

消癌散의 항암효과 및 血管新生抑制에 미치는 영향

김용수 · 이성원 · 추영국² · 정규용³ · 안성훈 · 정우열¹ · 우원홍*

원광대학교 한의학 전문대학원, 1: 원광대학교 한의과대학 한방병리학교실,
2: 원광대학교 자연과학대학 생물학교실, 3: 원광대학교 의과대학 약리학교실

Study on the Anticancer & Inhibitory Effects of Soamsan

Yong Su Kim, Seong Won Lee, Young Kug Choo², Kyu Yong Jung³,
Seong Hun Ahn, Woo Yeal Jeong¹, Won Hong Woo*

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

Cancer, which is expressed in various forms, is one of the leading causes of human death. Soamsan (SAS) is composed of ten medicinal herb, the prescription was made according to the principles of Oriental traditional medicine based on the concept of synergic effects and interaction of among the components. SAS has been used for the cancer therapy, but the mechanism of it's effect is not well known. In the present study, the cytotoxic effect of the SAS water extract on cancer cell lines was investigated by the method of MTT in A549 cell lines and the anti-angiogenic effect was shown in the assay of chorioallantoic membrane (CAM) and in the cornea of rat administered orally with SAS water extraction. The viability of A549 cell lines was not affected by the whole extract of SAS but the n-Hexan fraction of SAS water extract showed strong cytotoxicity which was not seemed to be done by the apoptotic mechanism. SAS water extract showed inhibition effects of angiogenesis induced in the cornea of rat and CAM assay. As the above results, it is suggested that SAS can be a candidate for new prescription for cancer therapy.

Key words : Soamsan(消癌散), anti-angiogenesis, cancer therapy

서 론

암은 정상세포가 여러 가지 자극으로 세포증식 조절에 관련된 유전자가 변형되어 무절제하게 증식됨으로써 형성된 변형세포의 집단으로, 기존의 치료법들은 대개 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등이 주를 이루어 왔으나, 이러한 치료법들이 주로 암세포주에 대하여 직접적인 살상작용을 목표로 하고 있어 정상세포에도 피해를 입혀 골수기능억제나 면역기능저하 등 많은 부작용을 야기하고 있다. 그러므로 근래에는 세포독성은 약하지만 정상세포에 피해를 주지 않고 항암성을 증가시키면서 부작용을 줄일 수 있는 면역요법이나 apoptosis, 세포분화유도법, 혈관형성저해법 등 새로운 방법의 연구가 활발히 진행되어 왔으며¹⁻³⁾, 천연물인 한약재에 대한 많은 연구도 진행되어 왔다. 한의학에서 암을 비롯한 모든 질병은 正氣와 邪氣의 盛衰에 의하여 발생된

다고 인식^{2,4)}하므로, 암의 치료 또한 證型에 따라 健脾益氣, 滋補肝腎 등의 扶正法과 活血化痰, 化痰軟堅 등의 祛邪法, 그리고 동시에 扶正法과 祛邪法을 응용한 扶正祛邪法이 활용된다. 이 중 活血化痰法은 적극적인 치료방식으로 瘀血과 종양의 밀접한 관련성 때문에 많이 응용되어지는 治法이다^{2,5-6)}. 따라서, 한의학의 整體觀的 개념을 응용하여 새로운 처방을 立方하는 것은 현재 암 치료의 한계로 지적되고 있는 암세포의 전이, 변성 및 성장 등의 문제해결에도 도움이 될 것으로 생각한다. 소암산은 한의학적인 암 치료방법에서 扶正祛邪法에 상응하는 처방으로 『東醫治療經驗集成』¹¹⁾중 元氣를 補하고 解毒하며 瘀血을 제거하고 항암작용이 있다는 소암산 處方을 응용한 것으로, 人蔘 · 當歸 · 半枝蓮 · 白茯苓 · 白花蛇舌草 · 白朮 · 昆布 · 海藻 · 三稜 · 海巴라기 줄기 등 10가지 약물로 구성되어 있다. 처방 내용 중 人蔘 · 白朮은 補氣藥物로 특히 中氣가 虛한 것을 補하고, 當歸는 補血 · 活血의 功效가 있어 血液循環을 촉진하며, 三稜은 破血祛瘀의 작용으로 當歸와 함께 血瘀로 인한 혈액장애를 개선시킨다. 또한 昆布, 海藻는 다함께 消痰軟堅하는 작용이 있어 腫塊를 消失시키고

* 교신저자 : 우원홍, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과전문대학원
E-mail : whwoo@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-6845
· 접수 : 2002/10/16 · 수정 : 2002/12/06 · 채택 : 2003/01/20

軟化시키는 效能이 있으며, 白茯苓은 性味가 辛散 · 苦澁한 藥물로 肝氣의 鬱結을 疏散시키는 작용이 있어 氣를 疏通케 하여 瘀血을 公축하는 작용 뿐만 아니라 祛風明目 · 祛風止痒하는 작용도 있다¹⁰⁾. 半枝蓮과 白花蛇舌草의 경우 清熱解毒藥物로 清熱 · 解毒 · 散瘀止血 · 利水消腫 및 각종 암에 효과가 있는 것으로 보고되었으며, 특히 소화기성 암에 유효한 것으로 보고^{7,9)}되고 있다. 해바라기 줄기는 血淋 · 尿路結石 · 小便不利에 효과^{7,9)}가 있어, 민간에서는 해바라기 줄기속을 물에 달여서 차물 대신 常服하여 위암을 치료하였다는 보고가 있다¹¹⁾. 따라서 본 처방은 補氣 · 補血 · 祛痰 · 清熱 · 解毒 등의 작용이 있어 益氣活血, 清熱解毒, 軟堅散結의 功效가 있어 각종 소화기성 만성질환과 암치료에 응용되어지는 처방이다. 최근에 보고된 소암산의 항암효과에 대한 연구결과로 김 등¹²⁾은 소암산의 경구투여가 면역 체계에서 glycoproteins와 endotoxins의 혼합작용을 통한 antigen-specific immune responses를 증가시킨다고 보고하였다. 이에 저자는 암에 대한 한의학의 치료법 중 扶正祛邪法에 相應하는 처방인 소암산의 항암효과를 실험적으로 규명하고 새로운 항암제 처방의 구성 자료로 활용하기 위하여 다양한 실험이 필요하다고 보고 A549 세포주를 이용한 소암산의 독성 실험과 chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay와 랫트의 각막에서 유도된 신생혈관억제 분석 실험을 실시하여 항혈관신생효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

