

地膚子의 신생혈관 및 염증매개 단백질 발현에 미치는 영향

나상혁 · 고성규* · 신용철

경희대학교 한의과대학 예방의학교실

Effects of Kochiae Fructus Extracts on the Expression of Angiogenesis and Inflammation Related Proteins

Sang Hyuk Na, Seong Gyu Ko*, Yong Cheol Shin

Department of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

Hypoxia induced angiogenesis and inflammation are essential processes for metastasis and progress of solid tumors. We examined the anti-angiogenic and inflammation related activity of Kochiae Fructus (KF) extract. To investigate the roles of the KF extract, we performed MTS assay, western blots using HaCaT cells and HepG₂ cells. The results are as follows. The protein level of HIF-1 α was reduced when induced by CoCl₂ in HepG₂ cells treated with KF extract and induced by IGF-II in HaCaT cells treated with KF extract. KF extract reduced the mRNA level of VEGF in HaCaT cells and KF extract reduced the protein level of iNOS in HaCaT cells. These results suggest that KF extract contributes to the anti-angiogenic and anti-inflammatory activities and also we could assume that KF extract act as antioxidant or anti-inflammatory agents via reduction of HIF-1 α .

Key words : Kochiae Fructus (KF), HIF-1 α , iNOS, IGF-II, Angiogenesis

서 론

地膚子 (Kochiae Fructus, KF)는 淸熱利濕, 祛風止痒하는 효능이 있어 外用 또는 內服으로도 사용하여 건선을 비롯한 각종 소양성 피부병에 유효한 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 地膚子(Kochiae Fructus)는 명아주과 (Chenopodiaceae)에 속한 일년생 草本인 딥싸리(*Kochia scoparia Schrad*)의 성숙한 과실을 전조한 것으로 性은 寒, 無毒하고, 味는 苦하다³⁾. 地膚子의 항알레르기, 항염증 및 소양감 억제의 효능에 관한 실험적 연구는 이미 보고 된 바 있는데, Yoshikawa⁹⁾ 는 地膚子 추출물이 피부소양증을 억제하는 효과가 있다고 하였고, Matsuda⁶⁾ 은 地膚子 추출물이 type I, III 및 IV의 알레르기 반응을 억제한다고도 보고하였다.

혈관신생은 암의 전이뿐만 아니라 배 발생과정, 상처치유 및 조직재생 등 정상적인 상태에서도 중요한 역할을 담당하고 있다¹⁰⁾. 하지만 혈관신생기전에 이상이 발생하여 비정상적인 혈관신생 과다에 의해 악성암, 당뇨병성 망막증, 류마티스 관절염, 건선,

만성염증 등의 질환들이 일어난다고 알려져 있으며^{11,12)}, 이 혈관신생과정은 많은 혈관신생인자 및 억제인자의 균형에 의해 조절된다. 최근 혈관신생인자로 보고된 Insulin-like growth factor II (IGF-II)는 간암에서 그 발현이 증가하는 단백질로 알려져 있다¹³⁾. IGF-II는 proinsulin과 구조적인 상동성을 가지며 여러 세포에서 증식과 분화를 조절하는 인자로 알려져 있을 뿐만 아니라¹⁴⁾, 암화과정에서는 혈관신생인자로도 작용함이 알려져 있다^{15,16)}. 이와 같이 암화과정과 발생과정뿐만 아니라, IGF-II가 작용하여 나타나는 혈관신생관련 질환으로는 건선을 들 수 있다. 건선은 피부의 과형성, 다양한 염증세포들의 유입 및 피부세포의 증식 등으로 발생하는 피부병의 일종인데^{17,18)}, IGF-II는 인간의 각질세포의 증식을 촉진시키며¹⁹⁾, 건선 주변조직에 그 발현이 증가되어 있음이 밝혀진 바 있다.

