

대황 및 소암산이 신혈관형성 기전에 미치는 영향

한양대학교 식품영양학과, ¹국립보건원 중앙유전체연구소,
²동덕여자대학교 보건관리학과

신현아 · 남명진¹ · 김재현² · 엄애선

Effects of *Dahuang* and *Soamsan* on Angiogenic Mechanism

Hyun-Ah Shin, Myung-Jin Nam¹, Jae-Hyun Kim² and Ae-Son Om

Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

¹Central Genome Center, National Institute of Health, Seoul 122-701, Korea

²Department of Health Science, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Angiogenesis is a complex process involving a cascade of events that result in the formation of new blood vessels from existing ones. This process are known to be essential for tumor growth, survival and metastasis. There are a number of angiogenic factors controlling the process. The present study was conducted to assess the effects of 0.1 mg/ml *dahuang* and 1.0 mg/ml *soamsan* on human hepato-carcinoma (SNU449) and gastric-adenocarcinoma (SNU638) induced tube formation, proliferation and migration of vascular endothelial cells (ECV304), and on expressions of angiogenic factors (VEGF, TGF- β and PDGF) *in vitro*. In SNU449 cells, the expressions of VEGF, TGF- β and PDGF were inhibited by *dahuang*. In SNU638 cells, the expression of VEGF was inhibited by *dahuang* and *soamsan*, but TGF- β was inhibited only by *soamsan*. In ECV304 cells, tube formation and migration were inhibited by *dahuang* and *soamsan*. The cell proliferation induced by SNU449 CM seemed to be significantly inhibited by *dahuang* (78%, $p < 0.05$) and *soamsan* (67%, $p < 0.01$). However, the cell proliferation induced by SNU638 CM was significantly inhibited only by *dahuang* (56%, $p < 0.01$). According to the results, *dahuang* and *soamsan* seemed to inhibit angiogenesis mechanism, therefore they are thought to be a potential anti-cancer materials.

Key Words: Angiogenesis, Hepato-carcinoma, Gastric-adenocarcinoma, *Dahuang*, *Soamsan*

서 론

국내에서 위암의 발병률은 남자가 24.5%, 여자가 15.8%로 1위를 차지하여 전체적으로 20.8%의 높은 발병률을 지니고 있으며, 간암은 남자가 16.3%로 2위, 여자가 6.7%로 7위의 발병률을 나타내 전

체 암 발생률 중 3위(12.2%)를 차지하고 있다.¹⁾

세포가 생존하기 위해서는 혈관으로부터 산소와 영양분을 공급받아야 하며, 이를 위해 혈관으로부터 100~200 μ m 반경 내에 존재해야 한다. 같은 맥락에서 세포가 성장하기 위해서는 새로운 혈관을 형성해야 하고, 암세포도 이러한 과정을

책임저자 : 엄애선, ☎ 133-791, 서울시 성동구 행당동 17번지, 한양대학교 생활과학대학 식품영양학과

Tel: 02-2290-1203, Fax: 02-2281-8285, E-mail: aesonom@hanyang.ac.kr

접수일 : 2002년 2월 5일, 게재승인일 : 2002년 3월 14일

거쳐 성장하며, 다른 기관으로 전이되게 된다.²⁾ 최근 악성흑색종, 유방암, 난소암, 비소세포성 폐암, 전립선암, 위암 등과 같은 여러 종양에서 신혈관형성(angiogenesis)이 암의 성장 및 전이에 중요한 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.^{3~9)}

한편, 종양 치료 방법에는 크게 수술요법, 방사선요법과 화학요법이 있는데, 이들 요법의 부작용이 알려지면서,¹⁰⁾ 천연물을 이용한 항암제 탐색에 대한 연구가 활발하며 미국의 암센터(NCI)에서도 1980년까지 114,045 종의 전세계 천연물을 수집하여 항암물질에 대한 연구를 하였다.¹¹⁾ 최근에는 콩의 saponin과 genistein, daidzein, Labiatae *S. revularis*의 flavonoid 성분인 baicalein과 녹차의 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)에서 유효한 활성이 관찰되었다.^{12~15)}

1971년, Folkman에 의해 종양의 성장과 전이에 신혈관형성이 필수적이라는 가설이 제기된 이후 오늘날 신혈관형성은 암을 연구하는 학자들의 주된 관심사가 되고 있으며,^{16~18)} 신혈관형성을 억제함으로써 암을 치료하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 우리나라에서 발병률이 높은 간암과 위암의 세포주에 대황과 소암산을 투여하여 신혈관형성 기전의 억제 여부, 특히 종양의 신혈관형성에 주된 역할을 하는 VEGF, TGF- β 및 PDGF의 세포 내 발현 양상을 조사하고, 혈관내피세포의 튜브형성, 증식 및 이동에 미치는 영향을 조사하여 대황과 소암산이 신혈관형성 기전을 억제하는지 연구하였다.

