

異功散의 血管新生 및 癌轉移 억제효과에 관한 연구

강창희 · 명유진 · 강 희 · 최선미¹ · 심범상 · 김성훈² · 최승훈 · 신현규¹ · 김동현³ · 안규석*

경희대학교 한의과대학 병리학 교실, 1: 한국한의학연구원, 2: 경희대학교 동서의학대학원, 3: 경희대학교 약학대학

Anti-metastatic and Anti-angiogenic Activities of Ekong-san and Its Metabolites by Human Intestinal Bacteria

Chang Hee Kang, Eu Gene Myung, Hee Kang, Mi Sun Choi¹, Bum Sang Shim, Sung Hoon Kim²,
Seung Hoon Choi, Hyeun Kyoo Shin¹, Dong Hyun Kim³, Kyoo Seok Ahn*

Department of Oriental Medicine, Kyung Hee University, 1: Korea Institute of Oriental Medicine,
2: Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University,
3: college of pharmacy, Kyunghee University

Ekong-san(EKS) was expected to have inhibitory effects on angiogenesis, considering the fact that its constituents such as Ginseng Radix, Glycyrrhizae Radix and Citri Pericarpium were reported to inhibit angiogenesis. Moreover, recently several metabolites transformed by the human intestinal microflora were reported to enhance effectiveness compared to their crude drugs. Based on these data, this study was designed to confirm whether the EKS metabolites (EKS-M) can significantly exert the anti-angiogenic and anti-metastatic activities. Hence, with EKS and EKS-M, viability assay, proliferation assay, in vitro tube formation assay, gelatin zymogram assay, in vitro invasion assay were carried out. EKS showed less toxicity in ECV304 and HT1080 cells than EKS-M. EKS-M inhibited the proliferation of HT1080 cells by 30% at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 42% at 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively. Also, EKS-M degraded the tube network at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. EKS and EKS-M inhibited the expression of MMP-9 at 200 and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in HT1080 cells. EKS reduced the invasive activity of HT1080 cells through matrigel coated transfilter at the concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ more effectively than EKS-M. These data suggest that EKS and EKS-M has anti-angiogenic and anti-metastatic activities.

Key words : Ekong-san, Ekong-san metabolite, human intestinal microflora, angiogenesis, metastasis

서 론

癌은 세계적으로 사망원인의 1, 2위를 차지하는 질환으로 이를 정복하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다¹⁾. 대부분의 암치료는 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등을 적절히 배합하여 시행되어 왔으나, 그 치료효과가 만족스럽지 못할 뿐만 아니라 치료의 부작용이 많아 이를 해결하기 위한 연구가 진행되고 있다. 최근 혈관신생의 정도는 종양의 성장과 전이, 재발과 예후와 많은 상관관계가 있는 것으로 보고되었다²⁾. 이는 혈관신생이 암의 점진적인 성장을 위한 생물학적 과정일 뿐만 아니라 암의 형성 및 성장에 있어서 전이와 침윤의 통로로 작용하기 때문이다³⁾.

따라서 新生血管의 生成을 抑制함으로써 암에 대한 酸素와

營養素 공급을 차단하여 암의 成長과 다른 臟器로의 轉移를 막기 위해 新生血管 生成의 억제제가 治療目標로서 研究되고 있다⁴⁾. 이와 관련하여 최근 한의학에서도 다양한 약재와 처방을 이용하여 혈관의 신생을 억제하는 약물에 대한 실험적 연구가 활발히 이루어지고 있다^{5,7)}.

그러나 현재까지 한약을 이용한 항전이 연구는 대부분 천연 상태의 한약만을 대상으로 한 것이며, 장내 미생물 대사체를 이용한 항전이 연구는 미흡한 상태이다. 최근의 연구보고는 한약을 사람의 장내 미생물로 대사시켜 만든 대사체에서 각종 효능을 평가한 결과 자연상태의 성분들 보다 강화된 효능을 보여주고 있다⁸⁾. 한약의 효능은 전통적으로 경구투여를 통해 입증되어 왔는데, 이처럼 장내 미생물에 의한 대사 후의 활성변화는 한약의 연구에서 중요한 의미를 가진다고 생각된다.

본 연구자는 중앙임상에서 항암제 등에 의한 소화관 독성 부작용에 응용되는 이공산이 그 구성약물인 인삼, 감초, 진피 등

* 교신저자 : 안규석, 서울시 회기동 1 경희대학교 한의과대학 병리학교실
· E-mail : ahnks@khu.ac.kr, · Tel : 061-720-7522
· 접수 : 2004/9/25 · 수정 : 2004/10/23 · 채택 : 2004/11/24

의 혈관신생 억제효과를⁹⁾ 감안할 때 일정한 혈관신생 억제 효과가 있을 것으로 예상되며, 아울러 인삼, 감초, 진피 등이 장내미생물에 의하여 성분이 변화한다는 보고에 기초하여 이공산 대사체의 성분 변화가 혈관신생 억제활성의 변화로 의미있게 나타나는지를 확인하고자 하였다.

따라서 본 연구에서는 85% 메탄올로 추출하여 동결건조한 이공산 추출물과 이를 장내 미생물에 대사시켜 얻은 이공산 대사체를 이용하여 혈관신생에 대한 억제효과와 아울러 육종암세포의 전이억제효과를 평가하였다. 우선 사람혈관내피세포인 ECV-304세포와 사람육종세포인 HT 1080을 이용하여 세포생존율과 세포증식율을 알아본 후에 in vitro tube formation assay, in vitro gelatin zymogram assay, in vitro invasion assay를 혈관신생 및 암전이 억제효과를 알아보았다. 이상과 같은 방법으로 연구를 진행한 결과, 유의한 결과를 얻어기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 세포주

인간의 臍帶靜脈 세포를 불멸화시킨 ECV-304 (ATCC CRL-1998; transformed human endothelial cell)와 HT 1080 (KCLB 10121; human fibrosarcoma)를 배양하여 실험에 사용하였다. ECV-304는 medium 199 (M199)에 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제 (penicillin 10 units/ml · streptomycin 10 µg/ml)를 첨가하여 배양하였고 HT-1080은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)에 10% FBS 및 항생제를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다.

