

抗血管 1호의 抗戰移에 관한 연구

손창규 · 조종관 · 이승호*

대전대학교 한의과대학 내과학교실

Study on Anitmetastatic Effects of Antivascular-first

Chang Kyu Son, Chong Kwan Cho, Seung ho Lee*

Department of Internal Medicine, college of Oriental Medicine, Daejeon University

To evaluate the antimetastatic effect of Antivascular-first(AntiV-F), we investigated cytotoxic effect on B16-F10 and HMCB, gene expression of MMP-9 and nm23-H1, and survival. After treating with AntiV-F, AntiV-F promoted cytotoxic effect on B16-F10 and HMCB as its density, compared with Control. AntiV-F inhibited gene expression of MMP-9 in the L+14 and HMCB cell line compared with Control. On the other hand AntiV-F increases gene expression of nm23-H1 and survival about 30% compared with Control. These results suggest that AntiV-F has effects on anti-metastasis can be used for treatment of cancer patients and preventing recurrence.

Key words : antimetastatic effect, Antivascular-first(AntiV-F), MMP-9 and nm23-H1.

서 론

암은 현재 우리 나라뿐만 아니라 전 세계를 압도하는 가장 심각한 질병으로 사망 질병 원인 수위를 차지하며 점차 그 점유율이 빠르게 증가하고 있고 그에 따른 사회적, 경제적 손실 또한 막대하다. 그러나 그 동안의 엄청난 투자나 노력에도 불구하고 5년 생존율을 비롯한 가시적인 치료효과는 크게 달라지지 않았을 뿐만 아니라 암으로부터의 해방은 매우 요원한 상태이다. 현재 보편적으로 이루어지고 있는 암의 치료법은 수술과 방사선요법, 화학요법, 면역요법 등이 있으나 이 대부분이 매우 제한적 관해율과 심각한 부작용등으로 인해 새로운 癌 치료의 필요성이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 따라서 최근의 癌 치료의 새로운 연구 경향은 세포독성이 강한 물질을 찾는 것에서 탈피하여 기존 치료법의 부작용을 감소시킬 수 있는 방법, 면역능을 증가시키거나 암의 전이를 방지하는 방법, 신생혈관의 생성을 억제하거나 암세포의 자살을 유도하는 방법 등이 연구되고 있다.

한의학에서는 암 발생의 病因·病機를 外感六淫, 七情內傷, 飲食不節, 過勞 및 邪毒 등의 유발요인에 의하여 개체의 장부기능과 기혈이 실조됨으로 일차적으로는 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒溫結, 正氣虛弱, 經絡瘀阻등의 병리변화가 나타나고, 이어서 이런 변화가 단독 혹은 상호 錯雜되면서 氣機가 불통되고 오래되면 發癌

하는 것으로 인식하여 왔으며, 또한 치료에 있어서도 암을 무조건적 박멸의 대상으로 보아왔다기보다 인체와 병사간의 불균형에 따른 결과물로서 깨어진 음양기혈의 균형을 회복하고 신체의 면역력과 환경을 개선함으로써 스스로 암의 발생과 성장 및 전이가 억제되도록 하는 “養正則積自除”의 원칙을 가장 중시하여 왔다. 이에 저자는 암의 최대 특징인 왕성한 성장, 분열과 전이에 필수적인 새로운 영양혈관의 형성과 전이를 억제할 목적으로 하여 임상한 抗血管 1號方의 효능을 입증하기 위하여 암전이 유전자인 MMP-9과 암전이 억제 유전자인 nm23-H1등의 유전자 발현에 대한 실험과 항혈관 억제실험인 in vitro neovascularization assay에서 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험 방법

1. 재료 및 동물

1) 약제

본 실험에 사용한 항혈관 1호의 처방구성은 대전대학교 부속한방병원 처방집에 준하였으며 사용한 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 분량은 Table 1과 같다.

2) 동물

실험동물은 한국 화학 연구소에서 구입한 자성 BALB/C와 C57BL/6 mouse 4주령을 구입하여, 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물사육실의 조건은 conventional system으로 22±2 ℃, 1일중 12시간은 200-300 Lux

* 교신저자 : 이승호, 대전시 중구 대흥동 22-5 대전대학교 한의과대학

E-mail : dongaam@hanmail.net, Tel : 042-229-6959

접수 : 2001/12/02 · 수정 : 2002/01/18 · 채택 : 2002/02/05

로 조명하고 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고품사료 (조단백질 22.1%이상, 조지방8.0%이하, 조섬유5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

Table 1. Prescription of Antivascular-first

韓藥名	生藥名	分量(g)
白花蛇舌草	Oldenlandiae Diffusae Herba	8
仙鶴草	Agrimonia pilosa ledeb	8
黃耆	Astragali Radix	6
人蔘	Ginseng R	6
白朮	Atradylodes rhizoma	6
白茯苓	Hoelen	6
甘草	Glycyrrhizae Radix	4
當歸	Angelicae gigantis Radix	4
川芎	Cnidii Rhizoma	4
丹蔘	Salviae Radix	4
雞血藤	Spatholobi Caulis	4
乳香	Olibanum(Mastix)	4
桃仁	Persicae Semen	4
蓬朮	Zedoariae Rhizoma	4
水蛭	Hirudo	4
蒲黃	Typhae Pollen	4
益母草	Leonuri Herba	4
赤芍藥	Paeoniae Radix	4
蘇木	Caesalainiae Lignum	4
牡丹皮	Moutan Cortex Radicis	4
Total amount		96g

3) 시약 및 기기

실험에 사용된 시약은 Mitogen으로서 RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS,USA), dμbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A, USA) Sigma사(USA) 제품을 사용하였으며, RNazolB (Tel-Test,Inc.) Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa(Japan)사 제품을, 역전사효소 (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 promega사 제품, 그리고 Agarose(FMC,USA)등을 사용하였고, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다. 사용된 기기는 cytometer(Becton Dickinson, USA), imager system(kodak,USA), microcentrifuge(한일과학), UV-Vis spectro- photometer(shimazue,Japan), Turbo ThemalcyclerTM (Bioneer Co., Korea), CO₂ incubator (rapco, USA), clean bench(KMC-14001, vision scientific Co.) rotary vaccum evaporator(Büchi 461), autoclave(Hirayama, Japan) 등을 사용하였다.

