

원저

한약물을 이용한 혈관신생 촉진에 대한 최근의 연구동향

이송실* · 강중원# · 백용현# · 최도영# · 박동석# · 김덕윤[†] ·
김강일[‡] · 박상도[‡] · 양하루** · 지미영* · 이재동#

*경희대학교 골관절질환 한방연구센터
#한외과대학 침구과, [†]의과대학 핵의학과, [‡]정형외과, [‡]류마티스내과
**한국한의학연구원 한약제제연구부

Abstract

Recent Studies of the Effects of Herbal Medicines on Angiogenesis

Lee Song-shil*, Kang Jung-won#, Back Yong-hyeon#, Choi Do-young#,
Park Dong-seok#, Kim Deog-yoon[†], Kim Kang-il[‡], Park Sang-do[‡],
Yang Ha-ru**, Ji Mi-young* and Lee Jae-dong#

*Oriental Medicine Research Center for Bone & Joint Disease, KyungHee University

#Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medical, KyungHee University

[†]Dept. of Nuclear Medicine and [‡]Dept. of Orthopedic Surgery, College of Medicine, KyungHee University

[‡]Division of Rheumatology, Dept. of Internal Medicine, College of Medicine, KyungHee University

**Dept. of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine

* 본 연구는 2003년도 보건복지부 한방치료기술 연구개발사업 지원 연구비에 의하여 수행되었음(03-PJ9-PG6-SC01-0002).

· 접수 : 2004년 5월 14일 · 수정 : 2004년 5월 15일 · 채택 : 2004년 5월 15일

· 교신처 : 이재동, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한방병원 침구과

Tel. 02-958-9208 E-mail : ljdacu@khmc.or.kr

Background : Angiogenesis is the proliferation of a network of blood vessels emanating from pre-existing vessels, supplying nutrients and oxygen and removing waste products. Angiogenesis occurs in a variety of normal physiologic and pathologic conditions and is regulated by a balance of stimulatory and inhibitory angiogenic factors. Excessive angiogenesis should be suppressed. However, if blood supply is insufficient, it should be encouraged. Hyul-Mek(血脈) or Hyul-Rark(血絡), known as blood vessels in western medicine, is deeply related to Chung-Ki-Hyul(精 · 氣 · 血). The goal of this study is to review the effects of herbal medicines on angiogenesis that is involved in wound healing and enhancement of blood supply.

Methods : We conducted a systematic and comprehensive literature search for the identification, retrieval, and bibliographic management of independent studies to locate information on the topic. A computerized search of the published literature of Korea(KISS, RISS), China(CNKI), Japan(Kampo medicine, etc), and western countries(MEDLINE) was performed, and further supplemented with manual searches of print sources(1999 to 2003).

Results : The herbal medicines with angiogenic activity were mainly found among herbs that carry replenish Shin-Cheng(補腎益精), foster Eum and improve the circulation of blood(養陰活血), or warm and circulate Kyung-Rark(溫經通絡). In particular, herbs with improve the circulation of blood and clear blood(活血化癆) activity contain a significant amount of tannin, saponin, and pyrazine.

Conclusion : Replenish Ki-Hyul(補氣血) and circulate Kyung-Rark(通經絡) could contribute to the induction of angiogenesis because various growth factors and proliferation, differentiation, and migration of vascular endothelial cells are involved in angiogenic activity.

Key words : Angiogenesis, herbal medicine, Hyul-Mek(血脈), Hyul-Rark(血絡)

I. 緒 論

혈관신생(angiogenesis)은 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 만들어지는 일련의 과정으로, 혈관을 구성하고 있는 내피세포의 이동(migration)과 세포간 장벽인 extracellular

matrix(ECM)를 통과하는 침윤(invasion), 증식(proliferation), 혈관으로의 분화(tube-like structures), 새로운 ECM의 형성, 평활근세포의 관여 등 복잡하게 이루어지며, 이에 대한 유도물질과 억제물질간의 균형에 의하여 정교하게 조절되는 것으로 알려져 있다¹⁾. 생리적 상태의 혈관신생은 태아의 발생, 여성의 월경 및 국소의 산소부족에 따라 한시적으로 일어날

수 있으며, 병리적으로는 압, 당뇨병성 망막염, 류마티스성 관절염 등에서 혈관의 과잉 증식으로 나타난다. 허혈성 질환이나 골절 등에서는 혈류의 공급이 원활하지 못하여 치료성 혈관신생이 활용되고 있다³³⁾.

한의학에서 血脈, 血絡, 血分の 개념이 혈관계와 밀접한 관련이 있으며 活血祛瘀, 祛瘀生新, 疏經通絡의 효능이 있는 약물들이 혈관계에 직간접적으로 작용할 것으로 예상된다. 기존에 보고된 혈관신생에 대한 연구는 한약의 항암효과와 연관된 혈관신생 억제가 주류를 차지하며, 혈관신생 촉진에 대한 연구는 매우 미비하다. 따라서 이 분야의 자료조사를 통한 동정 파악이 당면된 과제이며, 이를 토대로 혈관신생 촉진에 가능성이 있는 한약을 선별하여 개발함으로써 허혈성 질환의 치료뿐만 아니라 혈액공급 개선에 따른 골절 치유에도 많은 도움이 될 것으로 기대한다.

본문은 한국, 중국, 일본 및 서양의 주요 학술사이트와 저널을 중심으로 1999년-2003년까지 발표된 논문을 검색하여 약물자료를 수집하였다.

II. 본 론

1. 연구방법

1) 조사방법

1999년에서 2003년까지 발표된 한약을 이용한 혈관신생 촉진에 관한 국내외 논문을 검색하였고, 한국, 중국, 일본을 중심으로 각국의 대표적인 학술저널 및 인터넷 사이트를 통하여 DB data를 주로 활용하였다.

【검색 사이트 및 학술지】

(1) 한국 자료

<http://search.koreanstudies.net>(한국학술정보)

<http://www.riss4u.net>(한국교육학술정보원)

(2) 중국 자료

<http://www.cnki.net>(清華同方)

中國中醫藥 및 中華中醫藥 관련 학술지 검색

(3) 일본 자료

경희의료원 도서관 소장 和漢醫學 및 東洋醫學 관련 학술지 검색

① 東洋醫學雜誌(Kampo Medicine)

② 和漢醫學雜誌(J. of Traditional Medicines)

③ 日本生藥雜誌(Natural Medicines)

④ 日本藥理學雜誌

(Folia Pharmacologica Japonica)

(4) 서양 자료

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Medline에서 herbal 관련 내용 검색

【검색용어】

(1) 한국: 혈관신생, 혈관내피, 미세순환

(2) 중국: 血管生成, 血管新生, 血管內皮, 內皮細胞, 中藥 등을 조합하여 검색

(3) 일본: 저널목록을 참고하여 검색

(4) PubMed: angiogenesis, herbal medicine, chinese medicine, oriental medicine 등을 조합하여 검색

2) 연구자료

검색된 자료는 유형별로 검토하여 정리하였고, 혈관신생에 관한 한약제제 연구내용을 크게 單味劑, 單味劑의 유효성분, 2종 單味劑의

配合, 2종 이상 複合製劑 등으로 나누어 요약하였다.

(1) 單味劑

① 당귀

오 등²⁾은 甘溫한 성질을 지니는 당귀는 《神農本草經》에 “...洗洗在皮膚中, ...諸瘡瘍, 金瘡, 煮飲之”라고 기록되어 한의학에서 대표적인 補血劑로 간주되며, 血分 病證에 주로 활용되므로 血脈에 대한 반응의 하나로 혈관신생에 미치는 영향을 관찰하였다. 韓當歸, 當歸, 日當歸 추출물을 SD rat에 경구투여하고, 스폰지 모델을 이용하여 대퇴정맥에 10% gelatin에 용해시킨 5% carmine red 2ml를 주입하고 vascularity index 정량법으로 혈관신생을 측정하였으며, HE 염색을 통하여 조직학적 검사를 실시한 결과 혈관신생 인자 Angiotensin II의 국소투여에 의하여 스폰지모 혈관신생이 유도되며, 당귀류가 혈관신생 유도효과를 증강시키는 것으로 나타났고, 韓當歸의 효능이 가장 강하다고 보고하였다.

Wang 등³⁾은 일본산 white rabbit에 고지방 식이로 10주간 사육한 후 채혈하여 혈청을 분리하여 고지방 혈청(hyperlipidemic serum, HLS)을 얻었고, 臍帶靜脈 내피세포 cell line (ECV304) 5×10^4 /ml에 25% 當歸注射液 20mg/ml과 HLS 50 μ l/ml를 각각 처리하여 전자현미경으로 내피세포의 막구조를 관찰하였고, SABC 면역염색 후 ICAM-1, bFGF, TGF β 1의 발현을 측정하였으며 세포배양액의 NO를 측정하였다. 當歸注射液과 HLS 처리군은 세포의 손상이 유의하게 감소되고, 세포 배양액의 NO 수준이 증가되었으며, ICAM-1, bFGF의 발현이 유의하게 감소하는 반면, TGF β 1의 발현이 증가되는 결과를 보여 혈관내피세포의 손상에

방어하는 효과를 나타낸 것으로 보고하였다.

② 영지

안 등⁴⁾은 《神農本草經》에 수록된 6종류의 영지 중 비교적 많이 사용되는 赤芝와 紫芝는 주로 ergosterol, mannitol, α -mycose, stearic acid와 glucosamine, ergosterol, mannitol 등을 각각 함유하고 있어 強心, 心筋收縮力과 冠狀動脈 血流量 증가, 血壓 조절 작용이 있으며, 문헌에 紫芝는 “利關節, 保神, 益精氣, 堅筋骨...”의 효능이 있다고 하여, 영지 추출액이 혈관신생을 통한 혈액의 흐름에 미치는 영향을 관찰한 바 있다. SD rat의 스폰지 모델을 이용하여 혈관신생인자 AII를 병용한 경우 영지 추출액을 경구 투여한 rat은 14일이 경과한 후 혈관신생이 억제되지 않고 오히려 유도되는 현상을 확인할 수 있어 영지 추출액의 혈관신생 촉진작용을 보고하였다.

