓醫學的 解釋 등에 있어서 보다 많은 연구가 필요한 실정이다.

淸離滋坎湯은 龔信의 萬病回春에 처음 수록되어 陰虛火動이나 勞瘵, 腎虛脾弱으로 인한 諸證을 치료하는 처방으로 咳嗽, 燥熱, 盜汗, 痰喘과 四肢困倦無力, 不思飲食, 大便泄瀉, 肚腹 蟲脹腫 등에 활용된다²⁰⁾. 淸離滋坎湯에 대한 실험적 연구로는 면역기능저하를 유발한 마우스에 淸離滋坎湯을 투여했을 때 항체생산능이 증가하고 탐식세포의 기능이 증가하지만, 면역기능의 증가보다는 유지에 있어서 일정한 역할을 담당하며 따라서 항암제와의 병용투여에서 일정한 역할을 할 것으로 추정되고 있다.

본 연구에서는 淸離滋坎湯이 癌轉移에 미치는 영향을 규명하기 위하여 人體 폐암세포주인 A549를 사용하여 細胞毒性和 細胞增殖 抑制率을 측정 한 후, MMP-2, -9의 gelatinolytic activity의 변화를 측정하기 위하여 gelatin zymography를 시행하였으며, Transwell을 이용한 *in vitro* invasion assay를 시행하였고, 암세포의 전이 억제와 관련된 것으로 알려진 nm23에 대하여 western blotting을 시행한 결과, 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. A549 세포배양

세포주는 사람의 폐암 세포인 A549를 사용하였다. A549 세포주는 배양용기의 기저면에서 단층으로 증식하는 특성을 갖고 있다. 배지는 DMEM에 FBS 10%, NaHCO₃ 24 mM 및 Penicillin/Streptomycin등을 첨가하여 5% CO₂,

37℃ 조건에서 세포배양기로 배양했다.

2. 검액의 조제

청리자감탕을 80% ethanol 열탕 추출하여 감압농축 후 용매를 증류수로 바꾸어 다시 감압농축하였다(yield 26.7%). 청리자감탕 추출액이 가장 잘 녹은 상태가 되도록 DMSO를 가하여 66%가 되도록 한 후 1ml 씩 분주하여 -80℃에 보관한 채 실험에 사용하였다.

3. MTT Assay

Cell viability에 청리자감탕이 미치는 영향을 보고자 하여 MTT assay를 수행하였다. A549를 5×10^3 /well이 되도록 96-well cell culture plate에 10% FBS가 포함된 DMEM으로 plating하여 37℃ 5% CO₂ incubator에서 24시간 키운 후 청리자감탕을 serum free DMEM에 녹여 0, 400, 800, 1600 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 처리하여 다시 20시간 키웠다. MTT solution 15 μl /well을 가하고 4시간 배양한 후 stop solution 100 μl /well 가하여 다시 2시간 배양하여 formazan crystal을 완전히 녹인 후 ELISA를 이용하여 490nm, reference 650nm에서 측정하였다.

4. methyl-³H-thymidine incorporation assay

세포를 24-well cell culture plate에 5×10^4 cells/well로 seeding한 후 24시간 동안 키우고 serum free DMEM에 추출액을 가하고 동시에 1 $\mu\text{Ci/well}$ of [methyl-³H]thymidine (Amersham)을 가하였다. 18시간이 지난 후 media를 제거하고 세포들을 methanol로 고정한 후 PBS로 2회 washing 하고 다시 10% TCA로 washing 하고 나

서 0.2 N NaOH로 세포를 녹인 후 lysate를 취하여 β -scintillation counter로 측정하였다.

5. Gelatin zymography

A549를 1×10^6 /ml이 되도록 맞춘 후 10% FBS가 포함된 DMEM으로 6-well cell culture plate에 seeding하였다. 37℃, 5% CO₂ incubator에 24시간 키운 후 청리자감탕을 serum free DMEM에 녹여 0, 400, 800, 1600 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 처리하여 12시간을 배양한 후 PMA 100 ng/ml을 투여하여 다시 12시간 키웠다. 세포가 분비한 gelatinase 양을 알아보기 위하여 conditioned media를 취하여 gelatin(0.4mg/ml; Sigma)이 포함된 8% SDS-PAGE로 분리하였다. 전기영동 후 gel을 2.5% Triton X-100으로 30분간 3번 washing하고 37℃ water bath에서 18시간 동안 substrate buffer (0.05 M Tris · HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.01 M CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 0.02% NaN₃)에 incubation하였다. 이 gel을 0.25% coomassie blue R250으로 staining하고 7% acetic acid로 destaining한 다음 사진 촬영하였다.