2 방법

1) 항혈관 1호 추출물 분리

항혈관 1호 288g (3척분량)에 각각 증류수 2000 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 항혈관 1호 추출물(77.7 g)을 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 항혈관 1호 검액 제조

항혈관 1호는 다양한 농도로 우태아결핍 RPMI1640 배양액에 녹여 사용하였고, 동물실험용 검액 제조는 1.55g/kg (1일1회)의 용량으로 경구투여하였다.

3. 세포독성 및 안전이 유전자발현 분석

1) in vitro 세포독성실험

세포독성방법은 SRB assay법¹⁾을 약간 변형하여 실험에 사용한다. L+14 normal cell line, B16-F10 melanoma cell (ATCC, CRL6322)과 HMCB(bowes melanoma,ATCC CRL-9607)은 37℃, 5% CO₂ incubator에서 자란것을 Trysin-EDTA용액으로 single cell이 되도록 떼어내고, 세포를 2.0 x 10⁴개의 세포를 96 well plate에 분주하고 Incubator (37℃, 5% CO₂)에서 48시간 배양한다. 항혈관 1호는 최종 농도가 각각 200μg/ml, 100μg/ml, 50μg/ml, 10μg/ml이 되도록 96 well에 분주 2시간 후에 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척한다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid)를 50μl를 가하고 1hr 동안 4℃에 방치한다. 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기중에서 건조한다. SRB(0.4%/1% acetic acid) 용액을 100μl/well로 가하고 RT에서 30분간 staining한다. 그리고 0.1% acetic acid solution으로 약 4-5회 세척한다음 공기중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100μl/well로 용해시킨다. 이 plate를 plate shaker(Lab-Line, USA)에서 3.5speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER (molecular devices,USA)에서 540nm에서 absorbance를 측정한다.

2) MMP-9 및 nm23-H1 유전자 발현에 대한 영향

(1) 세포배양 및 약물 처리

L+14 normal cell line과 HMCB(bowes melanoma, ATCC CRL-9607)은 37℃, 5% CO₂ incubator에서 자란것을 Trysin-EDTA용액으로 single cell이 되도록 떼어내고, 세포를 2.0 x 10⁴개의 세포를 24 well plate에 분주하고 Incubator (37℃, 5% CO₂)에서 48시간 배양한다. 항혈관 1호는 최종 농도가 각각 100 μg/ml, 10μg/ml이 되도록 24 well에 세포분주 2시간 후에 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척한다.

(2) RNA의 추출^{2,3)}

배양 종료 후 24 well plate의 상층액을 제거한 후 RNazolB (Tel-Test, Inc.)를 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라서 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μl의 증류수에 녹여 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)에 사용하였다.

(3) 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)^{4,5)}

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg에 해당하는 양을 75℃에서 10분 동안 denaturation시키고, 이 denatured total RNA 3 μg에 2.5 μl의 10 mM dNTPs mix, 1 μl의 random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl의 RNasin (20 U/μl), 1 μl의 100 mM DTT, 4.5 μl의 5 × RT buffer (250 mM Tris-Cl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 섞은 후, 1 μl의 M-MLV RT (200 U/μl)를 더하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl가 되도록 하였다. 이 20 μl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 spin down하여 37℃

항은 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 10분동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시키고 재빨리 얼음으로 옮겼다. 이렇게 합성이 완료된 first-strand cDNA는 polymerase chain reaction (PCR)에 사용되어졌다.

(4) cDNA의 PCR 증폭^{4,6-7)}

PCR은 water bath 방식의 Turbo Thermalcycler™ (Bioneer Co., Korea)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μl의 first-strand cDNA가 주형으로 사용되어졌으며, Table 1에서처럼 주형에 대한 primer는 B-actin, MMP-9, nm23-H1을 증폭하기 위하여 sense primer(10 pmole/μl)와 antisense primer(10 pmole/μl)를 혼합 후 1 μl씩 넣어주고, 여기에 3 μl의 2.5 mM dNTPs, 3 μl의 10 × PCR buffer (100 mM Tris-Cl, pH8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 μl의 Taq. polymerase (5U/μl)를 첨가한 뒤, 증류수로서 최종 부피가 30 μl가 되게하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은, predenaturation; 95℃, 5분을 한 다음, annealing; 57℃, 1분, elongation; 72℃, 1분, denaturation; 95℃, 1분을 30 cycles 한 뒤, postelongation을 72℃에서 3분 동안 해주었다. 각각의 PCR products는 20 μl 씩 1.2%의 agarose gel상에 loading하여 전기영동을 통해 분석되어졌다. Internal control로서 β-actin이 사용되어졌으며, 증폭되는 PCR product size는 β-actin(548bp), MMP-9(541bp) 그리고 nm23-H1(531bp)이다.

Table 2. Nucleotide sequences of cytokine primers⁹⁾

Gene	Primer	Sequence	Product(bp)
β-actin	hAct-S	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	548
	hAct-AS	CTCCTTAATGTACACGACGATTTTC	
nm23-H1	Sense	TTCCACCACTCGATGTCCAC	531
	Antisense	GAGTAGGCAGTCATTCTAG	
MMP-9	Sense	GGCTCACAGGTCTGTTTCGTT	541
	Antisense	TCGTGAACACTGCTGAAAGTG	

PCR product의 양은 Windows 1D main program (AAB, USA)을 이용하여 최고값 (height, H)으로 측정하였다

4. in vivo 항전이와 생명연장 효과

1) 항혈관 1호에 의한 암전이 억제효과

(1) B16-F10 암주 이식

B16-F10(ATCC, CRL-6322)을 C57BL/6 생쥐의 피하에 계대 배양하였고 실험전에 형성된 종양 부분을 분리하여 종양 1g에 10ml의 Cold D-PBS(Ca²⁺ & Mg²⁺-Free, Sigma)가 되게 조절한 후 100mesh (Sigma)로 종양 조직을 분쇄한 후 원심분리(1500 r.p.m., 5min.)하였다. 이 pellet에 collagenase (1700 U/mg, Type-XI Sigma)를 tumor 0.1g/ml을 처리하여 30분간 water bath(37℃)에서 배양시킨 후 원심분리(1300 r.p.m., 5min.)하였다. 상등액을 제거하고, 0.85% NH₄Cl을 넣어 잘 섞은 후 37℃ 배양기에서 5분간 방치하여 적혈구를 파괴시킨 후 원심분리하여 B16-F10을 분리하였다. B16-F10 암주를 2.0×10⁵ 세포로 조절한 후 미정맥에 이식하였다.