저산소 상태는 암의 발생과정에서 혈관신생유도에 매우 중요한 역할을 하고 이 과정에서 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)이 핵심적인 전사인자로서 작용한다^{20,21)}. 다양한 암세포에서 vascular endothelial growth factor (VEGF)뿐만 아니라 HIF-1 α 도 과발현되어 있다^{22,23)}. HIF-1 α 는 VEGF, erythropoietin, transferring, inducible nitric oxide synthase와 IGF-II 유전자의 전사를 조절하여 증가시킨다²⁴⁻²⁷⁾. 따라서 암발생에서 과발현하는

* 교신저자 : 고성규, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학

· E-mail : epiko@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0329

· 접수 : 2006/04/18 · 수정 : 2006/05/08 · 채택 : 2006/06/09

HIF-1 α 의 활성화 억제는 암의 증식 및 신생혈관을 억제하는 또 다른 방법으로 제시될 수 있을 것이다.

본 실험에서는 피부 질환 치료에 쓰이는 地膚子를 추출하여 그 추출액을 농도별로 처리하여 새로운 신생혈관과 염증에 관련된 단백질 및 RNA 발현에 미치는 영향을 실험하여 세포증식으로 발생하는 다양한 질환에 일상적 적용 가능성을 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 약재

본 실험에서 사용한 약재인 地膚子 (Kochiae Fructus, KF)는 올니허브 (Korea)에서 구입하여 100 g 정량 후 1L의 80% 에탄올을 가하여 30 분 동안 sonication 하였다. 3 mm filter 여과지 (Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 간압여과하였다. 이 여과액을 간압농축기 (Eyela, Japan)를 이용하여 농축한 후, 얹어진 농축액을 동결건조하여 (Freezedryer, Matsushita, Japan) 6 g의 분말을 얻어 세포배양에 사용되는 배지에 vortexing하여 녹였다. 그리고 난 후 37°C shaking incubator에서 12 시간 섞어 준 다음 syringe filter (0.20 um, Sartorius, Germany)를 이용하여 여과한 후 실험에 사용하였다.

2. 세포주와 세포배양

1) HepG₂ 세포의 배양

인간 간암세포주인 HepG₂ 세포은 10% fetal bovine serum (FBS) 을 첨가한 RPMI 1640에 100 U/ml Penicillin과 100 ug/ml Streptomycin (P-S)을 첨가한 배지에서 2-3일 마다 배양액을 교환해 주었으며, 배양 환경은 37°C 포화 습도로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 지부자 추출물에 의해 혈관생성인자의 발현의 감소를 조사하기 위하여 HepG₂ 세포를 100 mm dish 배양용기에 1×10⁶ 세포에서 48 시간 키운 후 각 농도의 지부자를 4시간 전 처리한 후 CoCl₂를 24 시간 처리 또는 처리하지 않은 샘플을 얻었다.

2) HaCaT 세포의 배양

변형된 인간 각질형성세포주인 HaCaT 세포은 10% FBS를 첨가한 Dulbesco's modified eagle media (DMEM)에 을 첨가한 배지에서 2-3일 마다 배양액을 교환해 주었으며, 배양 환경은 37°C 포화 습도로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. HaCaT 세포는 100 mm dish 배양용기에 1×10⁶ 세포에서 48 시간 키운 후 각 농도의 지부자 추출물을 4 시간 전 처리한 후 IGF-II를 1 시간 또는 24 시간 처리하여 세포를 얻었다. 다음 과정은 HepG₂ 세포와 같은 방법으로 수행하였다. 배양에 사용된 PRMI 1640과 DMEM은 GIBCO BRL의 제품을 구입하여 사용하였다.

3. MTS assay

HepG₂ 세포과 HaCaT 세포에 지부자를 농도별로 처리했을 때 생존율을 MTS (Promega, Madison, USA) assay로 조사하였다. 세포를 96-well culture plate에 각각 3×10³ 개, 5×10³ 개가

되도록 심어준 후 지부자 추출물을 농도별로 3, 4 일 처리한 후 MTS를 최종농도 0.25 mg/ml로 넣어 2시간 반응하였다. 490 nm에서 흡광도를 측정하여 약재의 세포독성 및 생존율에 대한 영향을 조사하였다.