Qian 등⁵⁾은 Rat의 肺臟 미세혈관으로부터 혈관내피세포를 in vitro에서 culture한 후 CD31 anti-body로 반응시켜 95% 이상의 세포에서 양성율을 확인한 다음 10^4 /ml 2代 cell에 형광염료 PI 50 μ l(50 μ g/ml)를 첨가하고 세포의 성장곡선을 산출하였고, 靈芝(생약: 27.5mg/ml, 일본 和漢生藥研究所 제공)를 dose별로 첨가하여 10^5 /ml cell의 성장곡선을 비교한 결과 영지 투여시 low dose(0.275mg/ml)에서 G₂-M期の cell이 유의하게 증가하며, middle dose(1.1mg/ml)에서 S期 cell이 유의하게 증가하였고, high dose(2.2mg/ml)에서 G₂-M期 및 S期 cell이 모두 유의하게 증가하여bFGF(0.01mg/ml)를 처리하였을 때의 50% 수준에 상당한 것으로 나타나 혈관내피세포 분화에 촉진작용이 있는 것으로 보이며, in vitro에서의 cell apoptosis에 대한 영향은 영지의 각 dose에서 유의한 차이가

없었으므로 혈관내피세포의 증식에 영지의 효과가 뛰어난을 밝혔다.

③ 단삼

Du 등⁶⁾은 New zealand White rabbit의 대퇴부 대혈관을 절단하여 혈액공급을 차단한 허혈성 모델을 조작하고, 정맥을 통하여 丹蔘注射液 10ml/kg⁻¹/d⁻¹을 연속 10일 투여하고 나서 이어 10일간 VEGF와 병용 투여하여 혈관신생 촉진효과를 관찰하였다. 시술 1일 후 실험동물의 보행형태, 양측 슬부 이하의 혈압차 측정 및 혈관造影을 실시한 결과 단순히 VEGF를 사용하는 것보다 丹蔘과 병용시 혈관신생에 대한 촉진효과가 더 유의하였음을 보고하였다.

④ 麥門冬, 生地

Zhang 등⁷⁾은 맥문동을 동물의 체중에 비례하여 2회/d, 연속 3일 경구투여하고, 마지막 경구투여(12시간전부터 금식) 1시간 후 경동맥에서 채혈하여 혈청을 분리하고, 56℃에서 30min inactivation하고 나서 0.22μm로 filtering 하여 맥문동 혈청을 얻고, HUVEC에 LPS를 처리하고 Annexin V-FITC와 PI를 이용하여 세포활성 및 세포사멸을 관찰하였는데, LPS를 처리한 HUVEC에 맥문동 혈청을 처리하였을 경우 세포사멸을 효과적으로 억제하며 LPS 처리후 MDA의 생성을 저하시키고 SOD 수준을 증가시키는 효과가 있다고 보고하였다.

李 등⁸⁾은 일본 white rabbit에 맥문동과 생지를 각각 인체 투여량의 20배로 1일 2회 연속 3일 경구투여하고, 마지막 약물 투여 1시간 후 경부 동맥에서 채혈하여 혈청을 분리하고 56℃에서 inactivation한 후 0.45μm로 filtering한 다음 약물성분이 함유된 혈청을 얻었다. HUVECs은 臍帶에서 분리하여 5×10⁷/L로 조절

한 후 96 well에 넣고 68시간 계대배양하여 cell에 약물을 포함한 혈청을 처리한 다음 MTT assay를 실시한 결과 맥문동과 생지는 모두 HUVECs의 proliferation을 촉진시키는 효과를 보였다고 밝혔다. 이는 기존 한의학적 시각에서 혈액순환에 도움이 되는 活血劑의 사용 외에 滋陰生津劑도 絡脈을 濡潤시키는 효능이 있어 혈관내피세포의 증식 및 대사 등에 유용하다는 근거를 제시하였다.

(2) 單味劑의 유효성분

① 鷄血藤

Takashi(西尾 孝) 등⁹⁾은 鷄血藤의 각 분획을 분석하여 血小板凝集에 대한 영향을 관찰하였는데, 측정 2주전 해열진통제를 복용하지 않은 20-36세 건강한 남녀의 혈액을 사용하여 ADP의 최종 농도를 1-3μM, collagen 용액은 0.5-2.0μg/ml의 범위에서 최대 응집을 초래하는 PRP를 이용하였다. 계혈등은 물추출 분획에서 농도에 의존하는 PRP의 응집 억제효과가 증가하였으며, methanol 분획에서 강한 효과가 있어 그 구성을 확인한 결과 tannin인 것으로 보고하였다.

② 川芎

Liang 등¹⁰⁾은 New zealand White rabbit의 대퇴동맥을 절단한 후 재봉합하고, Ligustrazine(川芎嗪)을 매일 1회씩 연속 14일간 정맥주사하여 혈관의癒합에 미치는 영향을 관찰하였다. 혈관수술 후 1,3,7,14일에 각각 정맥혈을 채취하여 ET, NO, PGI₂/TXA₂를 측정된 결과 heparin에 비해 부작용은 없는 반면에 혈중 ET를 저하시키고 NO를 증가시키며, PGI₂/TXA₂의 ratio를 높이므로 혈관내피세포의 성장을 촉진시킨다고 보고하였다.

Sun 등¹¹⁾은 Co γ 방사선(6.0 Gy)을 조사하여 골수 손상이 유발된 mice에 川芎嗪(Ligustrazine)을 4mg/1마리, 1일 2회 모두 13일간 투여하여 3, 7, 14일째에 각각 희생시키고, 대퇴골에서 골수세포를 분리하여 western bolt 분석법으로 골수의 FAK 발현과 ulna(尺骨)에 대한 HE 염색과 조직화학 염색을 통하여 flk-1의 발현을 관찰한 결과 川芎嗪은 골수의 조혈기능을 개선시키는 효과가 있다고 보고하였다.

Liu 등¹²⁾도 Sun 등과 같은 방법으로 방사선 조사에 의하여 mice의 골수 손상을 유발한 후 川芎嗪(Tetramethylpyrazine)을 2mg/1마리, 1일 2회 경구투여하고, 희생시킨 다음 humerus(상완골)에서 골수를 채취하여 BMNC counting과 VEGF의 발현을 관찰한 결과 골수의 VEGF 발현을 증가시켜 골수의 미세순환계를 개선시키고 조혈기능을 향상시켜 골수의 손상을 회복시키는 것으로 보고하였다.

Yin 등¹³⁾은 rabbit에 DXM(dexamethasone) sodium phosphate를 10mg/kg·d 기준으로 1, 2, 7, 8일에 피하주사하고, 28일간 연속 川芎嗪 10mg/kg·d을 피하주사한 후 실험전과 시험기간 15일째, 30일째, 60일째에 rabbit의 耳後 중앙동맥에서 채혈하여 각각 혈소판 수치와 tPA/PA I, PGI₂/TXA₂의 변화를 관찰한 결과 DXM sodium phosphate를 처리한 군은 15일 경에 혈소판의 수치가 저하되었으며, 30일 경에 tPA/PA I는 급격히 저하되었다. 이에 비해 DXM sodium phosphate를 처리하고 동시에 川芎嗪을 투여한 군은 tPA의 활성은 유의하게 증가되지만 DXM 처리시의 PA I 수준과 큰 차이가 없어 川芎嗪은 주로 혈관내피세포의 tPA 합성을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한 DXM 처리시 15일 경에 PGI₂가 저하되고 30일 경에 TXB₂가 저하되어 혈관경련 및 血栓 유도

의 경향을 보였으나 川芎嗪의 투여로 30일과 60일 경에 혈장 6-keto-PGF_{1 α} 의 저하 억제효과가 나타났고, TXB₂/6-keto-PGF_{1 α} 가 유의하게 저하되어 혈관내피의 분비기능에 영향을 주어 미세혈관의 이완을 유지하면서 혈소판의 응집을 억제하여 국소 혈액순환을 개선시키는 효과가 있음을 밝혔다.

③ 三七

Yan 등¹⁴⁾은 臍帶靜脈에서 분리된 passages 133 내피세포주 ECV₃₀₄를 제공받아 10⁵/ml cell을 96 well에 100 μ l씩 분주하고, total saponin of *Panax Notoginseng*(三七總皂甙)은 100mg/L 시작 농도와 Notoginsenosides는 100 μ M의 시작농도로 11개 dose에 따라 MTT assay를 실시하여 세포독성을 측정하였다. Cell을 넣은 well에 sodium dithionite를 함유한 1.0mM의 Earls액을 첨가하여 산소결핍 상태를 유발하고, total saponin of *Panax Notoginseng*과 Notoginsenosides를 3가지 농도로 각 well에 첨가하여 세포손상에 대한 억제효과를 MTT assay, trypan-blue 염색 및 LDH 활성 측정 등을 통하여 관찰한 결과 三七의 saponin 성분인 Rb₁, Rg₁, Re에서 모두 세포독성이 나타나지 않았고, 세포손상에 대한 억제효과가 있음을 보고하였다.

④ 丹蔘

Lay IS 등¹⁵⁾은 丹蔘(*Salvia miltiorrhiza*)에서 분리된 *Salvianolic acid B*(Sal B)를 ischemic-reperfusion(I/R) 동물 model에 low dose(5mg/kg)와 high dose(50mg/kg)로 시술 2시간 전과 시술 2nd, 4th days에 각각 투여하여 피부 조직판(flap, 5 \times 7cm)의 손상 억제효과를 관찰하였다. 동물 model은 SD rat의 left superficial

epigastric artery and vein을 3h clamping한 후 재관류시키고, mesh를 시술한 group과 시술하지 않는 group으로 나누었고, 시술 7일째에 flap necrosis area(FNA)를 animal using Sigma Scan으로 측정하고, 동시에 skin과 plasma의 AST, ALT, MDA, creatinine를 각각 측정하였는데, 유의한 차이는 나타나지 않아 *Salvianolic acid B*가 지질과산화 물 MDA의 수준에 영향을 미치지 않았음을 시사하였다. 한편 Murine endothelial cell line인 SVR를 culture하여 10th과 20th passages를 이용해 cell 농도를 3.6×10^6 으로 조절한 다음 RNA를 추출하여 angiogenic factors를 Western bolt와 RT-PCR법으로 분석한 결과 *Sal B* 처리시 Western bolt에서는 9h 경과 후 VEGF와 VEGF R2의 발현이 증가하였으며, RT-PCR에서는 2h 후 MMP-2의 발현이 증가되었고 40min 후 VEGF와 VEGF R2의 발현이 증가한 것으로 나타났다. 체중의 차이가 없는 각 group의 I/R에 의한 flap necrosis area는 *Sal B*의 dose에 관계없이 모두 유의하게 줄어 피부괴사에 대한 억제효과를 나타냈다고 하였다.