(2) 실험군의 분류

정상군(Normal)은 C57BL/6 생쥐 10마리를 1군으로 하여 항혈관 1호를 투여하지 않은 군이고, 대조군(Control)은 C57BL/6 생쥐 10마리를 1군으로 하여 B16-F10 암주 (2×10⁵세포)가 이식된

군이다. 실험군(항혈관 1호)은 C57BL/6 생쥐 10마리를 1군으로 하여 B16-F10 암주 (2×10⁵세포)를 이식하고 항혈관 1호를 14일간 경구 투여한 군으로 분류하였다.

(3) 항혈관 1호 경구 투여 및 생명연장율 측정

B16-F10 암주 (2×10⁵세포)를 이식하고 24시간 후에 항혈관 1호 (1.55g/kg)을 1일1회 14일간 경구투여 하였다. 생명연장율은 당일 생존여부를 관찰하여 평균생존일수 및 연명율을 구하였다.

MST (median survival time) : 생존일수중앙치

ILS (Increase in MST over control) : 연장율 = (T-C/C) × 100(%)

T : 처치군의 MTS, C : 대조군의 MTS

(4) Pulmonary Colonization Assay

B16-F10 암주 이식하고 24시간 후에 항혈관 1호를 경구투여하였다. 항혈관 1호 투여 14일 후에 lung colony 수를 관찰하였다. Pulmonary colonization assay는 폐장의 외부에 나타난 흑색의 colony 수를 현미경(40x, Nikon, Japan)으로 계수하였다.

(5) 병리조직검사

B16-F10 암주 이식하고 15일 후에 각 군에서 lung과 liver를 분리하여 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음, 포매한다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin염색을 한다.

2) in vitro neovascularization assay

인간태반의 제대정맥 내피 세포에서 (HUVEC)에서 기원한 혈관신생 내피세포인 ECV304 세포와 암 조직에 형성되는 모세혈관의 근간인 CD31+ 세포를 하여 분리하기 위하여 B16-F10 melanoma cell(2×10⁶cells)을 C57BL/6 생쥐의 피하에 14일간 계대배양한 후 형성된 종양부분을 분리하였다. Tumor에 collagenase (1700units /mg, Type-XI SIGMA)에 antibiotics를 넣은 용액을 340u/ml로 제조한다. Tumor 덩어리를 100mesh (SIGMA)에서 분쇄하여 pass시킨후 PBS로 약 2회 1300rpm에서 spin. Tumor에 1ml의 collagenase 용액을 처리한다. 37℃ 배양기에서 1시간 동안 배양한 후 PBS로 2회 수세한다. pellet에 RBC lysis solution 처리하고 2회 수세한 후 Anti-Mouse CD31 (PECAM-1)을 처리하여 ICE에서 1시간 배양한다. 배양후 MACS MS+/RS+ separation Columns에 서서히 통과시킨 후 PBS (0.5%BSA, 2mM EDTA)로 10분간 washing한다. Anti-Mouse IgG MicroBeads에 부착한 CD31+ 을 분리하여 실험에 사용하였다. 이들 세포들에 의한 혈관을 형성시키기 위해서 Schnaper등의 방법에 준하여 basement membrane인 Matrigel을 이용하여 신생혈관 형성을 유도한다. Ice bath상에서 96 well plate에 Matrigel을 50μl 씩 넣고 gel과 같은 상태로 되도록 37℃에서 30분에서 한시간 사이의 시간동안 incubation한다. Well당 2×10⁴ cells의 세포를 Matrigel이 덮인 96 well plate에 넣고, 항혈관 1호를 농도별로 곧바로 처리하고 18시간 후 Matrigel위에서 신생혈관 형성유무를 현미경을 사용하여 관찰하고 혈관형성 저해효과를 확인한다.

결 과

1. 항혈관 1호에 의한 세포독성 및 암전이 유전자 발현 분석

1) In vitro 세포독성 실험

항혈관 1호 3첩분량(288g)에서 추출물(77.7g)을 분리하여 동물세포에 세포독성을 검증하였다. L+14 normal cell line, B16-F10 cell line 그리고 HMCB를 96 well plate에 분주하고 항혈관 1호 농도를 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml 그리고 10µg/ml로 처리하여 48시간 후에 SRB 방법을 약간 변형하여 세포독성을 측정하였다. Table 3.에서 L+14세포주는 대조군에 비하여 세포독성이 없는 것으로 사료된다. 그러나 200µg/ml에서는 87.1±3.1로 23% 감소하였지만(p<0.01) 이는 항혈관 1호의 배양조건에 영향을 주어 나타난 세포독성이라 추측된다. 항혈관 1호는 B16-F10 세포주에서 대조군에 비하여 42.1%에서 9.8%까지의 유의성 있는 암세포 억제효과를 나타내었다(p<0.001). 즉 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml 그리고 10µg/ml에서 모두 유의한 감소를 보였다. HMCB 암세포주에서는 대조군에 비하여 54.5%에서 16.9%까지의 유의성 있는 암세포 억제효과를 나타내었다(p<0.001). 항혈관 1호는 정상세포에서는 세포독성을 나타내지 않고 B16-F10과 HMCB 암세포주에서 유의한 암세포 억제 효과를 나타내었다. 특히 B16-F10에서는 200µg/ml 처리군에서 42.1% 억제하였고, HMCB 세포주에서는 100µg/ml 37.3% 억제하였고, 200µg/ml에서는 54.5% 억제효과를 보여주었다(Table 3).