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

Table 1. Prescription of Somamsan

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
白茯苓	Fructus tribuli	30
白花蛇舌草	Herba oldenlandiae diffusae	25
白朮	Rhizoma atractylodis macrocephalae	20
昆布	Thallus laminariae	12
海藻	Thallus sargassi	12
三棱	Rhizoma scirpi	10
向日葵莖	Helianthus annuus	30
TOTAL AMOUNT		229

2) 동물

실험동물은 무균 상태의 C57BL/6 마우스를 샘타코로 부터 구입하여 계대배양하여 10~12 주령의 마우스를 암, 수 구별 없이 실험에 사용하였으며, CAM assay를 위한 수정란은 익산에 있는 영생 종계장에서 구입하여 실험에 사용하였다. 각막의 혈관 신생을 관찰하기 위하여 5주령으로 약 120~150 g된 랫트를 구입하여 사용하였다.

3) 세포 배양

A549 세포주 (ATCC)의 배양은 CO₂ 배양기 (37℃, 5%)에서 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI-1640배지에서 배양하였으며, 4일 마다 3ml의 trypsin-EDTA 용액을 사용하여 계대배양을 실시하면서 소암산물추출물과 소암산분劃物을 처리한 뒤 세포의 apoptosis 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다. 또한 C57BL/6 마우스의 흑색종으로부터 유래된 B16 흑색종 세포주는 한국세포주은행으로부터 분양 받아 시험관내에서 Minimal Essential Medium (10% FCS)에서 배양하고, 세포는 10-cm tissue culture dishes에 약 10 ml의 배지를 넣어 5%의 CO₂ incubator에서 일주일마다 계대배양 하면서 실험에 사용하였다.

4) 시약 및 기기

RPMI-1640 배지, fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA는 Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Maryland, U.S.A.)를 사용하였고, DNA 분절 염색과 DNA ladder에 Hoechst 33342 (Sigma Chemical Co., St. Louis, NY., U.S.A.), Wizard Genomic DNA purification kit(Promega Co., Madison, U.S.A.)가 사용되었다. 본 연구에 활용된 기기는 inverted microscope(Leica Co., USA), fluorometer (Molecular Devices Co., Sunnyvale, U.S.A), spectrophotometer (Beckman, DU-7 Model., Germany)를 사용하여 항암활성에 대한 연구를 수행하였다. 또한 신생혈관 기전의 억제효과를 연구하기 위하여 시약 처리용 thermax coverslips (Nunc Naperville, ILInc.,IL)과 신생혈관 유도 수술을 위한 10-0 nylon (Davis+Geck, Wayne, NJ)봉합사를 사용하였고 retinoic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, NY., U.S.A)는 CAM assay의 positive control로 사용되었다. 신생혈관억제를 좀더 자세히 관찰하기 위하여 fat emulsion (10%)를 Green Cross Pharm., Co. (Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였으며 봉합수술 후 염증을 예방하기 위하여 terramycin (Pfizer, Inc.)을 사용하였다. 본 연구에 사용된 기기는 실체현미경 (Olympus Co., Japan), Digital Camera (Nikon Co., Japan), haching system (Jeung-Do, Inc., Korea)을 신생혈관기전 억제 실험에 사용하였다. 또한 동물사육을 위해서는 무균무진-항온항습 자동 사육장치 (Jeung-Do, Inc., Korea)를 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 제조

소암산 229 g의 50%인 114.55 g을 증류수 1 l 를 가하여 3시간 동안 끓인 후 거즈로 여과하고 3,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상침액을 취하였다. 원심분리 후 여과액을 농축기(rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃에서 freeze dryer로 동결건조시켜 23.25 g의 건조추출물을 얻어 소암산물추출물 시료로 사용하였다. 또한 소암산의 생리활성 물질을 검색하기 위하여 유기 용매 분획을 실시하였는데, 전탕하여 얻어진 상기의 소암산물추출물을 유기용매인 hexane (n-Hexane)과 ethanol (EtOH) 그리고 butanol (BuOH)로 각각의 유기용매 추출물(分劃物)을 얻었으며, 이 유기용매 추출물은 암세포의 세포독성을 연구하는데 사용하였다.

2) 세포 생존율 측정

세포의 생존율은 MTT assay 방법을 이용하였다³⁰⁾. 간단히 기술하면 세포배양판 (24-well plate)에 1×10^5 씩 세포를 1 ml의 배양액에 넣어 분주한 후, 실험에 필요한 각각의 농도별 소암산물추출물과 용매 분획물을 처리한 다음, MTT를 최종농도가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 넣어주었다. 생존율의 판정은 MTT 처리 후 4시간 후에 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 불용성의 formazan을 100 μl 의 10% SDS가 포함된 0.01 N HCl 용액으로 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 방치하여 녹인 다음, ELISA reader로 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 또한 A549 세포의 생존세포수를 측정하기 위하여 trypan blue exclusion 방법³⁵⁾에 따라 측정하였다. 소암산물추출물과 소암산분획물이 처리된 세포를 trypsin-EDTA용액으로 부유시킨 후, 1 : 1의 trypan blue 용액으로 염색한 후 혈구계산기를 이용하여 살아있는 세포수와 죽어있는 세포수를 100배의 독립현미경하에서 관찰하고 세포생존율을 환산하였다.

3) Hoechst 염색

소암산이 나타내는 세포독성의 효과가 세포포사인지 apoptosis 과정인지 확인하기 위하여 apoptosis 과정의 특징의 하나인 DNA 분절화와 염색질 농축이 일어나는지 Hoechst 염색을 시행하였다. 이를 위해 소암산 hexane분획물이 처리된 세포들을 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 씻어주고 Hoechst 33342 염색시약을 PBS에 10 μM 이 되게 희석하여 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하고 형광현미경으로 관찰하였다.

4) Chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay 및 랫트의 각막에서 유도된 신생혈관억제 분석

수정란을 온도 37°C로 습도는 포화습도의 조건이 유지되는 incubator에서 3일간 부화시키고 4일째에 수정란의 air sac쪽에 albumin을 3~5 ml 정도 뽑아낸 후 air sac쪽을 직경 2 cm 되게 원형의 창을 핀셋을 이용하여 겹지를 투명테잎으로 제거하여 만든 후 투명 테잎으로 창을 막고 동일한 조건에서 배양하였다. 5일째에 CAM 이 형성된 것을 확인한 후 미리 제도된 thermanox coverslip의 sample을 CAM위에 loading하고 2일간 더 배양하였다. 배양 완료 후 fat emulsion (10%)약제에 의한 혈관신생의 억제효과를 대조군에 비교하여 육안으로 관찰하였다. 또한 각막의 신생혈관억제 실험은 무균무진-항온항습 자동 사육장치에서 사육된 랫트의 암컷 (5주령)을 각막봉합수술을 위하여 마취를 시키고 10-0 nylon 봉합사로 랫트의 각막에 봉합수술을 실시하고, 봉합술이 끝나면 teramycin을 발라 염증을 예방하였다. 마취에서 깨어난 랫트는 자동 사육장치로 옮긴 후 4주 동안 사육하면서 랫트의 몸무게 1 kg당 200 mg의 소암산 물추출물을 매일 경구투여 하였다. 실험 4주째에 마취를 시킨 후 디지털 카메라가 부착된 실험현미경하에서 각막의 신생혈관 억제를 관찰하고 사진을 찍었다.

6) 통계 처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들을 평균

과 표준편차로 표시하였고, 각 군간의 차이는 one-way ANOVA 후 Scheff's test하여 $P < 0.05$ 를 통계학적으로 의미 있다고 판정하였다.

실험결과

1. 소암산이 A549 세포의 생존율에 미치는 영향

1) MTT assay 결과

소암산물추출물이 A549 세포의 생존율에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 먼저 소암산물추출물의 농도를 변화시키면서 24시간과 48시간 배양한 후 세포의 생존율을 MTT assay 방법으로 측정하였다. 소암산물추출물 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 A549세포에 투여하고 24시간 배양한 결과, 각각 98.1%, 97.6%, 97.3%의 세포 생존율을 나타내어 소암산물추출물 자체에는 세포독성 작용이 나타나지 않았다. 또한 소암산의 추출 방법에 따른 세포독성효과를 규명하기 위하여 소암산물추출물 (SAS-W)을 유기용매인 EtOH, BuOH, n-Hexane으로 추출된 각각의 분획물로 세포의 생존율을 측정하였다. 소암산 각각의 분획물 또한 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 A549세포에 투여하고 24시간 배양한 후에 MTT assay 방법으로 측정된 결과, 소암산 EtOH 분획물 (SAS-E)에서는 97.0%, 97.0%, 96.2%로 세포독성작용이 나타나지 않았고, 소암산 BuOH 분획물 (SAS-B)에서도 97.5%, 96.2%, 96.3%로 역시 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 소암산 hexane 분획물 (SAS-H)에서는 71.5%, 65.3%, 35.6%의 생존율로 농도의존적인 세포 독성효과가 관찰되었다(Fig. 1, Table 2). 또한 시간 의존적인 결과를 알아보기 위하여 소암산물추출물과 각각의 EtOH, BuOH, n-Hexane분획물을 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 동일한 용량을 A549세포에 투여하고 48시간 배양한 결과, SAS-W의 경우 각각 96.7%, 89.0%, 84.8%의 세포 생존율을 나타내었으며, SAS-E에서는 86.8%, 86.1%, 83.2%의 세포생존율을, SAS-B에서는 84.9%, 80.6%, 76.0%로 대조군과 비교하여 세포생존율이 약간 감소하였으나 유의성은 인정되지 않았다. 그러나 SAS-H에서는 각각 51.7%, 34.8%, 7.8%로 농도의존적으로 대조군에 비하여 세포 생존율이 현저하게 감소되었다(Fig. 2, Table 3).

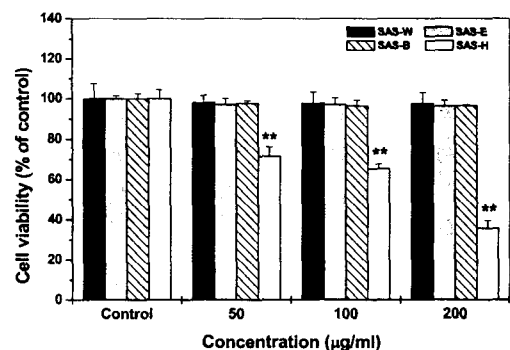


Fig. 1. Effects of Soamsan-water extract (SAS-W), -EtOH extract (SAS-E), -BuOH extract (SAS-B) and n-Hexane extract (SAS-H) on the viability of A549 cells by MTT assay. Each extract of SAS no changed the viability of A549 cells in a dose-dependent manner except SAS-H. A549 cells were treated with various concentrations (from 50 to 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of extracts of SAS. After the treatment of SAS extract for duration of 24 hr, the cell viability was measured by MTT assay. The data represented as mean \pm S.D. of quadruplicates. **: significantly different ($P < 0.01$) by ANOVA test.

