생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
35(2) : 110 ~ 115 (2004)

국내산 백화사설초 전초와 뿌리의 항암효과

이효정 · 이은옥 · 이연희 · 김관현 · 이재호 · 백남인[1] · 나정찬[2] · 김성훈*
경희대학교 동서의학 대학원 종양학 실험실, [1]경희대학교 생명공학연구원, [2]RNL생명과학(주)

Anti-tumor activity of Korean Oldenlandiae Herba and Radix

Hyo-Jeong Lee, Eun-Ok Lee, Yun-Hee Rhee, Kwan-Hyun Kim, Jae-Ho Lee, Nam-In Baek[1], Jeong-Chan Ra[2], and Sung-Hoon Kim*

Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University, 1 Seochunri, Kiheungeup, Yongin 449-701, South Korea
[1]School of Biotechnology and Plant Metabolism Research Center, KyungHee University, 1 Seochunri, Kiheungeup, Yongin 449-701, South Korea, [2]RNL Life Science Ltd.

Abstract – For the evaluation of anti-tumor activity of Korean Oldenlandia Herb (KOH) and Radix (KOR), our experiment was performed with methanol extracts of KOH and KOR. They did not shown any cytotoxicity against HT1080 cell lines. However, they effectively showed anti-metastatic activity through inhibition of the adhesion of HT1080 cells to gelatin, downregulated the expression of MMP2 and uPA and upregulated the expression of TIMP2. They also inhibited tube formation of HUVECs induced by bFGF. However, they did not affect DNA topoisomerase I activity. Simiarly, the T/Cs % in KOH and KOR treated mice were increased 134.9% and 171%, respectively at 2500 mg/kg. These results suggest that KOH and KOR exert anti-tumor activity *via* anti-metastatic and anti-angiogenic activities. The further study for isolation of effective compounds and its exact mechanism and comparative study with Chinese Oldenlandia Herba will be required.

Key words – Korean, Oldenlandia diffusa, Herba, Radix, anti-tumor, adhesion, tube formation, uPA, MMP2, TIMP2, S-180

서 론

식물은 항암작용을 갖는 물질의 좋은 자원이며, 여러 가지 항암 물질들이 식물에서 분리되었다.[1)] Epigallocathechin-3-gallate, resveratrol, lycopene 등은 각각 green tea, grape, tomatoe에서 분리되었고,[1)] 특히 항암제로 사용되고 있는 taxol, etoposide, camptothecin은 Pacific yew (*Taxus brevifolia*),[2)] mayapple (*Podophyllum peltatum*),[3,4)] camptotheca (*Camptotheca acuminate*)[5)]에서 분리되었다. 백화사설초는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 1년생 초본인 백운풀 [Oldenlandia diffusa (Willd.) Roxb. (=Hedyotis diffusa Willd.)]의 전초로서 꽃의 빛깔이 희고 잎 모양이 뱀의 혀를 닮았다 해서 붙여진 이름이며, 중국의 복건성이 원산지이지만 우리나라에서는 전남의 백운산, 제주도에 자생하고 있고, 최근 진주에서 재배하고 있다.[6,7)] 면역반응의 항체 생성 증가,[8)] 항균, 淸熱, 祛瘀, 해독작용[9-11)] 등의 약리작용을 갖고 있으며, 염증질환이나, 간암, 직장암, 위암 등의 각종 암 질환 치료제[9-11)]로 최근 중국에서 널리 연구되는 약초이다. 또한 cervical carcinoma 14, S-180 및 간암주에 대해 항종양효과가 있다고 보고되고 있으며,[12,13)] 백화사설초의 항암물질 연구가 많이 이뤄지고 있다.[13,14)] 그러나 대부분이 중국산 백화사설초를 이용한 연구이며, 더욱 백화사설초의 뿌리 연구는 전혀 이루어지지 않았다. 최근 국내에서도 백화사설초를 제주도, 진주 및 무주에서 재배하고 있는 바, 효능 검색을 통해 향후 농민의 수익 증대를 위한 재배 약초가 가능한지를 평가하기 위한 일환으로 본 연구에서는 국내산 백화사설초의 전초 (KOH)와 뿌리 (KOR)를 이용하여 다양한 항암효과를 평가하여 유의한 결과를 보고하는 바이다.