Table 3. Cytotoxic effect of Antivasular-first (AntiV-F) extract on L+14, B16-F10 melanoma cells and HMCB

Group	percent of control data		
	L+14	B16-F10	HMCB
Control	100±3.2	100±1.3	100±2.2a)
10µg/ml	98.3±3.2	90.2±2.7**	83.1±2.4***
50µg/ml	99.1±4.1	73.1±3.2***	76.3±3.0***
100µg/ml	94.2±3.5	70.3±3.3***	62.7±2.5***
200µg/ml	87.1±3.1**	57.9±1.9***	45.5±2.7***

a) : Mean ± standard error, Control : not treated, AntiV-F : 77.7g extracts isolation to 288g Antivasular-first, * : Statistically significant value compared with control data by T test. (**p<0.05, ***p<0.01, ****p<0.001)

2) MMP-9과 nm23-H1 유전자 발현 억제에 대한 영향

(1) MMP-9 유전자 발현 억제 효과

L+14 normal cell line과 HMCB 암세포주를 24 well plate에 분주하고 항혈관 1호 농도를 10µg/ml과 100µg/ml로 처리하여 48시간 후에 상층액을 제거하고 RT-PCR을 수행하였다. Matrix metalloproteinase는 암세포가 생체내에서 extracellular matrix protein으로 작용하여 invasion을 하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 전이 유발 효소이다. L+14 정상세포주에 항혈관 1호를 10µg/ml과 100µg/ml을 처리하여 MMP-9의 유전자 발현을 분석하였다. Fig. 1.의 중간 panel(L+14)에서 대조군 (line 1)의 Ht값이 73이고, 10µg/ml (line 4-5)이 81, 그리고 100µg/ml (line 2-3)이 83이다. 정상세포에서는 대조군과 항혈관 1호 처리군이 큰 차이가 없었다. L+14 세포주에서 항혈관 1호의 MMP-9 유전자 발현에 영향을 미치는 차이가 없었다. 상단 panel (HMCB)에서 대조군 (line 1)의 Ht값이 169이고, 100µg/ml (line 2-3)이 102, 그리고 10µg/ml (line 4-5)이 143이다. HMCB 암세포주에서는 대조군 (Ht: 169)과 항혈관 1호 10µg/ml 처리군 (Ht: 143)이 약간의 억제

효과가 있었지만 100µg/ml 처리군(Ht: 102)은 현저한 유전자 발현 억제효과가 있었다. 따라서 HMCB 암세포주에서 항혈관 1호가 MMP-9 유전자 발현을 억제하였다고 볼 수 있다.

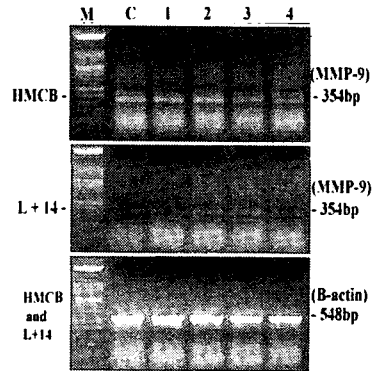


Fig. 1. Inhibition effect on MMP-9 gene expression in the L+14 and HMCB cell line. L+14 and HMCB cells are activated with RPMI1640 medium(lane 1), 100µg/ml AntiV-F(lane2-3) and 10µg/ml AntiV-F(lane4-5) for 48hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20µl reaction volume containing with 3µg total RNA and oligo d(T). And 3µl of resulting products were analyzed by PCR analysis. Synthesized β-actin cDNA product by RT-PCR was used in internal control. M : 100bp DNA ladder marker. Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods.

(2) nm23-H1 유전자 발현 증진 효과

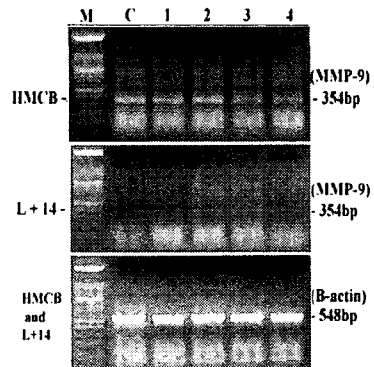


Fig. 2. Expressing effect on nm23-H1 gene expression in the L+14 and HMCB cell line. L+14 and HMCB cells are activated with RPMI1640 medium(laneC), 100µg/ml AntiV-F(lane1 and 2) and 10µg/ml AntiV-F (lane3 and 4) for 48hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20µl reaction volume containing with 3µg total RNA and oligo d(T). And 3µl of resulting products were analyzed by PCR analysis. Synthesized β-actin cDNA product by RT-PCR was used in internal control. M:100bp DNA ladder marker. Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods.

nm23-H1 유전자는 암전이 조절에 관여하는 항암전이 유전자로 알려져 있다. 정상세포에서 nm23-H1의 유전자 발현 증가는 세포의 증진과 분화에 관여한다. 그리고 nm23-H1 유전자 발현은 암 전이를 억제시키고, 낮은 nm23-H1 유전자 발현은 동물 암세포의 전이 증가를 나타낸다. L+14 정상 세포주에 항혈관 1호를 100µg/ml과 10µg/ml을 처리하여 nm23-H1의 유전자 발현을 분석하였다. Fig. 2.의 중간 panel(L+14)에서 대조군 (line 1)의 Ht값이 23이고, 100µg/ml (line 2-3)이 45, 그리고 10µg/ml (line 4-5)이 40이다. 정상세포에서는 대조군과 항혈관 1호 처리군이 nm23-H1 유전자 발현을 약간 증가시켰다. 즉 L+14 정상세포주