6. In vitro invasion assay

A-549를 6well plate에서 1×10^6 cells/well로 seeding하여 2ml 10% FBS DMEM과 함께 24시간 동안 배양 후, media를 1ml의 serum free DMEM으로 교체하고 여기에 청리자감탕 농축액을 투여하여 최종 농도가 0, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 하였으며 control well에는 2 μl 66% DMSO를 가하여 12시간 동안 배양하였다. 12시간 후 세포를 0.25% trypsin으로 처리한 후 청리자감탕 농축액과 PMA 100 ng/ml이 들어 있는 1ml serum free DMEM을 넣어 세포를 균일하게 현탁시킨 후 세포수가 2.5×10^4 cells/100 μl

가 되도록 하여 Transwell chamber로 옮겨서 24 시간을 배양하였다. Transwell의 membrane은 10ul Matrigel (1.5mg/ml)과 10ul collagen (0.5mg/ml)으로 위와 아래를 코팅하여 사용하였다. 배양이 끝난 후 Transwell을 hematoxyline/eosin으로 염색한 후 면봉을 이용하여 Transwell의 upper chamber에 남아있는 세포를 닦아내고 역상현미경을 이용하여 400배율에서 염색된 세포의 숫자를 세었다. 세포수의 측정은 무작위로 12곳을 선정하여 접안렌즈의 격자 눈금을 기준으로 삼아 동일한 면적의 염색된 세포의 수를 세어 그 평균값을 각 실험군과 비교하였으며 동일한 실험을 2회 실시하였다.

7. Nm23 western blotting

A549 2×10^6 개/10cm dish에 plating한 후 48시간 동안 배양하여 cell이 90% confluent해지면 serum free DMEM에 청리자감탕 추출액을 가하였다. 12시간이 경과한 후에 PMA를 100 ng/ml의 농도로 투여하였다. 12시간이 지난 후 세포를 harvest하였다. Cell에서 분리한 35ug의 단백질을 12%의 SDS-PAGE에 loading하여 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 PVDF에 electrotransfer하였다. 1차 항체로는 nm23 (rabbit polyclonal Ig G, Santa Cruz Biotechnology, USA)을 1:1000의 비율로 희석하여 사용하였다. Membrane의 20cm² 면적 당 ECL 용액 2ml의 비율로 membrane을 ECL 용액에 1분간 적신 후 플라스틱 비닐에 membrane을 밀봉하고서 10분 이내에 Hyperfilm ECL (Amersham, England)에 30초~5분간 노출시킨 후, 이 film을 X-ray film현상기를 사용 현상하였다.

III. 결 과

1. MTT assay

실험 결과 청리자감탕 농도별로 MTT가 증가하고 있는데 이것이 배지에 섞인 약물의 영향이 아닌가를 조사중이며 이것을 고려하더라도 한약 농도에 따라 cell viability에는 영향이 없을 것으로 생각된다(Table 1).

Table 1. Effect of Chunglijagamtang on cell viability of A-549

OD	Chunglijagamtang (mg/ml)			
	0	0.4	0.8	1.6
490-650nm	0.388±0.011	0.661±0.053	0.680±0.010	0.565±0.060

2. Proliferation assay

실험결과 청리자감탕 0, 400, 800ug/ml에서 cpm이 7371, 2645, 1377로서 control에 비하여 400ug/ml은 36%, 800ug/ml에서는 19%로 감소되어 있었다(Fig. 1). 이러한 cytostatic effect는 MTT assay에서 별다른 cytotoxicity effect가 관찰되지 않은 것을 고려할 때 세포에 대한 직접

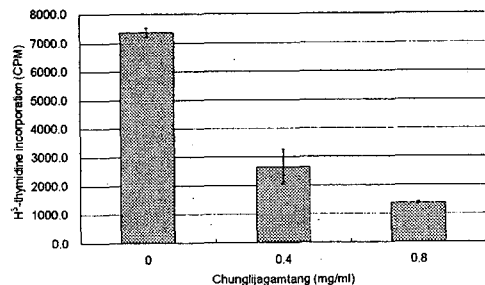


Fig.1. Effect of Chunglijagamtang on H3-thymidine incorporation of A-549

적인 독성은 없으면서 세포의 분열을 선택적으로 차단하는 것으로 생각된다.