재료 및 방법

1) 재료

RPMI-1640 배지, M199 배지, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)과 Trypsin-EDTA는 모두 GIBCO BRL 제품을 사용하였고, TRI reagent는 MRC 제품을, sodium bicarbonate, chloroform과 isopropanol은 Sigma-Aldrich 제품을 사용하였다. 또한, oligo-dT, reverse-transcriptase (RT) buffer, dNTP mixture, 10,000 U Rnasin, MMLV-Rtase는 모두 Promega 제품을 사용하였다.

2) 세포 배양

사람의 간암과 위암 세포주인 SNU449와 SNU638 세포는 한국세포주은행에서 구입하였으며, 56°C에서 30분간 불활성화시킨 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 들어간 RPMI-1640 배지를 이용하여 세포성장의 최적조건인 37°C, 5% CO₂로 평형된 CO₂ 배양기(Forma)에서 배양하였다. 사람의 제대정맥혈관내피 세포주인 HUVEC의 자연돌연변이 세포주인 ECV304 세포는 국립보건원에서 분양받아 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 들어간 M199배지를 이용하여 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 약 72시간 간격으로 계대 배양하였으며, 부착성 세포의 계대배양 시에는 Trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 용기로부터 떼어내었다.

3) 대황 및 소암산의 제조

대황과 소암산은 국립보건원에서 제공받았고, 모두 100 mg/ml의 농도로 3차 증류수에 용해시킨 후 0.2 μ m-pore membrane filter로 여과하였으며, 실험 시에 각각 0.1 mg/ml과 1.0 mg/ml의 농도로 희석하여 사용하였다.

4) ECV304 세포의 독성실험

ECV304 세포를 6well에 well 당 1 \times 10⁵개를 분주하여 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였고, 대황과 소암산의 최종농도가 각각 0.1 mg/ml, 1.0 mg/ml이 되도록 처리하여 CO₂ 배양기에서 24, 48, 72시간 동안 배양한 뒤 hemocytometer로 세포의 생존율을 조사하였다.

5) 신혈관형성인자들의 역전사 종합효소 연쇄반응법(RT-PCR)

총 RNA는 TRI Reagent를 이용하여 추출하였다. 총 RNA 3 μ g에 DEPC-H₂O 10 μ l를 분주하여 75°C에서 5분간 처리한 뒤 10 mM oligo-dT, 5 \times reverse-transcriptase (RT) buffer, dNTPs (각각 2.5 mM), 10,000 U Rnasin, MMLV-RTase와 DEPC-H₂O를 첨가하고 42°C에서 1시간, 75°C에서 5분 동안 반응시켜 first strand cDNA를 제조하였다. 제조된 cDNA를 10배 희석하여 Table 1에서 제시한 각각

의 primer 10 pmole, 10× PCR buffer, dNTPs (각각 2.5 mM), Taq polymerase를 첨가하고 다음과 같은 조건으로 PCR시험을 실시하였다. VEGF와 TGF-β는 94°C에서 5분 동안 반응시킨 뒤에, 94°C에서 30초, 57°C에서 1분, 72°C에서 30초간 반응시키는 과정을 30 cycle 반복한 후, 72°C에서 5분 동안 반응시켰다. 또한, PDGF는 94°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 30초, 62°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초간 반응시키는 과정을 30 cycle 반복한 후, 72°C에서 7분 동안 반응시켜 종료하였다. PCR 산물 10μl에 Tris/Boric acid/EDTA (TBE) buffer를 분주한 후 1.0% agarose gel상에서 전기영동을 실시하고, 자외선 투사기로 mRNA의 발현 유무를 확인하였다.

6) ECV304 세포의 튜브형성 실험

Matrigel을 녹여 24 well에 300μl씩 분주하고 CO₂ 배양기에서 1시간 동안 중합반응시킨 후 ECV304 세포를 well 당 5×10⁴개를 분주하였다. 그런 다음 대황과 소암산의 최종농도가 각각 0.1 mg/ml, 1.0 mg/ml이 되도록 처리하고 CO₂ 배양기에서 18시간 동안 배양시켜 현미경 관찰 후 사진을 촬영하였다.

7) Conditioned Media (CM)의 준비

SNU449와 638세포를 6well에 well당 1×10⁵개를 분주하고 24시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양한 후 대황과 소암산의 최종농도가 각각 0.1 mg/ml, 1.0 mg/ml이 되도록 처리하여 48시간 동안 37°C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배지를 제거하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 0.2μm-pore membrane filter로 여과하여 CM으로 사용하였다.