에서는 대조군(Ht; 23)과 항혈관 1호 100 μ g/ml처리군(Ht; 45)이 2.0배의 유전자 발현을 증가시켰고, 10 μ g/ml처리군(Ht; 40)은 약 1.7배의 유전자 발현을 증진시켰다. 상단 panel(HMCB)에서 HMCB 암세포주는 대조군 (line 1)의 Ht값이 27이고, 100 μ g/ml (line 2-3)이 136, 그리고 10 μ g/ml이 112이다. HMCB 암세포주는 대조군 (Ht; 27)에 비하여 항혈관 1호 100 μ g/ml 처리군 (Ht; 136)은 약 5배 유전자 발현이 증가되었고 10 μ g/ml 처리군 (Ht; 112)은 약 4.1배의 유전자 발현 증진효과가 있었다. 따라서 HMCB 암세포주에서 항혈관 1호가 nm23-H1 유전자 발현을 증진시켰다고 볼 수 있다.

2. in vivo 항전이와 생명연장 효과

1) 항혈관 1호에 의한 암전이 억제 효과

C57BL/6 생쥐에 B16-F10 암세포를 정맥내 주사한 뒤 14일간 항혈관 1호(1.55g/kg)를 1일 1회 경구투여하고, CTX를 24시간 후에 복강내 주사하여 생명연장 효과 및 생존 개체수를 관찰하였다. Table 4.의 암세포만 이식한 대조군의 평균생존 중앙치는 20.9 \pm 0.27이었다. CTX 처리군은 평균생존 중앙치는 25.3 \pm 1.02일로서 대조군에 비하여 약 5일 유의한 생명연장 효과를 보였고(p<0.001), 대조군에 대한 생명연장율(%)은 21.0% 신장되었다. 이에 비하여 항혈관 1호 투여군은 27.2 \pm 1.00일로서 대조군에 비하여 약 7일 유의한 생명연장 효과를 보였고(p<0.001), 대조군에 대한 생명연장율(%)은 30.1% 신장되었다.

즉 CTX와 항혈관 1호 모두 B16-F10 암세포를 억제시켜 생쥐의 생명을 연장한 것으로 사료되는데, 특히 항혈관 1호의 효과가 CTX에 비해 뛰어난 것을 알 수 있다. 또한 B16-F10 암세포를 정맥내 주사한 C57BL/6 생쥐의 생존개체수는 CTX 처리군은 20일까지 10이고, 대조군, 항혈관 1호 처리군 모두 19일까지 10이었다. 그후 대조군은 21일과 22일 사이에 0으로 하강하였고, 항혈관 1호 및 CTX 처리군은 모두 31일과 32일 사이에 0으로 하강하였다.

Table 4. Effect of Antivascular-first on MST and ILS of C57BL/6 mice implanted intraveinially with B16-F10 melanoma.

Group	Dose(mg/kg)	N	MST(days)	ILS(%)
Control		10	20.9 \pm 0.27	
CTX	100	10	25.3 \pm 1.01***	21.0
AntiV-F	1550	10	27.2 \pm 1.00***	30.1

In C57BL/6 mice were implanted intraveinially with B16-F10 melanoma(2 \times 10⁵cells) on days 0. In C57BL/6 mice were oral administration of AntiV-F(p.o, 1.55g/kg) for 14days beginning on the 1day and CTX(100mg/kg) after i.p 24hrs. MST and ILS was observed after i.p 15days. Each point represents the mean \pm SE of 10 mice. Statistically significant value compared with control data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) Pulmonary colonization assay

Table 5.에서 보는 것 같이 14일째 생쥐를 sacrificed시킨 후 Lung colony의 수를 조사하였다. 대조군은 Lung colony의 수가 83.5 \pm 6.90이었고 CTX 처리군은 2.5 \pm 0.7로(p<0.001) 감소율(%)이 97%이었고, 항혈관 1호 투여군은 Lung colony의 수가 19.6 \pm 1.8로(p<0.001) 감소율(%)이 76.6%로서 CTX 처리군보다 현저하게 감소하였다.

Table 5. Effects of Antivascular-first on lung colony number of C57BL/6 mice implanted intraveinially with B16-F10 melanoma.

Group	Dose(mg/kg)	N	Lung colony number	Decrease(%)
Control		10	83.5 \pm 6.9	
CTX	100	10	2.5 \pm 0.7***	97.0
AntiV-F	1550	10	19.6 \pm 1.8***	76.6

In C57BL/6 mice implanted intraveinially with B16-F10 melanoma(2 \times 10⁵cells) on days 0. In C57BL/6 mice were oral administration of AntiV-F(p.o, 1.55g/kg) for 14days beginning on the 1day and CTX(100mg/kg) after i.p 24hrs. Lung colony was observed after i.p 15days. Each point represents the mean \pm SE of 10 mice. Statistically significant value compared with control data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

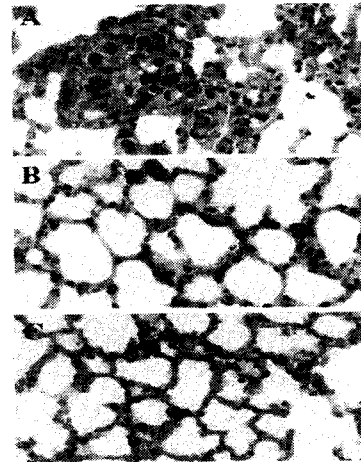


Fig. 3. Histological analysis of lung tissue of B16-F10 melanoma metastasis in C57BL/6 mice. A Control(B16-F10 melanoma injected), B. CTX(100mg/kg) C. AntiV-F(p.o, 1.55g/kg) for 14days. Fig. 3. Histological analysis of lung tissue of B16-F10 melanoma metastasis in C57BL/6 mice A Control(B16-F10 melanoma injected), B. CTX(100mg/kg) C. AntiV-F(p.o, 1.55g/kg) for 14days.

