

# 加味消癌散의 血管新生 억제에 관한 항암효과 연구

윤성찬, 안성훈, 문연자, 김진경<sup>1</sup>, 추영국<sup>2</sup>, 정규용<sup>3</sup>, 우원홍  
원광대학교 한의학 전문대학원, <sup>1</sup>포천중문대학교 의과대학,  
<sup>2</sup>원광대학교 자연과학대학 생물학교실, <sup>3</sup>원광대학교 의과대학 약리학교실

## Abstract

### Studies on the antimetastasis & antiangiogenesis effects of *Gamisoamsan*

Sung-Chan Yoon, Seong-Hun Ahn, Yean-Ja Mun,  
Jin-Kyeong Kim<sup>1</sup>, Young-Kug Choo<sup>2</sup>, Kyu-Yong Jung<sup>3</sup>, Won-Hong Whoo

Departments of Professional Graduate School of Oriental Medicine

<sup>1</sup>College of Medicine, Pochon CHA University

<sup>2</sup>Division of Biology Science, College of Natural Science, Wonkwang University

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Wonkwang University School of Medicine

*Soamsan* is known as an anti-cancer remedy in the traditional Korean Medicine. To enhance the synergic effects of anti-cancer activity of *Soamsan*, this study reconstituted the original components of *Soamsan* with a slight modification and produced a novel herbal remedy, namely *Gamisoamsan*. Extracts of *Gamisoamsan* inhibited the growth of cultured CT-26 cells, mouse colon adenocarcinoma, in a dose-dependent manner (1 to 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and  $\text{ID}_{50}$  was estimated approximately 16.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Using tumor-bearing

---

교신저자: 우 원 홍

익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의학전문대학원

TEL : 063)850-6845

E-mail : whwoo@wonkwang.ac.kr

접수일자: 2002. 11. 4

채택일자: 2002. 12. 21

\* 이 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업 HMP-99-O-01-0003에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

mouse model, in which was produced by subcutaneous injection of CT-26 cells ( $1 \times 10^5$  cells). the effects of *Gamisoamsan* on tumor growth and host survival were examined by evaluating tumor volume and increase in life span. When *Gamisoamsan* extracts in variable doses of 100, 200 and 500mg/kg body weight per day were orally administered to tumor-bearing mice, following results were obtained: Improvement in the hematological parameters following *Gamisoamsan* treatment such as hemoglobin contents, red blood cells and white blood cells of the tumor-bearing mice have been observed. *Gamisoamsan* treatment also showed a prolongation of life span and a reduction of tumor volume in the CT-26 tumor hosts. The results of the present study suggest that *Gamisoamsan* extracts has a potential anti-tumor activity and may be an useful remedy to prevent and/or treat cancer.

## I. 서 론

암은 한의학에서 육음침습(六淫侵襲)·칠정내상(七情內傷)·음식노권(飮食勞倦) 등의 발생원인에 의하여 기혈어체(氣血瘀滯)·담습응취(痰濕凝聚)의 병기가 발생되고 기체혈어(氣滯血瘀)·진고담결(津枯痰結)의 병리적 현상이 발생되어 결국 암이 형성<sup>1-3)</sup>되는데, 기존의 암치료 방법은 주로 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등 주로 암세포에 직접적으로 살상작용(殺傷作用)을 하는 치료 방법으로 이들은 암세포이외의 정상세포에도 살상작용을 나타내는 등 많은 부작용을 유발하므로, 최근에는 면역요법이나 apoptosis, 세포분화 유도법 및 혈관 형성저해법등 새로운 방법의 연구가 시도되고 있다<sup>4-7)</sup>.

암의 가장 중요한 생물학적 특성의 하나는 침습과 전이(Invasion & Metastasis) 현상으로 종양세포가 원발부위에서 다른 부위로 이동하여 새로운 환경에서 적응, 증식하는 것으로, 암조직과 같이 세포증식이 무한적으로 일어나는 경우 정상세포와 마찬가지로 암세포가 성장하고 확장하기 위

하여 필수적으로 새로운 혈관이 신생되어야 하므로 암의 전이 억제를 위한 방편으로 근래 혈관형성억제제에 대한 관심은 많이 고조되고 있다<sup>7-10)</sup>.

혈관신생(angiogenesis)은 암세포의 성장이나 전이에서 관찰되는 특징적 세포반응으로, 혈관신생의 측면에서 볼 때 종양의 증식과 전이는 여러 가지 성장인자(growth factor)의 분비 증가와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이들 중 가장 중요한 성장 조절물질로 알려져 있는 것은 vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF)등으로, VEGF의 발현은 다양한 종류의 고형암에서 증가하고 혈관신생을 증가시킴으로써 종양의 성장을 촉진하는 것으로 증명<sup>11-13)</sup> 되었으며, bFGF는 전신 혹은 국소 주입(infusion)에 의하여 종양세포의 혈류량, 혈관의 밀도와 길이 그리고 혈관 형성을 증가시키는 것으로 보고<sup>14-16)</sup> 되었다. 또한 암세포의 전이와 혈관신생에 대한 transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )의 세포병리학적 역할<sup>17-19)</sup>도 잘 알려져 있

으며, 이 외에 혈관신생 억제제로 현재까지 보고된 물질들로는 스테로이드, 항생제, 해파린과 비스테로이드성 소염제, 항염제, collagenase inhibitor 등이 있으며 platelet factor IV, 방사선, 레이저 광응고술을 이용하여 혈전을 형성시켜 혈관을 퇴화시키는 광혈전술, retinoic acid, thalidomide 등<sup>20,21)</sup>이 있다.

가미소암산은 기허(氣虛)·기체혈어(氣滯血瘀)·사독치성(邪毒熾盛)·담음적취(痰飲積聚)등의 기전에 의하여 암이 발생된다는 한의학적인 이론에 입각하여 보기(補氣)·활혈(活血)·해독(解毒)·연견산결(軟堅散結)등을 목적으로 구성된 처방으로 활혈화어법을 응용한 扶正祛邪法에 상응하는 處方인 『東醫治療經驗集成』<sup>22)</sup>의 소암산을 기본방으로 황기·대황·현호색·목단피·천궁이 가미된 처방이다.