Table 1. Nucleotide sequences of PCR primers

VEGF	Sense	5' CTGCTGCTCTGGGTGCATT 3'
	Antisense	5' CCTCGGCTGTGCACATTTTT 3'
TGF-β	Sense	5' ACTGCAAGTGGACATCAACG 3'
	Antisense	5' GTCCAGGCTCCAAATGTAGG 3'
PDGF	Sense	5' ACCAGGACGGTCATTTACGA 3'
	Antisense	5' TCTGGTTGGCTGCTTTAGGT 3'

8) CM으로부터 유도된 ECV304 세포의 증식 실험

ECV304 세포를 24well에 well 당 1×10⁴개를 분주하고 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, CM 300μl와 1% FBS를 함유한 M199 배지 200μl를 처리하였다. 48시간 배양한 후 hemocytometer로 계수하여 세포의 증식능을 조사하였다.

9) CM으로부터 유도된 ECV304 세포의 이동 실험

SNU449와 638 세포에 대황과 소암산을 처리하여 획득한 CM이 혈관내피세포의 이동에 미치는 영향을 조사하기 위하여 denuding injury model을 사용하여 실험을 진행하였다. ECV304 세포를 6well에 well 당 1×10⁵개를 분주하고 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고, 2~200 μl 파이펫 팁을 이용하여 가로로 세 줄을 그어 denuding area를 형성하였다. CM 2 ml씩을 분주하여 CO₂ 배양기에서 18시간 동안 배양시킨 후 현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

10) 통계처리

모든 실험의 결과는 평균치와 표준편차를 계산하였고, 대조군과 실험군과의 차이는 unpaired Student's t-test를 이용하여 유의성을 판정하였다.

결과 및 고찰

1) 대황과 소암산이 ECV304 세포의 독성에 미치는 영향

ECV304 세포에서의 대황과 소암산의 세포 독성실험 결과, 24시간 배양했을 때의 생존율은 대조군에 비교하여 각각 140%와 174% (p<0.01)로 증가하였고, 48시간 배양했을 때에도 대황 처리군은 116%, 소암산 처리군은 115%로 생존율이 증가하였다. 그러나 72시간 배양한 경우 대황군의 세포 생존율이 대조군의 85%로 다소 억제되었으며, 소암산 처리군에서도 대조군에 비교하여 27%로 유의하게(p<0.01) 억제되었다(Fig. 1).

이상의 결과로 혈관내피세포에 대황과 소암산을 처리한 후 24, 48시간 배양한 군에서는 대조

군 이상의 생존율을 보여주고 있으나, 72시간 배양한 군에서는 세포의 생존율이 대조군에 비교하여 각각 85%와 27%로 저하되어 약간의 세포독성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 향후 독성실험에 대한 농도 설정이 재실험되어야 할 것으로 사료된다.

2) 대황과 소암산이 SNU449, 638세포의 VEGF, TGF-β 및 PDGF 발현에 미치는 영향

SNU449와 638 세포에서의 대황과 소암산의 신혈관형성인자들의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같았다. SNU449 세포의 경우 대황을 처리했을 때 VEGF, TGF-β 및 PDGF의 발현이 모두 억제된 반면, 소암산을 처리했을 때에는 VEGF, TGF-β 및 PDGF가 모두 발현되었다. SNU638

세포의 경우 소암산을 처리했을 때 VEGF의 발현이 크게 억제되었고, TGF-β의 발현도 억제되는 경향을 보였으나, 대황 처리 시에는 VEGF와 TGF-β가 모두 발현되었으며, SNU638 세포에서 PDGF는 모든 군에서 전혀 발현되지 않았다(Fig. 2~4).

이상의 결과로, SNU449 세포에서는 대황이 신혈관형성인자들의 발현을 억제하며, SNU638 세포에서는 소암산이 신혈관형성인자들의 발현을 억제하는 경향이 있음을 알 수 있었다.

Antisense-VEGF cDNA나 VEGF의 antibody를 발현시킴으로써 VEGF의 발현이 억제되었고,^{19,20} 특히, antisense-VEGF cDNA를 발현시킨 경우 VEGF의 발현이 억제됨으로써 혈관내피세포의 증식과 튜브형성도 억제되었다.¹⁹

저산소증을 일으키는 hypoxia inducible factor

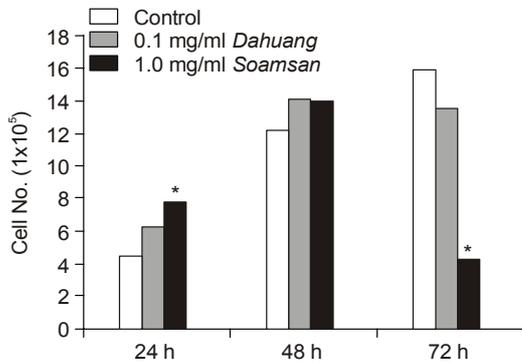


Fig. 1. Effects of the *Dahuang* and *Soamsan* on viability of ECV304 cells at 24, 48 and 72 hours. Statistical significance was calculated by unpaired Student's *t*-test. **p* < 0.01 vs control.