4. Western blot analysis

얻어진 세포를 차가운 PBS로 두 번 세척한 후 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA, 120 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.1% noniodet P-40, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ and P1 cocktail이 포함된 lysis buffer를 사용하여 vortexing하여 섞어 준 후 ice에서 30 분간 반응시켰다. 그리고 난 후 4°C, 13,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 상층액을 취하여 총 단백질을 얻었다. 얻은 총 단백질을 Brad-ford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) 방법을 이용하여 정량한 다음 40 ug의 단백질을 15% acrylamide gel에 전기영동하였다. 이것을 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Germany)에 transfer하여 PBST에 1% skim milk와 1% BSA가 든 blocking 용액에서 1 시간 동안 blocking한 후 PBST로 5 분간 2회 세척하였다. Anti-a-tubulin (Sigma Aldrich, Louis, MO), anti-HIF-1 α (BD Biosciences Pharmingen, Chicago, Illinois), anti-VEGF antibody (Santa Cruz, California)를 이용하여 1차 항체반응을 4°C에서 16 시간 반응 시킨 다음 PBST로 2차 항체반응을 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. PBST로 10 분, 15 분, 30 분간 세척한 후 ECL (Amersham Biosciences, UK)로 발광하여 X-ray film에 노출시켜 단백질 발현 분석을 실시하였다.

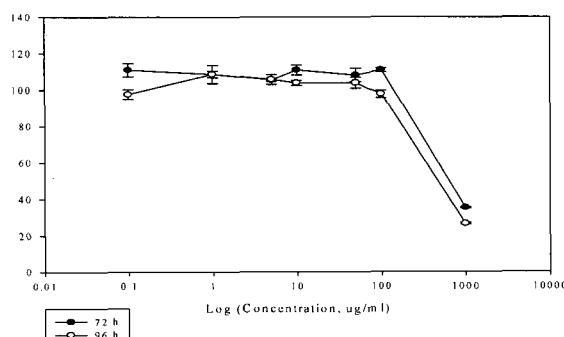
결과

1. 지부자 추출물 농도별 처리시 세포의 독성 및 생존율

지부자 추출물의 세포독성 및 생존율을 관찰하기 위하여 각 질 형성세포인 HaCaT keratinocytes 및 인간 간암세포주인 HepG₂ 세포에 지부자 추출물을 0.1, 1, 5, 10, 50, 100, 1000 ug/ml의 사용하여 MTS assay를 실시하였다. HaCaT 세포의 경우 지부자 추출물을 농도별로 처리한 결과 72 시간에서는 0.1-100 ug/ml의 농도에서는 110%의 약간 높은 생존율을 나타내었다. 그러나 1000 ug/ml의 농도에서는 35.2%로 낮은 생존율을 보였으며, 세포독성을 나타내었다. 또한 96 시간에서는 97-108% 정도의 생존율을 보였으며, 1000 ug/ml의 농도에서는 26.5%의 생존율의 낮은 수치로 세포독성을 나타내었다.

한편, HepG₂ 세포에 지부자 추출물에 의한 세포독성 및 생존율을 실험한 결과 72 시간에서는 농도에 상관없이 아무것도 처리하지 않은 세포와 생존율에서 별 차이가 나지 않았다. 하지만, 1000 ug/ml의 농도에서는 57.2%의 낮은 생존율을 보였다. 또한 96 시간에서는 1-100 ug/ml의 농도에서는 아무것도 처리하지 않은 세포와 비슷한 생존율을 보였지만, 1000 ug/ml의 농도에서는 42.2%로 낮은 생존율을 보이며 세포독성을 나타내었다 (Fig. 1).

A.



B.