*교신저자(E-mail) : sungkim7@khu.ac.kr
(FAX) : 031-204-2730

재료 및 방법

실험약재 – KOH (GSM-20031103-1)와 KOR (GSM-20031103-2)는 진주의 대도농산에서 공급받았으며, powder 1 kg씩을 상온에서 100% 메탄올 10 *l*에 담가 3회 추출하였

으며, 추출물은 filter paper로 여과하여 rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압 농축한 후 분말(Yield : KOH-3.65%, KOR-0.84%)을 얻었다.

Thin layer chromatography – CO (Chinese Oldenlandia; 중국산 백화사설초), KOH, KOR의 메탄올 추출물에 대한 구성 성분 비교를 위해 silica gel이 도포된 plate에 loading 후 mobile solvent로 $CHCl_3$: MeOH 비율을 조절하여 TLC chamber에서 전개시켰으며, 이에 대한 UV 흡광도를 측정하였고, 10% 황산에 발색하였다.

세포배양 – 암세포주인 HT1080 세포(ATCC, CRL-12011)는 L-gulutamine이 포함된 RPMI 1640 배지에 56°C 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 fetal bovine serum을 10% 혼합하고, 1% 항생제(antibiotics)와 $NaHCO_3$ 2 g을 첨가하여 제조된 배지에서 배양하였다. 정상 혈관 내피 세포인 human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)은 삼성 산부인과에서 공급받아 primary culture한 것을 0.1% gelatine이 coating된 plate에서 3 ng/m*l* bFGF, 5 unit/m*l* heparin, antibiotics가 첨가된 M199 배지에서 배양하였다. 모든 세포는 5% CO_2, 37°C 배양기에서 배양하였고, 암세포의 계대는 2 – 3일에 1회씩 하였으며, monolayer 암주를 부착면으로부터 분리하기 위하여 phosphate buffered saline 용액에 0.25% trypsin과 EDTA를 녹인 용액을 사용하였다.

세포독성 실험 – MTT 방법[15]을 이용하여 KOH와 KOR의 메탄올 추출물의 세포 독성을 측정하였다. HT1080 세포를 1×10^4가 되도록 하여 96 well plate에서 24시간 배양한 후 serum free 배양액에 메탄올 추출물을 여러 농도로 희석하여 100 μ*l*씩 처리하였다. 이를 24시간 배양 후 MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/ml) 용액 10 μ*l*씩 넣고 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 plate에서 MTT 용액을 제거하고, 형성된 formazan을 DMSO 100 μ*l*로 용해시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

암세포 부착저지 실험[16] – Gelatin (0.1%)이 coating된 plate의 각 well에 HT1080 세포 (1×10^6/well)를 KOH와 KOR와 함께 처리한 다음 37°C 배양기에서 대조군 세포들이 붙을 때까지 배양하였다. 세포를 phosphate buffered saline로 조심스럽게 세척하고 MTT법[15]으로 well에 붙어있는 세포를 염색한 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 약재의 세포부착저지 활성은 대조군의 OD값과 비교하여 계산하였다.

Tube formation assay – Grant *et al.* (1992)방법[17]에 의거하여 24 well plate에 matrigel (Bekton dickinson, U.S.A.) 200 μ*l*를 첨가하고 37°C에서 30분간 incubation하여 matrigel을 굳혔다. 양성 대조군으로 M199 media에 5 ng/m*l* 의 basic fibroblast growth factor (bFGF)를 첨가한 배지를 사용하였으며, 이와 같은 배지에 KOH와 KOR를 희석하여 각 well에 농도별로 첨가한 후 HUVECs을 well당 4×10^4으로 균일하게 seeding하였다. 37°C, 5% CO_2 조건으로 6시간 동안 배양하고 형성된 tube network를 사진 촬영하여 대조군과 비교하였다. 음성대조군에는 bFGF를 첨가하지 않았다.