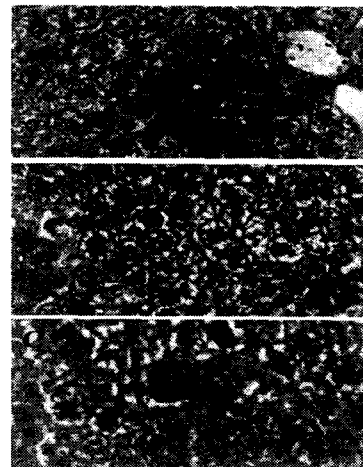


Fig. 4. Histological analysis of liver tissue of B16-F10 melanoma metastasis in C57BL/6 mice. A Control(B16-F10 melanoma injected), B. CTX(100mg/kg) C. AntiV-F(p.o, 1.55g/kg) for 14days.

고 찰

전이란 암이 그 원발부위로부터 여러 경로를 통해 다른 원격부위에 이식된 경우를 말하는 것으로 암세포의 생물학적 특성 중 침습과 전이는 인체에 대한 위해성 중 가장 관건이 되는 요소

이다⁹⁾. 통계에 의하면 80%이상의 암환자들은 전이와 재발에 의해서 사망하므로 전이가 없다면 예후는 좋은 것이다⁹⁾. 종양전이의 원인 및 기전은 아직 불명확하지만 이에 관련해서 밝혀진 내용으로는 종양요소로는 원발종양의 위치, 크기, 출현 및 종양 관련 항원이 있고 숙주관련 요소로는 면역기능 저하와 방사선이나 수술 등으로 인한 혈관내피손상(vascular endothelial damage) 및 호르몬 관련설 등이 있다. 이 중에서 최근 가장 주목을 받고 있는 분야는 암 자신이 스스로의 혈관을 만들어 나간다는 것이다. 따라서 신생혈관형성을 억제하므로 암의 성장과 전이를 막아 보려는 각종 시도는 현재 가장 중요한 연구 분야가 되고 있다¹⁰⁾. 한방에서는 종양의 전이에 대하여 직접적으로는 언급하고 있지 않지만 이와 유사한 내용을 살펴보면 가장 최초의 것은 잔존 암세포를 伏邪, 餘毒¹¹⁾으로 표현하였고, 《靈樞·百病始生篇》¹²⁾에서는 “虛邪之中人也, 始于皮膚, 皮膚緩則腠理開, ……留而不去, 則傳舍于絡脈……留而不去, 傳舍于經脈……留而不去, 傳舍于輸脈……留而不去, 傳舍于胃腸, 在胃腸之時, 黃鬱腹脹, 多寒則腸鳴腹瀉, 食不化; 多熱則便澀, 出糜, 留而不去, 傳舍于胃腸之外, 募原之間, 留著于脈, 稽留而不去, 息而成積. 留而不去, 息而成積, 或著孫絡, 或著輸脈, 或著于伏沖之脈, 或著于膈脈, 或著于胃腸之募原, 上連于緩筋, 邪氣淫日, 不可勝論”라고 한 내용이다. 그러나 이상의 내용을 통해서도 특별한 전이에 대한 치료법은 제시되어 있지 않다. 한의학에서 암에 대한 치료법은 清熱解毒, 化痰軟堅, 活血祛瘀, 行氣散結, 以毒除毒 등의 祛邪法과 健脾益氣, 健脾益腎, 益氣補血, 滋陰溫陽 등의 扶正法으로 대별¹³⁻¹⁶⁾되는데, 최근에는 攻補兼施 위주로 치료하는 경향이 있다¹³⁾. 암의 치료법 중에서 活血祛瘀法은 郁 등¹⁷⁾에 의하면 혈맥을 통하게 하고, 혈액순환을 촉진하고, 혈관을 확장시켜 미순환을 개선시킴으로 결체조직의 증식을 억제하여 종양의 성장 및 전이의 억제와 함께 腫瘍 축소 작용을 한다는 것이 실험적으로 입증되고 있다. 임상적으로 상용하는 처방으로는 桃紅四物湯, 膈下逐瘀湯, 小腹逐瘀湯, 通竅活血湯 등이 있고, 약물로는 당귀미, 적작약, 천궁, 단삼, 도인, 홍화, 울금, 삼칠근, 현호색, 유황, 몰약, 천산갑포, 삼릉, 봉출, 택란, 지벌충, 수질, 능소화, 수홍화자, 대황, 석견천 등이 있다¹⁸⁻¹⁹⁾. 항혈관 1호는 대전대학교 부속 한방병원 암 클리닉에서 신생혈관의 형성과 전이를 억제하고 인체의 면역능력 회복을 목적으로 하여 立方한 것이다. 처방의 구성은 백화사설초 8g, 선화초 8g, 황기 6g, 인삼 6g, 백출 6g, 백복령 6g, 감초 4g, 당귀 4g, 천궁 4g, 단삼 4g, 계혈등 4g, 유황 4g, 도인 4g, 봉출 4g, 수질 4g, 포황 4g, 익모초 4g, 적작약 4g, 소목 4g, 목단피 4g으로 되어 있다. 방제의 구성을 살펴보면 君藥으로 백화사설초 선화초가 사용되어 解毒消癥하며, 신약으로 황기 인삼 백출 백복령이 사용되어 健脾益氣하며, 佐使藥으로 당귀 천궁은 보혈을 겸한 活血化瘀 작용이 있으며 단삼 계혈등 유황 몰약 봉출 수질 포황 익모초 적작약 소목 목단피는 活血祛瘀한다. 따라서 암에 대한 치료법으로 祛邪法과 扶正法을 겸한 攻補兼施 위주로 치료하는 처방이라고 할 수 있다.