2) 약물

실험에 사용된 異功散(Ekong-san)의 구성 약물이인 인삼, 백출, 복령, 감초, 진피는 경희대학교 부속 한방병원 약재과에서 구입하여 실험에 사용하였다. 처방의 내용은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Ekong-san

| 韓藥名 | 生藥名 | 重量 |
|-----|---------------------------|-----|
| 人參 | Ginseng Radix | 4g |
| 白朮 | Atractylodis Rhizoma Alba | 4g |
| 乾薑 | Zingiberis Rhizoma(dried) | 4g |
| 甘草 | Glycyrrhizae Radix | 4g |
| 진피 | Citri Pericarpium | 4g |
| | 總重量 | 20g |

2. 방법

1) 추출물의 조제

이공산을 유리로 된 추출병에 넣고 물과 85% Methanol을 시료가 잠기도록 충분히 넣어 각각 하루 동안 냉침한 다음 50°C에서 한시간씩 2회 초음파세척기로 물리적 자극을 가하여 시료의 용해를 촉진하였다. 이 용액을 filter paper로 濾過한 다음 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)에서 減壓 濃縮한 뒤 1000ml round flask 에 옮겨 freezing dryer(Eyela, Japan)로 24시

간 동안 凍結 乾燥하여 건조된 분말을 실험에 사용하였다(yield: 19.2%).

2) 시료의 장내미생물처리 및 대사분획의 제조

신선한 사람의 분변 5g을 혐기성 희석배지(니스이제약, 일본)에 현탁하여 500rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 얻고 이 상등액을 다시 5000xg(7000rpm), 4°C에서 30분간 원심분리하고 혐기성배지로 2회 세척하여 장내 미생물총으로 사용하였다. 이공산의 추출물액기스 1g을 100ml의 혐기성 희석배지에 첨가하여 혐기적으로 37°C 에서 48시간 동안 반응시켜 ethylacetate 1000ml로 추출 후 다시 농축하여 대사체로 사용하였다.

3) Viability assay

이공산과 이공산대사체의 세포독성을 파악하기 위하여 각 세포에 시료를 처리한 후 Mosmann의 MTT assay¹⁰⁾를 변형하여 측정하였다. 먼저 모든 암세포를 2×10⁴ cells/100 µl/well의 밀도로 96-well cell culture plate에 접종하여 24시간을 배양한 후 배양액을 갈아주었다. 교체한 모든 배양액에는 FBS를 첨가하지 않고 여기에 이공산 추출물과 이공산대사체를 각각 50 · 100 · 200 · 400 µg/ml의 농도로 처리하여 20시간 배양하였다. 그런 다음 Celltiter 96R Aqueous One Solution Reagent (Promega, U.S.A)를 10 µl/well을 첨가하여 15분 후 색깔의 변색이 나타나면 microplate reader (Molecular Device, U.S.A.)를 이용해 측정파장 490 nm · 참고파장 650 nm로 측정하였다.

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{average of absorbance of sample} \times 100}{\text{average of absorbance of control}}$$

4) Proliferation assay

세포를 96 well plate에 각각 2×10⁴cells/well의 비율로 10% FBS가 함유된 배지 100µl와 함께 seeding하였다. 24시간이 지난 후 이공산추출물과 이공산대사체를 각각 50 · 100 · 200 · 400 µg/ml로 가하여 각각의 well에 투여하고 동시에 BrdU labeling solution 10µl/well을 가하였다. 18시간이 지난 후 ethanol 70% in HCl(7ml of 100% ethanol, 2.33ml of distilled water and 0.67 ml of hydrochloric acid) 200µl/well을 가하여 -20°C에 30분간 두어 세포를 고정한 후 PBS를 200µl/well로 3회 washing하였다. 다시 nuclease 100µl/well로 가한 후 30분간 37°C waterbath에 넣어 두었다가 PBS 200µl/well로 3회 washing하였다. 다시 anti-BrdU-POD를 100µl/well로 가하고 30 분간 37°C waterbath에 둔 후 washing buffer 200µl/well로 3회 washing하였다. Peroxidase를 100µl/well를 넣고 10분 후에 microplate reader (Molecular Device, U.S.A.)로 측정 파장 405nm, 참고 파장 490nm에서 Optical Density 값을 읽었다.

5) Tube formation assay

24-well cell culture plate를 얼음 접시에 놓고 matrigel 200 µl을 가한 후 spatula를 이용해 도포하였다. Matrigel을 바른 plate는 37°C incubator에 3~4시간 방치하고 matrigel이 굳도록 하였다. ECV-304를 matrigel이 도포된 plate에 8×10⁴ cells/well로 접종하고 10% FBS M-199에 한약시료를 첨가하여 18시간 동

안 배양하였다. Control well에도 같은 양의 DMSO를 첨가하였다. 18시간 후 control well에 tube가 형성된 것을 확인한 후 20배율로 사진 촬영하였다.

6) Gelatin zymogram assay

세포를 6-well cell culture plate에 1×10^6 cells/well로 seeding하여 2 ml의 10% FBS가 함유된 배지와 함께 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 그 후 1 ml PBS로 1회 세척하고 1 ml의 serum이 제거된 배지로 교체한 후 이공산 추출물과 이공산대사체를 농도별로 첨가되 control cell에는 같은 양의 용매로서 DMSO를 투여하여 CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 약물을 투여하고 12시간이 경과한 후에 100 ng/ml의 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 투여하였다. 그런 다음 12시간 동안 배양한 후 배양액을 취하여 1000 rpm, 4°C, 5분간 원심 분리하여 세포와 세포 조각을 침전시킨 후 상등액을 취하여 4°C에 보관하였다가 gelatin zymography를 시행하였다.