이들의 또 다른 연구¹⁶⁾에서는 Murine SVR cell line을 이용한 in vitro에서 丹蔘과 그 추출물 *Sal B*를 처리한 후 gene expression에 대하여 RT-PCR과 Western bolt로 각각 분석한 결과 MMP-2는 2h 경과 후 발현이 증가하였고, VEGF와 VEGF-R2는 40min 경과 후 발현이 증가하여 丹蔘의 혈관내피세포의 증식에 효과가 있음을 보고한 바 있다.

⑤ 桂皮

Kiyooki 등¹⁷⁾은 계피(*Cinnamomoni Cortex*)로부터 tannin 성분(TCC)을 추출하여 procyanidin

B-2(dimer), procyanidin C-2(trimer), Cinnamtannin A2(tetramer), Cinnamtannin A3(pentamer) 분획을 얻었다. Wistar rat의 胸部 대동맥을 적출하여 3mm 정도의 ring으로 절단하여 일부는 내피세포를 보존하고 일부는 내피세포를 제거하였다. 3×10^{-6} M prostaglandin F_{2a}(PGF_{2a})를 처리하고 10^{-3} g/ml의 TCC를 첨가하였을 경우 내피세포가 제거된 aorta ring은 PGF_{2a}에 의한 혈관수축을 완화시키는 작용이 없었으나 내피세포가 보존된 ring에서는 혈관의 수축을 억제하는 작용이 확인되었고, 10^{-4} M N^G-nitro-l-arginine methyl ester(L-NAME)를 60min 처리하여 NO 중합체를 억제시킨 내피세포 보존된 ring에서도 혈관수축의 억제나 일어나지 않아 TCC는 혈관내피에 의존한 혈관 이완 작용을 나타냈다고 하였다.

⑥ 紅花

Li 등¹⁸⁾은 홍화로부터 추출한 *safflor yellow* (SY)가 platelet activating factor(PAF)에 의하여 유도된 혈관내피세포의 손상에 미치는 영향을 관찰하였는데, 24 well에 10^9 /L HUVECs과 EVC₃₀₄를 넣고 SY(0.4g/L, 0.6g/L), PAF(10^{-6} mol/L)를 각각 30min 처리한 결과 10^{-6} mol/L 농도에서 PAF는 HUVECs의 형태적 변화를 일으켜 독성을 나타냈으며, 0.6g/L 농도의 SY도 독성을 나타냈고, 0.4g/L 농도의 SY는 PAF의 세포독성에 억제효과가 없는 것으로 보고하였다. EVC₃₀₄에 대한 SY(0.283, 0.381, 0.571, 1.143g/L)는 30min에서 세포독성은 나타나지 않았고, 2시간 후 1.143g/L에서 세포독성이 나타났으며, 4시간 경과시 농도상승에 따라 세포독성이 증가하는 것으로 나타나 혈관내피 손상에 대한 홍화추출물 SY의 효과는 없는 것으로 밝혔다.

⑦ 葛根

Xiao 등¹⁹⁾은 갈근에서 추출된 puerarin이 hydroxyl free radicals(HFR)에 의한 혈관내피 손상으로 내피세포에서 생성되는 NO와 ACE에 미치는 영향을 관찰하였는데, passages 3-5의 HUVECs를 이용하여 24 well에 $10^5/L$ 의 cell에 48시간 동안 low dose puerarin(0.5mg/ml)과 high dose puerarin(1.0mg/ml)를 각각 처리하고 soup를 취하여 NO, ACE를 측정함 결과 HFR에 의하여 HUVECs의 NO는 감소하는 반면 ACE 활성은 증가하는 것으로 나타났고, puerarin를 처리한 후 농도 증가에 따라 NO의 감소와 ACE의 활성증가는 유의하게 억제되어 puerarin이 HFR에 의한 혈관내피세포의 손상을 효과적으로 보호한다고 보고하였다.

Shi 등²⁰⁾도 puerarin의 혈관내피세포에 대한 보호효과를 관찰하였는데, 3-10 passages의 bovine aortic endothelial cells(BAECs)을 10 mL의 NaCN이 포함된 glucose-free medium에서 배양하여 산소결핍 상태를 유발하고, puerarin(0.1, 0.5, 1.0, 3.0mM/L)을 첨가하여 20시간 배양한 후 trypan blue staining과 dUTP에 의한 TUNEL, flow cytometry에 의한 DNA분석, Hoechst 33342 staining, immunocytochemical method에 의한 Caspase-3의 발현 등을 측정하였는데, NaCN에 의하여 58.6%의 cell이 apoptosis를 일으키고 48.3%의 cell에서 Caspase-3의 발현이 나타났으나 0.5-3mM/L 농도증가에 따라 puerarin이 혈관내피세포의 apoptosis와 Caspase-3의 발현을 억제하는 효과가 있음을 보고하였다.

(3) 2종 單味劑의 配合

① 황기+당귀

Lei 등²¹⁾은 李東垣의 《內外傷辨惑論》에 기

록된 當歸補血湯의 구성 약물인 황기와 당귀를 1:1, 2:1, 3:1, 5:1, 7:1, 10:1과 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, 1:10으로 배합하여 Wistar rat에 1일 2회 경구투여하고, 3일이 경과된 다음 복부동맥에서 채혈하여 혈청을 분리하고, CAM(Chick Embryo Choriollantoic Membrane) 모델을 이용하여 혈관신생에 미치는 영향을 관찰한 결과 原方에 의한 5:1의 配合 비율에서 가장 유의한 효과가 나타나 한의학적 이론에 착안하여 補氣劑와 補血劑의 配合에 따른 혈관신생 촉진작용을 입증하였다.

또한 Lei 등²³⁾은 in vitro에서 HUVECs에 대한 황기와 당귀의 효능을 연구하였는데, 2종 약제의 單味劑 및 혼합을 생약 1g/ml로 煎湯 농축시킨 다음 최대 농도를 24시간 동안 50% 세포사멸을 일으키는 량의 1/4로 정하고, $10^5/ml$ cell을 96 well에 넣어 dose별로 약물을 처리한 후 1, 3, 5, 7일에 cell counting을 하여 성장곡선을 구하고, MTT method를 통하여 proliferation을 확인하였으며, cell cycle을 5% 약물을 처리하고 48시간 incubation 한 다음 PI 염색하여 cytometry로 측정하고, SABC method에 따라 VEGF를 측정함 결과 황기와 당귀 併用은 VEGF의 발현을 증가시키고, 당귀는 S期の cell을 증가시키지만 황기하여 그 작용이 약하게 나타나고 2종 약물의 혼합 사용이 가장 효과가 강하게 나타나 DNA 합성을 촉진시키는 것으로 밝혔다.

Yang 등²²⁾은 Vascular smooth muscle cells(VSMC)를 6주령의 SD rat에서 분리한 후 4-8 passages cell를 사용하여 serum-free medium으로 24시간 incubation 시킨 뒤 8U/ml bFGF, 6mg/ml의 황기주사액(생약 2g/ml)과 3mg/ml의 당귀주사액(생약 0.05g/ml)을 각각 單味와 혼합 상태로 처리하여 24시간 경과한

다음 total RNA를 추출하고 RT-PCR과 Western bolt법으로 FAK의 RNA, DNA 발현을 측정하였으며, 상층액 중의 NO 수준을 측정하고, 또한 FITC-actin-bcl-2와 FITC-actin-caspase-3를 각각 이용하여 VSMC를 60 μ g/ml의 PI로 30min 염색 후 flow cytometry로 cell apoptosis 및 bcl-3, caspase-3의 발현을 측정하였다. 실험결과 VSMC에서 FAK mRNA의 발현을 확인하였으며 bFGF 처리시 약 1.29배 증가되는 반면에 황기주사액, 당귀주사액 및 2종 혼합 사용은 FAK의 mRNA와 DNA의 발현을 유의하게 억제시키고, NO 수준은 황기주사액과 당귀주사액 병용, 황기주사액, 당귀주사액 순으로 증가되었으며, apoptosis를 억제하는 bcl-2의 발현을 감소시키면서 apoptosis를 촉진시키는 caspase-3의 발현을 증가시켜 VSMC의 apoptosis를 촉진하는 것으로 나타나 황기와 당귀는 bFGF에 의하여 유발되는 FAK의 발현을 억제하는 한편 NO의 합성과 VSMC의 apoptosis를 촉진시키는 작용을 나타냈으며, 2종 약물의 혼합 사용에서 유의한 차이를 나타냈다고 하였다.