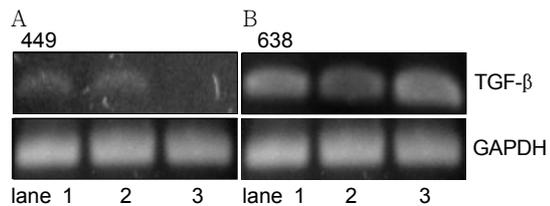


Fig. 3. Effects of the *Dahuang* and *Soamsan* on TGF-β mRNA expression in SNU449 and SNU638 cells. RT-PCR analysis of GAPDH was used as a loading control. (A) lane 1: control, lane 2: *soamsan*, lane 3: *dahuang*, (B) lane 1: control, lane 2: *soamsan*, lane 3: *dahuang*, upper panel: TGF-β (transforming growth factor-β), lower panel: GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

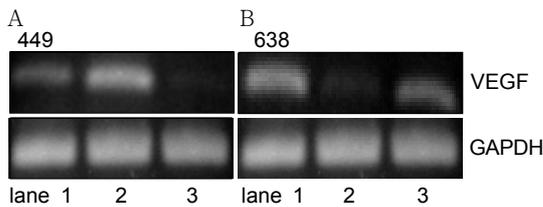


Fig. 2. Effects of the *Dahuang* and *Soamsan* on VEGF mRNA expression in SNU449 and SNU638 cells. RT-PCR analysis of GAPDH was used as a loading control. (A) lane 1: control, lane 2: *soamsan*, lane 3: *dahuang*, (B) lane 1: control, lane 2: *soamsan*, lane 3: *dahuang*, upper panel: VEGF (vascular endothelial growth factor), lower panel: GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

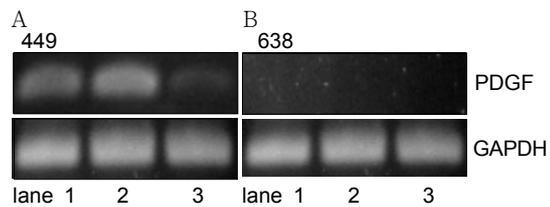


Fig. 4. Effects of the *Dahuang* and *Soamsan* on PDGF mRNA expression in SNU449 and SNU638 cells. RT-PCR analysis of GAPDH was used as a loading control. (A) lane 1: control, lane 2: *soamsan*, lane 3: *dahuang*, (B) lane 1: control, lane 2: *soamsan*, lane 3: *dahuang*, upper panel: PDGF (platelet-derived growth factor), lower panel: GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

(HIF)-1나 TGF- β 는 신혈관형성 조절인자이며,^{21,22)} 서로 상승작용을 일으켜 VEGF를 발현시켰다.²³⁾ 또한, 혈관내피세포에 fibroblast growth factor (FGF)-2를 투여했을 때 VEGF의 발현이 증가하였고, 생쥐의 각막에서 FGF-2로 신혈관형성을 유도하였을 때에도 VEGF의 mRNA와 단백질의 발현이 증가하였다. 반면, VEGF의 antibody를 처리했을 때에는 FGF-2로 인한 혈관내피세포의 증식과 각막에서의 신혈관형성이 억제되었다.²⁴⁾

따라서 본 연구에서는 대황 및 소암산이 간암과 위암 세포로부터 발현되는 여러 신혈관형성인자들을 증하시킴으로써 신혈관형성 기전에 미치는 이들 인자의 작용을 차단하는 것으로 사료된다. 또한, VEGF, TGF- β 및 PDGF의 상승작용으로 신혈관형성이 유도될 수 있기 때문에 이러한 여러 인자들 중 어느 한 인자를 억제함으로써 신혈관형성이 억제될 수 있다고 사료된다.

3) 대황과 소암산이 ECV304 세포의 튜브형성에 미치는 영향

ECV304 세포에서의 대황과 소암산의 세포 분화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군에서는

세포들이 분화하여 혈관이 분명하게 형성된 반면, 대황 처리군에서는 혈관의 형성이 부진하고 혈관망이 심하게 파괴되었으며 세포들이 바닥에서 탈락되었고, 소암산 처리군에서도 혈관의 형성이 부진하고 점차 혈관망이 파괴되었다(Fig. 5).