Gelatin zymography는 Heussen과 Dowdle의 실험방법¹¹⁾에 따라 배양액을 sample buffer (10% SDS · 4% sucrose · 0.25 M Tris · HCl pH 6.8 · 0.1% bromophenol blue)와 3 : 1로 섞은 후 가열하지 않은 채 0.4 mg/ml gelatin B (Sigma)를 포함한 8% (w/v) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에 첨가하여 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 2.5% (v/v) Triton X-100 (Sigma)에 30분씩 3회 세척하여 gel속의 SDS를 제거한 후 substrate buffer (0.05 M Tris · HCl pH 7.5 · 0.15 M NaCl · 0.01 M CaCl₂ · 1 μM ZnCl₂ · 0.02% NaN₃)에 담긴 채 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 10% methanol/10% 빙초산/0.1% (w/v) coomassie brilliant blue G-250 (Sigma)에 6시간 동안 염색시킨 후 10% methanol/10% 빙초산에 3시간 동안 탈염색시켰다. Gelatinase에 의한 gelatinolytic activity는 전체가 청색으로 염색된 gel에서 깨끗한 무색의 band가 검출되는 것으로 증명된다.

7) In vitro invasion assay

Invasion activity 측정은 transwell cell culture chamber를 이용하였다. 세포수가 5×10^4 cells/well가 되도록 serum free media로 현탁한후 transwell chamber로 옮겼다. 여기에 이공산 추출물과 이공산대사체를 농도별로 가한후 여기에 PMA 100 ng/ml로 투여하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. Transwell의 membrane은 matrigel 5 μg/10μl, collagen 10 μg/10μl로 위와 아래를 코팅하여 공기중에서 건조시킨 후 PBS에 담겼다 다시 공기중에서 건조시킨후 실험에 사용하였다.

Transwell chamber에서 24시간 동안 배양한후 transwell의 upper chamber에 있는 media를 제거하고 transwell의 lower chamber를 70% methanol에 5분간 담가서 membrane을 통과한 세포를 고정한 후 1분간 증류수에 담가 methanol을 세척하였다. 다시 hematoxylin solution eosin (in 1% glacial acetic acid, Sigma, US)에 30초 담근후 증류수에 1분가 담근후 95% ethanol에 2분간 2회 담가서 탈수시켰다. 이후 면봉을 이용하여 transwell의 upper chamber에 남아 있는 세포를 닦아내고 역상 현미경을 이용하여 50배율에서 염색된 세포의 숫자를 세었다.

실험성적

1. 세포 생존능력에 미치는 영향

실험결과 이공산 알콜 추출물은 200 μg/ml의 농도에서도 ECV-304의 생존률이 대조군과 근사하였고 400 μg/ml에서 78%의 생존률을 보여주었다. 그러나 이공산대사체의 경우 200 μg/ml의 농도에서 69%의 생존률을 보여주었으며 400 μg/ml의 농도에서 45%의 생존률을 보여주었다(Fig. 1).

HT 1080의 경우 이공산 추출물은 400 μg/ml의 농도에서도 대조군에 비해 94%의 생존률을 보여주어 별다른 세포독성은 보이지 않았으나 이공산대사체는 200 μg/ml까지 대조군과 차이가 없다가 400 μg/ml에서 54%의 생존률을 보여주어 고농도에서는 세포독성이 강하게 나타났다(Fig. 2).

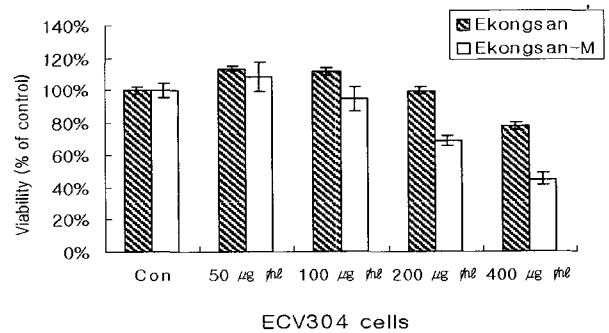


Fig. 1. Viability of ECV304 cells treated with Ekong-san methanol extract and Ekong-san Metabolite (Ekongsan-M) (50-400 μg/ml, respectively). Cell viability was determined by mitochondria reduction of MTT test. Data are expressed as means±S.D. of three independent experiments. Viability of controlled cells was referred to as 100%.

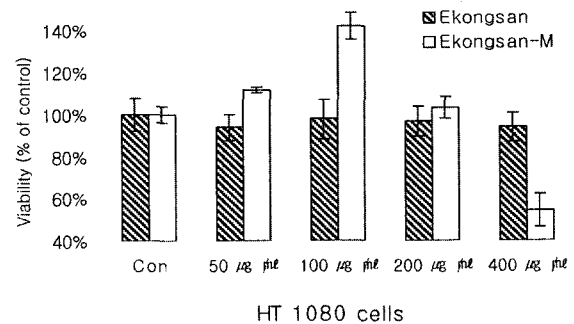


Fig. 2. Viability of HT 1080 cells treated with Ekong-san methanol extract and Ekong-san-M (50-400 μg/ml, respectively). Cell viability was determined by mitochondria reduction of MTT test. Data are expressed as means±S.D. of three independent experiments. Viability of controlled cells was referred to as 100%.

2. 세포 증식에 미치는 영향

실험 결과 이공산 메탄올 추출물은 ECV-304의 경우 400 μg/ml에서도 전혀 억제율을 나타내지 않았다. 이공산 대사체 역시 농도에 비례하여 오히려 증식을 촉진하였다(Fig. 3).

한편 HT 1080 세포의 DNA 증식을 측정한 결과 이공산 메

타을 추출물은 ECV-304에 대해서와 마찬가지로 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 전혀 억제율을 나타내지 않았다. 그러나 이공산 대사체는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군에 비해 70%의 증식률을 보여주었으며 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 경우 42%의 억제율을 보여주었다(Fig. 4).