② 丹蔘+赤芍藥

Ding 등²⁴⁾은 혈관내피세포의 migration에 의한 혈관신생에 미치는 活血化癥劑 작용을 관찰하기 위하여 Walker256 암세포를 Wistar rat의 spleen에 이식한 동물모델에서 liver로 轉移되는 design을 이용하였다. 丹蔘과 赤芍藥은 1:1로 配合한 후 PBS에 생약 6.5g/ml의 농도로 맞추어 투여하였고, Walker256 암세포는 50 \times 10⁶/ml으로 조절하여 0.2ml을 Wistar rat의 spleen에 이식하는 시술을 하고, 다음날부터 1일2회 매번 0.6ml의 한약 시료를 경구 투여한 다음 시술전과 시술 다음날, 시술 14일 후에

尾靜脈에서 채혈하여 ELISA로 혈청 중 VEGF의 변화를 immunohistochemistry staining으로 처리하여 관찰하고, microvascular density

(MVD)을 측정하였으며, 약물 투여 14일 후 실험동물을 해부하여 간과 복강내 암세포의 轉移를 확인하였다. 실험결과에 따르면 암세포 이식 후 단삼과 적작약을 14일간 투여한 group에서 간과 복강내 轉移, 血性 腹水 등이 모두 현저하게 변화되었으며, MVD가 유의하게 증가되었고, 혈청 중 VEGF의 농도가 증가하는 변화가 관찰되어 암세포 轉移에 결정적 영향을 미치는 혈관신생이 단삼과 적작약에 의하여 촉진되었음을 밝혔다.

(4) 2종 이상 複合製劑

① 芪丹通脈片

처방구성: 황기, 당귀, 단삼, 홍화, 계지

王 등²⁵⁾은 芪丹通脈片(생약 2.86g/g 함유)을 high dose(2.0g/kg⁻¹)와 low dose(1.0g/kg⁻¹)로 나누어 SD rat에 1일 2회, 연속 14일 경구투여하고, 마지막 경구투여 1시간 후 관상동맥 結紮을 실시하여 심근허혈을 유발한 다음 2시간 경과시 경동맥에서 채혈하여 CPK, LDH를 측정하였으며, 심근의 N-BT 염색으로 경색구역(IS)를 계산하는 한편 경색 경계면의 조직배양을 통하여 면역화학적 염색을 실시한 후 bFGF, VEGF의 발현을 관찰한 결과 芪丹通脈片은 급성 심근 허혈을 유발한 실험동물에 심근의 bFGF와 VEGF의 발현을 촉진하는 것으로 나타났다고 하였다.

② 補腎生血藥

처방구성: 熟地, 枸杞子, 山茱萸, 黃芪 등.

王 등²⁶⁾은 10개월령의 golden hamster 생식기 분비물을 주기적(發情期: 평균 4d)으로 관찰

하여 排卵期 1d 전의 hamster를 실험 group에 배정하고, 약물 투여군은 補腎生血劑를 low dose(생약 3.5g/kg)와 high dose(생약 7g/kg)로 2회/d 1ml씩 연속 20d 경구투여한 후 “V” 모양의 자궁 우측 부분을 적출하여 Bouin액에 고정하였고 paraffin embedding한 후 HE 염색하여 조직을 관찰하고, immunohistochemical localization에 따라 ABC 염색을 실시한 다음 bFGF, VEGF의 발현을 관찰하여 3개월령의 hamster와 비교하였다. 그 결과 HE염색에서 加齡에 따라 hamster의 자궁내막 혈관이 數의으로 줄고, 혈관내피에서 bFGF의 발현과 VEGF의 발현이 幼齡에 비해 감소되었으나 補腎生血劑를 high dose로 투여한 경우 자궁내막의 혈관 감소 및 내피에서의 bFGF, VEGF 발현저하가 모두 억제되었다고 하였다.

③ 六味地黃方

처방구성: 熟地黃 8, 山茱萸 4, 山藥 4, 澤瀉 3, 牡丹皮 3, 茯苓 3.

張 등²⁷⁾은 六味地黃方 구성약물을 rabbit의 체중에 비례하여 2회/d 연속 3일 경구투여한 후 마지막 투여(12시간 금식) 1시간 경과시 경부 동맥에서 채혈하여 혈청을 분리하였고 56°C에서 30min inactivation시킨 다음 0.22 μ m에서 filtering하여 약물이 함유된 혈청을 얻었다. HUVECs을 culture하여 Fluo-3/AM로 염색하고, LPS를 처리하여 cell의 apoptosis를 유도한 다음 HUVECs내의 Ca²⁺ 농도의 변화를 laser confocal microscope으로 측정된 결과 六味地黃方은 LPS에 의한 Ca²⁺의 over-loading을 억제하는 효과가 있다고 하였다.

④ 益氣化癆方

처방구성: 益氣化癆方-黃芪, 川芎 등

活血通絡方-乳香, 沒藥 등

Wang 등²⁸⁾은 8개월령의 SD rat에 수술기법으로 cartilage-end plate 허혈 모델을 조작하여 5개월 경과 후 C₄₋₅ 경추를 적출하여 Cartilage-end plate에 형성된 afferent bud의 數와 면적을 appearance와 Dissector automatically count로 분석하고, VEGF의 발현에 대하여 immunohistochemistry로 EnVision TM 염색법에 따라 관찰하였다. 경추 허혈 모델을 조작하여 5개월 경과 후 益氣化癆方은 생약 5.13g/kg·d, 活血通絡方은 생약 6.00g/kg·d, 대조 약물로는 芬必得 생약(300mg/粒) 60mg/kg·d을 각각 1일1회 연속 1개월 경구투여하고 각 group의 Cartilage-end plate에 형성된 afferent bud의 數와 면적 및 VEGF 발현을 비교한 결과 益氣化癆와 活血通絡의 처방 모두 미세순환의 개선효과가 있었으며, 국소 허혈 상태로 인한 저산소 자극에 의하여 혈관내피세포의 VEGF 발현이 증가되는데, 대조군에 비하여 두 종류의 약물 투여군에서 혈관신생이 촉진되어 국소 혈류량이 증가하면서 VEGF의 발현은 증가되지만 afferent bud의 면적당 발현율은 낮아 국소 혈액순환 개선효과가 있음을 보고하였다.

⑤ 養陰生津方 및 養陰三方

처방구성:

養陰生津方-生地, 石斛, 麥門冬, 玄蔘 각 6g.

養陰涼化方-水牛角 30g, 玄蔘 9g, 麥門冬 9g, 黃連 5g, 連翹 6g, 生地 15g, 竹葉心 3g, 丹蔘 6g, 金銀花 9g.

養陰活血方-水牛角 12g, 赤芍藥 3g, 牡丹皮 3g, 生地 5g, 玉竹 6g, 麥門冬 6g, 玄蔘 6g.

王 등²⁹⁾은 HUVECs을 experiment culture하여 cell 농도를 5×10⁷/L으로 조절한 후 96 well

에 넣고 incubator에서 계대배양하였다. 약물 시료(생약 1g/ml)는 日本 white rabbit(1.8-2.5kg)에 인체 투여량의 20배로 환산하고 체중에 비례하여 1일2회, 연속 3일 경구투여한 다음 마지막 투여 1시간 후(희생 12시간전 금식) 경부 동맥에서 채혈하고, 혈청을 분리하여 56°C에서 30min 정도 inactivation시킨 다음 0.45 μm로 filtering하고 생약이 함유된 혈청을 얻었다.

HUVECs를 8 group으로 나누어, 즉 LPS(2 μg/ml)를 처리한 대조군과 養陰生津方, 養陰涼化方, 養陰活血方 3종 처방의 생약을 함유하고 있는 혈청을 각각 배지에 단독 첨가한 group 및 LPS와 생약 함유 혈청을 동시 처리한 group에 대하여 48h incubator에서 배양한 후 상층액을 취하여 SOD, MDA를 측정하였다. 이들의 결과에 따르면 HUVECs에 대하여 養陰劑는 MDA 수준을 저하시키고 SOD 수준을 증가시켜 LPS 독성을 효과적으로 억제하며, 그중 養陰涼化方の 효과가 가장 유의한 차이를 나타냈고, 養陰生津方에 비하여 養陰劑에 活血劑를 加味한 경우는 효과가 미약한 것으로 나타났다.

⑥ 通脈化栓膠囊

처방구성: 垂盆草, 紫草, 車前草, 甘草, 金銀花 등.

Wang 등³⁰⁾은 New Zealand white rabbit(2-3.5kg)을 Thomas 방법에 의하여 external jugular veins에 Thrombin을 주입하여 혈전 형성을 유도하고 양측을 각 20min씩 차단하여 혈전형성 model을 조작하였다. 대조군과 실험군에 7마리를 배정하고 실험군에 통맥화전교낭 분말 1.6g/DW(싱인 투여량의 7배에 해당함)을 1일1회 경구투여하고, 3일째 5일째에 각 2마리

를 희생시켜 혈전이 형성된 external jugular veins을 2cm 잘라내어 고정시킨 후 electron microscope에서 혈관내피세포의 형태를 관찰하였고, 나머지 3마리는 시술전과 실험 1, 3, 5, 7, 14, 30d에 각각 耳背 중앙 동맥에서 채혈하여 tissue PA(profibrinolytic activator)와 PAI(profibrinolytic activating inhibitor)를 측정하였다. 이들의 방법에 따르면 혈전형성 model은 정맥염의 발병 mechanism과 다소 차이는 있으나 국소 혈전의 형성이 순환장애를 일으키면서 저산소 상태를 유발하여 WBC의 침윤과 혈소판 응집, 내피세포의 박리 등 일련의 염증성 반응과 유사한 과정을 일으키므로 下肢의 DVT에 근접할 model로 삼았고, 3d과 5d에 내피세포의 형태학적 관찰에서 병적 model의 형성을 확인할 수 있었다. 혈중 t-PA와 PAI를 측정한 결과 약물 투여 14일 경과 후 대조군에 비하여 유의한 차이가 나타나기 시작하였고, t-PA/PAI의 수준도 대조군보다 유의하게 향상되어 시간이 경과되면서 혈전 용해작용을 갖는 것으로 보고하였다.

⑦ 養陰劑과 活血劑

처방구성: 養陰劑-生地黃, 玄蔘, 麥門冬.

活血劑-丹蔘, 川芎, 當歸.