혈관내피세포에 울금을 처리하여 18시간 동안 배양했을 때 모세혈관의 형성이 억제되었고,²⁵⁾ SK-HEP1 세포에 antisense-VEGF cDNA를 발현시켰을 때 VEGF의 분비가 저하됨으로써 혈관내피세포의 증식, 튜브형성과 성장이 억제되었다.¹⁹⁾ 또한, thromboxane A₂ 수용체에 결합하는 [1S-(1 α ,2 β (5Z),3 α (1E,3R),4 α)-7-[3-(3-hydroxy-4-(4'-iodophenoxy)-1-butenyl)-7-oxabicyclo-[2.2.1]heptan-2-yl]-5'-heptenoic acid (IBOP)에 의해 혈관내피세포의 튜브형성과 이동이 억제되었다.²⁶⁾

4) 대황과 소암산이 ECV304 세포의 증식에 미치는 영향

ECV304 세포에서의 대황과 소암산의 세포 증식에 미치는 영향을 관찰한 결과, SNU449 세포의 CM을 처리했을 때 대황 처리군의 세포 증식률이 78%로 나타나 control 군에 비교하여 유의하게 억제되

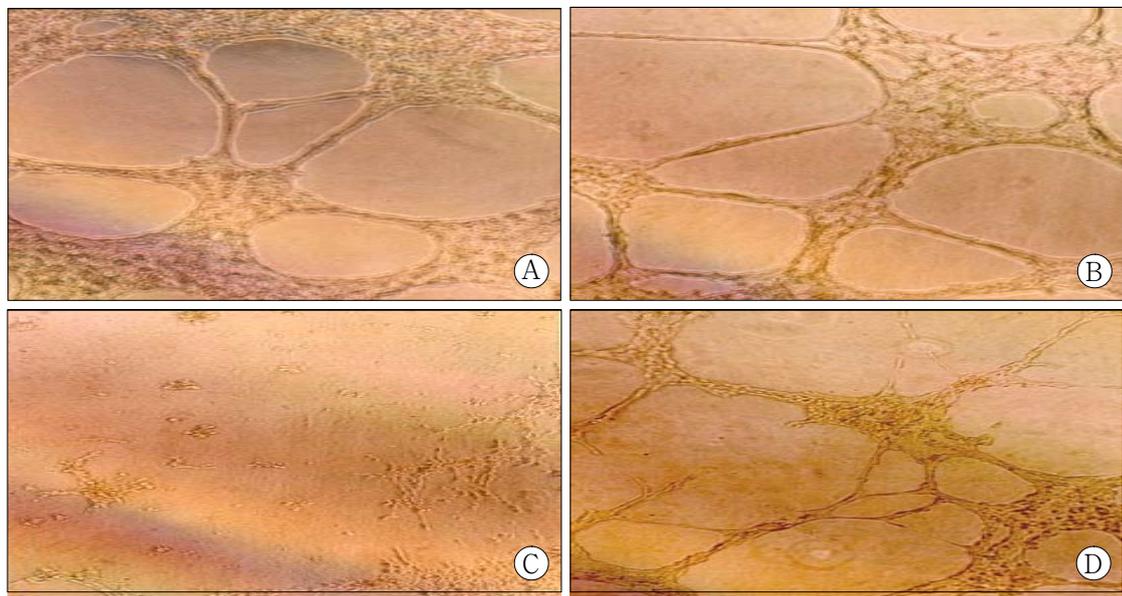


Fig. 5. Effects of the *Dahuang* and *Soamsan* on tube formation of ECV304 cells. (A) control, (B) control, (C) *dahuang*, (D) *soamsan*.

었으며($p < 0.05$), 소삼산 처리군에서도 67%로 유의하게 억제되었다($p < 0.01$). 또한, control 군은 배지만 분주한 positive control 군에 비교하여 세포의 증식률이 높았다. SNU638 세포의 CM을 처리했을 때 대황 처리군에서는 세포의 증식이 control 군에 비교하여 56%로 유의하게 억제되었으며($p < 0.01$), 소삼산 처리군에서도 유의하지는 않으나 control 군에 비교하여 억제되었다. 또한, control 군의 세포 증식은 positive control 군과 유사한 수준이었다(Fig. 6).

Heparin 유사물질인 carboxymethyl dextran benzylamide (CMDB7)는 TGF- β 와 PDGF가 수용체와 결합하는 것을 방해함으로써 이들의 작용을 억제하였고,²⁷⁾ 특히, CMDB7은 VEGF₁₆₅에 결합하여 heparin이 VEGF₁₆₅ 및 VEGF₁₆₅ · KDR 복합체에 결합하는 것과 KDR 수용체를 통해 혈관내피세포로 신호가 전달되는 것을 방해하였으며, 혈관내피세포에 대한 mitogenic effect를 억제하였다.²⁸⁾

5) 대황과 소삼산이 ECV304 세포의 이동에 미치는 영향

ECV304 세포에서의 대황과 소삼산의 세포 이

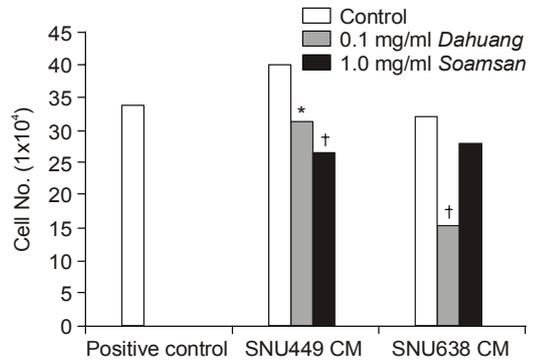


Fig. 6. Effects of the *Dahuang* and *Soamsan* on proliferation of ECV304 cells induced by SNU449 and SNU638 CM. Statistical significance was calculated by unpaired Student's *t*-test. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$ vs control.