RT-PCR analysis for uPA, MMP2, and TIMP2 – HT1080 세포를 well 당 5×10^5로 seeding하여 5% CO_2, 37°C의 조건에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 KOH와 KOR를 농도별로 처리하였으며 24시간 후에 세포를 수거하여 Trizol Reagent를 이용한 방법으로 RNA를 추출하였다. Total RNA 1 μg에 oligo (dT)와 MMLV reverse trandcriptase를 첨가하여 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 99°C에서 5분간 RT-PCR analysis로 cDNA를 합성하였다. 이에 합성된 cDNA에 uPA, MMP2, TIMP2 각각의 primer (Table I)를 첨가하여 94°C 30초, 59°C 30초, 72°C 30초의 패턴으로 30회 반복한 후 72°C에서 5분간 PCR을 수행하였다. PCR산물을 agarose gel에서 전기영동한 후 UV하에서 각각의 band를 확인하였다.

DNA topoisomerase I assay – 실험에 사용된 DNA topoisomerase I은 calf thymus에서 유래된 것이며, super-coiled pBR322 DNA는 *E. coli* 600의 것을 사용하였다. 또

Table I. Primer sequence of GAPDH, uPA, TIMP2, and MMP2

Gene	Direction	Sequences	Size
GAPDH	S	5'-GTGGATATTGTTGCCATCA-3'	700 bp
	AS	5'-ACTCATACAGCACCTCAG-3'	
uPA	S	5'-CTGCCTGCCCTGGAACTCTG-3'	477 bp
	AS	5'-CCTTGCGTGTTGGAGTTAAG-3'	
TIMP2	S	5'-TGCAGCTGCTCCCCGGTGCAC-3'	581 bp
	AS	5'-TTATGGGTCCTCGATGTCGAG-3'	
MMP2	S	5'-TAGGCTTCTGCCCTGAGAC-3'	970 bp
	AS	5'-TCCAAACTTCACGCTCTTCA-3'	

한 DNA topoisomerase I의 IC_{50} 값을 결정하기 위해 relaxation assay를 실시하였다. 35 mM Tris-HCl (pH 8.0), 72 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM dithiothreitol, 5 mM spermidine, 0.01% bovine serum albumin을 함유하는 용액에 0.5 μg pBR 322 supercoiled DNA와 효소만 가하여 총 반응액을 20 μl가 되게 한 것을 대조군으로 하고, 0.5 μg pBR 322 DNA와 효소와 KOH와 KOR를 가하여 총 반응액이 20 μl되게 한 것을 실험군으로 하여 이들을 37°C에서 30분간 배양하였다. 반응은 2% sodium dodecyl sulfate, 20% glycerol 및 0.05% bromophenol blue를 포함하는 반응종결액 5 μl를 첨가하여 반응을 종결시키고 이를 TBE running buffer (50 mM Tris base, 50 mM boric acid, 2.5 mM EDTA)로 전기영동을 한 후 agarose gel을 0.5 μg/ml의 ethidium bromide용액에서 염색하여, 자외선하에서 사진을 찍었다.

S-180 암세포에 대한 생존비 측정[18] – ICR 마우스의 복강내에서 7일간 배양된 sarcoma 180 (S-180) 세포를 복수와 함께 취하여 멸균된 냉생리식염수를 가하여 원심분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포를 냉멸균 생리식염수에 부유시켜 다시 원심분리하여 상층액을 제거한 후 혼재된 적혈구를 용혈시키고 S-180 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 3회 세척한 후 hemacytometer로 1×10^7 cell/ml의 농도가 되도록 세포 부유액을 만들고 이 부유액을 0.1 ml씩 복강내에 이식하였다. 이식 후 24시간부터 각 군당 7마리씩 배정하였다. KOH와 KOR (1250 mg/kg, 2500 mg/kg)는 생리식염수로 용해시켜 만든 후 4°C에 보존하였으며 0.2 ml씩 일주일간 연속 투여하였으며 대조군에는 동량의 생리식염수액을 투여하였다. 생존비 (T/C%)는 미국립 암연구소 protocol[19]에 언급된 식에 따라 계산하였다.