3. Gelatin zymogram

실험결과 청리자감탕은 400ug/ml에서 MMP-9이 증가했다가 800ug/ml, 1600ug/ml에서는 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

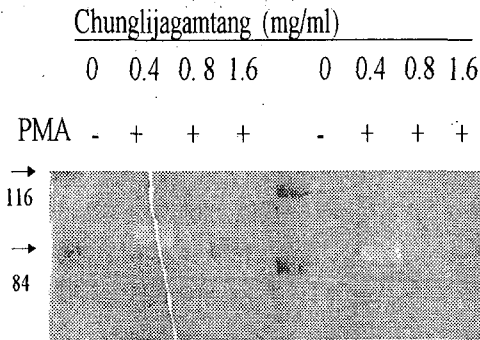


Fig. 2. Effect of Chunglijagamtang on gelatin zymography of A-549

4. In vitro invasion assay

실험 결과 (Fig. 3) 청리자감탕은 200ug/ml에서 transwell invasion cell 수가 48%로 감소하였고 400ug/ml에서는 33%로 감소하여 우수한 항암전이 효과를 나타내었다.

5. Western blotting

실험결과 Nm23은 청리자감탕 투여에 따른 변화를 보여주지 않고 있어서 청리자감탕은 Nm23과 다른 경로를 통해 항암효과를 나타내고 있을 것으로 생각된다.

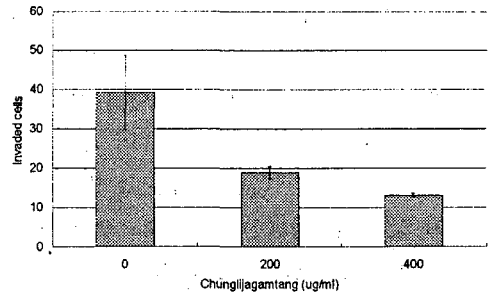


Fig. 3. Effect of Chunglijagamtang on invasion assay of A-549

IV. 고찰 및 결론

종양은 일반적으로 임상 및 병리 형태학적으로 양성과 악성 종양으로 구분하는데 그 기준은 侵入性和 擴散性이다. 양성 종양은 비교적 서서히 성장하며 주변 조직으로 확산되지 않기 때문에 수술에 의해 치유시킬 수 있다. 반면에 악성 종양은 빠른 성장을 주된 특징으로 하며, 국소적으로 발생한 상태 그대로 있지 않고 주위의 조직으로 침투하거나 체내 순환기관으로 침투하여 본래 발생부위로부터 먼 부위까지 확산된다. 이러한 이차적인 암을 유발하는 현상을 轉移(metastasis)라고 부르며 종양이 몸 전체에 퍼지면 생명에 위협을 초래한다¹⁾.

실제로 임상에서 큰 문제가 되는 것은 암의 재발인데, 고형 종양의 약 80%에서 전이가 일어나고, 암으로 인한 사망의 약 70%는 재발암에 의한 것이다. 따라서 종양의 재발을 방지하는 것이 임상적으로 큰 의의를 지니게 되며, 이와 관련한 연구는 gelatinase와 전이와의 상관성과²⁷⁾, Folkman의 Angiostatin, Endostatin 연구^{28,29)} 이래로 매년 증가하고 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을 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 있다²⁾. 또한 암치료에 있어서 화학요법과 한약치료를 병행하는 것이 효과적임을 보고하는 사례는 매우 많으며^{13,21)}, 우리 나라에서는 주로 正氣를 보강할 수 있는 藥物과 處方들에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다^{4,19)}.

최근에는 韓藥을 이용한 腫瘍의 再發 防止 관련 실험이 증가하고 있는데, 안 등²³⁾은 高良薑, 柴胡, 萆薢, 皂角刺, 牽牛子, 이 등²⁵⁾은 丹參, 김 등⁹⁾은 白花蛇舌草, 김 등⁸⁾은 消積白朮散, 加味君子湯, 加味地黃湯, 加味君子地黃湯의 細胞附着阻止 효과를 보고하였고, 최¹⁸⁾는 加味慈桃丸, 윤 등¹⁴⁾은 十全大補湯, 이 등¹⁶⁾은 血府逐瘀湯의 암전이 억제효과를 보고하였고, 강⁶⁾은 加味慈桃丸, 이 등¹⁵⁾은 立安散, 나 등¹⁰⁾은 活絡效靈丹, 강 등⁵⁾은 桂枝, 성 등¹¹⁾은 鬱金, 강³⁾은 沒藥散, 손 등¹²⁾과 김 등⁹⁾은 白花蛇舌草의 혈관신생 억제효과를 보고한 바 있다.

