

혈관신생 및 이식암세포증식 억제를 통한 가미소암산의 항암작용연구

윤성찬¹ · 안성훈¹ · 문연자¹ · 김진경² · 추영국³ · 정규용⁴ · 김영목⁵ · 우원홍^{1,5*}

1: 원광대학교 한의학전문대학원, 2: 포천중문의과대학교 의과대학, 3: 원광대학교 자연과학대학 생물학교실,
4: 원광대학교 의과대학 약리학교실, 5: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

Studies on the Antitumor Activity of Gamisoam-san via Suppressing Angiogenesis and Growth Factor Expression

Sung Chan Yoon¹, Seong Hun Ahn¹, Yean Ja Mun¹, Jin Kyeoung Kim²,
Young Kug Choo³, Kyu Yong Jung⁴, Yeong Mok Kim⁵, Won Hong Woo^{1,5*}

1: Departments of Professional Graduate School of Oriental Medicine, 2: College of Medicine, Pochon CHA University,
3: Division of Biology Science, College of Natural Science, Wonkwang University, 4: Departments of Pharmacology, Wonkwang School of
Medicine, 5: Departments of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Gamisoamsan is a prescription originated in Soamsan which 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. To investigate the effects of Gamisoamsan on anti-cancer reaction, I studied the effects of Gamisoamsan on angiogenesis via chorioallantoic membrane (CAM) assay, corneal neovascularization assay and the effects on expression of growth factor which are VEGF, TGF-β, bFGF and IMUP-1. Anti-cancer effects of Gamisoamsan was also observed through hematological parameters, tumor volume and survival rate in mice. Gamisoamsan inhibited embryonic angiogenesis of blood vessels in CAM assay and inhibited neovascularization of rat cornea. Gamisoamsan reduced cell proliferation in HT1080 cells and IC50 was 2.18 mg/ml. Gamisoamsan reduced the expression of VEGF, TGF-β, bFGF and IMUP-1 which was known as vascular growth factor and this effects of Gamisoamsan was predominant than VP-16. The treatment of Gamisoamsan decreased the CT-26 cell inoculated-tumor volume in mice colon adenocarcinoma and increased mice survival which was inoculated CT-26 cells. 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.

Key words : Gamisoam-san(加味消癌散), anti-cancer, angiogenesis, growth factor, CT-26 cell

서 론

암은 전 세계 인류의 사망원인 질병중 수위를 차지하는 질환으로 아직 뚜렷한 치료방법이 개발되지 않아 인류가 극복해야 할 난제중의 하나이다. 기존의 암치료 방법은 주로 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등 주로 암세포에 직접적으로 살상작용(殺傷

作用)을 하는 치료 방법으로 이들은 암세포 이외의 정상세포에도 살상작용을 나타내는 등 많은 부작용을 유발하므로, 최근에는 면역요법, apoptosis 촉진, 세포분화 유도법 및 혈관 형성저해법 등 새로운 방법의 연구가 시도되고 있다¹⁻³⁾. 한의학에서 암은 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 형성되는데, 암을 비롯한 모든 질병은 인체를 정체관(整體觀)적 개념에서 정기(正氣)와 사기

* 교신저자 : 우원홍, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원
· E-mail : whwoo@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-850-6845
· 접수 : 2003/04/18 · 수정 : 2003/05/30 · 채택 : 2003/07/21

(邪氣)의 성쇠(盛衰)에 의하여 발생된다고 인식하므로, 암의 치료 또한 증형(證型)에 따라 건비익기(健脾益氣), 자보간신(滋補肝腎) 등의 부정법(扶正法)과 활혈화어(活血化瘀), 화담연건(化痰軟堅) 등의 거사법(祛邪法), 그리고 동시에 부정법과 거사법을 응용한 부정거사법(扶正祛邪法)이 이용된다. 이 중 활혈화어법은 적극적인 치료방식으로 어혈(瘀血)과 종양의 밀접한 관련성 때문에 많이 응용되어지는 치법이다^{4,9)}.

가미소암산(加味消癌散)은 기허(氣虛)·기체혈어(氣滯血瘀)·사독치성(邪毒熾盛)·담음적취(痰飲積聚) 등의 기전에 의하여 암이 발생된다는 한의화적인 이론에 입각하여 보기(補氣)·활혈(活血)·해독(解毒)·연건산결(軟堅散結)등을 목적으로 구성된 처방으로 활혈화어법을 응용한 부정거사법에 상응하는 처방인 『동의치료경험집성』⁹⁾의 소암산을 기본방으로 최근 시도되는 면역증강, apoptosis촉진, 세포분화유도를 통한 암세포 성장억제, 혈관형성 억제를 통한 전이 억제등에 중점을 두고 황기·대황·현호색·목단피·천궁이 가미되어 입방된 처방이다. 암의 가장 중요한 생물학적 특성인 침습과 전이(invasion & metastasis)는 종양세포가 원발부위에서 다른 부위로 이동하여 새로운 환경에서 적응, 증식할 수 있다는 것^{1,2)}으로, 혈관신생(angioogenesis)은 암조직과 같은 세포증식이 무한적으로 일어나는 경우 정상세포와 마찬가지로 암세포가 성장하고 확장하기 위하여 필수적으로 새로운 혈관이 신생되어야 하므로 암의 전이 억제를 위한 방편으로 근래 혈관형성억제제에 대한 관심^{8,10,11)}은 많이 고조되고 있다.

이에 저자는 암에 대한 한의학의 치료법 중 부정거사법에 상응하는 처방인 소암산에 황기·대황·현호색·목단피·천궁을 가미한 가미소암산의 활혈관신생 효능을 통한 항암효과를 확인하기 위하여 Chorioallantoic membrane (CAM) assay, corneal neovascularization assay등 혈관신생에 미치는 효과와 vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor-β (TGF-β), basic fibroblast growth factor (bFGF)의 혈관증식인자 유전자 및 immortalization- upregulated protein 1(IMUP-1) 유전자 발현 양상을 관찰하고, 또한 종양세포를 직접 이식한 마우스에 대한 혈액학적 성상, 종양용적의 변화, 암세포 이식마우스의 생존율등을 통한 가미소암산의 암전이 억제효능을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 약재 및 동물

본 실험에 사용한 가미소암산의 처방내용은 Table 1과 같으며, 약재는 시중에서 구입하여 정선된 약재만을 사용하였다.

실험동물은 무균 상태의 Wistar 계 백서를 샘타코(오산, 한국)로 부터 구입하여 계대배양하여 6주령의 암컷만을 각각의 혈관신생유도 실험에 사용하였으며, CAM assay를 위한 수정란은 익산에 있는 영생 종계장에서 구입하여 실험에 사용하였다. 또한, 종양이식 마우스에 대한 실험에서는 체중 25-30 g의 BALB/c 웅성 마우스를 사용하였다.

Table 1. The Composition of Gamisoam-san

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
牡丹皮	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	Helianthus annuus	30
TOTAL AMOUNT		329

2. 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 μg/ml 스트렙토마이신을 첨가한 MEM 배양액에서 37°C, 5% 이산화탄소를 유지하며 배양하였다. 종양 모델마우스의 작출을 위한 in vivo 실험에서는 마우스 결장샘암종(mouse colon adenocarcinoma) 유래의 CT-26 세포주를 사용하였다.