Table 2. Effects of SAS-W, SAS-E, SAS-B and SAS-H on the viability of A549 cells in 24 hr after treatment by MTT assay

µg/ml	SAS-W	SAS-E	SAS-B	SAS-H
0	100.0±7.5	100.0±1.5	100.0±2.6	100.0±4.4
50	98.1±3.7	97.0±3.1	97.5±1.4	71.5±4.6**
100	97.6±5.7	97.0±3.3	96.2±2.9	65.3±2.3**
200	97.3±5.7	96.2±2.7	96.3±0.5	35.6±2.9**

** : significantly different (P < 0.01) by ANOVA test.

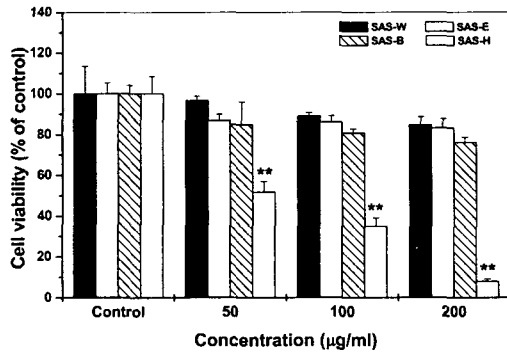


Fig. 2. Effects of Soamsan-water extract (SAS-W), -EtOH extract (SAS-E), -BuOH extract (SAS-B) and n-Hexane extract (SAS-H) on the viability of A549 cells by MTT assay. Each extract of SAS no changed the viability of A549 cells in a dose-dependent manner but n-Hexane extract of SAS decreased the cell viability. A549 cells were treated with various concentrations (from 50 to 200 µg/ml) of extracts of SAS. After the administration of SAS for duration of 48 hr, the cell viability was measured by MTT assay. The data represented as mean ± S.D. of quadruplicates. ** : significantly different (P<0.01) by ANOVA test

Table 3. Effects of SAS-W, SAS-E, SAS-B and SAS-H on the viability of A549 cells in 48 hr after treatment by MTT assay

µg/ml	SAS-W	SAS-E	SAS-B	SAS-H
0	100.0±13.2	100.0±5.2	100.0±4.0	100.0±8.4
50	96.7±2.1	86.8±3.1	84.9±11.8	51.7±5.3**
100	89.0±1.7	86.1±3.1	80.6±2.1	34.8±4.2**
200	84.8±3.8	83.2±4.4	76.0±2.5	7.8±1.2**

** : significantly different (P < 0.01) by ANOVA test.

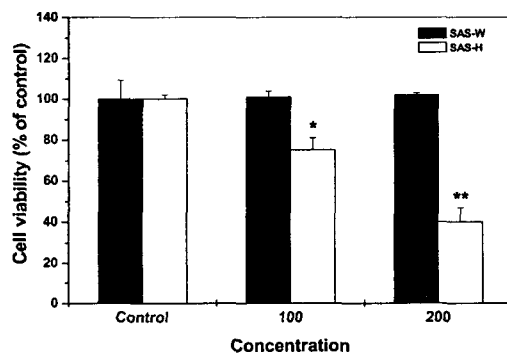


Fig. 3. Effects of Soamsan-Hexane (SAS-H) on the viability of A549 cells by trypan blue assay. A549 cells were treated with various concentrations(100 and 200 µg/ml) of SAS-H. After the administration of SAS-H for duration of 24 hr, the cell viability was measured by trypan blue assay. The data represented as mean ± S.D. of quadruplicates. * : significantly different (P<0.05), ** : significantly different (P < 0.01) by ANOVA test.

2) Trypan blue exclusion 결과

상기의 MTT assay 방법에 의한 실험의 결과, 소삼산의 세

포 독성작용은 주로 n-Hexane 분획물에서 일어남을 알 수 있었으며 이 SAS-H 처리에 의한 A549 세포의 생존 세포수를 trypan blue exclusion 방법으로 살아있는 세포수와 죽어있는 세포수를 관찰하여 세포생존율을 환산하였다. SAS-H 100 µg/ml, 200 µg/ml 처리한 후 24시간 배양한 결과, 각각 75.0±6.0%, 40.0±7.0%의 세포 생존수를 보였다 (Fig. 3, Table 4). 또한 48 시간 배양한 결과에서 SAS-H의 경우 각각 40.0±8.7%, 20.3±3.0%의 세포 생존수를 보여 MTT assay 방법과 유사하게 농도와 처리 시간에 의존적으로 생존 세포율이 감소됨을 알 수 있었다 (Fig. 4, Table 5).

Table 4. Effects of SAS-H on the viability of A549 cells by trypan blue assay after application for 24 hr

	SAS-W	SAS-H
0	100.0±9.2	100.0±2.0
100	101.0±3.0	75.0±6.0*
200	102.0±1.0	40.0±7.0**

* : significantly different (P < 0.05), ** : significantly different (P < 0.01) by ANOVA test.

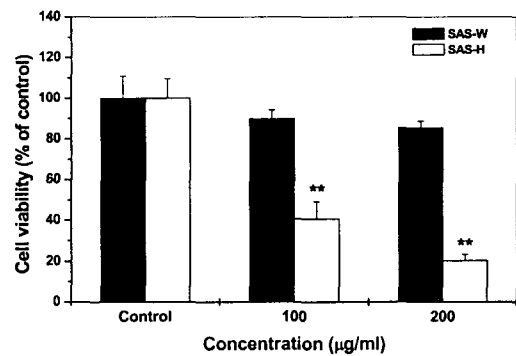


Fig. 4. Effects of Soamsan-Hexane (SAS-H) on the viability of A549 cells by trypan blue assay. A549 cells were treated with various concentrations (100 and 200 µg/ml) of extracts of SAS. After the administration of SAS-H for duration of 48 hr, the cell viability was measured by trypan blue assay. The data represented as mean ± S.D. of quadruplicates. ** : significantly different (P < 0.01) by ANOVA test.

Table 5. Effects of SAS-H on the viability of A549 cells by trypan blue assay after application for 48 hr

	SAS-W	SAS-H
0	100.0±10.9	100.0±9.6
100	89.9±4.4	40.0±8.7**
200	85.4±3.4	20.3±3.0**

** : significantly different (P < 0.01) by ANOVA test.

3) Hoechst 염색 결과

소삼산 n-Hexane 분획물의 세포독성 효과가 apoptosis의 과정을 유도하는지를 확인하기 위하여 Hoechst 염색을 실시하고 형광현미경하에서 세포의 형태학적인 관찰을 시도하였다. SAS-H 50, 100, 200 µg/ml를 A549 세포에 처리한 후 48시간 동안 배양한 후 A549 세포의 핵의 형태학적 변화를 관찰하였으나 SAS-H를 처리하고 48 시간 배양한 결과 A549 세포는 수적인 감소를 나타냈지만 핵의 농축 및 분절양상은 관찰되지 않았다 (Fig. 5).