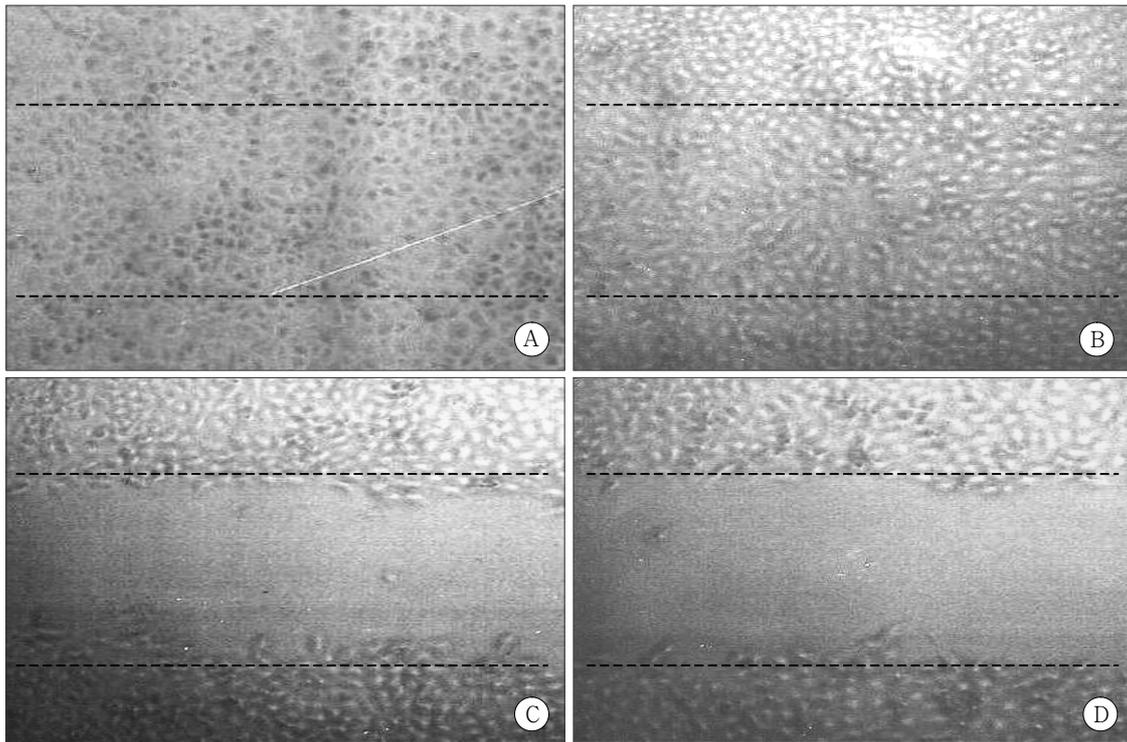


Fig. 7. Effects of the *Dahuang* and *Soamsan* on migration of ECV304 cells induced by SNU449 CM. (A) positive control, (B) control, (C) *dahuang*, (D) *soamsan*.

동에 미치는 영향을 관찰한 결과, SNU449 세포의 CM을 처리한 결과에서 배지만 분주한 positive control 군과 아무 것도 처리하지 않고 CM만 처리한 control CM 군의 경우 wounded area로 세포가 많이 이동된 것을 관찰할 수 있었다. 그러나, 대황과 소암산 처리군의 경우 혈관내피세포의 이동이 유의하게 억제되었다(Fig. 7).

SNU638 세포의 CM을 처리한 결과에서도 positive control군과 control CM 군의 경우 wounded area로 세포가 많이 이동된 것을 관찰할 수 있었다. 반면에, 대황을 처리한 경우 세포의 이동이 크게 억제된 반면, 소암산을 처리한 경우에는 wounded area로 세포가 조금씩 이동한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

Thromboxane A₂ 수용체에 IBOP가 결합함으로써 혈관내피세포의 튜브형성과 이동이 억제되었으며, 이는 IBOP가 수용체에 결합하여 혈관내피세포들 사이의 신호 전달을 방해하기 때문인 것

으로 유추하였다.²⁶⁾ 또한, 이것은 혈관내피세포들 사이의 신호 전달이 gap junction의 영향으로 증폭되어 내피세포가 이동한다는 결과로서 뒷받침될 수 있다.²⁹⁾

따라서 본 연구의 결과로 대황과 소암산에 의해 신혈관형성인자들의 발현이 억제되어 혈관내피세포의 증식, 이동 및 튜브형성이 순차적으로 억제될 것으로 사료된다. 또한, 대황과 소암산이 신혈관형성인자들의 발현을 직접적으로 억제하지 않더라도, 이들이 혈관내피세포의 수용체와 결합하는 것을 방해함으로써 내피세포로의 신호 전달을 막아 결과적으로 혈관내피세포의 증식, 이동 및 튜브형성이 억제될 것으로 사료된다.