淸離滋坎湯은 龔信²⁰⁾의 萬病回春에 처음 수록되어 陰虛火動이나 勞瘵, 腎虛脾弱으로 인한 諸證을 치료하는 처방으로 咳嗽, 燥熱, 盜汗, 痰喘과 四肢困倦無力, 不思飲食, 大便泄瀉, 肚腹

蟲脹腫 등에 활용된다. 구성약물로는 숙지황, 생견지황, 맥문동, 천문동, 당귀, 백작약, 산수유, 산약, 백복령, 백출, 목단피, 택사, 황백, 지모, 감초로 이루어져 있어서 滋陰, 養血, 淸熱, 瀉火하는 작용이 있다. 청리자감탕은 면역조절 효과로 항암효과를 나타내고 있지만 그 암전이 억제효과는 아직까지 연구된 바 없었다.

본 연구에서는 淸離滋坎湯이 癌轉移에 미치는 영향을 규명하기 위하여 人體 폐암세포주인 A549를 사용하여 細胞毒性和 細胞增殖 抑制率을 측정 한 후, MMP-2, -9의 gelatinolytic activity의 변화를 측정하기 위하여 gelatin zymography를 시행하였으며, Transwell을 이용한 in vitro invasion assay를 시행하였고, 암세포의 전이 억제와 관련된 것으로 알려진 nm23에 대하여 western blotting을 시행하였다.

암전이 억제여부를 알 수 있는 in vitro invasion assay에서 청리자감탕 농축액은 200 μ g/ml 투여군에서 대조군 대비 48%, 400 μ g/ml 투여군에서는 33%로 invasion이 감소되므로써 강한 암전이 억제효과를 나타내었다. 이러한 암전이 억제효과가 Nm23 단백질에 의한 것인지를 확인하기 위하여 Nm23에 대한 western blotting을 시행하였으나 청리자감탕은 Nm23의 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되어 이와는 다른 경로를 통해 이루어질 것임을 알 수 있었다. 암의 전이에서는 MMPs 단백질의 역할이 중요하므로 MMP-2, -9의 활성을 조사하기 위하여 gelatin zymogram assay를 시행하였다. 실험 결과 청리자감탕은 800 μ g/ml 농도에서부터 MMP-9의 발현이 억제되었다. 400 μ g/ml 농도에서는 PMA 만을 첨가한 대조군이 빠져 있어서 감소 여부를 확인할 수 없었다. 따라서 400 μ g/ml 농도에서의 in vitro invasion 억제효과와 MMP-9의 활성 저해를 확인할 수는 없지만 농도의존적으로 MMP-9의 활성이 저해되는 사실로 보아

MMP-9의 활성 저하와 invasion의 억제 사이에 일정한 상관관계가 있을 수 있을 것으로 생각된다. 또한 이러한 결과들이 살아있는 암세포의 활성을 관측하는 것임을 감안하여 MTT assay를 통해 cell viability를 조사하였는데, 400, 800 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비하여 생존율이 증가함에 따라 invasion 억제 및 MMP-9의 활성 저하가 청리자감탕에 의한 세포독성이 아님을 확인할 수 있었다. 또한 3H-thymidine up-take를 통한 세포증식을 관찰한 결과, 청리자감탕은 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군 대비 36%, 800 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 19%로 감소함에 따라 직접적인 항암활성은 나타내지 않았지만, 암세포의 증식은 억제할 수 있음을 보여주었다.

이상의 실험 결과로 미루어 청리자감탕은 in vitro 수준에서 폐암 세포주 A-549의 invasion을 억제하고 MMP-9의 활성을 저하시켰으며, 세포증식을 억제함에 따라 일정한 암전이 억제효과가 있을 것으로 기대되며 차후의 보다 깊은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한방치료기술개발연구사업(HMP-99-O-11-0011-C)의 지원으로 수행되었다.