이에 저자는 암에 대한 한의학의 치료법 중 부정거사법에 상응하는 처방인 소암산에 황기·대황·현호색·목단피·천궁을 가미한 가미소암산의 항혈관신생 기전을 통한 항암효과를 확인하기 위하여 CAM assay, corneal neovascularization assay 등 혈관신생에 미치는 효과와 vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor-beta (TGF-beta), basic fibroblast growth factor (bFGF)의 혈관증식인자 유전자 및 immortalization-upregulated protein 1(IMUP-1)<sup>23)</sup> 유전자 발현 양상을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 약 재

본 실험에 사용한 가미소암산의 처방내용은 아래와 같으며, 약재는 시중에서 구입하여 정선된 약재만을 사용하였다.

韓藥名	生 藥 名	重量 (g)
人 蔘	Radix ginseng	30
當 歸	Radix angelicae gigantis	30
半 枝 蓮	Herba scutellariae	30
白 疾 藜	Fructus tribuli	30
黃 芪	Radix scutellariae	30
白花蛇舌草	Herba oldenlandiae diffusae	25
大 黃	Rhizoma rhei	25
白 朮	Rhizoma atractylodis macrocephalae	20
玄 胡 索	Tuber corydalis	15
牧 丹 皮	Cortex moutan radidis	15
川 芎	Rhizoma cnidii	15
昆 布	Thallus laminariae	12
海 藻	Thallus sargassi	12
三 稜	Rhizoma scirpi	10
向日葵莖髓	Helianthus annuus	30
	TOTAL AMOUNT	329

#### 2) 동 물

실험동물은 무균 상태의 Wistar 계 백서를 샘타코로부터 구입하여 계대배양하여 6주령의 암컷만을(?체중 약 200-250g의 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를) 각막의 혈관신생유도 실험에 사용하였으며, CAM assay를 위한 수정란은 익산에 있는 영생 종계장에서 구입하여 실험에 사용하였다.

#### 3) 세포 및 배양

혈관증식 유전자 발현 실험에 사용한 세포주는 사람 섬유육종의 전이성 부위로부터 얻어진 HT1080 세포주가 이용되었다. 이 HT1080 세포주는 10% fetal bovine

serum(FBS)과 100 units/ml 페니실린, 100 ug/ml 스트렙토마이신을 첨가한 MEM 배양액에서 37°C, 5% 이산화탄소를 유지하며 배양하였다.

#### 4) 시약 및 기기

혈관신생 기전의 억제효과를 연구하기 위하여 시약 처리용 Thermanox coverslips (Nunc Naperville, IL Inc., IL)과 혈관신생 유도 수술을 위한 10-0 nylon (Davis+Geck, Wayne, NJ) 봉합사를 사용하였고 Retinoic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, NY., U.S.A)는 CAM assay의 positive control로 사용되었다. 혈관신생억제를 좀더 자세히 관찰하기 위하여 Fat emulsion (10%)을 Green Cross Pharm. Co. (Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였으며 봉합수술 후 염증을 예방하기 위하여 Terramycin (Pfizer, Inc.)을 사용하였다. 본 연구에 사용된 기기는 실체현미경 (Olympus. Co. Japan), Digital Camera (Nikon, Co. Japan), Haching system (Jeung-Do, Inc., Korea)를 혈관신생기전 억제 실험에 사용하였으며, 동물사육은 무균무진-항온항습 자동 사육장치 (Jeung-Do, Inc., Korea)를 이용하였다.

혈관 성장 인자 발현 억제를 위한 실험에서 사용된 MEM 배지, fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA는 Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Maryland, U.S.A)를 사용하였다.

## 2. 방 법

### 1) 시료의 제조

가미소암산 329 g의 50%인 164.5g을 증류수 1ℓ를 가하여 3시간 동안 끓인 후 거

스로 여과하고 3,000r.p.m.으로 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 원심분리 후 여과액을 농축기(rotary evaporater)로 농축한 다음 -70°C에서 freeze dryer로 동결건조시켜 34.4g (수득율 ; 약 21 %)의 건조추출물을 얻어 시료로 사용하였다.

### 2) Chorioallantoic membrane (CAM) assay

수정란을 90% 습도가 유지되는 37°C 배양기에 넣어 이를 0일배로 하여 배양하였다. 4일배가 되면 계란의 끝부분에 구멍을 내어 18-gauge 주사바늘을 사용하여 알부민(albumin) 3 ml를 뽑아낸 뒤, 계란의 공기주머니 아래에 있는 쪽을 70% 알코올로 소독한 후 메스를 이용하여 지름 3 cm 크기의 원형 창문을 만들고, 공기 주머니 아래에 있는 막은 핀셋으로 제거한 후 유리테이프로 구멍을 막았다. 5일배가 되면 살균처리 된 thermanox 15 mm의 coverslip위에 sample을 loading하여 용매를 완전히 말린 후, 계란의 테이프를 제거하고 CAM위에 살며시 올려놓고 다시 테이프로 밀봉하여 배양시키는데, 이때 CAM의 직경이 3-5 mm인 embryo를 혈관신생 억제실험에 사용하였으며, CAM이 안 보이거나 가장자리에 있는 것은 실험에서 제외시켰다.

가미소암산은 시료 50 µg/egg 씩 사용하였으며, 대조군으로는 retinoic acid(10 µg/egg)를 실험에 사용하였다. 다음 이를 배양기에서 2일 동안 배양시킨 후 33-gauge 주사바늘을 사용하여 10%의 fat emulsion(Intralipid, 녹십자)을 CAM안에 주입한 후 해부현미경으로 혈관신생 효과를 관찰하고 CAM의 사진을 찍었다.

이 실험은 각 군당 20개씩 총 3번 정도

실시하였으며, 수정란 20개 이상의 결과가 70% 이상 억제효과가 있을 경우에 한해 혈관신생억제효과가 있는 것으로 인정하였다.