결과 및 고찰

백화사설초 중국산, 국내산 전초, 국내산 뿌리 메탄올 추출물의 TLC profile – CO (중국산 백화사설초), KOH, KOR 메탄올 추출물을 용매의 조건을 달리하여 TLC패턴을 확인하였다. Fig. 1의 TLC에서 보면, KOR의 연두색으로 발색된 성분이 CO나 KOH에 비해 다른 특이 성분으로 보여지며, 마찬가지로 CO의 경우 KOH나 KOR에서 보여지지 않는 성분이 포함되어 있음을 알 수 있었다. 특히 KOH에서 분홍색 성분인 ursolic acid의 함량이 가장 높은 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1). 위와 같이 동종임에도 불구하고 지역별, 약용 부위별로 성분의 차이가 나타남을 알 수 있었다. 같은 성분이라 할지라도 그 성분의 함량 차이를 확인할 수 있는데, 이로부터 항암활성이 달라질 수 있으리라 사료된다.

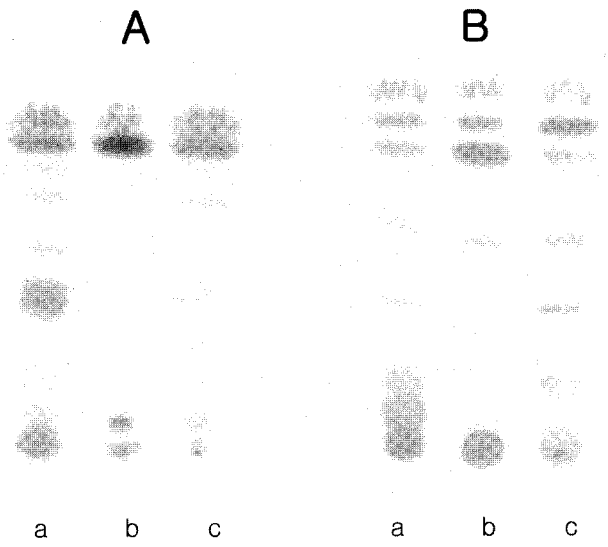

Fig. 1. Thin layer chromatography of methanol extracts of *Oldenlandia diffusa*. Mobile solvent (A) $CHCl_3$: MeOH = 3:1, (B) $CHCl_3$: MeOH = 7:1, a : CO, b : KOH, c: KOR.

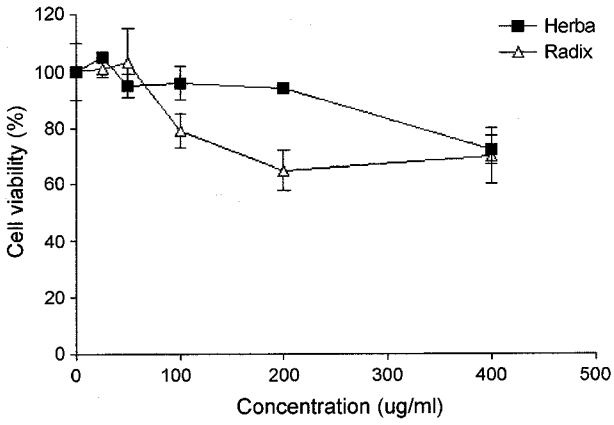

Fig. 2. Cytotoxic effect of methanol extracts of Korean *Oldenlandia diffusa* on HT1080 cells.

세포독성 효과 – 암세포주에 대한 세포 독성은 항암성을 평가하는데 가장 기반이 되는 실험으로 약재의 독성을 검증하여 항암 실험에 대한 방향을 설정하게 해줄 수 있다. 본 실험에서 HT1080에 대한 세포 독성 실험을 한 결과 KOH와 KOR 모두 유의한 독성을 나타내지 않았다(Fig. 2).

암세포 부착저지 효과 – KOH와 KOR의 암세포 부착저지 효과를 측정하였던 바, 농도가 증가할수록 HT1080 세포의 부착을 저지하는 효과를 나타내었고 KOH와 KOR의 400 μg/ml 농도에서는 각각 32.6%, 37.0%의 높은 부착 저지효과를 보였다(Fig. 3). 이는 KOH와 KOR는 암세포가 세포기질에 부착하는 것을 저해함으로써 전이를 억제할 가능성을 시사하고 있다.