3. 시약 및 기기

혈관신생 기전의 억제효과를 연구하기 위하여 시약 처리용 Thermanox coverslips(Nunc Naperville, ILInc, IL)과 혈관신생 유도 수술을 위한 10-0 nylon (Davis+Geck, Wayne, NJ) 봉합사와 retinoic acid(Sigma Chemical Co., St. Louis, NY., U.S.A)를 사용하였다. 혈관신생억제를 좀더 자세히 관찰하기 위하여 fat emulsion (Green Cross Pharm. Co., Korea) 10%를 사용하였으며 봉합수술 후 염증을 예방하기 위하여 terramycin (Pfizer, Inc.)을 사용하였다. 혈관신생기전 억제에 사용된 기기는 실체현미경(Olympus. Co. Japan), digital camera (Nikon, Co. Japan), haching system(Jeung-Do, Inc., Korea)이였으며, 동물사육은 무균무진-항온항습 자동 사육장치(Jeung-Do, Inc., Korea)를 이용하였다. 혈관 성장 인자 발현 억제를 위한 실험에서는 사용된 MEM 배지, fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA는 Gibco BRL(Life Technologies, Inc., Maryland, U.S.A)에서 구입하였으며, 종양이식 마우스의 혈액학적 변화는 Coulter's counter를 이용하였다.

4. 시료의 제조

가미소암산 329 g의 50%인 164.5 g에 증류수 1 l를 가하여 3 시간 동안 끓인 후 거즈로 여과하고 3,000 rpm으로 30 분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 원심분리 후 여과액을 농축기(rotary evaporator, Buchi, Swiss)로 농축한 다음 -70°C에서

freeze dryer로 동결건조 시켜 34.4 g (수득율 ; 약 21%)의 건조추출물을 얻어 시료로 사용하였다.

5. Chorioallantoic membrane (CAM) assay

수정란을 90% 습도가 유지되는 37°C 배양기에 넣어 이를 0 일배로 하여 배양하였다. 4일배가 되면 계란의 끝부분에 구멍을 내어 18 G 주사바늘을 사용하여 알부민(albumin) 3 ml를 뽑아낸 뒤, 계란의 공기주머니 아래에 있는 쪽을 70% 에탄올로 소독한 후 메스를 이용하여 지름 3 cm 크기의 원형 창문을 만들고, 공기주머니 아래에 있는 막은 핀셋으로 제거한 후 유리테이프를 구멍을 막았다. 5일배가 되면 살균처리 된 Thermanox 15 mm의 coverslip 위에 시료를 점적하여 용매를 완전히 말린 후, 계란의 테이프를 제거하고 CAM위에 살며시 올려놓고 다시 테이프를 밀봉하여 배양시키는데, 이때 CAM의 직경이 3-5 mm인 배를 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 G 주사바늘을 사용하여 10%의 fat emulsion(Intralipid, 녹십자)을 CAM 안에 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.

6. Cornea neovascularization

체중 약 200-250 g의 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, 음성대조군에서는 동량의 물을, 양성대조군에서는 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 점수화 하였으며, 혈관의 길이는 각막 윤부에서부터 새로이 생성된 혈관의 끝까지 재어 측정하였다.

7. MTS assay

가미소암산의 세포 독성 효과와 증식능력의 판별을 위한 처리 농도를 결정하기 위하여 MTS([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]) assay를 실시하였다. 96 well plate(Nunc)의 각 well에 HT1080 세포를 5×10³개 씩 되도록 분주한 후 배양하였다. 또한 실험의 결과의 정확성을 확보하기 위하여 이미 암세포의 분화를 억제하

는 것으로 알려진 VP-16(Sigma Pharmaceuticals, St Louis, MO)을 비교하여 관찰하였다. 약술하면 HT1080 세포의 배양 24 시간 후에 가미소암산과 VP-16의 각각의 농도를 포함한 새 배양액으로 교체하고 일정시간동안 배양한 다음 PBS로 남은 배양액을 씻고 20 µg의 MTS 처리하였다. 다시 배양기에서 3 시간 배양한 후 ELISA plate reader(A490)를 사용하여 흡광도를 측정하여 세포 독성 효과를 관찰하였다. MTS용액은 Promega사의 cell proliferation assay kit(Cell Titer96R AQueous One Solution)을 사용하고 한번 실험에 5 그룹씩 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 0.15 mg/ml 농도로 삼차 증류수에 녹인 다음 -20°C 냉동고에 보관하여 사용하였다.

8. RT-PCR을 응용한 혈관증식 유전자 발현 실험

HT1080 세포를 6 well plate를 활용하여 각각 10⁵개 씩 분주한 후 10% fetal bovine serum과 100 units/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신을 첨가한 MEM 배양액에서 37°C, 5% 이산화탄소를 유지하며 배양하였다. 세포가 well 바닥의 약 반정도 찼을 때, 대개 배양 후 24 시간 후로 이때 IC50의 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. 24 시간 그룹 또한 모두 TRIzol reagent가 처리되었을 때 4°C에 보관되어 있던 2 시간 배양된 그룹과 함께 각각의 RNA를 취득하였다. 그 후 invitrogen의 super script TM first-strand synthesis system을 이용하여 역전사반응을 수행하였다. 42°C에서 50 분 동안 처리한 후 70°C에서 15 분 동안 효소들을 불활성 시켰으며, 역전사가 끝난 뒤 RNase H를 37°C에서 20 분 동안 처리하여 RNA를 제거하였다. PCR은 기산바이오의 PCR reagent premix를 이용해서 실시하였다. 94°C에서 40초, 55°C에서 40 초, 72°C에서 40 초로 30 회 반복 복제한 뒤 72°C에서 5 분 동안 확장시킨 뒤 1% agarous gel에 전기영동을 실시하였으며, PCR을 수행하기 위한 각각 primer는 아래와 같다.

1) VEGF

sense, 5' -GTGGACATCTTCCAGGAGTA-3'

anti-sense, 5' -TCTGCATTCACATTTGTGT-3'

2) TGF-β

sense, 5' -GCAAAGATAACACACTGCAA-3'

anti-sense, 5' -GAAGTCAATGTAGAGCTGCC-3'

3) bFGF

sense, 5' -GGCTTCTAAATGTGTTACGG-3'

anti-sense, 5' -TTATACTGCCAGTTCGTTT-3'

4) IMUP1

sense, 5' -CCCTCGAGCTATGGAGTTCGACCTGGG-3'
antisens, 5' -CCGAATTCTCAGTGGGGAGCCTCC-3'

5) β-actin

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

9. CT-26 세포의 성장 억제실험

생쥐의 결장샘암종(mouse colon adenocarcinoma)에서 유래한 CT-26 세포를 24 well plate에 1 x 10⁴ cells/well의 농도로 분주하여 10% fetal bovine serum을 함유한 DMEM 배양액으로 24 시간 배양한 후 혈청이 함유되지 않은 배양액으로 다시 24 시간 배양하여 세포주기 동기화를 유도하였다. 0.5% 혈청이 함유된 DMEM 배양액으로 가미소암산 추출물(1-50 μg/ml)을 24 시간 처리하고 CT-26 결장샘암종세포의 성장 변화를 관찰하였다. 세포증식 억제 효과는 가미소암산 추출물 처리한 후 마지막 4시간 동안에 [3H]thymidine(1 μCi, 5 Ci/mmol)을 이용하여 평가하였다.