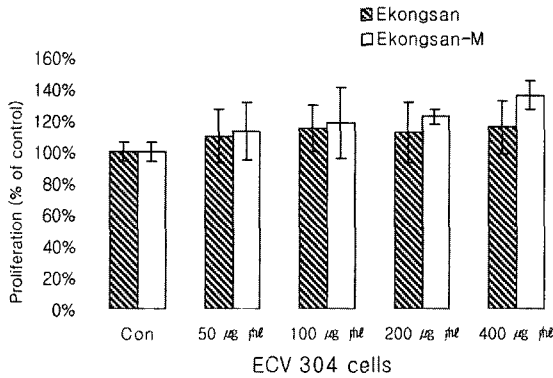


Fig. 3. Proliferation of ECV304 Cells treated with Ekong-san and Ekong-san-M (50-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively). DNA synthesis was determined by BrdU incorporation immunoassay. Data are expressed as means \pm S.D. of three independent experiments. Proliferation of controlled cell was referred to as 100 %.

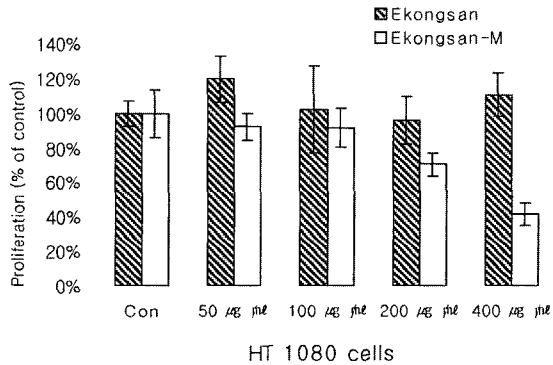


Fig. 4. Proliferation of HT 1080 Cells treated with Ekong-san and Ekong-san-M (50-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively). DNA synthesis was determined by BrdU incorporation immunoassay. Data are expressed as means \pm S.D. of three independent experiments. Proliferation of controlled cell was referred to as 100 %.

3. Tube formation 억제기전에 미치는 영향

이공산 메탄을 추출물과 이공산 대사체의 angiogenesis 억제 효과를 평가하기 위하여, ECV-304를 matrigel이 도포된 24-well plate에서 배양하여 tube formation을 유도한 후, 접종과 동시에 한약을 처리한 실험군과 대조군을 비교하여 보았다. 실험결과 처리한 대조군에서는 capillary tube가 잘 형성되어 있음을 볼 수 있었다. 이공산 메탄을 추출물을 처리한 실험군에서 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 tube 형성이 그대로 나타나지만 이공산대사체를 처리한 실험군에서는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 capillary tube가 degradation 되는 소견을 보여주었다 (Fig. 5).

4. Gelatinolytic activity 억제기전에 미치는 영향

실험결과 HT 1080의 MMP-9의 band는 이공산 메탄을 추출물과 이공산 대사체 모두 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약하게 발견되기 시작하였고 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 확실하게 억제되었다(Fig. 6).

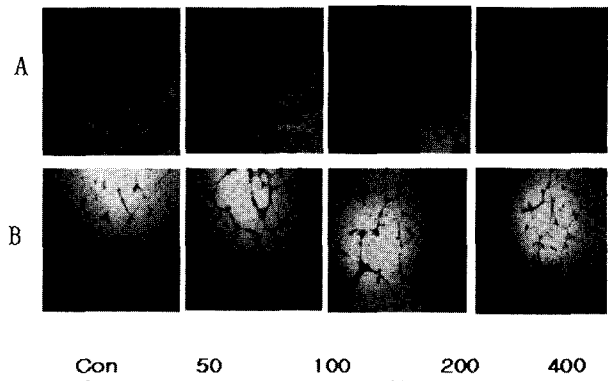


Fig. 5. Capillary-like tube formation on Matrigel. ECV-304 cells were seeded on Matrigel and treated with 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Ekongsan (A) and Ekongsan-M(B) for 18 h.

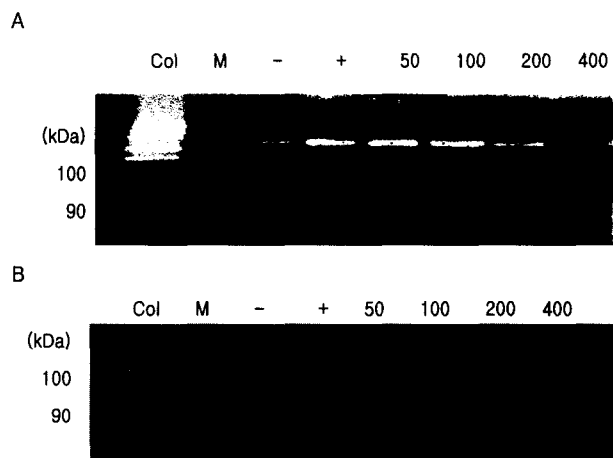


Fig. 6. MMP-9 expression of HT 1080 cells by zymography. Col: Bacterial collagenase. M: Marker. -: PMA negative. +: PMA positive. 50 ~400: concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of Ekongsan(A) and Ekongsan-M (B)

5. In vitro invasion 억제에 미치는 영향

실험결과(Fig. 7) 이공산 추출물의 경우 다공성 filter를 통과한 ECV304의 수는 대조군에서 85.2 \pm 32.3개였으며 이공산 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 97.2 \pm 16.0개로 약간 증가하였고 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 78.25 \pm 23.6으로 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 이공산 대사체를 처리한 실험에서는 대조군이 105.8 \pm 54.0개였으나 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 95.0 \pm 35.7개였고 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 51.8 \pm 32.9로 유의성있게 감소하였다(p <0.05). HT 1080의 경우 이공산 추출물을 처리한 실험에서는 대조군이 29.6 \pm 12.9개였고 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 26.2 \pm 12.9였고 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 14.2 \pm 10.13개로 유의성있게 감소하였다(p<0.05). 이공산 대사체를 처리한 경우 대조군에서는 22.6 \pm 12.8개였으며 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 20.2 \pm 9.52였고 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 19.4 \pm 14.7개로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

고 찰

한의학 문헌에서 腫瘍과 관련된 내용은 각종 病證에 포함되어 있으며, 서양의학에서의 癌腫과 어느 정도 그 표현이 일치하고 있다. 한의학에서는 암의 원인을 따로 다루는 것이 아니라, 일반적 질병발생의 원인인 六淫, 七情, 飲食傷, 痰飲, 瘀血 등으로