### 3) Cornea neovascularization

체중 약 200-250g의 수컷 Wistar 계 백서를 각막의 혈관신생유도 실험에 사용하였다. 백서 5마리의 복강내에 chloralhydrate를 400 mg/kg 농도 되게 주입하여 마취시킨 후 10-0 nylon을 사용하여 각막의 중앙부를 전층으로 한번 봉합한 후 각막의 염증을 예방하고자 teramycin을 하루에 한번씩 1주일간 점안하였다. 가미소암산의 각막혈관신생 억제효과를 규명하기 위하여, 실험군은 4 주 동안 하루에 한번씩 20 mg/kg의 가미소암산 시료를 경구 투여하였으며, negative 대조군에서는 동량의 물을, positive 대조군에서는 thalidomide (200 mg/kg)를 동일방법으로 경구 투여하였다.

또한 각막혈관신생 생성정도를 측정하기 위하여 동공을 확장시킨 백서를 ethyl ether로 흡입 마취시킨 후 수술 현미경으로 관찰하고 부착된 카메라로 촬영하였으며, 촬영된 소견으로 각막내에 생성된 혈관의 길이를 각각 점수화하였으며, 혈관의 길이는 각막 윤부에서부터 새로이 생성된 혈관의 끝까지 재어 측정하였다.

### 4) MTS assay

가미소암산의 세포 독성 효과와 증식능력의 판별을 위한 처리 농도를 알아보기 위하여 MTS([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium]) assay를 실시하였

다. 96 well plate(NUNC)의 각 well에 HT1080 세포를  $5 \times 10^2$  개 씩 되도록 분주한 후 배양하였다. 또한 실험의 결과의 정확성을 확보하기 위하여 이미 암세포의 분화를 억제하는 것으로 알려진 VP-16(Sigma Pharmaceuticals, St Louis, MO)을 비교하여 관찰하였다.

간기하면 HT1080 세포의 배양 24 시간 후에 가미소암산과 VP-16의 각각의 농도를 포함한 새 배양액으로 교체하고 일정시간동안 배양한 다음 PBS로 남은 배양액을 씻고 20 $\mu$ g의 MTS 처리하였다. 다시 배양기에서 3시간동안 배양한 후 ELISA plate reader(A490)를 사용하여 흡광도를 측정하여 세포독성 효과를 관찰하였다.

MTS용액은 promega의 Cell Titer96R AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit을 사용하고 한번 실험에 5그룹씩 반복되게 세 번 실험을 실시하였으며 남은 세포수가 배양액만 넣은 대조군의 반이 되게 하는 농도 (IC50 : 50% inhibitory concentration)를 계산하였다.

VP-16의 경우 디메틸 황화수소 (dimethyl sulfoxide)에 30 mg/ml 농도로, 가미소암산은 0.15mg/ml 농도로 삼차 증류수에 녹인 다음 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하여 사용하였다.

### 5) RT-PCR을 응용한 혈관증식 유전자 발현 실험

HT1080 세포를 6 well plate를 활용하여 각각  $10^5$  개 씩 분주한 후 10% fetal bovine serum과 100 units/ml 페니실린, 100 ug/ml 스트렙토마이신을 첨가한 MEM 배양액에서 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소를 유지하며 배양하였다. 세포가 well 바닥의

약 반정도 잤을 때, 대개 배양 후 24 시간 후로 이때 IC<sub>50</sub>의 농도의 가미소암산과 VP-16을 포함한 새 배양액으로 바꿔주고 2 시간그룹과 24 시간그룹으로 나누어 배양하였으며, 가미소암산의 HT1080 세포 증식 억제 효과를 형태학적으로 관찰하였다.

아울러 혈관증식 관련 유전자 발현을 알아보기 위하여 먼저 플레이트를 얼음 위에 놓고 차가운 PBS로 남은 배양액을 두 번 씻어 준 후 TRIzol Reagent (Molecular Research Center, Inc, USA)를 넣고 호일로 싸서 4°C에 보관하였다. 24시간 그룹 또한 모두 TRIzol Reagent가 처리되었을 때 4°C에 보관되어 있던 2시간 배양된 그룹과 함께 각각의 RNA를 취득하였다. 그 후 invitrogen의 Super Script™ First-Strand Synthesis System을 이용하여 역 전사반응을 수행하였다. 42°C에서 50분 동안 처리한 후 70°C에서 15분 동안 효소들을 불활성 시켰으며, 역전사가 끝난 뒤 RNase H를 37°C에서 20분 동안 처리하여 RNA를 제거하였다.

PCR은 기산바이오의 PCR Reagent Premix를 이용해서 실시하였다. 94°C에서 40초, 55°C에서 40초, 72°C에서 40초로 30회 반복 복제한 뒤 72°C에서 5분 동안 확장시킨 뒤 1% agarous gel에 전기영동을 실시하였으며, PCR을 수행하기 위한 각각 primer는 아래와 같다.

(1) VEGF

sense, 5' -GTGGACATCTCCAGGAGTA-3'  
anti-sense, 5' -TCIGCATTACATTTGTGT-3'

(2) TGF-β

sense, 5' -GCAAAGATAACACACTGCAA-3'

anti-sense, 5' -GAAGTCAATGTAGAGCTGCC-3'  
(3) bFGF

sense, 5' -GGCTTCTAAATGTGTTACGG-3'  
anti-sense, 5' -TTATACTGCCCAGTTCGTTT-3'  
(4) IMUP1

sense, 5' -CCCTCGAGCTATGGAGTTCGACCTGGG-3'  
antisens, 5' -CCGAATTCTCAGTGGGGAGCCTCC-3'  
(5) β-actin

sense, 5' -CTGAAGGCAAATGAACCTAC-3'  
antisense, 5' -CAACTTTGACTCTGAAAGGG-3'

### Ⅲ. 실험 성적

#### 1. CAM assay에 의한 혈관 형성 억제 효과

가미소암산의 혈관신생 억제 효과를 규명하기 위하여 수정란을 활용한 CAM assay 실험을 실시하였다. 아무 것도 처리하지 않은 coverslip만을 올려 놓은 대조군의 경우 일반적인 branching pattern의 혈관형태를 나타내고 어떠한 특이적인 혈관 분포에 대한 변화를 관찰할 수 없었다. 이것으로 보아 실험에 활용된 coverslip 자체의 무게는 혈관신생 형성에 별다른 영향을 끼치지 않는다는 것을 알 수 있었다.

positive 대조군으로 사용된 retinoic acid 처리군의 경우 48시간이 경과되었을 때 혈관신생이 현저하게 감소된 것을 알 수 있었으며, 가미소암산 건조추출물 50 μg/egg를 처리한 경우 retinoic acid 처리군과 유사한 혈관신생 억제 효과가 관찰되었다(Fig. 1).