龔 등³¹⁾은 養陰劑와 活血劑를 각각 구성하여 50%와 100% 물추출액을 제조하고, rabbit의 체중에 비례하여 1일2회 연속 3일 경구투여 하였다. 지막 투여 1시간 후(희생 12시간전 금식) 경부 동맥에서 채혈하고, 혈청을 분리하여 56°C에서 30min 정도 inactivation시킨 다음 0.22 μm로 filtering하고 생약이 함유된 혈청을 얻었다. 신생아의 cord 20-30cm에서 experiment culture로 HUVECs를 얻고, 96 well에 cell을 배양하여 coli-endotoxin 1μg/ml을 넣고 24h

incubation 하여 세포손상을 유발하였으며, 실험군은 養陰劑 생약 함유 혈청, 活血劑 생약 함유 혈청, 養陰劑와 活血劑의 合方 생약 함유 혈청을 각각 HUVECs에 첨가하여 24h 배양한 후 cell number를 5×10^6 /ml로 조절하여 PI 염색을 실시하고, 실온 暗處에 30min 방치하였다가 flow cytometer로 세포의 생존율을 측정하였으며, MTT assay로 세포증식을 측정하고, 약물 처리 후의 SOD, MDA, LDH를 kit로 각각 정량하였다. 이들의 결과에서 養陰 및 養陰+活血劑 처리군의 세포 apoptosis가 MTT assay에서 억제되는 경향을 나타내 세포손상을 보호하였으며, LDH가 감소하고, SOD는 3종 약물 처리군에서 비슷하게 감소 억제효과가 있었으며 MDA 수준은 복합제 사용시 유의한 감소를 보여 養陰劑와 活血劑를 병용하는 경우 혈관내피세포의 손상을 억제한다고 하였다.

III. 고찰

혈관신생이란 새로운 혈관이 형성됨을 의미하며, 생체의 발생단계에서 노화에 이르기까지 지속적으로 일어나는 현상으로서 국소 혈류공급의 안정에 필수적이며, 흔히 태생기의 혈관 발생(vasculogenesis)과는 구분된다¹⁾. 혈관신생은 각종 병리·생리적 과정과 연관되며, 이러한 과정에서 혈관신생 활성인자와 억제인자간의 균형적인 조절에 의하여 혈관내피세포의 증식, 분화, 이동 등이 자극되는 것으로 알려져 있다²⁾. 흔히 상처치유의 지연이나 노인성 질환, 만성 궤양, 선천성 기형, 허혈성 뇌졸중과

동맥경화성 치매 등에서 혈관신생의 부족 현상이 관련되고, 암이나 당뇨병성 망막염, 류마티스성 관절염, 건선, 화농성 육아종 등에서는 혈관신생이 과도하게 증식되어 문제시 되고 있다³⁾.

혈류공급의 영향을 비교적 많이 받는 근골격계 질환에서도 혈관신생의 중요성이 부각되면서 치료성 혈관신생이 가광을 받기 시작하였고, 골유합이나 新延 골형성, 골이식, 국소 허혈성 골괴사 등에서 이미 활용되고 있는 실정이다³⁹⁻⁴⁰⁾.

한의학이론에서 筋은 肝이 주관하고, 骨은 腎이 주관하며, 또한 肝은 藏血하고, 腎은 藏精하여 精血이 旺盛하여야 筋骨이 강해진다. 血管과 循環系는 血脈, 血絡, 經脈의 개념으로 요약될 수 있으며, 脈者 血之府也라고 하여 血은 주로 脈속에 머물러 있고, 그 運行은 氣의 통솔을 받는다. 精은 血中에 깃들여 있는 정미로운 부분이다(精涵於血中). 血이 脈을 따라 命門에 도달하면 精으로 化生되고, 精血은 모두 陰에 속한다³⁶⁻³⁷⁾. 따라서 血脈은 肝과 腎에 저장되어 있는 精과 血을 수송하는 통로이며, 血脈이 疏通되어야 精氣血이 순조롭게 운행되고, 근골을 滋養하여 그 기능을 강하게 유지할 수 있으며, 손상을 신속히 회복시킨다.

최근 한약의 혈관신생 촉진 및 억제 효과가 일부 밝혀지면서 각종 질병의 치료에 그 유용성이 인정되고 있다³⁵⁾. 한의학에서 氣血不和는 곧 百病을 일으키는 요인으로 인식되어 氣血의 調節이 한약치료에서 기본적인 원칙으로 간주된다. 근골격계 질환에서도 주로 精血을 보충하고 血脈을 소통시키는 補氣益腎(養精), 行氣活血, 行氣通脈의 원칙이 근간이 되며, 아울러 血脈이 순조롭지 못하면 국소의 영양분 공급이 원활하지 못하고 血脈에 瘀血이 형성되므로 養陰劑와 化瘀劑를 함께 사용하게 된다.

Table 1. Herbs with Angiogenesis Activities

약물/ 유효 성분	자료출처	Methods				Results summary
		실험	Models	투여방법	측정 항목	
當歸	오하식 외. 대한본초 학회지(2001)	In vivo	-male SD rat(150-200g) -스폰지 모델	Angiotensin II(100nM) 스폰지 주입 시료100mg/kg 경구투여	Vascularity(V.I) HE 염색 조직검사	韓當歸, 當歸, 日當歸 경구투 여 14일 경과시 한당귀 투여군 의 스폰지로 혈관신생의 침투 AII와 병용시 혈관신생 촉진 효과 한당귀 투여군이 가장 유 의한 차이 나타남
	Wang BH et, al. Acta Physiologica Sinica(2001)	In vitro	-endothelial cell line (ECV304) -일본 white rabbit에 고 지방 식이 후 혈청분리 (HLS)	cell 농도 5×10 ⁴ /ml 25% 당귀주사액 20mg/ml HLS 50μl/ml	SABC 염색 후 ICAM-1, bFGF, TGF β1의 발현 NO content	HLS 내피세포의 NO 및 TGFβ1의 발현 증가, ICAM-1 및 bFGF의 발현 감소 유발 당귀 HLS의 유도작용 억제, 내피세포의 손상을 보호
靈芝	안교필 외. 한방성인 병학회지(2000)	In vivo	-male SD rat(150-200g) -스폰지 모델	Angiotensin II(100nM) 스 폰지 주입 시료100mg/kg 경구투여	Vascularity(V.I) HE 염색 조직검사	영지추출물 경구투여 14일 경 과시 스폰지로 신생혈관의 침 투 AII와 병용시 영지추출물의 농도 증가에 따라 혈관신생 촉진
	Qian RZ et, al. J. of Chinese Microcirculation(2002)	In vitro	-male SD rat(60-80g)의 肺 미세혈관 내피세포 분 리 (RPMVEC, ex culture)	passage 2, cell 농도 10 ⁵ /ml 영지 low dose 0.275mg/ml middle dose 1.1mg/ml high dose 2.2mg/ml positive control : bFGF 0.01mg/ml	cell proliferation curve cell cycle cell apoptosis	4-8d 사이에 cell proliferation 유의하게 상승 low dose : G0-G1期 감소 G ₂ -M期 증가 middle dose : G0-G1期 감소 S期 증가 high dose : G0-G1期 감소 G ₂ -M期 증가 S期 증가 bFGF : G ₂ -M期 증가 apoptosis : 유의성 없음
丹蔘	Du JS et, al. Journal of Jilin University(2003)	In vivo	-male New zealand white rabbit(4kg) -左下肢 내측 허혈 model (혈관 절제술)	丹蔘注射液 수술 후 1일부 터 耳緣 vein 10ml/kg · d, 연 속 20d 주사 VEGF 수술 후 10d에 1mg/ 0.9% saline 3ml 1회 근육주 사	보행상태 양측 하지 혈압 ratio 하지 내측근육의 조직 병리	수술 후 21d Doppler 검사소 견상 단삼+VEGF군의 하지 혈 압 L/R ratio 상승 수술 후 21d 조직병리 검사소 견상 단삼+VEGF군의 capillary density 및 capillary/muscle fiber가 유의하게 증가 혈관조영술에서 단삼+VEGF 군 측부 순환계의 형성 확인
藜門 冬牛地	Zhang X et, al. Journal of Nanjing TCM University(2001)	In vitro	-HUVECs(ex culture) -white rabbit에 약물 경 구투여 후 생약을 함유 한 혈청분리	HUVECs 24h culture 후 Endotoxin과 맥문동 혈청 처리 4h	상층액의 SOD, MDA cell AQ/ER, Annexin V-FITC, PI staining	HUVECs 에 맥문동혈청 처 리 후 SOD 증가 MDA 감소 형태학적 소견 : endotoxin으 로 인한 cell apoptosis 및 괴 사 輕減 Flow cytometer 정량 분석 : cell의 생존율 증가
	李氏 외. 韓國藥學 (2001)	In vitro	-신생아 제대 20-30cm HUVECs(ex culture) -일본 white rabbit(1.8- 2.5kg)에 약물 경구투여 후 생약을 함유한 혈청 분리	HUVECs 68h culture (cell 농도 5×10 ⁷ /L) 상층액 100μl + 약물 혈청 100μl control group : RPMI-1640 정상 혈청 100μl 48h incubation	MTT assay	맥문동, 생지 성분이 함유된 혈청 처리후 cell proliferation 유의하게 상승