10. 종양 모델마우스의 작출 및 암증식 억제 실험

종양 모델마우스의 작출을 위하여 마우스 결장샘암종에서 유래한 CT-26 세포(1 x 10⁵ cells/mouse)를 체중 25-30 g의 BALB/c 마우스(웅성) 우측 옆구리에 피하 주사¹²⁾하였다. 암세포 이식 후 10 일째부터 육안적으로 판별이 가능한 종양 형성을 관찰할 수 있었다. 종양 이식 후 5 일째부터 가미소암산 추출물 100, 200 및 500 mg/kg 용량으로 일일 일회 경구 투여하면서 암증식 억제효과를 in vivo에서 관찰하였다. 종양세포 이식 후 15 일에는 북대정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈액중 헤모글로빈 함량, 적혈구 및 백혈구 수를 Coulter's counter를 이용하여 혈액학적 이상 변화를 관찰하고 아울러 종양의 용적을 측정하였다. 종양의 용적은 Streit 등¹³⁾의 방법을 이용한 다음의 공식에 의하여 산출하였다.

$$\text{종양 용적(mm}^3\text{)} = 4/3 \times \pi \times (1/2\text{DS})^2 \times 1/2\text{DL.}$$

DS: 단직경, DL: 장직경.

또한, 종양 모델마우스의 생존율은 대조군과 가미소암산 추출물 투여군의 종양 모델마우스의 생존 기간을 측정하여 생존율의 증가를 Gupta 등¹⁴⁾의 방법으로 평가하였다.

종양 모델마우스의 생존율 =

$$\frac{\text{처치군의 median survival time}}{\text{대조군의 median survival time}} \times 100 - 100$$

11. 통계 처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들을 평균과 표준편차로 표시하였고, 각 군간의 차이는 one-way ANOVA 후 Scheff's test하여 p값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 의미있다고 판정하였다.

실험성적

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(Fig. 1A). 이것으로 보아 실험에 활용된 coverslip 자체의 무게는 혈관신생 형성에 별다른 영향을 끼치지 않는다는 것을 알 수 있었다. 양성대조군으로 사용된 retinoic acid 처리군의 경우 48시간이 경과되었을 때 혈관신생이 현저하게 감소된 것을 알 수 있었으며(Fig. 1B), 가미소암산 건조추출물 50 μg/egg를 처리한 경우 retinoic acid 처리군과 유사한 혈관신생 억제 효과가 관찰 되었다(Fig. 1C).

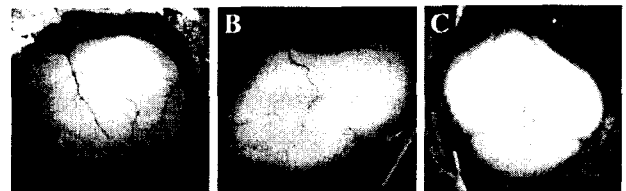


Fig. 1. Effects of Gamisoamsan on embryonic angiogenesis in CAM 2 days after sample implantation. Fat emulsion (10%) was injected into chorioallantois to make clearly the vascular network, and the representative CAMs were photographed. Control CAMs treated with empty coverslips show no disturbance of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

2. 각막혈관 신생억제 효과

가미소암산의 항혈관신생 효과를 규명하기 위하여 봉합으로 유도된 백서 각막 모델을 이용하여 4 주 동안 각막의 혈관신생 생성 정도를 관찰하였다. 동량의 물을 투여한 대조군의 경우 봉합 후 2-3 일째 부터 각막에 많은 혈관들이 뻗어 나오는 것을 관찰할 수 있었으며, 각막 봉합 후 5-6 일 이내에 봉합에 의한 각막기능 손상 부위까지 혈관이 뻗어 나가는 것을 볼 수 있었다. 그러나 가미소암산을 일일 1 회씩 20 mg/kg씩 경구 투여한 백서의 각막에서는 혈관신생이 대조군에 비하여 확연히 억제됨을 알 수 있었다. 아울러 이미 혈관신생 억제제로 효능을 인정받고 있는 thalidomide를 투여한 양성대조군과 비교할 경우 큰 차이를 나타내지 않아 가미소암산의 혈관신생 억제효과를 인정할 수 있었다(Fig. 2).



Fig. 2. Inhibitory effects of Gamisoamsan on the neovascularization of rat cornea. Wistar 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 Gamisoamsan (B) and thalidomide (C).

각막 혈관신생 억제 정도를 측정하기 위하여 백서의 동공을 사진 촬영한 후 사진상에서 각막내에 생성된 혈관의 길이를 계수화한 결과, 물을 투여한 대조군의 경우 혈관신생의 길이가 4 mm 정도 형성되었으나, 가미소암산을 투여한 실험군의 경우 혈관신생은 2 mm 정도로 억제되는 것이 확인되었다. 또한 양성대조군으로 활용된 thalidomide 투여군에서도 혈관신생 억제 효과가 가미소암산 투여군과 비슷하게 관찰되어 가미소암산의 혈관신생 억제효과를 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

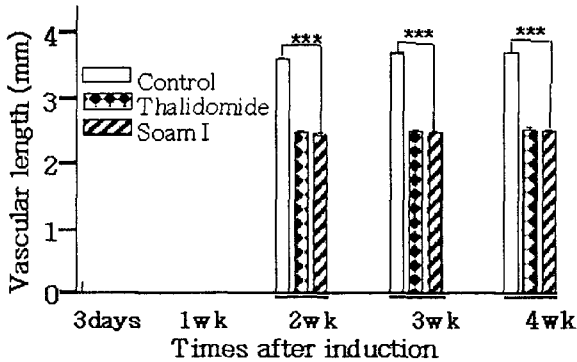


Fig. 3. Effects of Gamisoamsan on vascular length in rat cornea. Animals sutured with 10-0 nylon to produce corneal neovascularization were orally treated with herbal extracts (20 mg/kg body weight/day) or thalidomide (200 mg/kg body weight/day) for 4 weeks. The length of vascular extension from limbus was measured with triplicate for each cornea at various times. Results were expressed as mean \pm S.E. of 10 to 12 rats. *** : p<0.001 vs. control for each time.

3. HT1080세포에서의 세포 독성과 증식 억제 효과

가미소암산의 HT1080세포에 대한 세포 독성효과와 증식억제 효과를 기존의 항암제와 비교하기 위하여 VP-16 항암제를 이용하여 치료 후 24 시간 후에 MTS assay를 실시하였다. 그 결과, 가미소암산을 처리한 실험군의 IC50은 2.18 mg/ml로 나타났으며, 항암제 VP-16의 경우 IC50은 0.35 mg/ml인 것으로 나타났다. 아울러 HT1080세포에 대한 가미소암산의 세포 증식 억제효과를 관찰하기 위하여 각각의 IC50 용량인 가미소암산 2.18 mg/ml 과 항암제인 VP-16 0.35 mg/ml을 각각 처리하여 배양 2 시간 후와 24 시간 후에 현미경으로 형태학적인 관찰을 시도하였다. 그 결과, 각각의 치료 후 배양 2 시간 후에는 대조군과 비교하여 가미소암산과 VP-16는 HT1080의 증식을 억제하는 효과를 가지고 있었으며, 가미소암산이 더욱 증식을 억제하는 효과가 있음을 나타내었다(Fig. 4).