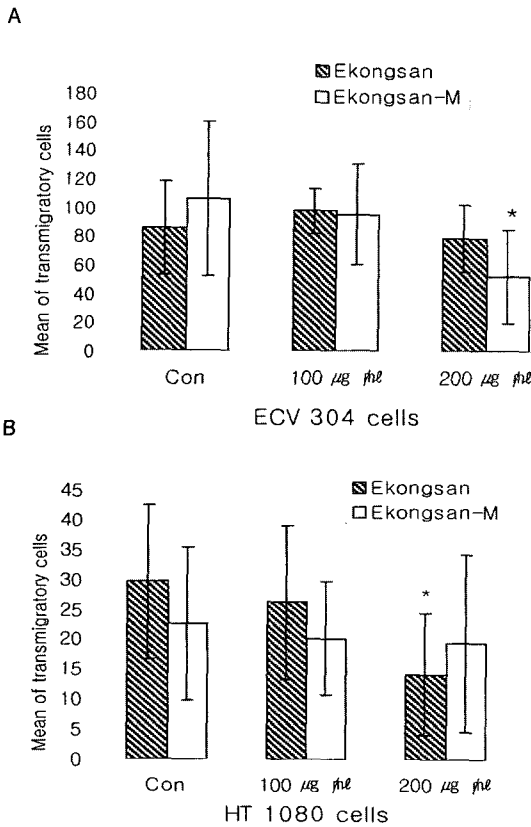


Fig. 7. Transigratory cells on Matrigel precoated transwell chamber. Cells were counted in 5 points randomly at a magnification of 400. *: p<0.05

분류하고 있다. 암에 대한 한의학적 치료는 扶正培本法, 祛邪法, 扶正祛邪法의 세가지 방법을 응용하는데 이는 주로 免疫機能의 活性化 및 腫瘍成長抑制를 기대하는 치료법이다¹²⁾. 또한 최근 암치료가 있어서 화학요법과 한약치료를 병행하는 것이 효과적임을 보고하는 사례는 매우 많으며^{13,14)}, 우리 나라에서는 주로 正氣를 보강할 수 있는 藥物과 處方에 대한 연구가 많이 이루어져 왔다^{15,16)}.

최근에는 암의 전이를 억제하여 종양의 재발을 막기 위한 연구가 폭 넓게 이루어지고 있다¹⁷⁾ 전이에 대한 한의학적 치법은 活血化癥法, 清熱解毒法, 化痰軟堅法, 扶正培本法 등이 있는데³⁾, 이는 종양에 대한 한의학적 치법에서 벗어나지 않는다. 扶正祛邪를 통해 正氣를 강화하고 邪氣를 배출시키는 것이 종양의 전신적 확산을 막는 요체가 되는 것이며, 이러한 원칙하에 환자의 상태에 따른 辨證論治를 엄격히 적용하는 것이 재발을 방지하고 환자의 생존기간 중 삶의 질을 제고하는 방법이 된다.

전이는 암세포가 친윤성 성장을 하는 행위에서 비롯되지만, 혈관 역시 암세포의 성장을 위한 영양 공급과 전이의 통로를 제공한다는 점에서 종양 조직내로의 혈관신생을 억제하는 것이 인체에 대한 독성이나 부작용없이 종양의 성장을 막고 전이를 억제할 수 있는 효율적 수법으로 여겨지고 있다. 특히 한약은 인체에 대한 부작용이 거의 없기 때문에 이 부문 연구에서 관련 연구자들의 주목을 받고 있으며, 活血祛癥 藥물이 혈관신생 관련 연구에서 좋은 성과를 거두고 있다.

또한 암의 전이를 억제하는 加味慈桃丸의 구성약물에 대한

연구에서 鬱金, 桃仁, 山慈菇가 혈관내피세포의 혈관신생을 억제함을 밝혔는데, 이 연구는 加味慈桃丸의 암 재발 방지 효과가 혈관신생 억제효과에 일부 기인하며, 이러한 효과는 처방 중 活血祛癥 藥물에 의한 것임을 밝힌 것이다^{18,19)}. 또 차은 in vitro에서 human fibrosarcoma cell, HT1080의 전이를 억제하는 扶正防癌湯의 구성약물을 대상으로 혈관신생 억제효과를 연구한 결과, 草河車와 破故紙의 혈관신생 억제효과가 가장 뛰어남을 밝혔다²⁰⁾. 또 鬱金은 活血祛癥 藥물 27가지를 선정하여 혈관신생 억제효과를 검색하였는데, 실험결과 대부분의 약물에서 혈관신생 억제효과가 관찰되었고, 특히 莪朮, 蘇木, 皂角刺, 王不留行의 효과가 우수한 것으로 보고하였다²¹⁾.

그 동안 한의학계에서 암의 전이 및 혈관신생 억제와 관련한 연구가 活血祛癥 藥물을 중심으로 이루어져 왔으나, 임상적으로 암환자는 扶正祛邪法을 사용해야 하는 경우가 대부분이다. 실험 연구를 통해 항암 효능을 갖는 扶正法 계열의 처방 연구는 다수 보고된 바 있으나, 혈관신생 분야에서 연구는 그동안 미진한 편으로 崔가 十全大補湯의 혈관신생 억제효과를 관찰한 것²²⁾, 李가 보기보혈 藥물의 혈관신생 억제 선별 연구²³⁾ 등이 고작이었다. 扶正祛邪에 의한 치료가 임상에서 빈용되는 것을 감안하면 부정지제의 암전이 혹은 혈관신생 억제 연구가 긴요한 것으로 생각된다.