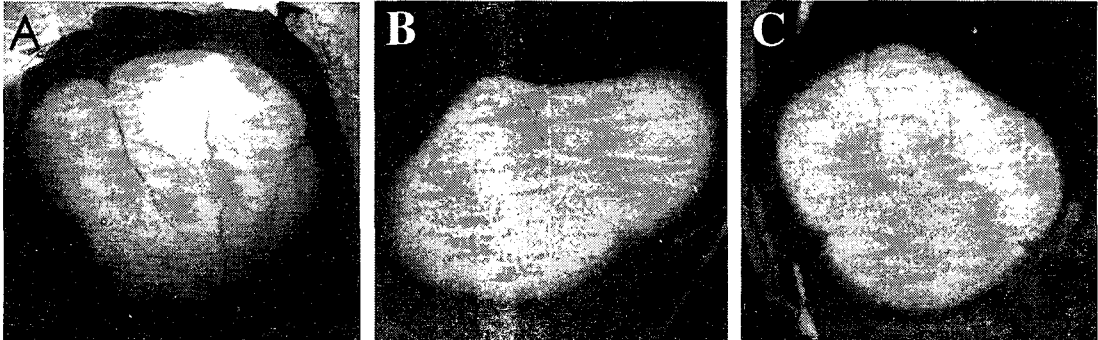


Fig. 1. Effects of GSS(*Gamisoamsan*) on embryonic angiogenesis in CAM 2 days after sample implantation. Fat emulsion (10%) was injected into chorioallantois to make clearly the vascular network, and the representative CAMs were photographed. Control CAMs treated with empty coverslips show no disturbance of angiogenesis (A). CAMs implanted with coverslips loaded with retinoic acid (10 mg/ml, B), GSS (50  $\mu$ g /ml, C).

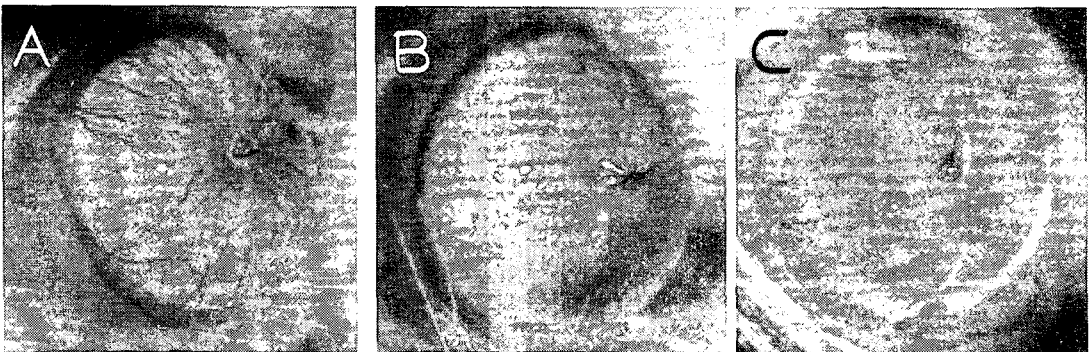


Fig. 2. Inhibitory effects of GSS on the neovascularization of rat cornea. Sprague-Dawley rat corneas were sutured with 10-0 nylon to produce corneal neovascularization, and animals were orally treated with herbal extracts (20 mg/kg body weight/day) or thalidomide (200 mg/kg body weight/day) for 4 weeks, and slitlamp photographs of cornea were taken. Figures are showing an intensive corneal neovascular response by suture (A) and a marked inhibition of neovascularization by GSS (B), Thalidomide (C).

## 2. 각막혈관 신생억제 효과

가미소암산의 항혈관신생 효과를 규명하기 위하여 봉합으로 유도된 백서 각막 모델을 이용하여 4주 동안 각막의 혈관신생

생성정도를 관찰하였다.

동량의 물을 투여한 대조군의 경우 봉합 후 2~3일째 부터 각막에 많은 혈관들이 뻗어 나오는 것을 관찰할 수 있었으며, 각

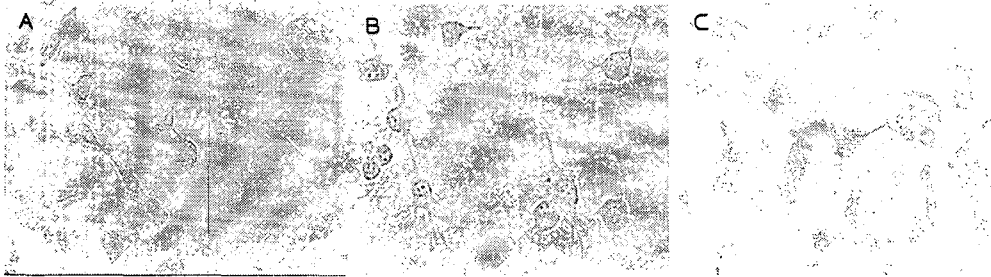


Fig. 3. HT1080 treated anti-cancer drugs for 2h. The HT1080 cells were inoculated at a density of  $10^5$  cells in 6-well plates and cultured in MEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100units/ml penicillin. The cells reached 50% confluence, (normally after 24h) and were then changed medium to the new medium with the (B) 2.18mg/ml of Soamsan, and (C) 0.35mg/ml of VP-16 and incubated for 2h, respectively. (A) panel is control culture.