이상의 항혈관 1호 처방의 3첩분량(288g)에서 추출물(77.7g)을 분리하여 동물세포에 세포독성을 관찰한바 Table 2에서 L+14 세포주는 대조군에 비하여 세포독성이 없는 것으로 사료된다. 그러나 200 μ g/ml에서는 87.1 \pm 3.1로 23% 감소하였지만 이는 항혈

관 1호의 배양조건에 영향을 주어 나타난 세포독성이라 생각된다. B16-F10세포주²⁰⁾는 대조군에 비하여 유의성 있는 암세포 억제효과를 나타내었다(p<0.001). 즉 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml 그리고 10 μ g/ml에서 모두 유의한 감소를 보였다. 그러나 200 μ g/ml에서는 57.9 \pm 1.9로 42% 감소하였지만 이는 항혈관 1호의 B16-F10 암세포주 배양조건에 영향을 주어 나타난 세포독성이라 생각된다. HMCB 암세포주는 대조군에 비하여 유의성 있는 암세포 억제효과를 나타내었다(p<0.001). 즉 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml 그리고 10 μ g/ml에서 모두 유의한 감소를 보였다. 그러나 200 μ g/ml에서는 45.5 \pm 2.7로 44.5% 감소하였지만 이는 항혈관 1호의 HMCB 암세포주 배양조건에 영향을 주어 나타난 세포독성이라 생각된다. 따라서 항혈관 1호는 정상세포에서는 세포독성을 나타내지 않고 B16-F10과 HMCB 암세포주에서 유의한 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다(Table 3). Matrix metalloproteinase는 암세포가 생체 내에서 extracellular matrix protein으로 작용하여 invasion을 하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 전이 유발 효소이다. Tumor 주위의 extracellular matrix가 matrix metalloproteinase(MMP)에 의해 감소되는 것은 암 전이에 결정적인 증거라고 생각된다. MMP 활성화는 국부적인 곳에서 tissue inhibitors of metalloproteinase(TIMPs) 형성을 저해하는 데 비하여 잠재적 효소의 활성비율에 의해서 조절된다. MMP조직의 국부화의 해석에 대한 연구는 MMPs를 생성하는 수많은 cell type에 의해서 좀더 복잡하다²⁰⁻²³⁾. L+14 normal cell line과 HMCB 암세포주를 24 well plate에 분주하고 항혈관 1호 농도를 10 μ g/ml과 100 μ g/ml로 처리하여 48시간 후에 상층액을 제거하고 RT-PCR을 수행하였다. Fig. 1의 중간 panel(L+14)에서 대조군의 Ht 값이 73이고 10 μ g/ml이 81, 그리고 100 μ g/ml이 83이다. 정상세포에서는 대조군과 항혈관 1호 처리군이 큰 차이가 없었지만 100 μ g/ml의 투여군에서 약간의 세포독성이 보였다. 그래서 L+14 세포주에서 항혈관 1호의 MMP-9 유전자 발현에 영향은 차이가 없었다. 상단 panel(HMCB)에서 대조군의 Ht값이 169이고, 10 μ g/ml이 143, 그리고 100 μ g/ml이 102이다. HMCB암세포주에서는 대조군(Ht:169)과 항혈관 1호 10 μ g/ml처리군(Ht:143)이 약간의 억제 효과가 있었지만 100 μ g/ml처리군(Ht:102)은 현저한 유전자 발현 억제 효과가 있었다. 그래서 HMCB암세포주에서 항혈관 1호가 MMP-9 유전자 발현을 억제하였다. nm23-H1 유전자는 암전이 조절에 관여하는 항암전이 유전자이다²⁴⁾. 정상세포에서 nm23-H1의 유전자 발현 증가는 세포적 증진과 분화에 관여한다. 그리고 nm23-H1 유전자 발현은 암전이를 억제시키고, 낮은 nm23-H1 유전자 발현은 동물암세포의 전이증가를 나타낸다²⁵⁾. L+14 정상 세포주에 항혈관 1호를 10 μ g/ml과 100 μ g/ml을 처리하여 nm23-H1의 유전자 발현을 분석하였다. Fig. 2의 중간 panel(L+14)에서 대조군의 Ht값이 23이고, 10 μ g/ml이 40, 그리고 100 μ g/ml이 45이다. 정상세포에서는 대조군과 항혈관 1호 처리군이 nm23-H1 유전자 발현을 약간 증가시켰다. 즉 L+14 정상세포주에서는 대조군(Ht:23)과 항혈관 1호 10 μ g/ml처리군(Ht:40)이 약 1.7배 증가되었고, 100 μ g/ml처리군(Ht:45)은 약 2.0배의 유전자 발현을 증진시켰다. 상단 panel(HMCB)에서 HMCB 암세포주는 대조군의 Ht값이 27이고, 10 μ g/ml이 112, 그리고 100

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 1360이다. HMCB암세포주는 대조군(Ht;27)에 대한 항혈관 1호 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군(Ht;112)이 약 4.1배 유전자 발현이 증가하였고, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군(Ht;136)은 약 5배의 유전자 발현 증진효과가 있었다. 그래서 HMCB암세포주에서 항혈관 1호가 nm23-H1 유전자 발현을 증진시켰다. C57BL/6 생쥐에 B16-F10 암세포를 정맥내 주사한 뒤 14일간 항혈관 1호($1.55\text{g}/\text{kg}$)를 1일 1회 경구 투여하고, CTX를 24시간 후에 복강내 주사하여 생명연장 효과 및 생존 개체수를 관찰하였다. Table 4.의 암세포만 이식한 대조군의 평균생존 중앙치는 20.9 ± 0.27 이었다. CTX 처리군은 평균 생존 중앙치는 25.3 ± 1.02 일로서 대조군에 비하여 약 5일 유의한 생명연장 효과를 보였고($p<0.001$), 대조군에 대한 생명연장율(%)은 21.0% 신장되었다. 이에 비하여 항혈관 1호 투여군은 27.2 ± 1.00 일로서 대조군에 비하여 약 7일 유의한 생명연장 효과를 보였고($p<0.001$), 대조군에 대한 생명연장율(%)은 30.1% 신장되었다. 즉 CTX와 항혈관 1호 모두 B16-F10 암세포를 억제시켜 생쥐의 생명을 연장한 것으로 사료되는데, 특히 항혈관 1호의 효능이 CTX에 비해 뛰어난 것을 알 수 있다. 항혈관 1호에 의한 항전이 생쥐를 sacrificed시킨 후 Lung colony의 수를 조사하였다. Table 5에서 보는 것 같이 대조군은 Lung colony의 수가 83.5 ± 6.9 이었고 CTX 처리군은 2.5 ± 0.7 로($p<0.001$) 감소율(%)이 97%이었고, 항혈관 1호 투여군은 Lung colony의 수가 19.6 ± 1.8 로($p<0.001$) 감소율(%)이 76.6%로서 CTX 처리군보다 현저하게 감소하였다. 이상의 결과로부터 항혈관 1호는 암전이 억제에 현저한 효과가 있다고 볼 수 있으며, 향후 암의 항전이에 대한 많은 임상보고 및 연구가 필요하리라 사료된다.