異功散은 益氣健脾, 溫中和胃하여 脾胃虛弱, 飲食不進, 泄瀉 등을 주치한다. 한방 중앙 임상에서는 항암치료, 방사선 치료 후 나타나는 口乾, 惡心嘔吐, 食慾不振, 腹痛, 泄瀉 등 소화기 독성에 대하여 선복화대자석탕, 이진탕, 삼령백출산, 보중익기탕 등과 함께 응용되고 있다²⁴⁾. 그동안 이공산의 실험적 연구로는 조혈작용, 지혈작용, 위액분비, 위산억제 및 항게양 효능²⁵⁾, 장관운동억제, 승압작용, 소장수축능향진, 이담작용에 대한 효능²⁶⁾, 항피로 효과²⁷⁾ 등이 보고된 바 있다. 종양과 관련해서는 cisplatin 유도에 의한 신장독성 보호²⁸⁾, 마우스에 대한 흑색종의 전이 및 증식억제효능과 면역증진 작용^{29,30)}이 보고된 바 있다.

異功散의 구성약물 중 인삼, 감초 등은 혈관신생 혹은 암전이 관련 연구가 보고된 바 있는데 Morisaki 등은 紅蓼에서 추출된 saponin이 10-100 µg/ml 농도에서 인간제대정맥 혈관내피세포인 HUVE cell에 의한 tube formation을 증가시킨다고 보고하였으며³¹⁾, Sato 등은 B16-BL6 melanoma를 이식한 생쥐에 人蓼에서 추출된 ginsenoside-Rb2를 투여한 결과, 10-50 µg/mouse의 농도에서 혈관신생과 폐장전이를 억제한다고 보고하였다³²⁾. 또한 Mochizuki 등 역시 B16-BL6 melanoma와 colon 26-M3.1 carcinoma cell을 이식한 생쥐에 紅蓼 추출물인 ginsenoside-Rb2, 20(R)-, 20(S)-ginsenoside-Rg3를 투여한 결과 암세포의 부착과 invasion을 저해하므로써 암전이 억제효과를 나타내는 것으로 보고하였다.³³⁾

甘草에 대하여 Kobayashi 등은甘草의 glycyrrhizin은 in vitro에서 tube formation을 증가시키며, flavonoid 성분 중 isoliquiritin은 tube formation을 억제하는데, isoliquiritin의 작용이 더욱 강력하여甘草 추출물에서 혈관신생억제효과가 나타난다고 보고하였다³⁴⁾. 이에 연구자는 중앙임상에서 항암제 등에 의한 소화관 독성 부작용에 응용되는 이공산이 그 구성약물들의 혈관신생 억제효과를 감안할 때 일정한 혈관신생 억제 효과가

있을 것으로 예상하고 그 효과를 평가해 보고자 하였다.

한편, 李는 이종당과 소음인보중익기탕의 항알러지 효과를 장내미생물에 의한 대사 전후로 비교하여 대사 후에 효과가 증가되었으며, 구성약물중 진피의 주요성분인 hesperidin이 hesperetin으로 변한 사실 등을 증거로 제시하였다³⁵⁾. 李의 연구는 전통적으로 경구투여되고 있는 한약의 활성 연구에서 장내 미생물에 의한 대사 전후의 활성변화가 일정한 의의를 갖고 있음을 보여준 의미있는 연구라 하겠다. 또 장내미생물에 의해 대사되는 한약의 예로 대황의 주요성분인 sennoside A가 reinanthron으로 대사되어 약리효과를 나타내며, 감초의 glycyrrhizin은 glycyrrhetic acid 등으로 전환되는 등의 기존 보고들을 함께 고려할 때, 한약물의 대사에서 장내미생물이 많은 영향을 미치고 있음을 알 수 있다³⁶⁾. 아울러 이공산의 구성약물 중 인삼의 ginsenoside Rb1은 compound K와 20(s)propanaxdiol로 대사되며, 진피의 hesperidin은 hesperetin으로 대사되는 것으로 보고되어 있는데³⁷⁾, 이러한 보고들을 감안하여 본 연구자는 이공산의 장내미생물 대사에 의해 일어나는 성분 변화가 혈관신생 억제활성의 변화로 의미있게 나타나는지를 확인하고자 하였다.

암의 전이는 암세포의 성장, 원발 장기 기저막 (basement membrane)의 침윤 (invasion), 혈관벽 침윤 및 혈관내 이동, 원격부위의 혈관벽 부착 및 침윤, 원격부위에서의 성장이라는 단계를 따르게 된다³⁸⁾. 혈관신생은 모세혈관 또는 세정맥의 혈관내피세포가 여러 가지 조절인자의 자극을 받아 분화함으로써 새로운 모세혈관을 만드는 현상으로, 혈관내피세포의 activation, sprouting, tube formation, vessel network 형성의 4가지 단계를 거치게 된다³⁹⁾. Activation은 혈관내피세포가 VEGF 등 혈관신생인자들의 감작을 받는 단계이고, sprouting 단계에서는 혈관내피세포가 증식하는 한편, 세포외기질 (ECM; Extracellular Matrix)을 분해하여, 침윤 (invasion)하는 일이 벌어진다. Tube formation은 혈관내피세포가 분화하여 인접 혈관내피세포끼리 협동으로 모세혈관을 형성하는 단계이며, 최종적으로 이렇게 형성된 모세혈관이 vessel network를 형성하여 암조직에 영양을 공급하게 된다. 이들 여러 단계 중에서도 암세포 혹은 혈관내피세포의 증식과 기저막과 혈관벽의 외피를 구성하고 있는 세포의 기질 분해 및 이동의 과정은 암세포의 전이와 혈관내피세포에 의한 혈관신생의 공통적인 과정이며, 약물이 이들 단계 중 한곳을 차단할 수 있으면 결과적으로 암의 전이를 차단할 수 있게 된다.

본 연구에서는 이공산 및 이공산 대사체가 암전이 및 혈관신생에 미치는 영향을 평가하기 위하여 암세포 및 혈관내피세포의 증식에 미치는 효과, 세포외 기질 분해에 미치는 효과, 침윤에 미치는 효과, tube formation에 미치는 효과를 살펴보았다.