막 봉합 후 5~6일 이내에 봉합에 의한 각막기능 손상부위까지 혈관이 뺏어 나가는 것을 볼 수 있었다. 그러나 가미소암산을 일일 1회씩 20 mg/kg씩 경구 투여한 백서의 각막에서는 혈관신생이 대조군에 비하여 확연히 억제됨을 알 수 있었다. 아울러 이미 혈관신생 억제제로 효능을 인정받고 있는 thalidomide를 투여한 positive 대조군과 비교할 경우 큰 차이를 나타내지 않아 가미소암산의 혈관신생 억제효과를 인정할 수 있었다(Fig. 2).

### 3. HT1080세포에서의 세포 독성과 증식 억제 효과

가미소암산의 HT1080세포에 대한 세포 독성효과와 증식억제 효과를 기존의 항암제와의 비교하기 위하여 VP-16 항암제를 이용하여 시료 처리 후 24시간 후에 MTS assay를 실시하였다. 그 결과, 가미소암산을 처리한 실험군의  $IC_{50}$ 은 2.18 mg/ml으

로 나타났으며, 항암제 VP-16의 경우  $IC_{50}$ 은 0.35 mg/ml인 것으로 나타났다.

아울러 HT1080세포에 대한 가미소암산의 세포 증식 억제효과를 관찰하기 위하여 각각의  $IC_{50}$  용량인 가미소암산 2.18 mg/ml 과 항암제인 VP-16 0.35 mg/ml을 각각 처리하여 배양 2시간 후와 24시간 후에 현미경으로 형태학적인 관찰을 시도하였다. 그 결과, 각각의 시료 처리 후 배양 2시간 후에는 대조군과 비교하여 가미소암산과 VP-16는 HT1080의 증식을 억제하는 효과를 가지고 있었으며, 가미소암산이 더욱 증식을 억제하는 효과가 있음을 나타내었다(Fig. 3). 또한 배양 24시간 후에도 2시간 후에 관찰된 결과와 마찬가지로 대조군과 비교하여 가미소암산과 VP-16는 HT1080의 증식을 억제하는 효과를 가지고 있었으며, 가미소암산이 더욱 증식을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).



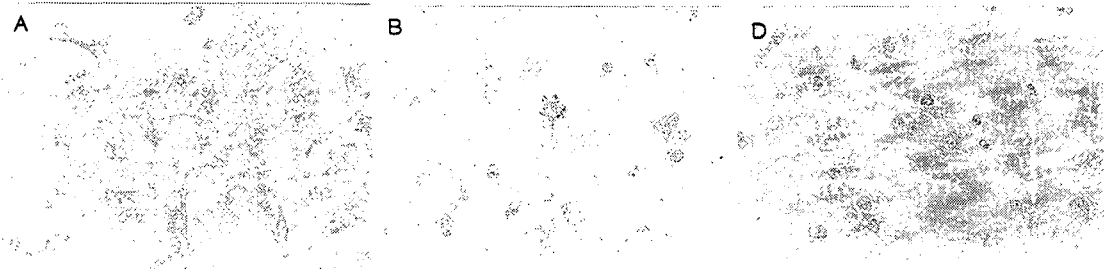


Fig. 4. HT1080 treated anti-cancer drugs for 24h. (A) panel is control culture. (B) 2.18mg/ml of Soamsan, and (C) 0.35mg/ml of VP-16 were treated and incubated for 24h, respectively.

#### 4. 혈관증식 관련 유전자 발현 억제 효과

VEGF(Vascular endothelial growth factor)는 종양세포 뿐만 아니라 정상세포의 상피계세포 등 각종 세포에서 발현하는데, VEGF는 몇몇의 세포종에서 낮은 효소의 조건하에서 유도되는 것으로 알려져 있으며<sup>11-13)</sup>, TGF- $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ )는 정상외 세포에서 증식을 촉진시키는 인자로서 발견되어 현재 세포의 증식억제, 분화의 제어, 세포의 접착, 혈관신생의 제어, 면역억제 등의 다양한 작용을 가지는 사이토카인으로 알려져 있다<sup>17-19)</sup>. 또한 FGF(Fibroblast growth factor)의 경우 대뇌와 뇌하수체엽체에 존재하는 섬유아세포의 DNA합성과 증식을 촉진시키는 물질로 분리되었으며, 특히 bFGF(Basic fibroblast growth factor)는 강력한 혈관신생의 작용을 가지고 있다고 알려져 있으며<sup>14-16)</sup>, IMUP-1(Immortalization upregulated protein 1)은 HT1080세포에서 발견되었으며, 각종 암세포와 조직에서 특이적으로 발현 상승하는 것으로 알려져 있다<sup>23)</sup>. 이에 가미소암산과 기존의 항암제인 VP-16에 의한 혈관신생에 관여하는 각종 증식인자와 암세포에서 특이적으로 발현하

는 유전자의 발현 변화를 알아보기 위하여 HT1080세포를 이용하여 RT-PCR로 확인하였다.

그 결과 가미소암산의 경우 배양 2시간 후 VEGF, TGF- $\beta$ , bFGF, IMUP-1의 발현을 억제시키는 것으로 나타났으며, 기존의 항암제인 VP-16에 비교하면 가미소암산이 이러한 유전자의 발현을 더 강하게 억제시키는 것을 알 수 있었다. 특히 배양 24시간 후의 관련유전자의 발현 양상은 가미소암산의 경우 현저하게 VEGF, TGF- $\beta$ , bFGF, IMUP-1의 발현을 억제시키는 것으로 나타났으며, VP-16에 비하여 가미소암산이 더욱 억제시키는 것으로 관찰되었다(Fig. 5).