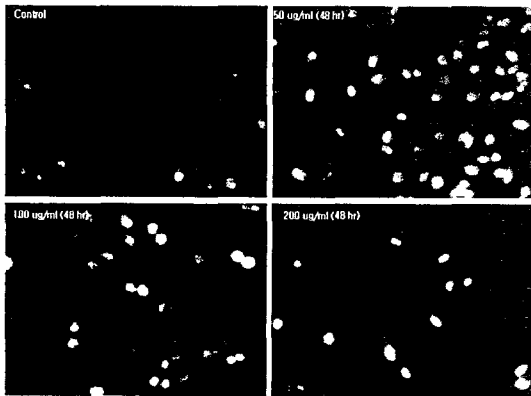


Fig. 5. The n-Hexane extract of SAS does not induced DNA fragmentation. Fluorescent staining of nuclei in A549 cells by Hoechst 33342. Media control cells were showed normal nuclear morphology with diffused chromatin structure. And after the duration of 48 hour for incubation from the time of SAS-H treatment, the fragmentation of nuclei was not observed.

2. 소암산물추출물의 신생혈관 억제효과

1) Chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay 분석

신생혈관 억제 효과를 관찰하기 위하여 chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay 및 랫트의 각막에서 유도된 신생혈관억제 분석 실험을 실시하였다. CAM assay에서 음성 대조군 (Fig. 6A)과 양성 대조군인 retinoic acid (Fig. 6B)와 비교했을 때 소암산물추출물 (500 µg/ml)의 혈관억제효과는 positive control과 유사하게 나타난다는 것이 확인되었다 (Fig. 6C). 특히 신생혈관의 굵기나 분포 면적에서 크게 억제된 것이 확인되었다.



Fig. 6. Effects of Soamsan (SAS) on embryonic angiogenesis in CAM 2 days after sample implantation. Fat emulsion (10%) was injected into chorioallantois to make clearly the vascular network, and the representative CAMs were photographed. Control CAMs treated with empty coverslips show no disturbance of angiogenesis (A). CAMs implanted with coverslips loaded with retinoic acid (10 mg/ml, B), SAS (50 mg/ml, C).

2) 랫트의 각막에서 유도된 신생혈관억제 분석

랫트의 각막모델에서의 신생혈관 억제효과에 대한 결과는 대조군과 비교했을 때 상당한 억제가 확인되었다. 대조군은 각막의 중앙에 봉합된 자리까지 각막의 기저귀 부위에서 신생혈관이 뻗어 올라온 것을 확인 할 수 있으며 (Fig. 7A), 혈관 분포와 수가 무척 많은 것이 확인되었다. 그에 반해 소암산물추출물을 처리한 처리군의 경우 대조군에 비해 각막의 중앙 부위의 봉합된 자리까지 혈관이 뻗지를 못했고 분포 또한 상당히 억제된 것이 관찰되었다 (Fig. 7B).



Fig. 7. Inhibitory effects of and Soamsan (SAS) on the neovascularization of rat cornea. Sprague-Dawley rat corneas were sutured with 10-0 nylon to produce corneal neovascularization, and animals were orally treated with herbal extracts (20 mg/kg body weight/day) 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 SAS (B).

고 찰

암이란 정상세포가 여러 가지 자극으로 인하여 유전적인 形質轉換이 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 위험을 주는 병증이다^{1-3,14-15}. 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 약할지라도 항암제와 병용 투여함으로써 항암성을 증가시키고 부작용을 줄일 수 있는 면역요법이나 apoptosis, 세포분화유도법, 혈관형성저해법 등과 관련한 연구가 활발히 진행중인 실정이다^{1-3,16-19}. 현대의학에서 암 치료법으로서 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등이 병행되고 있지만 소화장애, 간장장애, 탈모, 혈액학적 변화, 면역기능저하, 골수조혈장애, 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 필요하다²⁰⁻²². 암의 전이는 종양으로부터 혈관 형성인자 (angiogenic factor)가 분비되어서 혈관내피세포를 인식하고, 종양 세포가 인접한 세포와 접합하기 위해서 adhesive phenotype으로 변환하여 primary tumor는 줄어들고 intergrin이라고 하는 adhesion molecules들이 ECM의 collagen, laminin, proteoglycan과 같은 거대분자를 변형시킨다. 이후 혈관형성유도 단백질인 VEGF family가 내피세포 특이 mitogen의 작용으로 혈관생성을 일으키며, 맥관내 투과성을 증가를 일으켜 혈관침투가 일어난다²³. 암의 전이의 과정 중에 가장 중요한 혈관형성은 암