결 론

본 실험에서 항혈관 1호가 암전이 억제를 알아보기 위하여 암전이 유전자인 MMP-9과 암전이 억제 유전자인 nm23-H1 등의 유전자 발현을 L+14 normal cell, HMCB cell에서 RT-PCR로 유전자 증폭하여 확인하였다. L+14 정상세포주에 대한 세포독성 실험 결과는 농도구배에 따른 세포독성은 보이지 않았다. B16-F10과 HMCB 암세포주 대한 세포독성 실험 결과는 대조군에 비하여 농도구배에 따른 세포독성을 보였다. MMP-9의 유전자 발현은 항혈관 1호 처리군이 대조군에 비하여 억제되었다. nm23-H1 유전자 발현은 항혈관 1호 처리군이 대조군에 비하여 증가되었다.

결론적으로 항혈관 1호는 암전이 유전자(MMP-9)를 억제하고, 암전이 억제유전자(nm23-H1)를 촉진하여 항전이 효과를 나타내고 면역세포 활성화로 면역증진의 효과를 나타내었다.

참고문헌

1. Papazissi, K., Geromichalos, D., Dimitriadis, K., Kortssaris, H. Optimization of the sulforhodamine B(SRB) colorimetric assay., J. immunological method. 208, 151-158, 1997.
2. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72,

- 248-252, 1976.
3. Hirsch, H. H., V. Backenstoss, and C. Moroni, Impaired interleukin-3 mRNA decay in autocrine mast cell tumors after transient calcium ionophore stimulation. Growth Factors 13, 1-12, 1996.
4. Cohen, S., The role of cell-mediated immunity in the induction of inflammatory responses. Am. J. Pathol. 88, 502-509, 1977.
5. Curran, T., and B. R. Franza, Fos and Jun: the AP-1 connection. Cell 55, 395-397, 1988.
6. Sato, H., Takino, T., Cae, J., Yamamoto, E., Sieki, M., A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. Nature(Lond.), 370, 61-65, 1994.
7. Saiki, I., Fujii, H., Yoneda, J., Abe, F., Nakajima, M., Tsuruo, T., and Azuma, I. Role of aminopeptidase N(CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. Int. J. Cancer, 54, 137-143, 1993.
8. Saiki, P. K., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Aruhein, N. : Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230 : 1350, 1985.
9. 대한병리학회, 병리학 I, p 221, 고문사, 서울, 1995.
10. 高進, 癌의侵襲與轉移, p 1, 北京醫科大學 中國協和醫科大學聯合出版社, 北京, 1996.
11. Paul Calabresi, Medical Oncology 2nd edition, pp. 68-77, McGRAW-HILL, INC., 1993.
12. 劉宇龍 等, 癌症復發與轉移的病機及中醫治療探討, 山東中醫雜誌, 14, 435-436, 1995.
13. 洪元植 編, 黃帝內經, pp.103-104, 249-268, 358-359, 高文社, 서울, 1974.
14. 洪元植, 現代中國의 癌治療法, pp.17-35, 81-84, 361-388, 英文社, 서울, 1980.
15. 邱佳信 外, 惡性腫瘤服藥方法的實驗研究, 中國, 浙江中醫雜誌, 第7號, 985.
16. 楊貴貞 外, 人蔘抗小鼠手術應激的細胞免疫調節效應, 中西醫結合雜誌, 8, 479-480, 1988.
17. 李佩文 主編 : 中西醫臨床腫瘤學, 北京, 中國中醫藥出版社, pp.102-154, 1996.
18. 孟琳升 等 編, 中醫治癌大成, pp.98-144, 北京科學技術出版社, 北京, 1994.
19. 李佩文 主編, 惡性腫瘤併發症實用療法, pp.19-26, 中國中醫藥出版社, 北京, 1995.
20. Nannmark. U., B. R. Johansson, J. L. Bryant, M. L. Unger, M. E. Hokland, R. H. Goldfarb, and P. H. Basse, Microvessel origin and distribution in pulmonary metastases of B16 melanoma: implication for adoptive immunotherapy. Cancer Res. 55, 4627, 1995.
21. Basse. P. G., U. Nannmark, B. R. Johansson, R. B. Herberman, and R. H. Goldfarb., Establishment of

- cell-to-cell contact by adoptively transferred adherent lymphokine-activated killer cells with metastatic murine melanoma cells. *J.Natl. Cancer Inst.* 83, 944, 1991.
22. Goldfarb, R. H., NK cells: adhesive interaction, microvasculature, extracellular matrices and angiogenesis: preface. *Nat. Immun.* 15, 75, 1997.
23. Ennis, B. W., and L. M. Matrisian., Matrix degrading metalloproteinases. In *Brain Tumor Invasiveness*, R. H. Goldfarb, ed. Kluwer. Dordrecht. p 17, 1994.
24. Bevilacqua, G., Soebel, M. E., Liotta, L. and Steeg, P. S., Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinoma indicators of high tumor metastatic potential. *Cancer Res.*, 49, 5185-5190, 1989.
25. Leone, A., Seeter, R. C., Hong, C. M., Hu, Y. Y., Arboleda, M. J., Brodeur, G. M., Stram, D., Slamon, D. J., and Steeg, P. S., Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene*, 8, 855-865, 1993.