## VI. 고 찰

암이란 정상세포가 여러 가지 자극으로 인하여 유전적인 형질전환이 이루어져 세포의 형태학·생물학·화학·물리학·면역학적 행동이 변하고, 이것이 유전적으로 무절제하게 증식함으로써 형성된 변형세포의 집단을 말하는 것으로, 여러 가지 요인

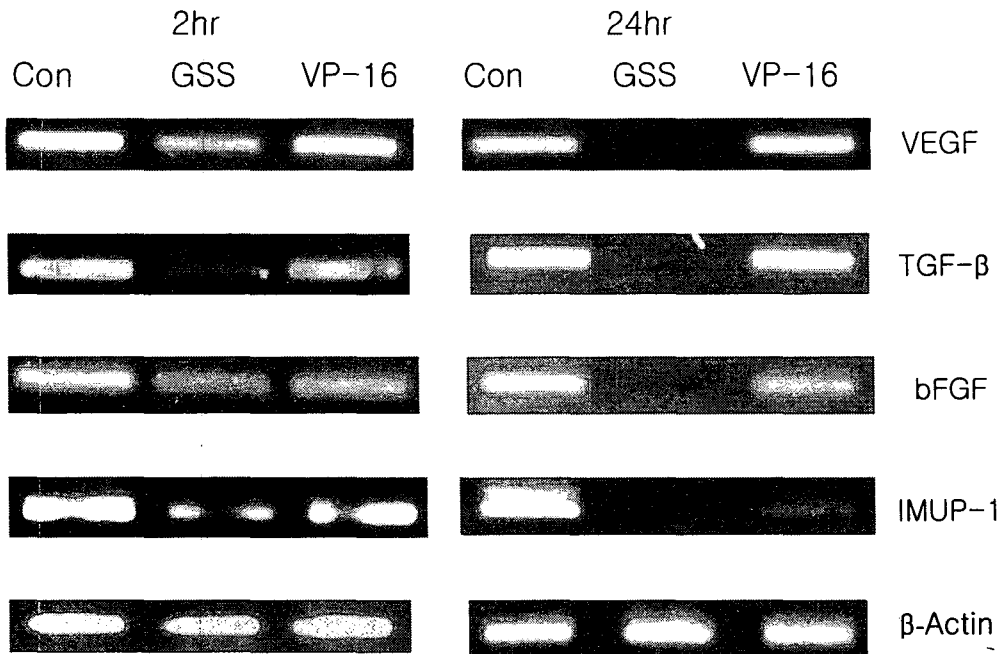


Fig. 5. RT-PCR about VEGF, TGF- $\beta$ , bFGF, and IMUP-1. RT-PCR about  $\beta$ -actin was done for control. The cells reached 50% confluence, (normally after 24h) and were then changed medium to the new medium with the IC<sub>50</sub> concentrations of VP-16, Soamsan and incubated for 2h or 24h, respectively. The cells were rinsed quickly in ice-cold PBS twice and RNA was isolated by using TRIzol Reagent (Molecular Research Center, Inc, USA) according to the manufacturers instructions. The first strand cDNA was synthesized using the Super Script<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR (invitrogen). PCR was performed using the PCR Reagent premix (kisan, Korea) under following PCR condition: 4 minutes at 94°C, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 40 seconds, annealing at 55°C for 40 seconds, and extension at 72°C for 40 seconds. A final extension step was followed at 72°C for 5 minutes and then run on 1% agarose gel (Gibco BRL). VEGF, TGF- $\beta$ , bFGF, and IMUP-1 cDNAs are reduced by Soamsan and VP-16. This results were represented by % when normalized to mRNA levels of actin. GSS ; Gamisoamsan

으로 인하여 세포가 정상 분화를 하지 못하고 조직의 자율적 또는 독립적으로 과잉 성장하거나 미분화하여 형성된 신생물을 말하며 주위의 정상조직들을 침범하고 파괴하여 인간의 건강과 생명에 위협을 주는 병증이다<sup>1,24)</sup>.

암의 가장 중요한 생물학적 특성의 하나는 침습과 전이(Invasion & Metastasis) 현상으로 종양세포가 원발부위에서 다른 부위로 이동하여 새로운 환경에서 적응, 증식하는 것으로, 암조직과 같이 세포증식이 무한적으로 일어나는 경우 정상세포와 마찬가지로 암세포가 성장하고 확장하기 위하여 필수적으로 새로운 혈관이 신생되어야 하므로 암의 전이 억제를 위한 방편으로 근래 혈관형성억제제에 대한 관심은 많이 고조되고 있다.

이러한 혈관신생의 유발은 미세조직의 저산소증(hypoxia)과 밀접한 관련이 있음이 밝혀졌으며, 저산소증에 의해 세포내 산소분압을 유지하기 위한 다양한 세포반응들은 호흡증가, 혈관확장, 적혈구 생성증가, 그리고 gluconeogenesis의 감소, ATP 생성 반응 감소등의 현상이 나타나게 되며 이러한 저산소증을 체내에서 가장 효과적으로 극복할 수 있는 방법이 혈관신생이다. 특히, 암조직과 같이 세포증식이 무한적으로 일어나는 경우 공간적으로 세포의 수가 증가되어 암조직 내부에 존재하는 세포에 산소가 전달되기 위해서는 혈관신생이 반드시 일어나서 산소를 공급해줘야 한다. 즉, 간암을 비롯한 초기 고형암의 성장은 암세포 자신이 분비하는 자가 성장인자에 의존하며 1-2mm 이상의 크기로 성장한 암조직 내부는 저산소 상태에 이르게 된다. 이러한 상태에서 세포들의 대사과정

을 바꾸거나, 저산소증에 대한 저항성을 획득하지 못한 많은 암세포들은 괴사하거나 세포사멸(apoptosis)로 소멸되기도 한다. 이러한 과정에서 저산소증을 극복하기 위하여 암세포들은 혈관신생 인자를 분비하여 주변의 혈관세포로부터 새로운 혈관을 유발시키는 것으로 추정되고 있다.

혈관신생(angiogenesis)은 암세포의 성장이나 전이에서 관찰되는 특징적 세포반응<sup>25)</sup>으로 여겨지는 바, 혈관신생의 측면에서 볼 때 종양의 증식과 전이는 여러 가지 성장인자(growth factor)의 분비 증가와 밀접한 관련이 있는 것으로도 알려져 있으며, 이들 중에서도 가장 중요한 성장 조절물질로 알려져 있는 것이 vascular endothelial growth factor(VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF)이다. VEGF의 발현은 다양한 종류의 고형암에서 증가하고 혈관신생을 증가시킴으로써 종양의 성장을 촉진하는 것으로 증명<sup>11-13)</sup>되었으며, bFGF의 전신 혹은 국소 주입(infusion)은 종양세포의 혈류량, 혈관의 밀도와 길이 그리고 혈관 형성을 증가시키는 것으로 보고<sup>14-16)</sup>되었다.