Table 2. Alkaloid of Herbs with Angiogenesis Activities

약물/ 유효성분	자료출처	Methods			Results summary
		실험	Models	투여방법	
鷓鴣菜 (Tarinin)	Takashi Nishio et. al. Natural Medicines(2000)	ex vivo	-ADP, collagen induce Platelet Aggregation. 3036세 건강한 남녀의 blood에서 혈소판 워킹 분리	혈소판 20-35만 조정 plasma ADP(1.3μM) 20μl collagen(0.5-20μg/ml) 시료(30% DMSO) 5μl	계혈 등의 물추출 분획과 acetone, methanol, H ₂ O fraction 분획 HPLC 분석 ADP, collagen으로 유도한 Platelet Aggregation에 계혈등의 물추출 분획에서 강한 억제효과를 나타냄 HPLC 분석에서 물추출 분획의 혈소판응집 작용은 tarinin으로 추정
川芎 (Ligustrazine)	梁德 외. 中藥止痛(2001)	in vivo	New zealand white rabbit (2.25kg) -femoral arteries 절단 補助劑	시료 5mg/kg 정맥주사 14d heparin 60u/kg(control)	시술 1,3,7,14일째 채혈 ET, NO, PGI ₂ /TXA ₂ 혈관 분할 시술 후 heparin 투여군과 비교 ET, NO, PGI ₂ /TXA ₂ ratio 모두 비슷한 변화를 나타냄
	徐德 외. 中華放射醫學與防護雜誌(2003)	ex vivo	Mouse(18-22g) irradiation injury(Co ⁶⁰ 照射) bone marrow(femura) nuclear cell culture(BMNCs)	Co ⁶⁰ (6.0Gy, 0.56Gy/min) 1회 시료(4mg, 2회/d, 13일 경구투여)	Bone marrow HE stain anti-factor VII & flk-1 stain Western blot : phosphorylated FAK 시료 투여 후 Co ⁶⁰ 조사에 의한 Bone marrow 손상억제 FAK의 발현증가와 flk-1의 발현감소를 억제 FAK의 발현감소를 억제 내피세포 및 조혈세포의 신호전달체계를 보호
	劉振芳 외. 中藥與放射學結合急救雜誌(2002)	ex vivo	Mouse(18-22g) irradiation injury(Co ⁶⁰ 照射) -bone marrow(femura & humerus) nuclear cell culture (BMNC/megakaryocytes)	Co ⁶⁰ (6.0Gy, 0.56Gy/min) 1회 시료(2mg, 2회/d, 13일 경구투여)	BMNC(femura) count megakaryocytes(humerus) : HE stain, HGF count Hematopoietic tissue Humerus HE stain VEGF 시료 투여 후 Co ⁶⁰ 照射로 BMNC & megakaryocytes의 감소 억제 Hematopoietic tissue의 area 감소 억제 VEGF 발현 증가 촉진, 14d 경과후 정상 수준 회복
	尹良軍 외. 中藥藥(2002)	in vivo	-male rabbit(26±0.3kg) Dexamethasone(control)	1st, 2nd, 7th, 8th days Dexamethasone 10mg/kg · d 2ml s.c 시료 10mg/kg · d 2ml s.c 2d	15일, 30일, 60일에 채혈 Platelet count plasma tPA, PAL, TXA ₂ /PGI ₂ 시료 투여 후 DXM으로 일시 유발된 혈소판 감소 억제 (tPA/PAL ratio 저하 및 TXA ₂ /PGI ₂ ratio 불균형 조절 미세혈관 경련 및 혈소판의 응집 억제
三七 (Total saponin & Notoginsenosides)	門參芳 외. 中國實驗方劑學雜誌(2002)	in vitro	-Cord vein endothelial cell line (ECV304) -Hypoxia(Sodium dithionite & glucose free Earls sol.)	passage 133 cell 농도 10 ⁶ /ml 시료 농도 100mg/L 11 doses 18h incubation	MTT assay : Toxicity Trypan blue stain : Apoptosis LDH 三七에서 추출된 total saponin과 Notoginsenosides는 세포독성 없음 시료 처리 후 cell apoptosis 억제 Hypoxia damage 완화
丹蔘 (Savianolic acid B)	J Sung Res.(2003) Lay IS et. al. Hanta Med(2003)	in vivo	-male SD rat(250-300g) ischemic reperfusion(I/R) (-mesh (+)mesh model)	Sal B low dose(5mg/ml) high dose(30mg/ml)	7th days skin flap (5*7cm) FNA plasma AST, ALT, MDA, creatinine 시료 투여 후 skin flap의 FNA는 유의하게 감소 plasma AST, ALT,MDA, creatinine 유의한 차이 없음
		in vitro	-Murine SVR cell line	cell 농도 3.6×10 ⁶ passage 10th and 20th	RT-PCR Western blot 시료 투여 후 MMP-2는 2h 후 발현 VEGF, VEGF-R2는 40min 후 발현
桂皮 (Tarinin)	Kyoaki Tanikawa et. al. Journal of Traditional Medicines (일본 和漢醫學雜誌 1999)	ex vivo	male Wistar rat(300-400g) Thoracic aorta ring (3mm) Endothelium 제거 or 보존	pretreatment L-MANE (10 ⁻⁶ M) PGF ₂ 2α (3×10 ⁻⁶ M) 시료 (10 ⁻⁶ g/ml)	PGF ₂ 2α 및 L-MANE 처리 후 혈관내피수축 시료 처리후 PGF ₂ 2α에 의한 혈관내피수축 및 L-MANE 전처리로 NO 억제시 without endothelium rings에서 이완은 나타나지 않고, 내피보존 rings에서만 나타남 계피의 tarinin 성분은 endothelial cell에 의존하여 혈관수축 억제
紅花 (Safflor yellow)	李文 외. 中藥藥理學通報(2001)	in vitro	-HUVECs ex culture (3-5d incubation) EVC304 (endothelial cell line) Platelet activity factor(PAF) induce EC damage	cell 농도 10 ⁶ /L PAT: 10 ⁻¹¹ -10 ⁻⁶ mol/L 시료 농도 0.4g/L Positive control : Ginkgolide (은왕추출물) cell damage control : 0.05% triton	inverted 현미경 관찰 MTT assay(독성 반응) PAT induce된 cell 독성은 incubation 30min 후 나타남 시료 투여시 농도 의존성 독성 증가에 억제 효과 미약 HUVECs와 EVC304에서 비슷한 결과 보임
葛根 (Puerarin)	肖德龍 외. 江門醫學院學報(2002)	in vitro	-Cord 25-30cm HUVECs ex culture Fenton 반응에 의한 HFR induce OH(10 ⁻⁶ M/L)	cell 농도 10 ⁶ /L 24 well passage 3-5 시료 low dose(0.5mg/ml) high dose(1.0mg/ml) 4h	NO Angiotensin Converting Enzymet(ACE) activity 시료 투여시 HFR로 인한 NO의 감소를 억제 ACE 활성 증가를 억제
	石瑞龍 외. 藥學學報(2003)	in vitro	-bovine aortic endothelial cell (BAECs, 10cm) ex culture hypoxia ischemia model NaCN(glucose-free medium) induce	passage 3-10 NaCN(10mM/L) 시료 0.1, 0.5, 1, 3mM/L, 2h	Caspase-3 immunocytochemical cell apoptosis(dUTP) flow cytometry Hoechst 33342 stain 시료 0.5mM 이상에서 NaCN에 의한 세포 고사 억제 Caspase-3 발현 억제 flow cytometry에서 apoptotic peak 면적 감소 Hoechst 33342 stain으로 DNA손상 DR1에 효과 확인

본문은 1999년에서 2003년까지 한국, 중국, 일본을 중심으로 일부 서양에서 보고된 자료를 추가하여 한약을 활용한 혈관신생 촉진 관련 연구를 조사하고 사용된 한약의 유형을 알아보 고자 하였다.

혈관신생에 활용된 한약은 Table 1에서 나타 난 바와 같이 단미제 중 補氣劑(黃芪), 補血劑(當歸), 補腎劑(六味, 靈芝, 枸杞子), 養陰劑(生地, 玄參, 麥門冬, 葛根), 活血化瘀(丹蔘, 川芎, 鷄血藤, 赤芍藥, 三七, 紅花), 溫經通絡(桂皮, 紫草)이 주로 활용되어 대부분 補益腎精, 養陰 補血, 活血化瘀, 溫通脈絡의 효능이 있는 한약에 집중되었음을 알 수 있다. Table 2에서는 주로 活血化瘀의 효능이 있는 한약에서 추출한 tannin, saponin, pyrazine 등의 성분이 혈관신 생에 효과적인 것으로 나타났다.

Maruyama 등(Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi 39:831-836 1963)이 내피세포를 enzyme perfusion method로 사람의 태혈에서 분리한 이래 내피세포를 대구경 혈관으로부터 분리, 배양이 가능해져 혈관생성 인자의 다양한 기능을 세포 및 분자생물학적 수준에서 연구할 수 있게 되었다. In vitro에서 적절한 passage의 cell line을 이용하거나 계대배양 후 약물을 처리하여 세포의 증식, 분화, 이동 등을 관찰하는 데, 單味劑와 그 유효성분이 내피세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 신생아 태줄로부터 분리된 HUVECs^{7-8,18-19)}과 EVC304^{3,14,18)}, rat의 폐 미세혈관에서 분리된 RPMECs⁵⁾, Mouse의 Bone Marrow에 분리한 BMNCs¹¹⁻¹²⁾, Murine SVE cell line¹⁶⁾, 소의 대동맥에서 분리된 BAECs cell line²⁰⁾ 등으로 실험한 결과 당귀, 영지, 맥문동, 생지, 천궁의 *Ligustrazine*, 삼칠의 *saponin*, 단삼의 *Salvianolic acid B*, 홍화의 *Safflor yellow*, 갈근의 *Puerarin* 등이 효과가

있음을 알 수 있고, 또한 맥문동과 생지의 배 합에서 cell proliferation을 촉진하는 효과가 확 인되었다.

생체에서 어떤 요인으로 국소에 혈류장애가 나타나면 혈관신생인자를 분비하게 되고 새로 운 혈관생성을 자극하는데, 발아(sprouting)의 형태로 개시되는 혈관신생은 MMPs와 같은 단백질분해효소(protease)의 분비에 의해 국소 혈관의 세포외 기질(ECM)을 분해하고, 이어 내피 세포의 증식으로 소관(capillary)을 형성한 후 angiogenic stimulus의 분포에 따라 migration 이 일어나면서 周皮細胞(평활근세포)의 침윤 으로 혈관 외층이 형성되어 새로운 혈관으로 융합된다. 이러한 과정의 신호전달은 내피세포 의 세포막에 존재하는 다양한 종류의 수용체 매개 작용에 의해 가능하며, 혈관신생인자 중 에서 비교적 많이 연구된 VEGF, bFGF, 혈소 판에 다량 존재하는 sphingolipid의 일종인 SIP, Angiogenin 등이 주된 역할을 수행하는 것으로, 그 핵심에 focal adhesion kinase(FAK)의 활성화가 결정적이다^{34,38)}. 川芎의 *Ligustrazine* 은 FAK의 발현¹¹⁾과 VEGF 발현¹²⁾을 증가시키고, 단삼의 *Salvianolic acid B*는 VEGF 및 그 수용체와 MMP2의 발현¹⁶⁾을 증가시키는 효과가 있어 혈관신생인자의 발현에 活血化瘀의 한 약이 효과적인 작용이 있음을 시사한다.