우선 세포외 기질 분해 및 침윤에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT를 이용한 cell viability assay를 시행하였다. 세포외 기질 분해 및 침윤 현상은 세포의 behavioural activity에 해당하므로 세포 개체수가 약물에 의해 영향을 받아서는 안되며, 따라서 생존율이 대조군과 유의한 차이가 없는 농도에서 시행되어야 한다. 세포수의 측정은 MTT dye가 mitochondria에 의해 대사된 formazan의 형성량을 측정하는 간접적인 방식을 취하였다. 실험

결과 이공산 추출물은 ECV-304와 HT1080에서 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지 별다른 세포독성을 나타내지 않았으나, 이공산 대사체는 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 45% (ECV-304), 54% (HT1080)의 독성을 나타내었다.

이공산과 이공산 대사체가 세포의 DNA 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 BrdU incorporation assay를 시행하였다. 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)는 증식하는 세포의 DNA에 thymidine 대신 incorporation됨으로써 immunoassay에 의해 BrdU가 측정된다. 실험 결과 이공산 추출물과 대사체는 ECV-304에 대한 세포증식 억제효과가 나타나지 않았으나, HT1080에 대해서는 이공산 대사체가 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서부터 세포증식 억제효과를 나타내었다.

혈관신생은 혈관내피세포가 원격부위로 이동한 후, 세포외 기질에 부착하여 capillary-like tube를 형성함으로써 완성된다. 이공산과 이공산 대사체의 혈관신생 억제효과를 평가하기 위하여 in vitro tube formation assay를 시행한 결과, 이공산 추출물은 혈관형성 억제효과가 없었으나, 이공산 대사체는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서부터 혈관형성을 억제하였다.

암세포 혹은 혈관내피세포가 국소 침윤을 하기 위해서는 ECM을 분해하는 단계를 필수적으로 거쳐야 한다. ECM은 여러 가지 성분으로 구성되어 있는데 이중에서 collagen type IV이 주요 성분 중의 하나이며 암세포는 ECM을 분해하기 위하여 여러 가지 단백분해 산소를 분비하는데 이들은 공통적으로 Zn이온이 있어야 단백질을 분해할 수 있기 때문에 matrix metalloproteinases (MMPs)라고 부르는데 이들 MMP family중 collagen typeIV를 기질로 하는 것은 MMP-2, MMP-9 두 가지가 알려져 있으며 이들은 각기 72 kDa, 92kDa의 크기를 갖고 있다. Gelatin zymogram은 이들 MMP-2, MMP-9의 발현과 활성을 알아보는 방법이다. 실험결과 이공산과 이공산 대사체는 HT 1080에서 MMP-9의 발현을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 억제하였다.

암세포와 혈관내피세포의 invasion activity를 측정하기 위하여 in vitro invasion assay를 시행한 결과, 이공산은 ECV-304의 invasion을 억제하지 못하였으나 이공산 대사체는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 invasion cell 수를 대조군에 비하여 유의성있게 감소시켰다. ($p < 0.05$). HT 1080의 경우 이공산 추출물은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 invasion cell 수를 대조군 대비 유의성있게 감소시켰으나 ($p < 0.05$). 이공산 대사체를 처리했을 때는 대조군에 비해 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

이상의 실험결과를 종합하여 볼 때, 이공산은 암세포의 전이를 억제시키는 효능이 보다 강하며, 이공산 대사체는 혈관신생을 억제하는 효능이 보다 강한 것으로 생각된다. 다만 이러한 결과는 in vitro 연구를 통한 것이므로 실제 생체내 연구를 통해 보다 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

이공산과 이공산 대사체의 암전이, 혈관신생 억제 효과를 기전을 실험적으로 규명하고자 반지련의 물과 메탄을 추출물을 이

용하여 세포독성, 혈관내피세포의 증식, tube 형성, MMP-9 발현에 대한 영향을 관찰하였다.

이공산과 이공산 대사체의 혈관신생에 대한 억제효과와 아울러 육종암세포의 전이억제를 평가하고자, ECV-304세포와 섬유모세포인 HT 1080를 이용하여 세포생존율, proliferation assay, tube formation assay, gelatin zymogram assay, in vitro invasion assay를 시행하였다.

이공산 알콜 추출물은 ECV-304의 경우 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 78%의 생존율을 보여주었다. 그러나 이공산대사체의 경우 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 69%의 생존율을 보여주었으며 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 45%의 생존율을 보여주었다. HT 1080의 경우 이공산 추출물은 별다른 세포독성은 보이지 않았으나 이공산대사체는 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 54%의 생존율을 보여주어 고농도에서는 세포독성이 강하게 나타났다. DNA 증식 억제를 측정할 결과 이공산 메탄올 추출물은 ECV-304의 경우 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 전혀 억제율을 나타내지 않았다. 이공산 대사체 역시 농도에 비례하여 오히려 증식을 촉진하였다. 한편 HT 1080 세포에서도 이공산 메탄올 추출물은 전혀 억제율을 나타내지 않았으나 이공산 대사체는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군에 비해 70%의 증식율을 보여주었으며 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 경우 42%의 억제율을 보여주었다. tube formation 실험에서는 이공산 메탄올 추출물을 처리했을 때 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 tube 형성이 그대로 나타나지만 이공산대사체를 처리한 실험군에서는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 capillary tube가 degradation 되는 소견을 보여주었다. Gelatin zymography 실험결과 HT 1080의 MMP-9의 band는 이공산 메탄올 추출물과 이공산 대사체 모두 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약하게 발현되기 시작하였고 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 확실하게 억제되었다. In vitro invasion 실험에서는 이공산 추출물의 경우 다공성 filter를 통과한 ECV304의 수는 대조군에 비해 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 이공산 대사체를 처리한 실험에서는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의성있게 감소하였다($p < 0.05$). HT 1080의 경우 이공산 추출물을 처리한 실험에서는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의성있게 감소하였다($p < 0.05$). 이공산 대사체를 처리했을 때는 대조군에 비해 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (01-PJ9-PG1-01co05-0004)

참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사; 1991.
2. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. J Biol Chem 264:17213-17221, 1989.
3. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane

- WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell Jan 24;88(2):277-85 1997.
4. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell Oct 21;79(2):315-28, 1994.
5. Lee JH, Shim BS, Ahn KS, Choi SH. Anti-metastatic effects of Xuefuzhuyutang. Journal of Korean Oriental Oncology 5:61-75, 1999.
6. Kang DI, Kim SH, Shim BS, Choi SH, Ahn KS. Study on the Angiogenic Inhibition Effects of Molyaksan. Korean Journal of Oriental Medical Pathology 14:91-107, 2000.
7. Sohn JG, Kim SH, Seok DS, Shim BS, Choi SH, Ahn KS. Effects of Huoluoxiaolindan on Anti-metastasis. Korean Journal of Oriental Medical Pathology 14:182-98, 2000.
8. Kim Dong-Hyun. Herbal medical microbiology. Seoul: Hyo-il Press, pp. 95-132, 2000.
9. Lee JW, Kim HY, Kang H, Yu YB, Shim BS, Choi SH, Ahn KS. Angiogenic inhibition effects of several herbs supplementing Qi and blood. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology 16:499-506, 2002.
10. Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays, J Immunol Methods 65(1-2): 55-63, 1983.
11. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Anal Biochem 102:196-202, 1980.
12. 최승훈. 동의종양학. 서울: 행림출판; 1995.
13. 안문생. 항암제 mitomycin C와 수종 보익제의 병용투여효과에 대한 연구. 대한한방내과학회지, 15(1): 60-80, 1994.
14. 陳建中, 中西藥配合化療在胃癌治療中對白細胞的影響. 中西醫結合雜誌, 10(12): 717-719, 1990.
15. 강윤호. 수종의 한약물이 백서의 자연살해세포활성에 미치는 영향, 대한한의학회지, 8(1): 53-74, 1987.
16. 한주석, 고병희, 송일병. 태음인 갈근해기탕이 면역반응 및 NK세포활성도에 미치는 영향. 대한한의학회지, 11(2): 106-114, 1990.
17. Shim BS, Park KK, Choi SH. Anti-metastatic effects of fuzhengfangaitang on human fibrosarcoma cells HT1080. Am J Chin Med 31:235-46, 2003.
18. Wang TC, Park JH, Yu YB, Shim BS, Ahn KS, Choi SH. Study on the effects of Jiaweicitaowan ingredients on angiogenic inhibition. Korean Journal of Oriental Medical Pathology 14:155-67, 2000.
19. Wang TC, Park JH, Yu YB, Shim BS, Choi SH, Ahn KS. Study on the effects of Jiaweicitaowan ingredients on angiogenic inhibition (II). Korean Journal of Oriental

- Medical Pathology 15:235-40, 2001.
20. Park JH, Yu YB, Shim BS, Choi SH, Ahn KS. Anti-metastatic effects of ingredients of Fuzhengfangaitang. *Journal of Korean Oriental Oncology* 7:39-60, 2001.
 21. Kim SH, Shim BS, Choi SH, Ahn KS. Study on effect of the herbs that invigorate and dispel blood stasis on angiogenic inhibition. *Journal of Korean Oriental Oncology* 7:19-37 2001.
 22. Choi H, Park JH, Yu YB, Shim BS, Choi SH, Ahn KS. Anti-angiogenic effects of Sipjeondaebo-tang. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology* 15:403-11, 2001.
 23. Lee JW, Kim HY, Kang H, Yu YB, Shim BS, Choi SH, Ahn KS. Angiogenic inhibition effects of several herbs supplementing Qi and blood. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology* 16:499-506, 2002.
 24. 조종관. 한방임상종양학. 주민출판사. 대구. p. 410. 2001.
 25. 신동설: 전씨이공산의 효능에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원, 1987.
 26. 김동윤: 전씨이공산이 소화기계에 미치는 영향에 관한 연구, 경희대학교 대학원, 1986.
 27. 민경아: 전씨이공산의 항피로효능에 관한 연구, 경희대학교 대학원, 1997.
 28. 이경태, 노영수, 안규석, 장성구, 정지창: 이공산의 Cisplatin 유도 신장독성 보호효과, *생약학회지* 29(3):258~264, 1998.
 29. 이선구, 하지용: 이공산이 마우스흑색종의 폐전이억제에 미치는 항암 및 면역작용에 관한 연구, *동의병리학회지* 11(1):21-30, 1997.
 30. 안규석, 이경태, 장성구, 정지창, 노영수: 이공산의 면역증강효과에 관한 실험적 연구, *한의학연구소논문집* 2(1):15-29, 1999.
 31. Morisaki N, Watanabe S, Tezuka M, Zenibayashi M, Shiina R, Koyama N, Kanzaki T, Saito Y. Mechanism of angiogenic effects of saponin from ginseng *Radix rubra* in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 115(7): 1188-93 1995.
 32. Sato K, Mochizuki M, Saiki I, Yoo YC, Samukawa K, Azuma I. Inhibition of tumor angiogenesis and metastasis by a saponin of *Panax ginseng*, ginsenoside-Rb2. *Biol Pharm Bull.* 17(5): 635-9 1994.
 33. Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, Sato K, Saiki I, Tono-oka S, Samukawa K, Azuma I. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg3, of red ginseng. *Biol Pharm Bull.* 18(9): 1197-202 1995.
 34. Kobayashi S, Miyamoto T, Kimura I, Kimura M. Inhibitory effect of isoliquiritin, a compound in licorice root, on angiogenesis in vivo and tube formation in vitro. *Biol Pharm Bull.* 18(10): 1382-6 1995.
 35. Lee, Neung Kee. The Anti-allergic activities of Lizhong-Tang and Shaoyinren-Buzhongyiqi-Tang fermented by human intestinal bacteria and their bifidogenic activities. Ph. D. diss. Kyung Hee University, Seoul. 50 2003.
 36. Kim Dong-Hyun. Herbal medical microbiology. Seoul: Hyo-il Press, pp. 95-132 2000.
 37. 상계서
 38. Hart IR, Saini A. Biology of tumor metastasis. *Lancet* 339:1453 1992.
 39. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 6(4): 389-95 2000.