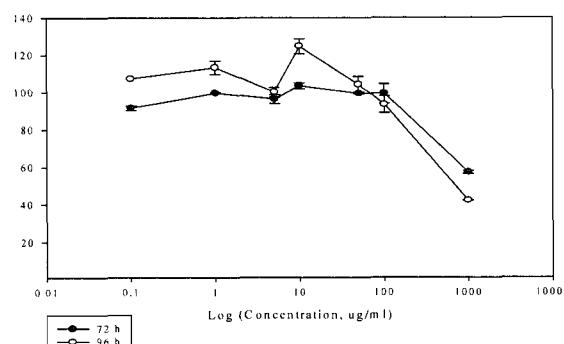


Fig. 1. Effects of KF extracts on viability in HaCaT cells (A) or HepG₂ cells (B). The HaCaT cells were treated with indicated amounts of KF extracts, and cell viability was determined via MTS assay. HaCaT cells & HepG₂ cells were exposed to different concentrations (0.1-1000 ug/ml) of the KF extracts for 72 h, 96 h

2. HepG₂ 세포에서 CoCl₂에 의한 HIF-1α 단백질 발현 유도

HepG₂ 세포에 CoCl₂를 6, 12, 24, 36, 48 시간 처리한 결과 0 시간과 비교하여 12시간에서 24 시간에 HIF-1α의 단백질 발현이 증가되어 있었다. 36 시간에서는 약간 감소되어 나타났으며, 48 시간에서는 control 세포와 같은 상태로 HIF-1α의 단백질 발현이 거의 나타나지 않았다. 이를 통해 HepG₂ 세포에 HIF-1α 단백질 유도시 12 시간에서 24 시간이 HIF-1α의 발현이 가장 많이 증가되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 3). 또한 VEGF 단백질 발현을 확인해 보면 HIF-1α 단백질 발현이 유도된 24, 36 시간에서 증가되어 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

3. HepG₂ 세포에서 CoCl₂로 유도된 HIF-1α 단백질 발현에 지부자가 미치는 영향

인간 간암 세포주인 HepG₂ 세포에서도 지부자 추출물에 의한 HIF-1α의 단백질 발현이 억제되는지 알기 위해 HIF-1α 단백질 발현을 유도하는 CoCl₂를 24 시간 처리하여 시행한 결과 1, 10 ug/ml의 낮은 농도의 지부자 추출물을 처리한 세포에서는 CoCl₂에 의해 유도된 HIF-1α 단백질 발현에 영향을 주지 않은 반면, 지부자 추출물을 25 ug/ml 이상의 농도로 처리한 세포에서는 CoCl₂에 의해 유도된 HIF-1α의 단백질 발현이 감소하였고, 특히 50 ug/ml과 100 ug/ml의 농도로 처리한 세포에서는 거의 정상 수준의 발현을 억제함을 알 수 있었다 (Fig. 3).

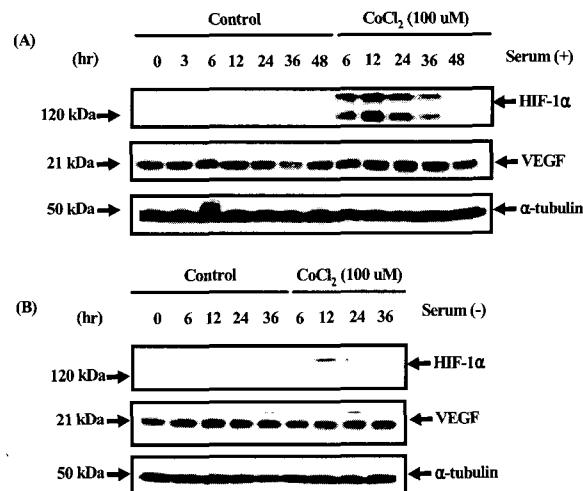


Fig. 2. CoCl₂ induces the protein level of HIF-1α in HepG₂ cells. Immunoblot analysis of total lysates (40 ug) was performed using anti-HIF-1α antibody. HepG₂ cells were incubated with CoCl₂ in the presence of 10% serum (A) or serum-free (B) for 0, 3, 6, 12, 24, 36 and 48 hr.