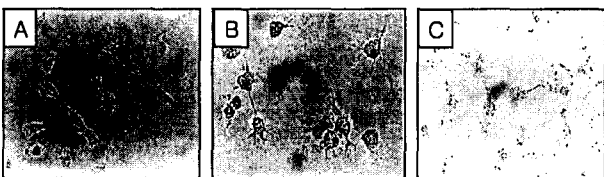


Fig. 4. HT1080 cells treated with Gamisoamsan or Vp-16 for 2h. The HT1080 cells were inoculated at a density of 10⁵ cells in 6 well plates and cultured in MEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin. When cells reached at 50% of confluence (normally after 24 h), medium was changed to fresh on contained with drug. A, control ; B, Gamisoamsan (2.18 mg/ml) ; C, VP-16 (0.35 mg/ml).

또한 배양 24 시간 후에도 2 시간 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. 5).

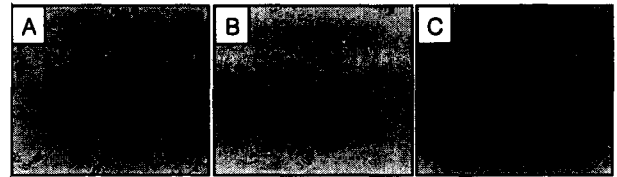


Fig. 5. HT1080 cells treated Gamisoamsan or VP-16 for 24 h. (A), control culture ; (B), 2.18 mg/ml of Gamisoamsan ; (C) 0.35 mg/ml of VP-16.

4. 혈관증식 관련 유전자 발현 억제 효과

VEGF(vascular endothelial growth factor)는 종양세포 뿐만 아니라 정상세포의 상피세포 등 각종 세포에서 발현하는데, VEGF는 몇몇의 세포종에서 낮은 효소의 조건하에서 유도되는 것으로 알려져 있으며¹⁵⁾, TGF- β (transforming growth factor- β)는 정상 상피세포에서 증식을 촉진시키는 인자로서 발견되어 현재 세포의 증식억제, 분화의 제어, 세포의 접착, 혈관신생의 제어, 면역억제 등의 다양한 작용을 가지는 사이토카인으로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁸⁾.

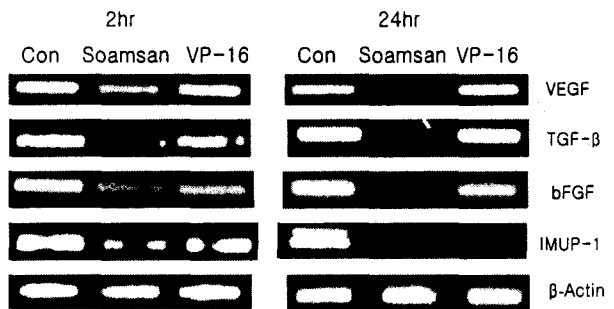


Fig. 6. RT-PCR about VEGF, TGF- β , bFGF, and IMUP-1 expression. When cells were reached at about 50% of confluence, medium was changed to the fresh one contained with Gamisoamsan of Vp-16, followed by further incubation for 2 hr of 24 hr. The cells were rinsed quickly in ice-cold PBS twice and RNA was isolated by using TRIzol Reagent (Molecular Research Center, Inc. USA) according to the manufacturers instructions. The first strand cDNA was synthesized using the Super ScriptTM 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 $^{\circ}$ C, followed by 30 cycles of denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 40 seconds, annealing at 55 $^{\circ}$ C for 40 seconds, and extension at 72 $^{\circ}$ C for 40 seconds. A final extension step was followed at 72 $^{\circ}$ C for 5 minutes and then run on 1% agarose gel (Gibco BRL). VEGF, TGF- β , bFGF, and IMUP-1 cDNAs are reduced by Gamisoamsan and VP-16. These results were represented by % when normalized to mRNA levels of actin, GSS : Gamisoamsan.

또한 FGF(fibroblast growth factor)의 경우 대뇌와 뇌하수엽체에 존재하는 섬유아세포의 DNA합성과 증식을 촉진시키는 물질로 분리되었으며, 특히 bFGF(basic fibroblast growth factor)는 강력한 혈관신생의 작용을 가지고 있다고 알려져 있으며¹⁹⁻²¹⁾, IMUP-1 (immortalization upregulated protein 1)은 HT1080세포에서 발견되었으며, 각종 암세포와 조직에서 특이적으로 발현 상승하는 것으로 알려져 있다²²⁾. 이에 가미소암산과 기존의 항암제

인 VP-16에 의한 혈관신생에 관여하는 각종 증식인자와 암세포에서 특이적으로 발현하는 유전자의 발현 변화를 알아보기 위하여 HT1080세포를 이용하여 RT-PCR로 확인하였다. 그 결과 가미소암산의 경우 배양 2시간 후 VEGF, TGF- β , 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- β , bFGF, IMUP-1의 발현을 억제시키는 것으로 나타났으며, VP-16에 비하여 가미소암산이 더욱 억제시키는 것으로 관찰되었다 (Fig. 6).

5. In vivo 에서 배양 암세포 증식 억제 효과

1) CT-26 암세포에 대한 증식 억제 효과

가미소암산의 암세포 증식 억제 효과를 조사하기 위하여 생쥐결장샘암종에서 유래한 CT-26 암세포에 대한 가미소암산의 성장억제 효과를 관찰하였다. 그 결과 가미소암산은 농도 의존적으로 CT-26 암세포의 성장을 억제하였으며, 특히 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최저 농도에서 유의한 억제 효과가 관찰되었다. 또한, CT-26세포 성장 억제에 대한 가미소암산의 IC50을 측정한 결과 16.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 평가되었다(Fig. 7).

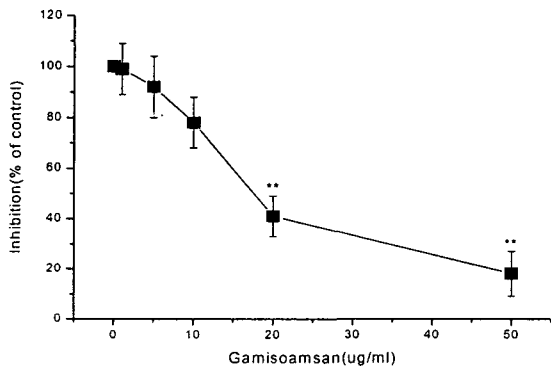


Fig. 7. Concentration-response of Gamisoamsan on the proliferation of cultured CT-26 cells. Cells were seed into 24-well plates with density of 1×10^6 cells/well and cultured with DMEM medium. Subconfluent cells were treated with several concentrations (1 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of Gamisoamsan for 24 hrs, and [^3H]thymidine was pulsed for the last 4 hrs of this period. Experiments were independently repeated 7 times with duplicate measurements for each sample. Results are expressed as mean \pm S.E. **p<0.01 vs. control cells without treatment.