세포가 정상세포와 마찬가지로 성장하고 확장하기 위해서 필수적으로 새로운 혈관의 생성이 필요하다. 만약 고형암세포가 성장하기 위한 자체혈관을 갖지 못할 경우 직경 2 mm 이상으로 자랄 수 없다²⁴⁾. 동물실험에서도 angiogenesis 차단제를 투여하면 새로운 혈관의 생성이 차단되어 암세포의 크기를 아주 미세한 크기로 축소시키고, 암세포를 성장 정지 상태에 머무르게 하는데 전이 차단제중 angiostatin과 endostatin은 체내 antiangiogenic 단백질로서 쥐실험에서 이 두물질을 각각 투여시에 암이 거의 소멸했으며 동시 투여시에는 암세포가 완전소멸하였다^{25),26)}. 이러한 연구 결과 후 혈관형성 억제제들이 많이 밝혀져 있으며, 현재 임상에서 연구중인 것은 synthetic/semi-synthetic inhibitor로 carboxiamidotriazole (phase I), CM101, marimastat (phase II), pentisan polysulphate (phase I), TNP-470 (phase III), thalidonide (phase II) 등이 있고, endogenous inhibitor로 angiopoietin-2, angiostatin, endostatin, IL-12, interferon- α , platelet factor-4가 있다. Biological antagonist로 $\alpha V \beta 3$ intergrin antagonist, VEGF inhibitor, VEGF receptor blocker, soluble receptor가 있으며, vascular targeting은 regional TNF- α therapy, antibody targeting, vascular gent therapy가 있다²⁶⁾. 여기에 진일보하여 혈관형성 억제제와 기존의 항암 화학치료제와의 결합투여 방법으로 치료효과의 상승에 대한 연구로 Kato 등은 현재 임상 3기의 혈관형성억제 물질인 TNP-470에 기존의 항암제인 mitomycin C, adriamycin, 5-fluorouracil, cisplatin 등을 병용 투여 했을 때 B16-BL6 흑색종과 Lewis lung carcinomark TNP-470 단독투여 보다 더 억제되었다고 보고하였다²⁷⁾. 이 사실은 세포독성 물질과 혈관 형성 억제제와 같은 항전이제를 병용 투여 하는 방법이 더욱 효과적이라는 점으로 앞으로의 연구동향은 복합적 기전을 갖는 방법을 사용하여 치료를 증가와 부작용 감소 등 복합적인 효과를 갖는 방법이 연구될 가능성이 높다는 것을 추측해 한다. 한의학적 암에 대한 인식은 『靈樞』 ‘刺節眞邪論’에 “以手按之堅 有所結 … 日以益大 則爲骨疽”라하여²⁸⁾ 骨腫과 유사하게 묘사를 한 것 외에도 腸覃·石瘕에 대한 서술이 있었으며, 巢²⁹⁾는 『諸病源候論』에서 癥瘕·石瘕·石疽에 대하여 언급하였다. 또한 여러 문헌에서는 ‘癥疽’, ‘癭瘤’, ‘翻花瘡’, ‘喉痺’, ‘噎膈’, ‘反胃’, ‘痰癥’, ‘血蟲’, ‘乳癰’ 등으로 다양하게 명명하고 있으며 이들 대부분은 덩어리가 축지되는塊狀에 따라 표현되고 있다³¹⁻⁴⁴⁾. 단일약물의 항암효과에 대한 실험적 보고로 金⁴⁵⁾은 人蔘·鹿茸으로 항체생산억제에 대한 완화효과를, Odajima⁴⁶⁾는 人蔘이, Sasaki⁴⁷⁾는 甘草가, Tang 등⁴⁸⁾은 白朮이, Moon 등⁴⁹⁾은 蓬朮이 각각 상당한 항암효과가 있음을, 任⁵⁰⁾은 魚腥草·鹿血·豬鬃·穿山甲 등이 강력한 항암효과가 있을 뿐 정상 면역세포에서는 毒作用을 나타내지 않았다고 보고하였고, 박⁵¹⁾은 乳香이 혈관암세포에서 세포사멸유도효과가 있음을 보고하였다. 또한 方劑의 抗암效果에 대한 실험적 보고로 金⁵¹⁾은 扶正抗암湯이 직접적인 항종양효과를, 魯⁵²⁾는 消積補中丸이 항암효과가 있음을 보고하였다. 최근 복잡한 암의 생성과 轉移過程에 따라 다양한 연구가 시도되고 있으며 그 시도의 일환으로 한의학에서도 한의학 이론의 정체적 개념에 맞게 복합된 처방의 실험

결과도 다수 보고되어지고 있다. 加味金櫃腎氣丸⁵³⁾, 血府逐瘀湯⁵⁴⁾, 十全大補湯⁵⁵⁾ 등의 抗암, 抗轉移 및 血管形成 抑制效果 등이 보고되었으며 특히 蔘耆白朮散의 연구는 基本方에 瓦松·金銀花·蒲公英을 加味한 처방^{56),57)}과, 白花蛇舌草·仙鶴草·魚腥草를 加味한 處方^{58),59)}이 연구되어 복합처방이 가지는 항암효과를 증명하였다. 본 연구에서도 人蔘·當歸·半枝蓮·白疾藜, 白花蛇舌草, 白朮, 昆布·海藻, 三陵, 해바라기 줄기 등 10가지 약물로 구성되어 益氣活血, 清熱解毒, 軟堅散結의 功效가 있다고 알려진 소암산의 항암효과를 세포생존을 검사에 의한 독성작용을 연구하였고 암의 전이 및 발전과정에 필수적인 혈관신생에 관한 실험을 CAM과 각막실험을 통하여 연구하였다. 소암산의 세포 생존율에 대한 실험은 한약의 추출물이 대부분 물로 끓여 추출한다는 점을 감안하여 먼저 물로 끓인 후 건조 추출물을 얻어 실험하였다. 소암산의 세포독성의 경우 물추출물에서는 200 $\mu\text{g/ml}$ 까지 A549세포에 대한 독성작용이 나타나지 않았다 (Fig. 1). 전체적인 소암산물추출물의 항암효과를 세분화하여 관찰하기 위하여 소암산물추출물을 다시 EtOH, BuOH와 n-Hexane의 유기용매를 사용하여 각각의 분획물을 제조하여 세포독성 실험을 실시하였다. 소암산 EtOH 분획물과 BuOH 분획물에서는 물추출물과 마찬가지로 세포독성이 나타나지 않았으나, n-Hexane 분획물에서는 대조군과 유사한 세포독성 효과가 관찰되었다 (Fig. 1, Fig. 2). 소암산의 hexane 분획물에서 관찰된 세포독성 효과는 농도 의존적, 시간 의존적으로 나타나 이들의 세포독성효과가 세포괴사의 과정인지 아니면 apoptosis의 과정인지를 확인하기 위하여 hoechst 염색으로 관찰한 결과, 세포 사멸 과정 중 핵의 농축현상이나 DNA의 분절화현상은 관찰되지 않아 소암산 n-Hexane 분획물에서 나타나는 사멸과정은 apoptosis가 아님을 알 수 있었다 (Fig. 5).