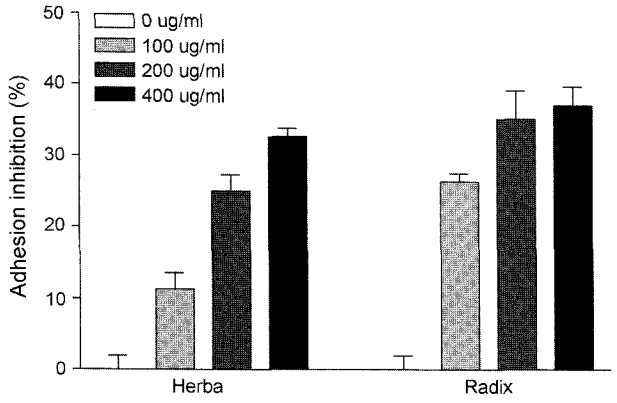

Fig. 3. Effect of methanol extracts of Korean *Oldenlandia diffusa* on the adhesion of HT1080 cells to gelatin.

혈관형성 억제 효과 – 전이에 있어서 혈관은 중요한 통로를 제공하며 종양조직내로의 혈관신생을 억제하는 것은 전이를 효율적으로 억제할 수 있으며 암의 성장도 막을 수 있다. 암조직은 자신들의 생존을 위해 혈관으로부터 산소와 영양분을 공급받으므로써 반드시 성장에 신생 혈관의 형성(angiogenesis)이 필요하며, 혈관형성 없이는 암조직은 1–2 mm 이상 성장할 수 없다.[20-24] 신생혈관형성(angiogenesis)이란 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 형성되는 과정으로써 혈관형성의 inhibitor (thrombospondin-1, angiostatin, endostatin etc.)와 activator (VEGF, bFGF, EGF etc.)의 균형에 의해 조절되고, embryonic development, reproduction과 상처치유의 과정에서 나타난다.[26-29] 신생혈관형성은 activator의 자극을 받은 다음 endotherial cell activation, migration, proliferation, tube formation, extracellular matrix (ECM) remodeling과 vascular stabilization의 순으로 일어난다.[28,29] Angiostatin과 endostatin을 투여하여 쥐에 유발된 종양의 성장이 억제되었다는 발표가 있은 후로 신생혈관형성의 억제가 종양의 새로운 치료방법으로 부각되었다.[30,31] 본 실험에서는 bFGF로 유도된 HUVECs의 tube formation assay에서 대조군에서는 tube가 많이 형성된 것에 반하여 KOH와 KOR를 처리한 군에서는 모든 농도에서 음성대조군과 같이 tube 형성을 저해하였다(Fig. 4). 이는 KOH와 KOR가 혈관형성을 차단시킴으로써 암의 성장을 억제할 것으로 추측되어진다.

uPA, MMP2, and TIMP2 발현 – TIMPs는 MMPs의 활성을 조절하고, MMPs 중 MMP2와 MMP9은 type IV collagen을 분해함으로써 basement membranes을 뚫고 침윤을 도와줌으로써 암의 전이를 용이하게 한다.[25] KOH와 KOR의 항암활성효과 중 항전이 실험으로 세포 외 기질 분해 효소인 uPA, MMP2, 그것의 억제인자인 TIMP2의 mRNA발현을 보았다. KOH는 세포 외 기질 분해효소인 MMP2의 발현을 200 μg/ml에서부터 400 μg/ml까지 억제하는 효과를 나타냄을 확인하였으나, uPA와 TIMP2의 발현에서는 변화가 없었다. KOR는 세포 외 기질분해효소 중 하나인 uPA와 MMP2의 발현이 대조군에 비해 감소시킴을 확인할 수 있었으며, TIMP2의 발현을 증가시킴을 알 수 있었다(Fig. 5). 이로써 KOH와 KOR는 전이에 관여하는 인자인 MMP2의 발현을 저해함으로써 전이억제 효과를 나타낼 가능성을 보여주었다.