2) 종양모델마우스의 혈액학적 변화

마우스 결장샘암종에서 유래한 CT-26 세포를 이용하여 종양 모델마우스를 만들고 in vivo상에서 암증식억제 효과를 관찰하기 위하여, 종양 이식 후 5일째부터 가미소암산 추출물 100, 200 및 500 mg/kg 용량으로 일일 일회 경구 투여하고, 이식 후 15일째에 복대정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈액중 헤모글로빈 함량, 적혈구 및 백혈구 수를 관찰하였다. 가미소암산 투여에 의한 CT-26 암세포 이식 마우스의 혈액학적 정상 변화에 대한 결과는 표 1과 같다. 종양세포의 이식에 의한 헤모글로빈 함량은 정상군

의 생쥐가 $13.2 \pm 0.16 \text{ g\%}$ 인데 반하여 $8.7 \pm 0.31 \text{ g\%}$ 로 현저하게 저하되는 것으로 나타났으며, 이러한 감소 현상이 가미소암산 200 mg/kg 투여군에서 11.5 ± 0.42 로 부분적으로 개선됨을 알 수 있었다. 또한, CT-26 암세포의 이식에 의하여 적혈구 수는 다소 감소되었으나 총 백혈구 수는 현저한 증가를 보였으며, 특히 종양 유발에 의하여 lymphocyte의 비율은 저하된 반면에 neutrophil은 현저한 증가 현상을 나타내었다. 이러한 종양이식에 의한 적혈구 및 백혈구 수의 변화는 가미소암산 200 mg/kg 투여군에서 다소 개선되는 결과를 관찰할 수 있었다.

Table 1. Effects of Gamisoamsan on hematological parameters in colon adenocarcinoma-bearing mice

	Normal control	Tumor control	Tumor-bearing Mice (mg/kg/day)		
			100	200	500
Hemoglobin(g%)	13.2 ± 0.16	8.7 ± 0.31	8.9 ± 0.36	11.5 ± 0.42	10.3 ± 0.43
Total RBC (cells/ml $\times 10^9$)	5.8 ± 0.12	3.4 ± 0.27	3.8 ± 0.21	4.6 ± 0.32	3.9 ± 0.51
Total WBC (cells/ml $\times 10^6$)	8.6 ± 0.27	23.2 ± 0.60	19.2 ± 0.97	13.6 ± 0.74	18.2 ± 0.84
Lymphocytes(%)	68.8 ± 1.67	32.4 ± 2.91	23.7 ± 0.54	45.1 ± 0.81	49.8 ± 0.72
Neutrophils (%)	28.7 ± 1.08	63.7 ± 3.85	74.7 ± 0.78	51.9 ± 0.76	48.2 ± 0.97
Monocytes (%)	2.5 ± 0.38	3.9 ± 0.27	1.6 ± 0.24	3.0 ± 0.34	2.0 ± 0.31

3) 종양모델마우스의 종양 용적에 미치는 영향

가미소암산의 암증식 억제 효과를 알아보기 위하여 CT-26 암세포 종양 이식 후 5일째부터 가미소암산 추출물 100, 200 및 500 mg/kg 용량으로 일일 일회 경구 투여하고, 이식 후 15일째에 복대정맥으로부터 혈액을 채취한 후 이식에 따른 종양의 용적을 측정하였다. 가미소암산 100 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 종양의 용적이 감소하였으나 유의성은 인정되지 않았고, 가미소암산 200 및 500 mg/kg 투여군에서는 통계학적인 유의성을 인정할 수 있을 정도의 암 증식 억제효과를 관찰할 수 있었다. 특히 가미소암산 200 mg/kg 투여군에서 더 우수한 암증식 억제효과가 관찰되었다(Fig. 8).

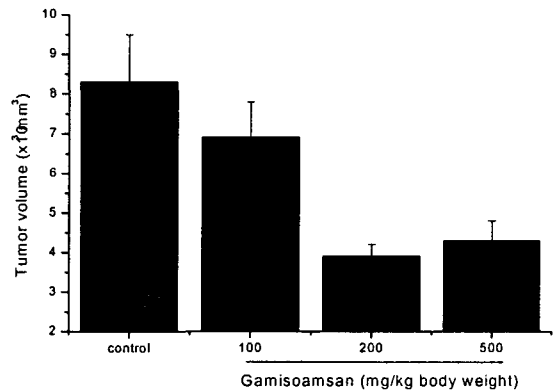


Fig. 8. Decrease of tumor volume by treatment of Gamisoamsan in CT-26 tumor-bearing mice. Tumor volume was measured at 15 days after inoculation of CT-26 cells, mouse colon adenocarcinoma. Results are expressed as mean \pm S.E. of 16 mice. *p<0.05, **p<0.01 vs. control mice.

4) 종양모델마우스의 생존을 변화

CT-26암세포가 이식된 종양모델마우스의 생존 기간을 측정하여 가미소암산의 생존 기간 연장 효과를 90일 동안 관찰하였다. 그 결과 median survival time은 대조군의 경우 39.4 ± 3.72 일로 나타났으며, 가미소암산 100 mg/kg 투여군에서는 44.2 ± 4.94 일, 가미소암산 200 mg/kg 투여군에서는 61.2 ± 6.36 일, 그리고 500 mg/kg 투여군에서는 52.7 ± 4.89 일로 나타나 가미소암산은 종양 이식 마우스의 생존을 현저하게 연장시키는 효과가 있을 알 수 있었다(Fig. 9).

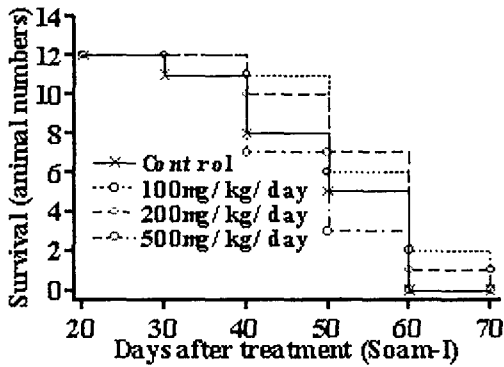


Fig. 9. Kaplan-Meier survival curves of CT-26 tumor-bearing mice. 1: control group, 2: experimental group by treatment of Gamisoamsan 100 mg/kg, 3: experimental group by treatment of Gamisoamsan 200 mg/kg, 4: experimental group by treatment of Gamisoamsan 500 mg/kg. n = 16 animals in each group.

고찰 및 결론

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 요인으로 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 병종이다¹²⁾. 암의 발생기전 및 종류는 매우 다양한데 비하여 아직까지도 그 치료법은 정상세포와 암세포를 선택적으로 명확히 구분하지 못하기 때문에 원인에 입각한 근본적인 대책보다는 결과를 수습하는 수준의 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등이 주가 되고 있다. 또한 기존의 항암제들은 암세포주에 대해 직접적인 살상을 목표로 하고 있기 때문에 세포독성 효과는 있지만 대부분 개체 저항력을 떨어뜨리는 부작용 등의 많은 문제점들을 나타내고 있어 근래에는 세포독성은 비록 약할 지라도 항암제와 병용 투여함으로써 항암성을 증가시키고 부작용을 줄일 수 있는 면역요법이나 apoptosis 촉진, 세포분화유도법, 혈관형성저해법 등과 관련한 연구가 활발히 진행중이다^{16, 23-25)}. 현대의학의 암 치료법으로서는 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등이 병행되고 있지만 소화장애, 간장장애, 탈모, 혈액학적 변화, 면역기능저하, 골수소혈장애, 생식기장애, 유전인자장애, 피부변화 및 폐섬유 등 그 외의 여러 가지 부작용을 고려할 때

부작용이 적은 한약재를 통하여 직접적으로 암세포를 공격하여 살상하는 항암활성이 뛰어난 약재를 검색하여 항암치료에 활용하는 것이 필요하다.