암은 생성과 발전과정 중에서 많은 양의 영양분을 필요로 하며 그 공급을 원활하게 하기 위해서 신생혈관의 생성은 필수적인 과정이다. 이런 관점에서 소암산의 항암효과를 규명하기 위한 일환으로 in vivo에서 소암산의 탕제 추출물을 경구투여한 후 CAM assay와 각막의 신생혈관을 이용한 실험을 실시한 결과 신생혈관 억제가 현저히 나타난다는 사실을 확인하였다. 즉 소암산을 ml당 500 μg 로 처리했을 때 CAM에서의 신생혈관의 억제가 뚜렷하게 나타나는 것을 확인되었다 (Fig. 6). CAM assay에서의 신생혈관은 발생단계에서 자연적으로 생성되기에 그 의미는 매우 크다고 볼 수 있다. 또한 랫트의 각막에서의 신생혈관 억제효과는 CAM에서의 억제효과 못지 않게 대조군과 뚜렷한 차이가 나타났다. 즉 인위적으로 신생혈관을 유도하기 위해 각막 중앙부위에 봉합수술을 실시하면 4주 후 각막은 신생혈관의 생성이 최고조에 달하는데 이때 소암산을 매일 kg당 200 mg으로 경구 투여한 랫트의 각막에서는 상당히 신생혈관이 억제되었다 (Fig. 7). 이상의 실험결과를 살펴보면 소암산은 암세포에 직접 또는 간접적으로 암세포를 사멸시키기보다는 독성이 없는 단위 농도에서 암의 전이 및 발전과정에 필수적인 신생혈관의 억제작용이 있으므로 소암산은 암세포 전이와 성장 및 예방에 적용될 수 있을 것으로 보인다. 한의화적인 관점에서 소암산은 부정거사

와 활혈화어가 주작용이라고 할 수 있으므로 이러한 작용은 면역기능의 회복 및 활성화하는 작용으로 부정거사의 의미와 상합한다고 할 수 있다. 또한 신생혈관 억제 실험에서도 소암산이 발생단계에서의 신생혈관이든 인위적인 신생혈관이든 신생혈관을 억제하는 것이 뚜렷하게 나타나기 때문에 이들 결과는 암세포의 전이와 증식에 깊이 관여하는 신생혈관에 소암산이 영향을 미쳐 항암효과를 나타내었을 것으로 사료된다.

결 론

한의학의 암의 치료법 중 扶正祛邪法에 상응하는 처방인 소암산의 항암효과를 실험적으로 규명하기 위하여 A549 세포주를 이용한 세포독성실험과 혈관신생 억제효과를 보기 위하여 chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay 와 랫트의 각막을 이용한 신생혈관억제 효과를 관찰한 결과, 소암산물추출물의 A549 세포주에 대한 세포독성효과는 나타나지 않았으며 소암산물추출물 중 유기용매 분획물의 세포독성효과는 n-Hexane 분획물에서 강한 세포독성효과를 나타냈으나, apoptosis의 과정은 일어나지 않았다. 또한 소암산물추출물은 CAM assay에서 발생단계의 신생혈관을 상당히 억제시켰으며, 각막모델에서 또한 인위적으로 유도된 신생혈관에도 뚜렷한 혈관신생억제효과를 나타냈다. 따라서 소암산물추출물은 종양세포의 직접적인 살상작용에 의한 효과보다는 암세포의 증식과 전이에서 중요하게 여겨지는 혈관신생억제 효과를 가지고 있어, 향후 암 치료에 있어 한의학적 이론에 근거한 새로운 개념의 항암제가 개발되는데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한방치료기술연구사업 HMP-99-O-01-0003의 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사한다.

참고문헌

1. 서울대학교 의과대학편 : 종양학. 서울. 서울대학교출판부. pp.137-148, 193-205, 1998.
2. 문구 외: 암동서이결합치료1 : 원광대학교출판국. pp. 253-303, 383-460, 1999.
3. 東西醫學融合研究會編 : 臨床東西醫學, 서울, 永林社, pp. 538-546, 1997.
4. Odajima Yoshio : Effects of Ginseng on cancer cell. Yakuyo Ninjin sono Kenkyu to Shinpo, pp.198-209, 1981.
5. Sasaki S. : Antitumor agents from medical plants. Jpn. Kokai Tokyo koho Jp. p. 58, 118, 820, 1983.
6. 박래길, 오광록, 이광규, 문연자, 김정훈, 우원홍 : 유항물추출물의 HL-60 혈액암세포에서 세포사멸유도효과, 약학회지, 45:161-168, 2001.
7. 王冰 : 抗癌中藥方選, 北京, 人民軍醫出版社, 1, 6-7, 1995.

8. 郁仁存 : 中醫腫瘤學(下冊), 北京, 科學出版社, 77-78, 85-86, 1997.
9. 張民慶·龔惠明 : 抗腫瘤中藥的 臨床應用, 北京, 人民衛生出版社, 41-46, 1998.
10. 康秉秀·金永坂 : 臨床配合本草學, 서울, 永林社, 109-110, 386-388, 586, 622-623, 1994.
11. 동의치료경험집성편찬위원회 : 동의치료경험집성(제7권), 서울, 해동의학사, 387, 1997.
12. Eun-Ha Kim, Jeong-Chae Lee, Me-Yae Lee, Chan-Hee Park and Yong-Suk Jang : Soamsan, a traditional Korean medicine, enhances antigen-specific immune responses in low-responder mice via the combined activity of glycoproteins and endotoxins. (in pressed) int.immunopharm, 2002.
13. 주성민, 양휘훈, 우원홍, 정우열, 조원준, 이기영, 전병훈, 김원신 : 소암산의 경구투여에 의한 마우스 B16 흑색종 세포의 폐전이에 대한 항전이 효과 동의생리학회지 15(6), 1006-1010, 2001.
14. 대한병리학회 : 병리학, 서울, 高文社, pp.201-222, 231-258, 1997.
15. 송계용외 : 핵심병리학, 서울 고려의학 pp. 147-189, 1998.
16. Cohen JJ. : Apoptosis. Immunol. Today 14: 126-130, 1993.
17. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR : Cell death: the significance of cell death. Int. Rev. Cytol. 68: 251-306, 1980.
18. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ : Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. Pathol. Annu. 17: 229-259, 1982.
19. Im, S. Y., Han, S. J., Ko, H. M., Choi, J. H., Chun, S. B., Lee, D. G., Ha, T. Y., and Lee, H. K. : Involvement of nuclear factor-kappa B in platelet-activating factor-mediated tumor necrosis factor-alpha expression. Eur. J Immunol 27, 2800-2804, 1997.
20. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of cell death. Int. Rev. Cytol. 68: 251-306, 1980.
21. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. Pathol. Annu. 17: 229-259, 1982.
22. Im, S. Y., Han, S. J., Ko, H. M., Choi, J. H., Chun, S. B., Lee, D. G., Ha, T. Y., and Lee, H. K. : Involvement of nuclear factor-kappa B in platelet-activating factor-mediated tumor necrosis factor-alpha expression. Eur. J Immunol 27, 2800-2804, 1997.
23. Kleiner DE, Steleir-Stenenson WG : Matrix metalloproteinases and metastasis, Cancer Chemother Phamacol, 43 Suppl: S pp.42-51, 1999.
24. Folkman J. : Antiangiogenesis. New concept for therapy of solid tumors. Ann. Surg., 175, pp.409-416, 1972.
25. Bruce R. Zetter : Angiogenesis and tumor Metastasis, Annu. Rev. Med., 49, pp.407-702, 1988.
26. Hellmut G. Augustin : Antiangiogenic tumour therapy: will it work?, TIBS, 98(1), 1998.