또한 암세포의 전이와 혈관신생에 대한 transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )의 세포병리학적 역할<sup>17-19)</sup>도 잘 알려져 있으며, 혈관신생 억제제로 현재까지 보고된 물질들로는 스테로이드, 항생제, 헤파린과 비스테로이드성 소염제, 항염제, collagenase inhibitor등이 있으며 platelet factor IV, 방사선, 레이저 광응고술을 이용하여 혈전을 형성시켜 혈관을 퇴화시키는 광혈전술, retinoic acid, thalidomide 등이 있다<sup>20,21)</sup>.

가미소암산은 기허(氣虛)·기체혈어(氣滯血瘀)·사독치성(邪毒熾盛)·담음적취(痰飲

積聚)등의 기전에 의하여 암이 발생된다는 한의학적인 이론에 입각하여 보기(補氣)·활혈(活血)·해독(解毒)·연견산결(軟堅散結)등을 목적으로 구성된 처방으로 활혈화어법을 응용한 부정거사법에 상응하는 처방인 『동의치료경험집성』<sup>22)</sup>의 소암산을 기본방으로 황기·대황·현호색·목단피·천궁이 가미된 처방이다. 처방 내용을 살펴보면 人蔘·白朮은 補氣藥物로 특히 中氣가 虛한 것을 補하고, 當歸는 補血·活血의 功效가 있어 血液循環을 촉진하며, 三稜은 破血祛瘀의 작용으로 當歸와 함께 血瘀로 인한 혈액장애를 개선시킨다. 또한 昆布, 海藻는 다함께 消痰軟堅하는 작용이 있어 腫塊를 消失시키고 軟化시키는 效能이 있으며, 白蒺藜는 性味가 辛散·苦泄한 약물로 肝氣의 鬱結을 疏散시키는 작용이 있어 氣를 疏通케 하여 瘀血을 공축하는 작용 뿐 만 아니라 祛風明目·祛風止痒하는 작용도 있다. 半枝蓮과 白花蛇舌草의 경우 清熱解毒藥物로 清熱解毒·散瘀止血·利水消腫 및 각종 암에 효과가 있는 것으로 보고되었으며, 특히 소화기성 암에 유효한 것으로 보고되고 있다. 해바라기 줄기[向日葵莖髓]는 血淋·尿路結石·小便不利에 효과가 있어, 민간에서는 해바라기 줄기속을 물에 달여서 찻물 대신 常服하여 胃癌을 치료하였다는 보고가 있다<sup>7)</sup>.

여기에 황기를 가미한 것은 승제고표(升提固表)의 효능이 있는 황기가 자양강장(滋養強壯)의 효과가 있는 인삼, 보비(補脾)작용이 있는 백출과 배합되어 건비익기(健脾益氣)·익기고표(益氣固表)·보기건비(補氣健脾)의 작용을 도와 면역력을 증강시킬 것으로 보았으며, 대황·현호색·목단피·천궁의 활혈화어 약물을 가미한 것

은 사열(邪熱)과 어혈을 제거하는 대황, 활혈하여 지통작용을 하는 현호색, 활혈하여 어혈을 제거하는 목단피, 활혈행기(活行氣)하는 천궁이 배합하여 활혈(活血)·소종(消腫)·지통(止痛)의 효과를 얻어 암세포의 혈관형성을 억제하여 암의 전이 현상을 억제할 수 있을 것으로 보았다. 또한 곤포와 해조를 배합시킨 것은 소담연견(消痰軟堅)의 작용을 증가시켜 연견산결(軟堅散結)케 함으로 세포분화를 증진하여 암세포의 성장을 억제할 수 있다고 보고 입방하였다.

이에 암의 중요한 생물학적 특성인 침습과 전이에 대한 가미소암산의 효과를 알아보기 위하여 혈관신생 및 성장인자 발현의 억제가 나타나는지 규명하고 암세포의 이식에 의한 가미소암산의 종양세포 증식억제 효과를 관찰하였다.

혈관신생의 촉진물질이나 억제물질을 탐색하는 동물실험의 경우 일반적으로 수정란을 이용하는 CAM(chorioallantoic membrane) assay와 투명한 각막에 혈관신생을 유도하고 억제효과를 관찰하는 방법이 많이 시도되고 있다. 전자의 방법은 발생 과정 중 자연스러운 혈관의 생성과정을 관찰하고 촉진과 억제물질의 효과를 조사하는 방법으로 이용되고 있으며, 후자의 방법은 투명한 조직에 병적으로 혈관신생을 유도하여 촉진과 억제를 관찰하는 방법으로 이용되고 있다.

본 연구에서는 이 두가지 방법을 이용하여 가미소암산의 혈관신생 억제 효과를 관찰한 결과 가미소암산은 CAM assay와 각막실험에 적용한 결과 혈관신생 억제가 현저히 나타난다는 사실을 확인하였다. 가미소암산을 ml당 500 $\mu$ g으로 처리하였을때

Fig. 1에서 보는 바와 같이 CAM assay에서의 혈관신생의 억제는 뚜렷하게 나타나는 것을 확인하였는데, CAM에서의 혈관신생은 발생단계에서 자연적으로 생성되기 때문에 그 의미는 매우 크다고 볼 수 있다. 또한 랫트의 각막에서의 혈관신생 억제효과도 CAM assay에서의 억제효과 못지않게 대조군과 뚜렷한 차이를 관찰할 수 있었다. 인위적으로 혈관신생을 유도하기 위하여 각막중양부위에 봉합수술을 실시하고 나면 수술 4주 후 각막의 혈관신생 생성은 최고조에 달하는데, 가미소암산을 200mg/kg 씩 1일 1회씩 경구 투여한 결과 각막에서의 혈관신생은 상당히 억제되었음을 알 수 있었다(Fig. 2 & 3). 이렇게 가미소암산이 발생단계에서의 혈관신생이든 인위적인 혈관신생이든 혈관신생을 억제하는 것이 뚜렷하게 나타난다는 것은 암세포의 전이와 증식을 억제할 수 있는 효능이 가미소암산에 있다는 것을 암시한다고 하겠다.