한의학적인 암에 대한 인식은 《영추·자질진사론》(靈樞·刺節眞邪論)에 “以手按之堅 有所結 … 日以益大 則爲骨疽”라 하여²⁶⁾ 골종(骨腫)과 유사하게 묘사를 한 것 외에도 장담(腸覃)·석하(石瘕)에 대한 서술이 있었으며, 소²⁷⁾는 《제병원후론》(諸病源候論)에서 징하(癥瘕)·석옹(石癰)·석저(石疽)에 대하여 언급하였다. 또한 여러 문헌에서는 응저(癰疽), 영류(癭瘤), 번화창(翻花瘡), 후비(喉痺), 일격(噎膈), 반위(反胃), 현벽(瘰癧), 혈고(血蠱), 유암(乳癥) 등으로 다양하게 명명하고 있으며 이들 대부분은 멍어리가 축지되는 과상(塊狀)에 따라 표현되고 있다²⁸⁻³¹⁾. 단일약물의 항암효과에 대한 실험적 보고로 김 등³²⁾은 인삼·녹용으로 항체생산억제에 대한 완화효과를, Odajima³³⁾는 인삼이, Sasaki³⁴⁾는 감초가, Tang 등³⁵⁾은 백출이, Moon 등³⁶⁾은 봉출이 각각 항암 효과가 있음을, 임³⁷⁾은 어성초·록혈·저령·천산갑 등이 강력한 항암효과가 있을 뿐 정상 면역세포에서는 독작용을 나타내지 않는다고 보고하였고, 박 등은³⁾ 유향이 혈액암세포에서 세포사멸유도효과가 있음을 보고하였다. 또한 방제의 항암효과에 대한 실험적 보고로 송 등³⁸⁾은 가미부정양음탕(加味扶正養陰湯)의 직접적인 항종양효과를, 송 등³⁹⁾은 가미삼령백출산(加味蔘苓白朮散) 용매분획의 항암효과를 보고하였다. 최근 김⁷⁸⁾은 소암산(消癌散)이 암전이 억제에 탁월한 효과가 있다고 보고하였다.

암의 가장 중요한 생물학적 특성의 하나는 침습과 전이(invasion & metastasis) 현상으로 종양세포가 원발부위에서 다른 부위로 이동하여 새로운 환경에서 적응, 증식하는 것으로, 암 조직과 같이 세포증식이 무한적으로 일어나는 경우 정상세포와 마찬가지로 암세포가 성장하고 확장하기 위하여 필수적으로 새로운 혈관이 신생되어야 하므로 암의 전이 억제를 위한 방편으로 근래 혈관형성억제제^{8,10,11)}에 대한 관심이 많이 고조되고 있다. 이러한 혈관신생의 유발은 미세조직의 저산소증(hypoxia)과 밀접한 관련이 있음이 밝혀졌으며, 저산소증에 의해 세포내 산소 분압을 유지하기 위한 다양한 세포반응들은 호흡증가, 혈관확장, 적혈구 생성증가, 그리고 gluconeogenesis의 감소, ATP생성 반응 감소등의 현상이 나타나게 되며 이러한 저산소증을 체내에서 가장 효과적으로 극복할 수 있는 방법이 혈관신생이다. 특히, 암 조직과 같이 세포증식이 무한적으로 일어나는 경우 공간적으로 세포의 수가 증가되어 암조직 내부에 존재하는 세포에 산소가 전달되기 위해서는 혈관신생이 반드시 일어나서 산소를 공급해 줘야 한다. 즉, 간암을 비롯한 초기 고형암의 성장은 암세포 자신이 분비하는 자가 성장인자에 의존하며 1-2 mm 이상의 크기로 성장한 암조직 내부는 저산소 상태에 이르게 된다. 이러한 상태에서 세포들의 대사과정을 바꾸거나, 저산소증에 대한 저항성을 획득하지 못한 많은 암세포들은 과사하거나 세포사멸로 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 관찰