參 考 文 獻

1. 서울대학교 의과대학. 개정판 종양학. 서울: 서울대학교 출판부; 1989
2. 최승훈. 동의종양학. 서울: 행림출판; 1995
3. 강대인. 몰약산이 혈관신생 억제에 미치는 효과에 대한 연구 [학위논문]. 서울: 경희대학교; 2000
4. 강윤호. 수종의 한약물이 백서의 자연살해 세포활성에 미치는 영향. 대한한의학회지, 1987; 8(1):53-74.
5. 강윤희, 최승훈, 안규석. 계지가 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향. 동의병리학회지, 1999; 13(2):41-53.
6. 강현숙. 가미도환의 Angiogenesis 억제효과에 관한 실험적 연구 [학위논문]. 서울: 경희대학교; 2000
7. 김동희, 가미지황탕, 가미사군자탕 및 가미군자지황탕의 항종양활성과 방사선 부작용 감소효과[학위논문]. 대전: 대전대학교; 1998
8. 김성훈, 가미소적백출산의 항암 및 항전이 효과에 관한 연구. 보건복지부 중간보고, 1997년
9. 김성훈, 안규용, 류시용. 백화사설초 헥산분획과 다당체가 항암 및 항전이 활성에 미치는 영향 (Ursolic acid와 Asperuloside 병용투여시 항암 및 항전이 효과에 관한 연구). 동의병리학회지, 1999; 13(1):65-75.
10. 나기환, 최승훈, 안규석. 활락효령단이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향. 대한한방종양학회지, 1998; 4(1):17-36.
11. 성희근, 최승훈, 안규석. 울금이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향. 동의병리학회지, 1999; 13(2):66-78.
12. 손경희, 이옥희, 이열남, 정해영, 이정준, 김규원. 우르솔릭산의 혈관형성 억제활성. 약학회지, 1993; 37:532-537
13. 안문생. 항암제 mitomycin C와 수종 보익제의 병용투여효과에 대한 연구. 대한한방내과학회지, 15(1): 60-80, 1994.
14. 윤재호, 안규석, 최승훈. 십전대보탕이 암전이 억제에 미치는 영향. 대한한방종양학

- 회지, 근간 1999.
15. 이기룡, 최승훈, 안규석. 입안산이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향. 대한한방종양학회지, 1998; 4(1):177-198.
 16. 이진화, 안규석, 최승훈. 혈부축어탕이 암전이 억제에 미치는 영향. 대한한방종양학회지, 근간 1999.
 17. 조한지, 김성훈. 도홍사물탕가감방의 항암 및 항전이 효과에 관한 연구. 동의병리학회지, 1999; 13(1):76-91.
 18. 최승훈. 보건의료기술연구개발: 수종 한약처방의 암전이 억제 효능에 관한 연구. 서울, 1999. 관리번호: HMP-96-M-5-1084. 보건복지부의 연구지원을 받았음
 19. 한주석, 고병희, 송일병. 태음인 갈근해기탕이 면역반응 및 NK세포활성도에 미치는 영향. 대한한의학회지, 11(2): 106-114, 1990.
 20. 龔廷賢. 萬病回春. 香港, 人民衛生出版社, p201. 1980.
 21. 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.
 22. Sugarbaker EV, Weingard DN, Roseman JM. Cancer Invasion and Metastases (L.A. Liotta and I.R. Hart ed.), Boston, Nijhoff, 1982, p. 427-465.
 23. Ahn BZ, Yoon YD, Lee YH, Kim BH, Sok DE, Inhibitory Effect of Bupieuri Radix Saponins on Adhesion of Some Solid Tumor Cells and Relation to Hemolytic Action: Screening on 232 Herbal Drugs for Anti-Cell Adhesion. *Planta Medica* 1998;64:220-224
 24. Kwack KH, Kim SH. Effect of So minbojungikgitang & So minbojungikgitangkambang on The Anticancer Activity and The Reduction of Side Effect by Cyclophosphamide. *Korean Journal of Oriental Medical Pathology* 1996;10(2):122-140
 25. Lee KI, Kim SH, Seong RK. Study on Antitumor Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix* and Isolation of Active Compound. *Korean Journal of Oriental Medical Pathology* 1996; 10(2):76-91
 26. Ogilvie DJ, Hailey JA, Juacaba SF, Lee ECG, Tarin D. Collagenase secretion by human breast neoplasm: A clinicopathologic investigation. *J Natl Cancer Inst* 1985 Jan;74(1):19-27.
 27. 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.
 28. Barsky SH, Gopalakrishna R. High metalloproteinase inhibitor content of human cirrhosis and its possible conference of metastasis resistance. *J Natl Cancer Inst* 1988 Mar 16;80(2):102-8.
 29. 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.