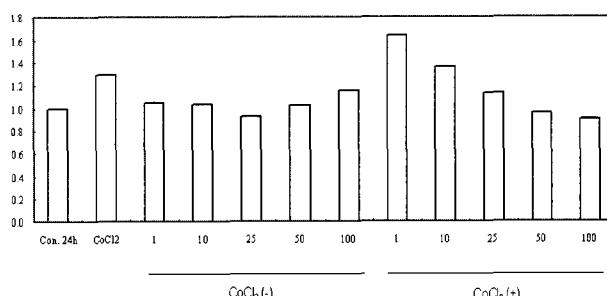


Fig. 3. KF extracts reduced the protein level of HIF-1α in HepG₂ cells. HepG₂ cells were treated with 1, 10, 25, 50, 100 ug/ml KF extracts. After 4 hr, HepG₂ cells were treated with CoCl₂ (100 uM) for 24 hr (A).

4. HaCaT 세포에서 IGF-II에 의한 HIF-1α 발현유도

각질형성세포인 HaCaT keratinocytes에서 IGF-II에 의한 혈관신생과정을 실험하였다. VEGF의 발현을 조절하는 전사 인자인 HIF-1α의 단백질 발현변화를 정상산소 상태인 HaCaT 세포에서 IGF-II를 16 시간과 24 시간 처리하여 관찰한 결과 HIF-1α 단백질 발현이 0 시간에 비해서 16 시간과 24 시간에 현저하게 발현이 증가되어 있었다. 이를 통해 HaCaT 세포에서 IGF-II 유도시 HIF-1α의 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4).

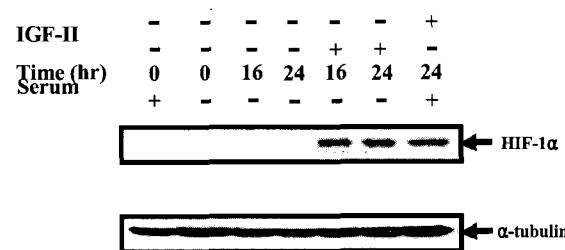


Fig. 4. IGF-II induced the protein level of HIF-1α in HaCaT cells. Immunoblot analysis of total lysates (40 ug) was performed using anti-HIF-1α antibody. HaCaT cells were incubated with 100 ng per mL IGF-II for 16 or 24 h or CoCl₂ in the presence of 10% serum for 24 h.

5. 지부자가 HaCaT세포에서 VEGF mRNA 전사에 미치는 영향
지부자 추출물의 인간각질형성세포주 HaCaT 세포주에서의 신생혈관의 대표적인 마커인 VEGF mRNA의 전사를 실험한 결과 VEGF의 전사는 IGF-II 유도에 큰 영향을 받지 않으며, 100 ug/ml 이상의 농도에서 전사 억제를 관찰할 수 있었다.

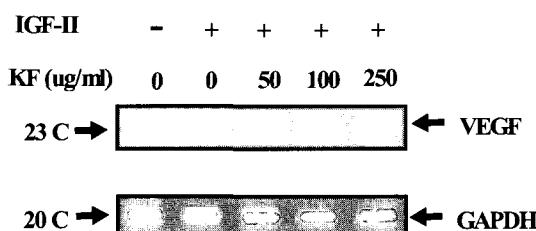


Fig. 5. Reduction of the mRNA level of VEGF in HaCaT cells by the treatment of KF. HaCaT cells were treated with 50, 100, 250 ug/ml KF extract. After 4 hr, HaCaT cells were treated with IGF-II protein (100 ng/ml) for 24 hr.

6. 지부자가 HaCaT세포에서 iNOS 발현에 미치는 영향
지부자 추출물의 인간각질형성세포주 HaCaT 세포주에서의 항산화 및 염증관련 단백질 기전의 대표적인 iNOS 단백질의 발현을 본 결과 IGF-II 유도에 상관없이 100 ug/ml 이상의 농도에서 발현억제를 보여주었다 (Fig. 6).