결 론

- 1) 혈관내피세포에 대황과 소암산을 처리한 후 24, 48시간 배양했을 때 세포의 생존율은 증가했

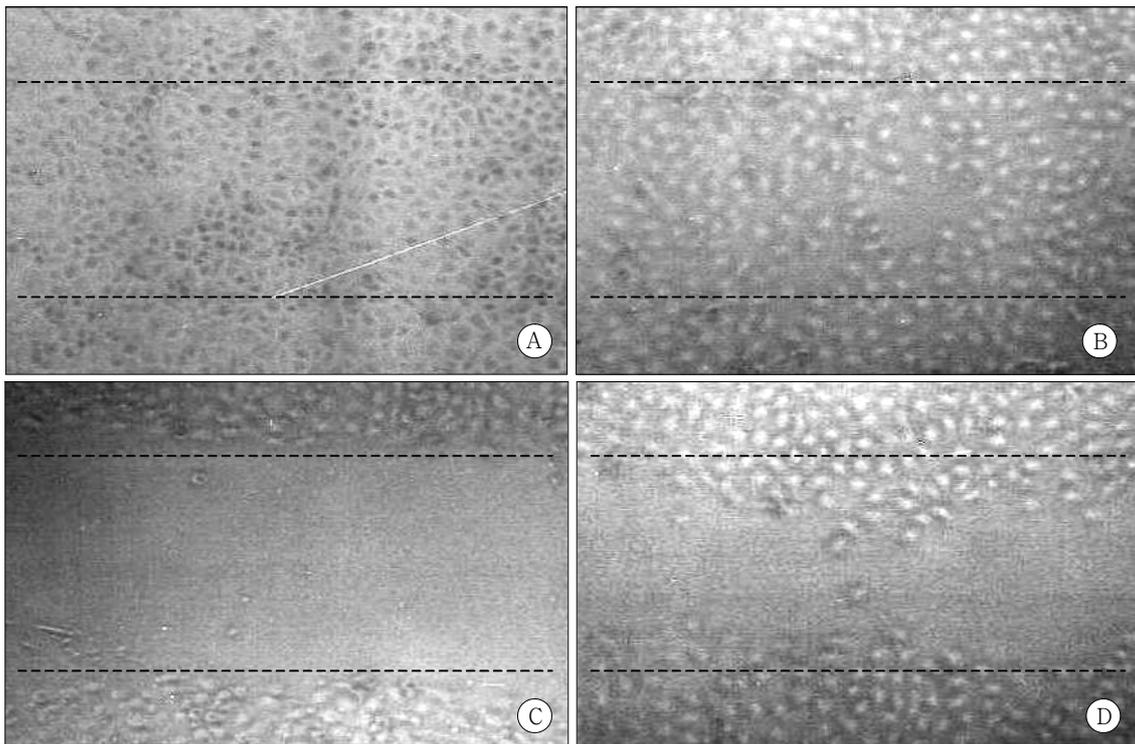


Fig. 8. Effects of the *Dahuang* and *Soamsan* on migration of ECV304 cells induced by SNU638 CM. (A) positive control, (B) control, (C) *dahuang*, (D) *soamsan*.

고, 대황 처리 후 72시간 배양했을 때에는 생존율이 다소 감소했으며, 소암산 처리 후 72시간 배양했을 때에도 생존율이 유의하게 감소되었다.

2) 대황은 간암 세포에서 VEGF, TGF- β 및 PDGF의 발현을 억제하였고, 위암 세포에서는 VEGF의 발현만 다소 억제하였을 뿐, 다른 인자들의 발현에는 영향을 주지 않았다. 소암산은 위암 세포에서 VEGF와 TGF- β 의 발현을 억제하였고, 간암 세포에서는 어떠한 인자에도 영향을 주지 않았다.

3) 혈관내피세포에 대황을 처리했을 때 혈관의 형성이 부진하고, 혈관망이 파괴되었으며, 세포가 바닥에서 탈락된 현상이 관찰되었고, 소암산을 처리했을 때에도 점차 혈관과 혈관망의 형성이 파괴되는 양상을 보였다.