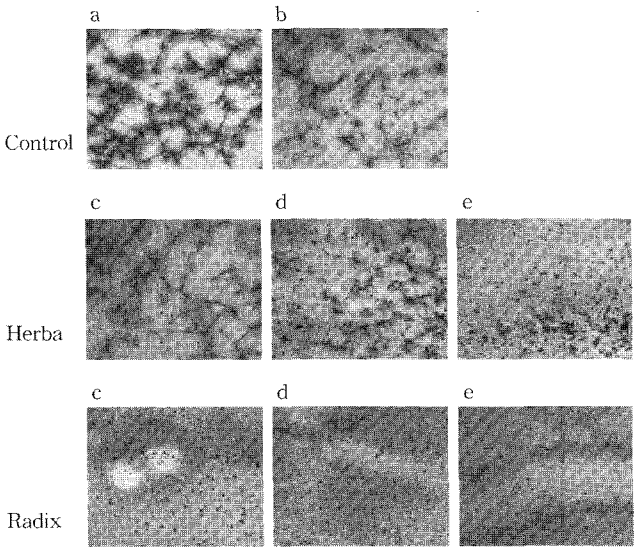

Fig. 4. Effect of methanol extracts of Korean *Oldenlandia diffusa* on tube formation of HUVECs in matrigel. a : (+) bFGF, b : (–) bFGF, c : 100 μg/ml, d : 200 μg/ml, e : 400 μg/ml.

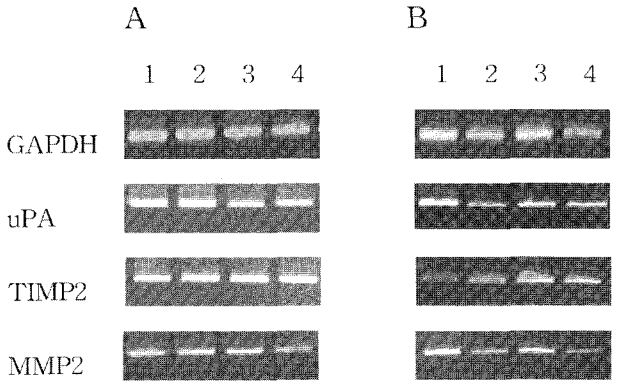

Fig. 5. Effect of methanol extracts of Korean *Oldenlandia diffusa* on the expressions of uPA, TIMP2, and MMP2 mRNA in HT1080 cells by RT-PCR analysis. A : Herba, B : Radix, Lane 1 : Control, Lane 2 : 100 μg/ml, Lane 3 : 200 μg/ml, Lane 4 : 400 μg/ml.

DNA topoisomerase I assay – DNA의 synthesis에 작용을 하여 세포의 증식을 억제하는 효능을 가지고 있는지의 여부를 확인하고자 DNA Topoisomerase I assay를 실행한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 DNA만을 처리한 실험

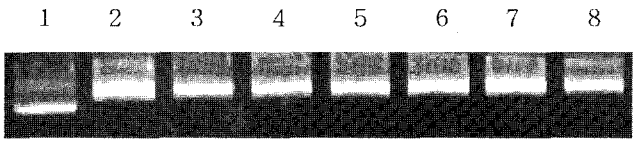

Fig. 6. Effect of methanol extracts of Korean *Oldenlandia diffusa* on DNA Topoisomerase I. Lane 1 : DNA only, Lane 2 : DNA+TOPO I, Lane 3 : Herba 100 μg/ml + TOPO I, Lane 4 : Herba 200 μg/ml + TOPO I, Lane 5 : Herba 400 μg/ml + TOPO I, Lane 6 : Radix 100 μg/ml + TOPO I, Lane 7 : Radix 200 μg/ml + TOPO I, Lane 8 : Radix 400 μg/ml + TOPO I.