In vitro와 in vivo 실험결과가 완전히 일치 할 수는 없겠지만 한약의 체내 대사기전을 명확하게 규명하기 어려운 실정에서 세포수준의 연구는 나름대로 혈관신생에 관여하는 한약의 특성을 쉽게 파악할 수 있는 장점을 갖고 있다. 물론 in vivo에서도 적절한 model의 설정에 촉 각을 세우고 다양한 측면에서 접근하고 있다. 스폰지 모델^{2,4)}이나 허혈 재관류(I/R) 모델¹⁵⁾은 조직형태학적 변화를 통하여 직접적으로 한약

의 작용을 확인할 수 있으나 복합 처방의 경우 체내에서의 mechanism 설명에 한계가 있다. 최근 실험동물에 복합 처방으로 구성된 한약을 투여한 후 그 성분이 함유된 혈청을 분리하여 제외 배양된 세포에 처리함으로써 체내대사와 근접한 상태를 조성하려는 노력들이 시도되고

있다(Table 3). 이러한 측면에서의 접근은 복합 처방의 구성 약물을 직접 처리하는 경우와 약물 함유 혈청을 처리할 때의 효과를 비교하여 mechanism을 보다 객관적으로 설명할 수 있을 것이다.

Table 3. Formula of Herbs with Angiogenesis Activities

처방의 주된 약물구성	자료출처	약물구성의 특성	Angiogenesis Activities
當歸補血散(黃芪·當歸, 5:1)	高燕 외. 中藥日藥雜誌(2003) 高燕 외. 中藥日藥結合雜誌(2003) 楊長春 외. 中藥日藥結合雜誌(2003)	補氣, 補血	황기와 당귀의 配合은 1) CAM model에서 혈관신생 촉진 2) HUVECs의 proliferation 증가, VEGF의 발현을 증가 3) VSMC의 apoptosis 유도 (NO 합성 증가, FAK 발현 억제, caspase-3 발현 촉진, bcl-2 발현 억제)
丹蔘+赤芍藥	丁麗 외. 中藥雜誌(2001)	活血化瘀	단삼과 적작약의 配合은 rat의 Walker256 liver metastasis model에서 1) 종양 전이 2) 종양의 미세혈관 밀도 증가 3) 혈청 중 VEGF 증가
芪丹通脈片: 黃芪 當歸 丹蔘 紅花 桂枝	白宗仁 외. 第四中醫大學學報(2003)	補氣補血 活血化瘀 溫經通絡	芪丹通脈片은 rat의 관상동맥 LAD결찰 infarction model에서 1) 심근색전색력(IS)은 감소 2) LDH 증가 억제, CKP 증가 억제(max) 3) VEGF, bFGF의 발현 증가
補腎生血藥: 熟地 枸杞子 山茱萸 黃芪 등	白宗仁 외. 中藥日藥結合雜誌(2000)	滋陰補腎 補氣	補腎生血藥은 9개월의 gold hamster 노령 model에서 1) 자궁조직의 HE stain 후 현미경관찰시 자궁내막 비후, 혈관신생 촉진, 세포표면 분비물 증가 2) bFGF는 muscle fiber, 자궁내막의 미세혈관 에 가장 많이 분포 하고, VEGF는 자궁내막의 혈관내피에 가장 많이 분포
六味地黃方: 熟地黃 山茱萸 山藥 澤瀉 牡丹皮 茯苓	張旭 외. 中藥藥理學雜誌(2003)	滋陰補腎	六味地黃湯은 HUVECs에 LPS처리 apoptosis model에서fluo 3/AM stain 후 laser confocal microscope 및 flow cytometry로 측정된 결과 Ca ²⁺ 의 over-loading을 완화
益氣化瘀方: 黃芪 川芎 등 活血通絡方: 乳香 沒藥 등	王維軍 외. 中藥日藥結合雜誌(2002)	益氣化瘀 活血通絡	SD rat의 경추에 수술방법으로 퇴행성 model 유발 1) cartilage end-plate에 약물 투여 후 Afferent bud의 No. 및 area 증가 2) VEGF 발현 증가
養陰三方: a) 養陰生津方-生地 石斛 麥門冬 玄蔘 b) 養陰化方-水牛角 玄蔘 麥門冬 黃連 連翹 生地 竹葉心 丹蔘 金銀花 c) 養陰活血方-水牛角 赤芍藥 牡丹皮 生地 玉竹 麥門冬 玄蔘	王維軍 외. 國際中藥學雜誌(2001, 2002)	養陰生津 養陰清熱, 活血化瘀 養陰活血	養陰 처방은 HUVECs에 LPS 처리 model에서 1) MDA 감소, SOD 증가 2) 효과는 養陰化方>養陰生津方>養陰活血方 3) 養陰生津方은 HUVECs의 proliferation촉진
通脈化癆藥: 重盆草 紫草 車前草 甘草 金銀花 등	丁麗 외. 上海中醫藥雜誌(2003)	涼血活血 清熱利濕	New zealand white rabbit의 下肢 vein에 thrombin을 주입하여 血栓 model 유발 후 처방 투여 1) 혈관내피에 no WBC adhesion, infiltration 2) 치료기간에 따라 blood IPA 증가, tPA/PAI-1 ratio 상승, 내피세포 보호
養陰劑 + 活血劑: 養陰劑 生地黃 玄蔘 麥門冬 活血劑 丹蔘 川芎 當歸	樊曉寧 외. 中藥日藥藥學雜誌(2003)	養陰 活血, 養血	HUVECs에 coli-endotoxin 처리 apoptosis model 유발후 약물 투여 養陰劑와 養陰活血 복합제 사용시 1) apoptosis 억제 2) LDH 및 MDA 증가 억제, SOD 감소 억제

혈관신생에 관련된 복합 처방의 약물 구성은 Table 3에서 요약된 것과 같이 혈관내피세포 활성화에 직접 기여하는 補腎劑(養陰, 益精)와 혈관신생인자의 활성화에 기여하는 活血化癥劑의 적절한 配合이 주축을 이루며, 補氣劑와 溫經通絡劑를 추가한 것이 특징이다.

지금까지 한약을 이용한 혈관신생에 대한 연구가 대부분 암과 관련된 측면에서 진행되었으나 Wang 등³⁵⁾이 CAM model에서 screening 한 한약의 작용을 살펴보면 당귀, 백작약, 삼칠, 갈근 등은 혈관신생 촉진에 효과가 탁월한 한편 당귀, 백작약, 갈근은 anti-angiogenesis에서도 높은 활성을 나타내 주목할 부분이다. 즉 한약은 생체의 불균형을 유기적으로 조절하는 측면에서 생체의 자가 복구능력을 향상시키는 데에 의미가 더 크다고 할 수 있다. 복합 처방의 약물 배합에서도 이와 같은 맥락을 잘 반영하고 있다.

현재 임상에서 일부 질환에 효과적으로 활용되고 있는 혈관신생 치료법이 국소 혈류의 공급을 개선시킴과 동시에 전신적인 순환을 통하여 원하지 않는 부위까지 혈관의 과잉 생성을 초래할 우려가 있어 각종 혈관신생 촉진인자간의 균형적인 투여가 엄격히 요구되고 있다³⁶⁾. 그럼에도 불구하고 bFGF로 인한 급성 저혈압 유발, VEGF로 인한 혈관육종 발생 등과 같은 부작용이 여전히 존재하고, 혈관신생인자 투여후 그 효과의 지속성이 아직 명확하지 않아 앞으로 해결해야 할 과제로 남아 있다. 이러한 측면에서 국소적 조절보다 유기적 조절에 효과적인 한약의 활용 가능성과 병행 사용은 충분히 고려할 가치를 지니고 있다.

본 조사에서 혈관신생에 기여하는 한약이 주로 補腎·益精·養陰·活血의 효능이 있는

약물에 집중되어 있고, 이러한 약물로 구성된 처방 역시 補腎養陰, 活血化癥, 溫經通絡, 行氣活血의 원칙에 따라 血脈, 血絡을 滋養하는 것으로 나타나 한의학 이론에서 筋骨의 強化와 血脈의 滋養에 공통적인 특성을 지닌 한약의 활용에 충분한 근거를 찾을 수 있었고, 향후 혈관신생에 효과적인 한약을 근골격계 질환에 적용시키는 데에 타당성이 있는 점점을 제시할 것으로 생각한다.

IV. 결 론

혈관신생을 촉진시키는 한약 및 그 처방은 주로 單味劑, 單味劑의 유효성분, 2종 이상 複合製劑로 크게 구분할 수 있다. 유효성분은 주로 活血化癥의 작용을 하는 한약에서 추출된 tannin이나 saponin, pyrazine 성분이 많다. 複合製劑는 補腎生血(養陰) 및 活血化癥가 주류를 차지하고, 補氣劑나 溫經通絡의 효능이 있는 한약을 配合하는 특징이 있다. 이는 한의학에서 血管系를 血脈, 血絡으로 간주하여 精血과 脈의 관계로 설명되는 이론과 일치성을 이루며, 腎精과 陰血을 補益시키는 약물과 혈액 순환을 원활히 소통시키는 補氣 및 通經化癥의 약물 배합이 혈관신생 촉진에 유용할 것으로 생각된다. 향후 補腎生血 活血化癥 補氣通經 등의 한약 응용원칙에 착안하여 혈관신생 촉진인자나 관련 유전자의 발현, 혈관내피세포 및 혈소판 기능 등에 미치는 한약의 작용을 분자생물학 및 세포수준에서 명확히 究明한다면 보다 객관적인 data를 확보할 수 있을 것으로 기대한다.