4) 간암 세포의 경우 대황을 처리했을 때 혈관내피세포의 증식이 유의하게 억제되었고, 소암산을 처리했을 때에도 유의하게 억제되었다. 또한, 위암 세포의 경우 대황 처리 군에서 세포의 증식이 유의하게 감소되었으며, 소암산을 처리했을 때에도 감소하는 경향을 보였다.

5) 간암 세포의 CM을 처리한 경우 대황과 소암산 모두 혈관내피세포의 이동을 억제하였고, 위암 세포의 CM을 처리한 경우에도 대황, 소암산 처리 시 세포의 이동을 억제하였다.

6) 이상의 결과로 대황과 소암산은 *in vitro* 수준에서 간암과 위암으로 인한 신혈관형성 억제에 효과를 보여 신혈관형성 억제제로서의 유력한 후보물질로 여겨지며, 차후 *in vivo* 실험과 다양한 분자생물학적 실험을 통하여 그 기전을 연구해 볼 필요가 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 국립보건원 중앙유전체연구소와 한양대학교 교내 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- 1) 한국중앙암등록 사업 연례 보고서, 보건복지부, 2000.
- 2) Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.

- 3) Srivastava A, Laidler P, Highes L, Woodcock J, Shedden E. Neovascularization in human cutaneous melanoma; a quantitative morphological and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 1205-1209.
- 4) Weidner N, Semple J, Welch W, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *New Eng J Med* 1991; 324: 1-8.
- 5) Hollingsworth H, Kohn E, Steinberg S, Rothenberg M, Merino M. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147: 33-41.
- 6) Macchiarini P, Fontanini G, Hardin M, Squartini F, Angeletti C. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340: 145-146.
- 7) Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 401-409.
- 8) Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995; 13: 477-481.
- 9) Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T, Horiuchi T, Muraoka R, Iki M. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 2671-2676.
- 10) 박재갑. 인간생명과학. 서울대학교출판부, 1994; pp 662-673.
- 11) Suffness M, Douros J. Current status of the NCI plant and animal product program. *J Nat Prod* 1982; 45: 1-14.
- 12) Oh YJ, Sung MK. Soybean saponins inhibit cell proliferation by suppressing PKC activation and induce differentiation of HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Nutr cancer* 2001; 39: 132-138.
- 13) Zhou JR, Gugger ET, Tanaka T, Guo Y, Blackburn GL, Clinton SK. Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice. *J Nutr* 1999; 129: 1628-1635.
- 14) Chen CH, Huang LLH, Huang CC, Lin CC, Lee Y, Lu FJ. Baicalein, a novel apoptotic agent for hepatoma cell lines: a potential medicine for hepatoma. *Nutr Cancer* 2000; 38: 287-295.
- 15) Cao Y, Cao R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 1999; 398: 381.

- 16) Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
 - 17) Folkman J. How is blood vessel regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1986; 46: 467-473.
 - 18) Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
 - 19) Kang MA, Kim KY, Seol JY, Kim KC, Nam MJ. The growth inhibition of hepatoma by gene transfer of antisense vascular endothelial growth factor. *J Gene Med* 2000; 2: 289-296.
 - 20) Lynch CN, Wang YC, Lund JK, Chen YW, Leal JA, Wiley SR. TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 8455-8459.
 - 21) Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 21-43.
 - 22) Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med* 2000; 6: 389-395.
 - 23) Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbi A, Attisano L, Bernabu C. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- β pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* 2001; 276: 38527-38535.
 - 24) Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 1998; 141: 1659-1673.
 - 25) 성희근. 울금이 angiogenesis 억제기전에 미치는 영향. 경희대학교 석사학위논문, 1998.
 - 26) Ashton AW, Yokota R, John G, Zhao S, Suadicani SO, Spray DC, Ware JA. Inhibition of endothelial cell migration, intercellular communication, and vascular tube formation by thromboxane A₂. *J Biol Chem* 1999; 274: 35562-35570.
 - 27) Bagheri-Yarmand R, Kourbali Y, Mabilat C, Morere JF, Crepin M. The suppression of fibroblast growth factor 2/fibroblast growth factor 4-dependent tumour angiogenesis and growth by the anti-growth factor activity of dextran derivative (CMDB7). *Br J Cancer* 1998; 78: 111-118.
 - 28) Hamma-Kourbali Y, Vassy R, Starzec A, Meuth-etzinger V, Oudar O, Bagheri-Yarmand R, Perret G, Crpin M. Vascular endothelial growth factor 165 (VEGF₁₆₅) activities are inhibited by carboxymethyl benzylamide dextran that competes for heparin binding to VEGF₁₆₅ and VEGF₁₆₅ · KDR complexes. *J Biol Chem* 2001; 276: 39748-39754.
 - 29) Pepper MS, Spray DC, Chanson M, Montesano R, Orci L, Meda P. Junctional communication is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 1989; 109: 3027-3038.
-