Table II. Effect of methanol extracts of Korean *Oldenlandiae diffusa* on mean span time (MST) and T/C % in S-180 bearing ICR mice

Group	No. of animals	MST (day)	T/C (%)
Control	7	8.3	100
Herba 1250 mg/kg	7	10.6	127.7
Herba 2500 mg/kg	7	11.2	134.9
Radix 1250 mg/kg	7	10.6	127.7
Radix 2500 mg/kg	7	14.2	171

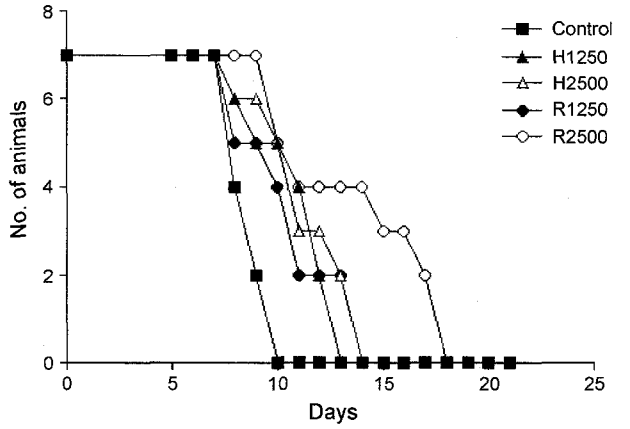

Fig. 7. Effect of methanol extracts of Korean *Oldenlandiae diffusa* on the survival of S-180 tumor bearing ICR mice. H : Herba, R : Radix, 1250 : 1250 mg/kg, 2500 : 2500 mg/kg.

군은 supercoiled form으로 나타났으며, DNA에 Topo-I을 처리한 대조군은 relaxed form으로 전환되었다. KOH와 KOR 모두 Topo-I의 활성을 억제하지 못한 것으로 보아 DNA synthesis에는 관여하지 않는 것으로 확인 할 수 있었다.

S-180이 이식된 생쥐의 생존비에 미치는 효과 – S-180이 이식된 생쥐에 KOH와 KOR의 메탄올 추출물을 7일간 경구 투여한 후 체중증가를 측정하였던 바, 복수암으로 인한 체중 증가는 대조군에서는 암주 이식 후 8일에 급격히 증가하여 10일에 모두 죽었다. 평균 생존일수 (MST)는 대조군이 8.3일인데 반해 KOH 1250 mg/kg, 2500 mg/kg에서 각각 10.6일, 11.2일이었으며 KOR 1250 mg/kg, 2500 mg/kg의 농도에서 각각 10.6일, 14.2일로 평균 생존일수가 증가하였다. 또한 S-180이 이식된 생쥐의 생존비에 미치는 효과에서는 생리식염수만을 경구 투여한 대조군보다 KOH와 KOR를 경구투여한 모든 군에서 T/C %가 높게 나왔으며 그 중에서도 KOR 2500 mg/kg 농도에서 171%로 가장 높게 나왔다(Table II, Fig. 7). 이로써 KOH와 KOR는 S-180의 증식을 억제하며 생명연장에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

결 론

KOH와 KOR의 메탄올 추출물의 항암효과를 실험적으로 입증하기 위하여 연구를 수행하였다. TLC상 국산 및 중국산간에 성분과 함량의 차이가 있음을 알 수 있었다. KOH와 KOR의 메탄올 추출물은 HT1080 암주에 대한 세포독성을 나타내지 않았으나, 독성 없는 농도에서 암세포의 gelatin에 대한 세포부착은 각각 최고 32.6%과 37%까지 저해하였다.

또한 전이에 관련된 MMP2와 uPA의 mRNA수준을 감소시켰으며, TIMP2의 발현은 증가시켰으나 topoisomerase-1에는 영향이 없었다.

KOH와 KOR은 bFGF로 유도된 사람 제대 내피세포(HUVECs)의 tube formation을 유효하게 억제하였고, 동물실험에서도 S-180을 복강내에 이식시킨 마우스에서 KOH와 KOR 모두 평균 생존일수를 증가시켰고, T/C %도 각각 134.9% (KOH), 171% (KOR)로 증가시킴으로써 KOH와 KOR이 모두 S-180 암의 성장을 저해함을 알 수 있었다.

이상의 결과를 보아 KOH와 KOR는 혈관형성 저해를 통해 전이를 차단하고 암의 성장을 조절함으로써 항암효과를 나타냄을 확인 할 수 있었다. 그러나 앞으로도 중국산 백화사설초와 효능비교, 특성적 유효물질 분리 및 구체적인 작용기전 등에 대한 연구는 지속되어야 할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2002년 농림기술개발연구과제 첨단기술과제의 지원으로 수행되었습니다.