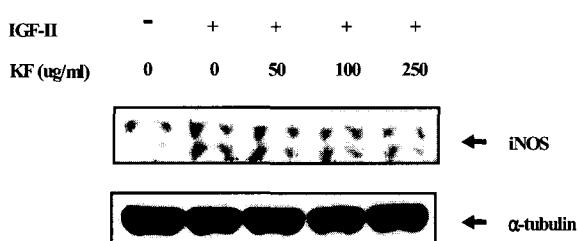


Fig. 6. Decreased iNOS expression by KF treatment in HaCaT cells. KF reduced the protein level of iNOS level. HaCaT cells were treated with 50, 100, 250 ug/ml KF. After 4 hr, HaCaT cells were treated with IGF-II protein (100 ng/ml) for 24 hr.

고 칠

地膚子(Kochiae Fructus)는 명아주과 (Chenopodiaceae)에 속한 일년생 草本인 납싸리(Kochia scoparia Schrad)의 성숙한 과실을 건조한 것으로 性은 寒, 無毒하고, 味는 苦하다¹⁾. 淸熱利濕, 祛風止痒, 殺蟲解毒하는 작용이 있어 습진, 소양증, 담마진, 피부묘기증, 신경성 피부염, 알레르기성 피부염 등에 사용된다^{2,4)}.

地膚子는 내복하는 방법 외에도 蛇床子, 白藜 등을 배합하여 피부습진과 소양증에 煎湯外洗하거나¹⁾, 苦蓼, 土槿皮, 百部, 明礬 등을 煎水外洗하여 음부소양, 습진, 手足癬, 피부소양증 등을 치료하는 등²⁾, 소양성 피부병의 외용제제에 널리 사용되는 약물이다⁵⁾.

외용제에 의한 국소치료는 병소에 화학적 및 물리적 작용을 가하여 효과를 얻게 되는데²⁾, 地膚子의 화학적 성분에 대해서는 phytoecdysteroids, saponins 및 alkaloids가 식물의 씨앗, 열매 및 지상부에서 분리되었고, 地膚子의 메탄올 추출물과 glycosidic

fraction에서 피부 소양증을 억제하는 효과가 있으며, 주된 항소양성 성분은 momordin Ic(3- α -[β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-glucurono-pyranosyl]-oleanolic acid)라고 밝혀져 있다⁹⁾.

地膚子 추출물과 주된 항소양성 성분인 momordin Ic은 특별히 소양증의 유발과 관련이 있는 histamine이나 serotonin 같은 화학 매개체에 길항작용을 하며, 항염증작용을 통한 peripheral antinociceptive effect가 있다고 하였다⁶⁾. 또한 type I, III 및 IV의 알레르기 반응을 억제하는데, 이는 地膚子가 체액성 면역뿐만 아니라 세포성 면역도 억제하며 地膚子의 항소양효과는 항알레르기 효과에 의하여 나타나는 것으로 생각된다고 하였다⁷⁾. 그리고 이러한 한약재에 포함되어 있는 여러 가지 oleanolic acid glycoside의 항소양효과를 연구하여 3-O-glycoside 성분과 oleanolic acid glycoside의 28-carboxyl group은 항소양효과를 나타내는 가장 중요한 요소라고 하였고, 3-O-glucuronide는 상응하는 3-O-glucoside보다 강한 활성을 나타낸다고 하였다⁸⁾.

혈관신생의 촉진 및 억제기전에 관한 연구는 세계적으로 활발하게 진행되고 있다. 특히 혈관신생 억제에 관한 연구는 암 예방 및 치료법의 하나로 관심이 모아지고 있다. 건선 또한 피부세포의 증식과 염증반응을 촉진시키는 만성피부염 질환으로서 그 발생 기작이 명확히 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 이러한 간암과 건선의 신생혈관 증식을 억제 할 수 있는 효과적인 질병 치료 방법을 제시하려고 하였다.