혈관신생의 발생기전은 아직 정확히 밝혀지지 않고 있으나, 생리적 또는 종양 등의 병적인 과정에서 여러 가지 혈관형성유발인자(angiogenesis factors)유리, 세포외기질(extracellular matrix)의 변화와 내피세포와의 상호작용, 혈관내피세포의 이동, 증식 및 분화 등의 과정을 거쳐 이루어지며, 각 과정에 여러 가지 혈관신생 관여인들이 복합적으로 작용하게 된다.

특히 혈관신생의 측면에서 종양의 증식과 전이는 여러 가지 성장인자(growth factor)의 분비 증가와 밀접한 관련이 있는 것으로도 알려져 있으며, 이들 중에서도 가장 중요한 성장 조절물질로 알려져 있는 것이 vascular endothelial growth

factor(VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF)이다. VEGF의 발현은 다양한 종류의 고형암에서 증가하고 혈관신생을 증가시킴으로써 종양의 성장을 촉진하는 것으로 증명되었으며, bFGF의 경우 종양세포의 혈류량, 혈관의 밀도와 길이 그리고 혈관 형성을 증가시키는 것으로 강력한 혈관신생의 작용을 가지는 의약품으로의 응용이 검토되고 있다<sup>14-16)</sup>.

또한 암세포의 전이와 혈관신생에 대한 transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )의 세포병리학적 역할도 잘 알려져 있으며, IMUP-1(Immortalization-upregulated protein 1)경우 HT1080세포에서 발견되어, 각종 암세포와 조직에서 특이적으로 발현이 상승하는 것으로 알려져 있다<sup>23)</sup>.

이와 같이 성장인자의 발현이 혈관신생과 암세포의 성장에 미치는 영향에 대한 세포생화학적 의의는 많은 연구자에 의해서 증명되어 가미소암산이 각종 증식인자의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다.

먼저 가미소암산의 HT1080세포에 대한 세포 독성효과를 관찰한 결과 가미소암산을 처리한 실험군의 IC<sub>50</sub>은 2.18 mg/ml로 나타났으며, 기존의 항암제로 활용되고 있는 VP-16의 경우 IC<sub>50</sub>은 0.35 mg/ml인 것으로 나타났다. 또한 세포독성에 대한 형태학적인 변화를 관찰한 결과 가미소암산과 VP-16는 HT1080의 증식을 억제하는 효과를 가지고 있었으며, 가미소암산이 더욱 증식을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 3, 4). 이에 가미소암산과 기존의 항암제인 VP-16에 의한 혈관신생에 관여하는 각종 증식인자의 발현 변화를 알아보기 위하여 HT1080세포를 이용하여 RT-PCR로 확인한 결과 Fig. 5에서 보는

바와 같이 가미소암산은 배양 2시간 후와 배양24시간 후의 관련유전자들인 VEGF, TGF- $\beta$ , bFGF, IMUP-1의 발현을 억제시키는 것으로 나타났으며, 기존의 항암제인 VP-16에 비교하면 가미소암산이 이러한 유전자의 발현을 더 강하게 억제시키는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 가미소암산에 의한 혈관신생 억제는 혈관증식인자의 발현을 억제시킴으로써 이루어지는 것으로 추정되며, 기존의 항암제보다 혈관신생의 억제효과가 더욱 높은 것으로 사료된다.

또한 HT1080 암세포에서 특이적으로 발현 상승하는 IMUP-1의 유전자를 이용하여 확인한 결과, 가미소암산이 IMUP-1의 유전자 발현도 억제시키는 것으로 확인되어 가미소암산의 효과는 핵에서 존재하는 IMUP-1의 유전자 발현에도 영향을 미치는 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과들을 종합하여 보면 가미소암산은 CAM assay와 각막실험에 서 혈관신생 억제가 현저히 나타난다는 사실이 확인되었고, 혈관신생에 관여하는 각종 증식인자인 VEGF, TGF- $\beta$ , bFGF, IMUP-1의 발현을 억제시키는 것으로 나타나, 가미소암산은 암의 전이에 억제작용을 할 수 있을 것으로 생각되어지나 이러한 과정이 어떠한 기전을 통하여 일어나는지 계속 추구되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

한의학의 암의 치료법 중 부정거사법에 상응하는 처방인 가미소암산의 항혈관신생 기전을 통한 항암효과를 실험적으로 규명

하기 위하여 Chicken chorioallantoic membrane(CAM) assay, Corneal neovascularization assay등 혈관신생에 미치는 효과와 혈관증식관련인자인 Vascular endothelial growth factor (VEGF), Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), basic fibroblast growth factor (bFGF) 및 Immortalization-upregulated protein 1(IMUP-1) 유전자 발현 양상을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

1. 가미소암산은 CAM assay에서 발생단계의 혈관신생을 상당히 억제시켰다.
2. 가미소암산은 인위적으로 유도된 각막 모델 혈관신생에서도 뚜렷한 혈관신생 억제효과를 나타내었다.
3. 가미소암산의 HT1080세포에 대한 IC<sub>50</sub> 용량은 2.18 mg/ml 이었고, 항암제인 VP-16의 IC<sub>50</sub> 용량은 0.35 mg/ml 이었다.
4. 가미소암산과 VP-16는 HT1080의 증식을 억제하는 효과를 가지고 있었으며, 가미소암산이 더욱 증식을 억제하는 효과가 있었다.
5. 가미소암산은 VEGF, TGF- $\beta$ , bFGF, IMUP-1의 발현을 억제시켰으며, 기존의 항암제인 VP-16에 비하여 우수한 효과를 나타내었다.

이상의 결과 가미소암산은 발생단계의 혈관신생이나 인위적으로 유도된 혈관신생에 대하여 억제 효과가 있었으며, 혈관신생관련유전자 발현에도 강력한 억제 효과를 나타내어 암의 전이 억제제로 개발될 수 있을 것으로 생각되며, 추후 독성실험 등 다양한 방법의 연구가 필요할 것으로 사료된다.