인용문헌

1. Surh, Y. J. (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer.* **3**: 768-780.
2. Rao, S., Orr, G. A., Chaudhary A. G., Kingston D. G., and Horwitz S. B. (1995) Characterization of the Taxol Binding Site on the Microtubule. *J. Biol. Chem.* **270**: 20235-20238.

3. Canel, C. (2000) Mayapple's cancer-fighting precursor. *Agricultural Research* **July**: 9.
4. Kutney, J. P. (1993) Plant cell culture combined with chemistry: a powerful route to complex natural products. *Acc. Chem. Res.* **26**: 559-566.
5. Pizzolato, J. F. and Saltz, L. B. (2003) The camptothecins. *Lancet* **361**: 2235-42.
6. 신민교(1968) 원색임상본초학, 688, 영림사, 서울.
7. 이창복(1982) 대한식물도감, 693, 향문사, 서울.
8. 조규형(1984) 묘약기방, 53, 범진문화사, 서울.
9. 신문풍출판공사(1971) 중약대사전, 654, 신문풍출판공사, 대북.
10. 이상인외 5인(1986) 한약임상응용, 133, 성보사, 서울.
11. 신재용(1991) 녹차와 약차, 323, 동화문화사, 서울.
12. 구명, 서홍화, 이연문, 낙화생(1990) 항종루본초도보, 20, 상무인서관.
13. 김성훈(1996) 백화사설초로부터 분리된 항암성물질에 관한 연구, 대전대학교 한의학연구소, 한의학논문집, 273-297.
14. 김영희(1995) 백화사설초의 성분에 관한 연구, 한국약용작물학회, 한국약물작물학회지, **31**(2): 91-95.
15. Rubinstein, L. V., Paull, K. D., Shoemaker, R., Simmon, R., Skehan, P., and Boyd, M. R. (1989) Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) verse a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines. *Proc. Assoc. Am. Cancer Res.* **30**: 2418.
16. Chelberg, M. K., Tsilibary, E. C., Hauser, A. R., and McCarthy, J. B. (1989) TypeIV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration : Involvement of multiple, distant domanes of the collagen molecule. *Cancer Res.* **49**: 4796-4802.
17. Grant, D. S., Kinsella, J. L., Fridman, R., Auerbach, R., Piasecki, B. A., Yamada, Y., Zain, M., and Kleinman, H. K. (1992) Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) *in vitro* and induction of angiogenic behavior *in vivo*. *J. Cell. Physiol.* **153**: 614-25.
18. Hellmann, K. and Carter, S. K. (1987) Fundamentals of cancer chemotherapy, 132-140, McGraw-Hill Book Company, New York.
19. National Cancer Institute (1972) Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600, *Cancer Chemother. Res.* **3**: 17.
20. Folkman. J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**: 27-31.
21. Folkman, J. (2003) Angiogenesis and apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* **13**: 159-167.
22. Folkman, J. and Siegel, Y. (1992) Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **26**: 10931-10934.
23. Carmeliet, P. and Jain, R. K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**: 249-57.
24. Bergers, G. and Benjamin, L. (2002) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **3**: 401-410.
25. Tanaka, K., Iwamoto, Y., Ito, Y., Ishibashi, T., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., and Sugioka, Y. (1995) Cyclic AMP-regulated synthesis of the tissue inhibitors of metalloproteinases suppresses the invasive potential of the human fibrosarcoma cell line HT1080. *Cancer Res.* **55**(13): 2927-35.
26. 서울대학교 의과대학(1989) 종양학, 서울대학교 출판부, 서울.
26. Bergers, G. and Benjamin, L. (2002) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **3**: 401-410.
27. Carmeliet, P. and Jain, R. K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**: 249-57.
28. Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-64.
29. Plate, K. H., Breier, G., and Risau, W. (1994) Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol.* **4**: 207-18.
30. Folkman, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* **82**(1): 4-6.
31. O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H., and Folkman, J. (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**(2): 315-28.

(2004년 2월 10일 접수)