IGF-II는 간암으로의 이행과정과 건선의 발생과정에서 그 발현이 급격히 증가되는 것으로 알려져 있다. IGF-II는 human embryonic kidney 293 세포에서 HIF-1 α 의 발현을 유도한다고 증명된 바 있다²⁵⁾. HIF-1 α 는 산소 농도에 의존하는 여러 전사인자 중 가장 핵심적인 조절인자이다. 따라서 HIF-1 α 의 조절이 저산소상태에 의해 매개되는 세포내의 대사과정에서 매우 중요한 역할을 한다. 즉 HIF-1 α 는 혈관신생, 세포증식, 생존, 당 대사와 관련된 중요한 전사 인자이다. 그러므로 HIF-1 α 의 단백질 발현 억제는 효과적인 항암 치료의 목표가 될 것이다.

본 연구에서 HaCaT 세포에 IGF-II를 16 시간 또는 24 시간 처리하였을 때 HIF-1 α 의 단백질 발현이 0 시간에 비해 현저히 증가되어 나타남을 확인할 수 있었다. HepG₂ 세포에서도 HIF-1 α 의 단백질 발현을 유도하는 CoCl₂를 시간별로 처리하였을 때 12 시간과 24 시간에서 현저히 증가되었다.

이를 바탕으로 지부자 추출물의 혈관신생 억제효과를 연구하기 위해 먼저 MTS assay를 통하여 지부자 추출물이 미치는 HaCaT 세포와 HepG₂ 세포의 세포독성 및 생존율을 조사하였다. HaCaT 세포와 HepG₂ 세포에서 72시간, 1000 ug/ml 이상의 농도를 제외하고는 세포독성이 없는 것을 확인하였다. HepG₂ 세포인 인간 간암세포주에 지부자 추출물을 전 처리하고 HIF-1 α 의 발현을 유도하는 CoCl₂를 처리하였을 때 HIF-1 α 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

인간각질형성세포주 HaCaT 세포주에서의 신생혈관의 대표적인 마커인 VEGF mRNA의 전사를 실험한 결과 VEGF의 전사는 IGF-II 유도에 큰 영향을 받지 않으며, 100 ug/ml 이상의 농도에서 전사 억제를 관찰할 수 있었다. 한편 지부자 추출물이 인

간각질형성세포주 HaCaT 세포주에서의 항산화 및 염증관련 단백질 기전의 대표적인 인자인 iNOS 단백질의 발현을 본 결과 IGF-II 유도에 상관없이 100 ug/ml 이상의 농도에서 발현억제를 보여주었다.

결론적으로 본 연구에서는 악성종양 전이, 건선 관련세포들의 증식에 필수적으로 요구되는 혈관신생에 대한 자부자 추출물의 HIF-1 α 의 단백질 발현 및 항산화 관련 단백질의 발현을 확인한 결과 HIF-1 α 의 단백질 발현 감소를 통한 혈관신생 억제효과에 대한 가능성과 항산화관련 효과를 확인할 수 있었다.