V. 참고문헌

1. Folkman J and Shing Y. Angiogenesis. The Journal of Biological Chemistry. 1992 ; 267(16) : 10931-10934.
2. 오하식, 김형환, 안덕균, 최호영. 當歸類가 혈관신생에 미치는 영향에 대한 비교 연구. 대한본초학회지. 2001 ; 16(2) : 19-27.
3. Wang BH, Ouyang JP, Liu YM, Wei L, Yang JW. Protective Effect of Angelica on ECV304 from Injury Induced by Hyperlipidemic Serum In Vitro. Acta Physiologica Sinica. 2001 ; 53(3) : 240-243.
4. 안교필, 김동원, 김형환, 최호영. 영지추출액의 혈관신생에 대한 실험적 연구. 한방성인병학회지. 2000 ; 6(1) : 215-222.
5. Qian RZ, Sun N, Jin HM, Zhao FD, Zhang GP, Sen QF, Wang Z. Effect of LingZhi(靈芝) on Proliferation and Apoptosis of Microvascular Endothelial Cells In Vitro. J. of Chinese Microcirculation. 2002 ; 6(2) : 72-74.
6. Du JS, Sun DJ. Effect of *Salvia Miltiorriza* Combining with Vascular Endothelial Growth Factor on Collateral Circulation Formation in an Animal Limb Ischemic Model. Journal of JiLin University. 2003 ; 29(3) : 294-297.
7. Zhang X, Gong JN, Bian HM, Xu DQ, Xiang XR, Xu HQ, Yang J, Wang CH. Molecular Mechanism of Pharmacological Serum of *Radix Ophiopogonis* Against Apoptosis of Vascular Endothelial Cell. Journal of NanJing TCM University. 2001 ; 17(5) : 289-290.
8. 李民, 張旭, 朱平, 劉學鳳. 麥冬, 生地藥血清對血管內皮細胞增殖的影響. 國醫論壇. 2001 ; 16(5) : 43-44.
9. Takashi Nishio, Tomomi Iwasaki, Junko Kobayakawa, Katsuhiko Masataka Moriyasu. Effect of *Jixueteng*(鷄血藤, *Spatholobus Subretus* DUNN, *Leguminosae*) on Platelet Aggregation. Natural Medicines. 2000 ; 54(5) : 268-271.
10. Liang D, Han QM, Jin DX, Yin QL, Yang ZD, Huang KE, Huang F, He ZH. Effect of *Ligustrazine* on The Rabbit's Vascular Endothelial Cell After Anastomosis. The J. of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology. 2001 ; 13(11) : 643-644.
11. Sun L, Liu WL, Sun HY, Ren TH, Li DJ, Xu HZ, Ru W. Effect of *Ligustrazine* on The Signal Transduction of The Recovery of Bone Marrow Microenvironment in Irradiation Injured Mice. Chin J Radiol Med Prot. 2003 ; 23(2) : 93-95.
12. Liu ZF, Sun HY, Liu WL. Effect of *Tetramethylpyrazine*(川芎嗪) on The Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Bone Marrow in

- Acute Irradiation Injured Mice. 中國中西醫結合急救雜誌. 2002 ; 9(6) : 320-322.
13. Yin LJ, Wang AM, Jiang J. Correcting Effect of *Tetramethylpyrazine*(川芎嗪) on Dexamethasone Induced Functional Disorder of Vascular Endothelial Cell in Rabbit. Chinese Traditional and Herbal Drugs. 2002 ; 33(10) : 921-923.
 14. Yan YF, Zhang Z, Sun SL, Wang SR, He LY, Fan JP, Zhu LQ. Protective Effects of Total Saponin of *Panax Notoginseng*(三七) and *Notoginsenosides* on the Hypoxia Induced Damage of Cultured Vascular Endothelial Cells In Vitro. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae. 2002 ; 8(1) : 34-37.
 15. Lay IS, Hsieh CC, Chiu JH, Shiao MS, L ui WY, Wu CW. *Salvianolic Acid B* Enhances In Vitro Angiogenesis and Improves Skin Flap Survival in Sprague-Dawley Rats. J Surg Res. 2003 ; 115(2) : 279-285.
 16. Lay IS, Chiu JH, Shiao MS, L ui WY, Wu CW. Crude Extract of *Salvia Miltiorhiza* and *Salvianolic Acid B* Enhance In Vitro Angiogenesis in Murine SVR Endothelial Cell Line. Planta Med. 2003 ; 69(1) : 26-32.
 17. Kiyooki Tanikawa, Hirozo Goto, Norio Nakamura, Nobumitsu Tanaka, Masao Hattori, Takashi Itoh, Katsutoshi Terasawa. Endothelium-dependent Vasodilator Effect of *Tannin Extract* from *Cinnamomum Cortex*(桂皮) on Isolated Rat Aorta. Journal of Traditional Medicines. 1999 ; 16(2) : 45-50.
 18. Li W, Jin M, Li JR, Lu T, Chen TJ. Effect of *Safflor Yellow* on Cultured Vascular Endothelial Cell. Chinese Pharmacological Bulletin. 2001 ; 17(6) : 700-701.
 19. Xiao LZ, Luo W, Su H, Cheng XS, Wu QH. The Influence of *Puerarin*(葛根素) on the Secretion of NO and ACE of Endothelial Cells Cultured with Hydroxyl Free Radicals Conditions. Acta Academia Medicine JiangXi. 2002 ; 42(1) : 39-41.
 20. Shi RL, Zhang JJ. Protective Effect of *Puerarin*(葛根素) on Vascular Endothelial Cell Apoptosis Induced by Chemical Hypoxia In Vitro. Acta Pharmaceutica Sinica. 2003 ; 38(2) : 103-107.
 21. Lei Y, Wang JH, Chen KJ. Comparative Study on Angiogenesis Effect of *Astragalus membranaceus* and *Angelica sinensis* in Chick Embryo Choriollantoic Membrane. China Journal of Chinese Materia Medica. 2003 ; 28(9) : 876-878.
 22. Yang CC, Wen JK, Han M. Effect of *Astragalus Membranaceus* and *Angelica Sinensis* on Focal Adhesion Kinase Expression and Apoptosis of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. 中國中西醫結合雜誌. 2003 ; 23(3) : 201-203.
 23. Lei Y, Gao Q, Li YS, Chen KJ. Study on Effects of *Astragalus*, *Angelica* and Their Combination on Vascular

- Endothelial Cell Proliferation In Vitro. 中國中西醫結合雜誌. 2003 ; 23(10) : 753-756.
24. Ding G, Song MZ, Yu EX. Study on the Mechanism of *Danshen*(丹蔘), *Chishao*(赤芍藥) affecting Walker 256 Liver Metastasis in Experimental Rats. China Oncology. 2001 ; 11(4) : 364-366.
 25. 王宗仁, 李晶華, 肖鐵卉, 邵中軍, 馬靜, 鄭謹, 馬愛玲, 龍鋼, 王文, 李軍昌. 芪丹通脈片豫防大鼠急性心肌缺血及VEGF, bFGF表達的影響. 第四軍醫大學學報. 2003 ; 24(7) : 628-630.
 26. 王蕾, 呂鑫霞, 吳志奎, 王弘毅, 張樹成. 補腎生血藥對金黃地鼠子宮組織bFGF, VEGF表達水平的影響. 中國中醫基礎醫學雜誌. 2000 ; 6(12) : 25-28.
 27. 張旭, 卞慧敏, 張超英. 六味地黃丸藥物血清對血管內皮細胞胞內Ca²⁺的影響. 中藥藥理與臨床. 2003 ; 19(5) : 1-2.
 28. Wang YJ, Shi Q, Zhou CJ, Lan FL, Shen PZ, Liu M, Xu Y. The Effects of *Yiqihuayu-Fang*(益氣化瘀方) on The Blood of The Cartilage End-Plate. Chinese J Trad Med Traum & Orthop. 2002 ; 10(4) : 1-4.
 29. 王陸軍, 李民, 朱平, 張旭. 養陰三方抗血管內皮細胞損傷的機理研究. 國醫論壇. 2002 ; 17(1) : 24-25.
 30. Wang P, Huang XZ, Zhang H, Zhang BG. Therapeutic and Action Mechanism of *Tongmai huashuan*(通脈化栓膠囊) Capsule in Treating Experimental Venous Thrombosis in Rabbits. ShangHai Journal of Traditional Chinese Medicine. 2003 ; 37(2) : 51-54.
 31. 龔婕寧, 張旭, 許冬清, 卞慧敏, 劉學鳳. 養陰藥與活血藥配伍對血管內皮細胞的保護作用. 中國中醫藥信息雜誌. 2003 ; 10(2) : 14-15.
 32. Schott RJ, Morrow LA. Growth factors and Angiogenesis. Cardiovasc Res. 1993 ; 27 : 1155-1161.
 33. 정진옥, 김덕경. 혈관신생 치료법. 대한혈관외과학회지. 2000 ; 16(2) : 265-269.
 34. 김영미, 김영명, 김종대, 권영근. 혈관신생의 신호전달. 대한내분비학회지. 2001 ; 16(3) : 284-292.
 35. Wang S, Zheng Z, Weng Y, Yu Y, Zhang D, Fan W, Dai R, Hu Z. Angiogenesis and Anti-angiogenesis Activity of Chinese Medical Herbal Extracts. Life Sci. 2004 ; 74(20) : 2467-2478.
 36. 郭霽春. 黃帝內經素問校注語釋. 서울 : 醫聖堂. 1993 : 96.
 37. 許浚. 東醫寶鑑(內景篇, 外形篇). 서울 : 大成文化社. 1999 : 23-24, 70, 447, 455, 459.
 38. 居石 克夫. 血管リモデリソグの病理-FGF2遺傳子導入による機能的血管新生. 脈管學. 2004 ; 44(3) : 85-98.
 39. 안재훈, 최인호, 황덕호, 정진엽, 조태준. 신연 골성형술에서의 혈관신생. 대한정형외과학회지. 1999 ; 34(4) : 631-642.
 40. 김병건, 김진환, 권성택. Fibrin Sealant를 사용한 골자가 이식에서 혈관신생에 관한 실험적 연구. 대한성형외과학회지. 1993 ; 20(3) : 468-476.