되는 특징적 세포반응⁴⁰⁾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^{41,42)} 되었으며, bFGF의 전신 혹은 국소 주입(infusion)은 종양세포의 혈류량, 혈관의 밀도와 길이 그리고 혈관 형성을 증가시키는 것으로 보고²¹⁾되었다. 또한 암세포의 전이와 혈관신생에 대한 transforming growth factor- β (TGF- β)의 세포병리학적 역할¹⁶⁻¹⁸⁾도 잘 알려져 있으며, 혈관신생 억제제로 현재까지 보고된 물질로는 스테로이드, 항생제, 헤파린과 비스테로이드성 소염제, 항염제, collagenase inhibitor 등이 있으며 platelet factor IV, 방사선, 레이저 광응고술을 이용하여 혈전을 형성시켜 혈관을 퇴화시키는 광혈전술, retinoic acid, thalidomide 등이 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 한의학적 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』⁹⁾의 소암산을 기본방으로 황기·대황·현호색·목단피·천궁이 가미된 처방이다. 처방 내용 중 인삼·백출은 보기약물(補氣藥物)로 특히 中氣가 虛한 것을 補하고, 당귀는 補血·活血의 功效가 있어 血液循環을 촉진하며, 삼능은 파혈거어(破血祛瘀)의 작용으로 당귀와 함께 혈어(血瘀)로 인한 혈액장애를 개선시킨다. 또한 곤포, 해조를 다함께 소담연견(消痰軟堅)하는 작용이 있어 腫塊를 消失시키고 軟化시키는 效能이 있으며, 백질러는 性味가 辛散·苦泄한 약물로 肝氣의 울결(鬱結)을 疏散시키는 작용이 있어 氣를 疏通케 하여 瘀血을 공축하는 작용 뿐 만 아니라 거풍明目(祛風明目)·거풍지암(祛風止痒)하는 작용도 있다. 반지련과 백화사설초의 경우 청열해독약물(淸熱解毒藥物)로 청열(淸熱)·해독(解毒)·산어지혈(散瘀止血)·이수소종(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 혈림(血淋)·요로결석(尿路結石)·소변불리(小便不利)에 효과가 있어, 민간에서는 해바라기 줄기속을 물에 달여서 찻물 대신 常服하여 胃癌을 치료하였다는 보고가 있다⁹⁾. 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 것은 사열(邪熱)과 어혈을 제거하는 대황, 활혈하여 지통작용을 하는 현호색, 활혈하여 어혈을 제거하는 목단피, 활혈행기(活血行氣)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. 특히 소암산의 경우 항암효과 및 전이억제에 관련된 보고^{7,8)}가 있으며 또한 면역 체계에서 당단백질과 endotoxins의 혼합작용을 통한 항원특이 면역반응을 증가시킨다고 보고⁶⁾하였으며, 각각의 구성약물에 대한 많은 연구 결과가 있다. 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 각막실험에서 혈관신생 억제가 현저히 나타난다는 사실을 확인하였다. 가미소암산을 ml당 500 μ g으로 처리하였을 때 Fig. 1에서 보는 바와 같이 CAM assay에서의 혈관신생의 억제는 뚜렷하게 나타나는 것을 확인하였는데, CAM에서의 혈관신생은 발생단계에서 자연적으로 생성되기때문에 그 의미는 매우 크다고 볼 수 있다. 또한 랫트의 각막에서의 혈관신생 억제효과도 CAM assay에서의 억제효과 못지 않게 대조군과 뚜렷한 차이를 관찰할 수 있었다. 인위적으로 혈관신생을 유도하기 위하여 각막중상부위에 봉합수술을 실시하고 나면 수술 4주 후 각막의 혈관신생 생성은 최고조에 달하는데, 가미소암산을 200 mg/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 효과가 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, 세포외 기질(extracellular matrix)의 변화와 내피세포와의 상호작용, 혈관내피세포의 이동, 증식 및 분화 등의 과정을 거쳐 이루어지며, 각 과정에 여러 가지 혈관신생 관련인자들이 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^{19,21}). 또한 암세포의 전이와 혈관신생에 대한 transforming growth factor- β (TGF- β)의 세포병리학적 역할도 잘 알려져 있으며, IMUP-122) 경우 HT1080세포에서 발견되어, 각종 암세포와 조직에서 특이적으로 발현이 상승하는 것으로 알려져 있다²²). 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 IC50은 2.18 mg/ml로 나타났으며, 기존의 항암제로 활용되고 있는 VP-16의 경우 IC50은 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. 4, 5). 이에 가미소암산과 기존의 항암제인 VP-16에 의한 혈관신생에 관여하는 각종 증식인자의 발현 변화를 알아보기 위하여 HT1080세포를 이용하여 RT-PCR로 확인한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 가미소암산은 배양 2 시간 후와 배양 24 시간 후의 관련유전자들인 VEGF, TGF- β , 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 실험적인 결과들을 토대로 가미소암산이 항암제로 활용될 수 있을지의 가능성을 알아보기 위하여 종양이식모델마우스를 이용하여 혈액학적인 변화와 종양증식의 용적 변화 그리고 항암제로 이용될 수 있는 약물의 가치를 측정하는 데 있어서 여러 가지의 평가 방법 중 가장 신뢰할 수 있는 대표적인 예가 종양 이식 모델동물의 생존율 증가⁴¹)이므로, 결장샘암종세포인 CT-26 세포를 마우스에 이식하여 종양이식마우스 모델을 작출하고 이를 이용하여 가미소암산 투여에 의한 종양이식마우스의 생존율을 측정하였다. 우선 가미소암산이 결장샘암종세포인 CT-26 세포 증식억제 효과를 *in vitro*에서 관찰한 결과, 가미소암산은 암세포의 증식을 농도 의존적으로 억제하였으며(Fig. 7), 암세포 성장에 대한 억제 효과는 비교적 저농도의 가미소암산 처리에 의해서도 일어나는 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과는 가미소암산이 암세포 증식에 대하여 강력한 억제 작용을 가지고 있다는 것을 시사하는 것이라 할 수 있다. 아울러 마우스 결장샘암종 유래의 CT-26 암세포를 이식한 질환동물은 고칼슘혈증(hypercalcemia)을 비롯한 여러 가지의 병리학적 이상을 초래하

는 종양모델동물로 알려져^{43,44})있으며, CT-26 암세포의 피하주사는 암세포의 전신 순환으로 이어지고 이러한 결과로 인해 이식 후 10-14 일 경에 골(bone)을 비롯한 다른 장기에 강한 전이가 일어난다고 증명되어 있다⁴⁵).

본 연구에서는 CT-26 암세포 이식 후 10 일째에 육안적 관찰이 가능할 정도로 종양의 결절 형성을 관찰할 수 있었으며, 이러한 결과는 Morony 등⁴⁵)의 결과와 일치하는 것으로 나타났으며, 본 연구에서는 CT-26 암세포의 명확한 폐 전이를 관찰할 수 있었는데, 이러한 CT-26 암세포의 폐 전이가 가미소암산의 투여에 의하여 현저하게 저하되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 연구에 사용된 종양 모델동물은 가미소암산의 항암 효과를 증명하기에 적합한 질환 모델동물이라 할 수 있을 것이다. 암 치료를 위해 주로 사용되고 있는 화학요법(chemotherapy)에 의하여 가장 빈번히 일어나는 부작용의 하나는 빈혈(anemia) 및 골수억제(myelosuppression)로 알려져 있으므로⁴⁶), 가미소암산의 투여에 의하여 일어날 수 있는 혈액학적 부작용(악화)을 관찰한 결과 문제가 없음을 알 수 있었고, 이에 반하여 헤모글로빈 함량, 적혈구 및 백혈구 수의 개선 효과를 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 종양 이식 질환동물에서 일어나는 혈액학적 변화는 종양의 진행 정도를 평가하는 지표로 작용할 수 있기 때문에 결장샘암 종이식에 대한 가미소암산의 약리학적 항암작용을 시사하는 것이라 할 수 있다. 또한 가미소암산은 종양 이식모델동물의 종양 용적의 감소와 생존율 증가를 200 mg/kg 정도의 중등도의 투여군에서 최고의 효과를 나타내어 혈액학적 개선 효과와 유사한 양상으로 관찰되었다. 이러한 가미소암산의 고용량(500 mg/kg) 투여군에서 나타난 혈액학적 개선 효과와 생존율 증가 현상이 중등도의 가미소암산 200 mg/kg 투여군의 것보다 미약한 결과를 보였다는 것은 가미소암산 자체가 가지고 있는 독성이나 아니면 다른 약리·독성학적 작용에 의한 것으로 사료되며, 이를 규명하기 위한 보다 구체적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과들을 종합하여 보면 가미소암산은 CAM assay와 각막실험에서 혈관신생 억제효과가 현저히 나타난다는 사실이 확인되었고, 결장샘암종의 이식마우스에서의 증식과 전이를 억제하는 항암 효과를 확인하였다. 이러한 가미소암산의 약리학적 작용은 혈관신생 기전이나 세포 성장인자 발현의 조절을 통하여 일어나는 것으로 사료된다.