27. Kato T, Sato K, Kacknuma H, Matsuda Y : Enhanced suppression of tumor growth by combination of angiogenesis inhibitor O-(chlorocacetyl-caramoyl) fumagilol (TNP470) and cytotoxic agent in mice, *Cancer Res.*, 1;54(19):pp.5143-5147, 1994.
28. 楊維傑 : 黃帝內經靈樞經釋, 서울, 成輔社, p549, 1980.
29. 巢元方 : 巢氏諸病源候論. 臺中. 昭人出版社. p.370, 1960.
30. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55, 1983.
31. 李岩 : 腫瘤學. 北京. 人民衛生出版社, pp.2-5, 1985.
32. 李岩 : 腫瘤臨證備要, 北京, 人民衛生出版社, pp.11-26, 1983.
33. 葉銘洪 : 治瘡中藥及處方, 臺北, 華聯出版社, pp.4-10, 48-50, 282-283, 1981.
34. 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.
35. 羅天益 : 衛生寶鑑. 北京. 北京商務印書館, p.126, 1976.
36. 上海中醫學院 : 中醫學基礎, 香洪, 商務印書館, p.101, 1976.
37. 孫思邈 : 備急千金要方, 서울, 大星文化社, p.295, 1984.
38. 王肯堂 : 證治要訣 臺北, 旋風出版社, pp.101-102, 1979.
39. 王清任 : 醫林改錯, 臺聯, 國風出版社, p.30, 1975.
40. 劉完素 : 河間六書, 서울, 成輔社, p.409, 1975.
41. 李中梓 : 醫宗必讀, 臺南, 綜合出版社, pp.254-255, p.410, 412, 473, 1976.
42. 方廣 : 丹溪心法附與, 서울, 大星文化社, p.556, 627, 1982.
43. 謝觀 : 東洋醫學大辭典, 서울, 高文社, p.1068, 1980.
44. 趙佶 : 聖濟總錄, 臺北, 新文豐出版社, p.616, 723, 1013, 1979.
45. 金光湖 外 : 水腫 漢藥材가 制암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.
46. Odajima Yoshio : Effects of Ginseng on cancer cell, *Yakuyo Ninjin sono Kenkyu to Shinpo*. pp.198-209, 1981.
47. Sasaki S. : Antitumor agents from medical plants. *Jpn. Kokai Tokyo koho Jp*. p.58, 118, 820, 1983.
48. Tang, Defang : Hao, Yohung : Liu, Zuoya : Miao, Shulin, Wei, Hua, Wu, Jian : Constituents of the essential oil from rhizome of *Attactylodes macrocephala* produced in pingjiang (China) and their antitumor effects. *Yaouxue Tongbao*. 19(9). pp.555-558, 1984.
49. Chang Kiu Moon, Byeong Gon Lee, Soo Whan Lee and Tak Lim Kang : Effect of antitumor polysaccharides from *Albizza julibrissin* on Immune function, *Arch. Pharmacol Res.* 8(4), pp.277-282, 1985.
50. 임재훈 : 수종의 한약물이 암세포 감수성에 미치는 영향, *경희한의대논문집*, Vol.9. pp.242-266, 1986.
51. 김병주 : 扶正抗암湯의 抗腫瘍效果에 관한 實驗的 研究, 원광대학교 대학원, 1996.
52. 노훈정 : 消積補中丸의 抗腫瘍效果에 관한 實驗的 研究, 원광대학교 대학원, 1995.
53. 김용태, 김정효, 김성훈 : 가미금계신기환의 항암 및 항전이 효과에 관한 연구, *대한한방중앙학회지*, 5(1), pp.19-32, 1999.
54. 배문용, 강인철, 김성훈 : 사미연견탕가미미방이 항암 및 항전이 효과에 미치는 영향, *대한한방중앙학회지*, 5(1), pp.33-46, 1999.
55. 이진화, 심법상, 안규석, 최승훈 : 혈부축어탕이 암전이 억제에 미치는 영향, *대한 한방중앙학회지*, 4(1), pp.131-146, 1999.
56. 조성기 : 소적백출산의 항암, 면역증강효과 및 cisplatin 부작용에 미치는 영향에 관한 연구, 대전대학교 대학원 박사 학위논문, 1993.
57. 김태윤 : 소적백출산이 bleomycin의 부작용 감소와 항암효과에 미치는 영향, 대전대학교 대학원 박사학위논문, 1996.
58. 송 욱 : 혈부축어탕 및 가미혈부축어탕의 항암활성에 대한 실험적 연구, 대전대학교 대학원 박사학위논문, 1999.
59. 광계호 : 소음인보중익기탕 및 소음인보중익기탕가미방의 항암효과 및 cyclophosphamide에 의한 부작용에 미치는 영향, 대전대학교 대학원 박사학위논문, 1996.