감사의 글

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

참고문헌

1. 문구, 정병화, 김병주: 암동서의결합치료1 : 원광대학교출판국. pp. 253-303, 383-460, 1999.
2. 대한병리학회 : 병리학 서울 교문사 pp. 223-224, 1997.
3. 박래길, 오광록, 이광규, 문연자, 김정훈, 우원홍 : 유항물추출

- 물의 HL-60 혈액암세포에서 세포사멸유도효과, 약학회지, 45:161-168, 2001.
4. 김태영, 김대근, 전병훈, 정우열, 우원홍. 활혈화어약물의 항암활성에 대한 연구, 동의생리병리학회지, 15(2):356-360, 2001.
 5. 우원홍, 이승연, 김용수, 백은경, 정영목, 정우열. '活血化痰'의 동서의학적 이해, 동의생리병리학회지 15(6):833-836, 2001.
 6. 우원홍, 김용수, 전병훈, 정우열 : 활혈화어법을 응용한 한방항암처방 개발에 관한 연구, 동의생리병리학회지, 16(3):409-420, 2002.
 7. 주성민, 양휘훈, 우원홍, 정우열, 조원준, 이기영, 전병훈, 김원신. 消癌散의 경구투여에 의한 마우스 B16 흑색종 세포의 폐전이에 대한 항전이 효과, 동의생리병리학회지 15(6):1006-1010, 2001.
 8. 김용수 : 소암산의 혈관신생억제 및 B16 흑색종세포의 폐전이 억제 효과, 원광 대학교 대학원, 2002.
 9. 동의치료경험집성편찬위원회 : 동의치료경험집성(제7권), 서울, 해동의학사, p.387, 1997.
 10. 이동훈, 김동희, 강인철, 박영미, 송규용, 김성훈 : 가미저당탕의 항암 및 항전이효과에 관한 연구, 동의생리병리학회지, 16(3):472-478, 2002.
 11. 송호철, 길재호, 김성훈 : 가미삼령백출산 용매 분획의 항전이 및 항암활성에 대한 연구, 동의생리병리학회지, 15(6):927-935, 2001.
 12. Shin BA, Ahn KY, Kook H, Koh JT, Kang IC, Lee HC and Kim KK : Overexpressed human RAD50 exhibits cell death in a p21WAF1/CIP1- dependent manner: its potential utility in local gene therapy of tumor. Cell Growth Differ, 12(5):243-254, 2001.
 13. Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, Richard L, Riccardi L, Lawler J and Detmar M : Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinoma. Am J Pathol, 155(2):441-452, 1999.
 14. Gupta M, Mazumdar UK, Rath N and Mukhopadhyay DK : Antitumor activity of methanolic extract of Cassia fistula L. seed against Ehrlich ascites carcinoma. J Ethnopharmacol, 72(1-2):151-156, 2000.
 15. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E : Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature, 359(6398):843-845, 1992.
 16. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A : TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. Nat Genet, 29(2):117-129, 2001.
 17. Muraoka RS, Dumont N, Ritter CA, Dugger TC, Brantly DM, Chen J, Easterly E, Roebuck LR, Ryan S, Gotwals PJ, Kotliansky V, Arteaga CL : Blockade of TGF-β inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. J Clin Invest, 109(12):1551-1559, 2002.
 18. Wakefield LM, Roberts AB : TGF-β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. Curr Opin Genet Dev, 12(1):22-29, 2002.
 19. Song S, Wientjes MG, Gan Y, Au JL : Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. Proc Natl Acad Sci USA, 97(15):8658-8663, 2000.
 20. Shaulian E, Resnitzky D, Shifman O, Blandino G, Amsterdam A, Yayon A, Oren M : Induction of Mdm2 and enhancement of cell survival by bFGF. Oncogene, 15(22):2717-2725, 1997.
 21. Davies MM, Burke D, Carnochan P, Glover C, Kaur S, Allen-Mersh TG : Basic fibroblast growth factor infusion increases tumour vascularity, blood flow and chemotherapy uptake. Acta Oncol, 41(1):84-90, 2002.
 22. Kim JK, Ryll R, Ishizuka Y, Kato S : Identification of cDNAs encoding two novel nuclear proteins, IMUP-1 and IMUP-2, upregulated in SV40-immortalized human fibroblasts. Gene, 257(2):327-334, 2000.
 23. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR : Cell death: the significance of cell death. Int Rev Cytol, 68:251-306, 1980.
 24. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ : Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. Pathol Annu, 17:229- 259, 1982.
 25. Im SY, Han SJ, Ko HM, Choi JH, Chun SB, Lee DG, Ha TY, and Lee HK : Involvement of nuclear factor-kappa B in platelet-activating factor- mediated tumor necrosis factor-alpha expression. Eur J Immunol, 27(11): 2800-2804. 1997.
 26. 楊維傑 : 黃帝內經靈樞經釋, 서울, 成輔社, p549, 1980.
 27. 巢元方 : 巢氏諸病源候論. 臺中. 昭人出版社. p.370, 1960.
 28. 李岩 : 腫瘤學. 北京. 人民衛生出版社. pp.2-5. 1985.
 29. 李岩 : 腫瘤臨證備要. 北京. 人民衛生出版社. pp.11-26. 1983.
 30. 葉銘洪 : 治癌中藥及處方. 臺北. 華聯出版社. pp.4-10,48-50, 282-283. 1981.
 31. 黃文東 外 : 實用中醫內科學. 上海.上海科學技術出版社. pp.486-496, 621-623, 627-631, 634. 1988.
 32. 金光湖 外 : 水腫 漢藥材가 抗癌劑 및 Glucocorticoid의 抗體 生産抑制作用에 미치는 影響, 趙永植 博士 華甲紀念論文集, pp.1041-1050, 1981.
 33. Odajima Yoshio : Effects of Ginseng on cancer cell, Yakuyo Ninjin sono Kenkyu to Shinpo, pp.198-209, 1981.
 34. Sasaki S. : Antitumor agents from medical plants. Jpn. Kokai Tokyo koho Jp. p.58, 118, 820, 1983.
 35. Tang D, Hao Y, Liu Z : Miao, Shulin, Wei, Hua, Wu, Jian : Constituents of the essential oil from rhizome of *Attactylodes macrocephala* produced in pingjiang (China)

- and their antitumor effects. *Yaoxue Tongbao*, 19(9):555-558, 1984.
36. Moon CK, Lee BG, Lee SW and Kang TL : Effect of antitumor polysaccharides from *Albizia julibrissin* on Immune function, *Arch Pharmacol Res*, 8(4):277-282, 1985.
37. 임재훈 : 수종의 한약물이 암세포 감수성에 미치는 영향, 경희한의대논문집, Vol.9. pp.242-266, 1986.
38. 송민호, 김성훈, 김동희 : 加味扶正養陰湯의 항암활성에 관한 연구(1), 동의생리병리학회지, 15(3):396-402, 2001.
39. 송호철, 김성훈 : 加味參苓白朮散 hexane분획의 抗轉移 및 혈관형성억제작용에 대한 연구, 동의생리병리학회지, 15(6): 967-974, 2001.
40. Hanahan D. and Folkman J : Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86:353-364. 1996.
41. Claffey KP, Brown LF, Aguila LF, Tognazzi K, Yeo KT, Manseau EJ and Dvorak HF : Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis and experimental metastasis. *Cancer Res*, 56(1):172-181, 1996.
42. Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G, Soroceanu L, Heike Y, Gillespie GY, Siegal GP, Mao X, Bett AJ, Huckle WR, Thomas KA and Curiel DT : Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(15):8795-8800, 1998.
43. Capparelli C, Kostenuik PJ, Morony S, Starnes C, Weimann B, Van G, Scully S, Qi M, Lacey DL and Dunstan CR : Osteoprotegerin prevents and reverses hypercalcemia in a murine model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res*, 60(4); 783-787, 2000.
44. Strassmann G, Jacob CO, Fong M and Bertolini DR : Mechanism of paraneoplastic syndromes of colon-26: involvement of interleukin 6 in hypercalcemia. *Cytokine*, 5(5):463-468, 1993.
45. Morony S, Capparelli C, Sarosi I, Lacey DL, Dunstan CR and Kostenuik PJ : Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res*, 61(11):4432-4436, 2001.