결 론

지부자 추출물이 신생혈관 및 항산화 관련 단백질 발현에 주된 역할을 하는 HIF-1 α 에 미치는 영향을 알아보기자, HaCaT 세포와 HepG₂ 세포를 배양하고, Western blot analysis 를 통해 VEGF mRNA의 전사와 iNOS 단백질의 발현 정도를 실험한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다. 지부자추출물을 처리한 HaCaT 세포와 HepG₂ 세포에서 72시간 및 1000 ug/ml 이상의 농도에서 세포증식을 억제하였다. HepG₂ 세포에 지부자추출물을 전 처리하고 CoCl₂를 처리하였을 때 50 ug/ml 이상의 농도에서 HIF-1 α 단백질 발현을 감소시켰으며, 지부자추출물은 신생혈관의 대표적인 지표단백질인 VEGF mRNA의 전사를 IGF-II 유도에 큰 영향을 받지 않은 채, 100 ug/ml 이상의 농도에서 전사 억제를 관찰할 수 있었다. 또 지부자추출물은 염증 및 항산화 관련 단백질 기전의 대표적인 인자인 iNOS의 발현에서 IGF-II 유도에 상관없이 50 ug/ml 이상의 농도에서 발현억제를 보여주었다. 이상의 결과로 볼 때 지부자가 혈관신생억제, 항산화 및 항염증의 효과를 가질 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 전국한의과대학 본초학 교수. 본초학. 서울, 영립사. p 321, 1992.
2. 安家豐. 張志禮皮膚病醫案選萃. 北京. 北京出版社. p 275, 2000.
3. 김동일. 동의학사전. 평양: 과학백과사전종합출판사. p 259, 1988.
4. 대한피부과학회. 피부과학(개정3판). 서울, 여문각. p 548, 1994.
5. 宋兆友. 皮膚病中藥外用製劑. 北京, 人民衛生出版社. p 13, 423, 2000.
6. Matsuda, H. Studies on Kochiae FructusIII: antinociceptive and antiinflammatory effects of 70% ethanol extract and its component, Momordin Ic from dried fruits of Kochia scoparia L. Biol Pharm Bull. 20(10):1086-1091, 1997.
7. Matsuda, H., Dai, Y., Ido, Y. Studies on Kochiae FructusIV: anti-allergic effects of 70% ethanol extract and its component, Momordin Ic from dried fruits of Kochia scoparia L. Biol Pharm Bull. 20(11):1165-1170, 1997.
8. Matsuda, H., Dai, Y., Ido, Y. Studies on Kochiae FructusV: Antipruritic effects of oleanolic acid glycosides and the structure-requirement, Biol Pharm Bull. 21(11):1233-1234, 1998.
9. Yoshikawa, M. Studies on Kochiae FructusII: On the Saponin constituents from the fruit of chinese Kochia scoparia(chenopodiaceae) Chemical structures of Kochianosides I, II, III and IV., Chem Pharm Bull. 45(6):1052-1055, 1997.
10. Herron, G.S., Werb, G., Dwyer, K., Banda, M.J. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells: expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. J Biol Chem. 261:2814-2819, 1986.
11. Frater-Schroder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P., Bohlen, P. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 84:5277-5281, 1987.
12. Gimbrone, M.A., Leapman, S.B., Cotran, R.S., Folkman, J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. J Exp Med. 136:261-276, 1992.
13. Park, B.C., Huh, M.H., Seo, J.H. Differential expression of transforming growth factor alpha and insulin-like growth factor II in chronic active hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 22:286-294, 1995.
14. Cohick, W.S., Clemons, D.R. The insulin-like growth factors. Annu Rev Physiol. 55:131-153, 1993.
15. Kim, K.W., Bae, S.K., Lee, O.K., Bae, M.H., Lee, M.J., Park, B.C. Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 58:348-351, 1998.
16. Bae, M.H., Lee, M.J., Bae, S.K., Lee, O.K., Lee, Y.M., Park, B.C., Kim, K.W. Insulin-like growth factor II (IGF-II) secreted from HepG₂ human hepatocellular carcinoma cells shows angiogenic activity. Cancer Lett 128:41-46, 1998.
17. Christophers, E., Parzefall, R., Braun-Falco, O. Initial events in psoriasis: quantitative assessment. Br J Dermatol 89:327-334, 1973.
18. Braverman, I.M., Keh-Yen, A. Three-dimensional reconstruction of endothelial cells gaps in psoriatic vessels and their morphologic identity with gaps produced by the intradermal injection of histamine. J Invest Dermatol 86:577-581, 1986.
19. Neely, E.K., Morhenn, V.B., Hintz, R.L., Wilson, D.M., Rosenfeld, R.G. Insulin-like growth factors are mitogenic for human keratinocyte and a squamous cell carcinoma. J Invest Dermatol 96:104-110, 1991.
20. Birner, P., Schindl, M., Obermair, A., Breitenecker, G., Oberhuber, G. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. Clin Cancer Res 7:1661-1668, 2001.

21. Zagzag, D., Zhong, H., Scalzitti, J.M., Laughner, E., Simons, J.W., Semenza, G.L. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* 88:2606-2618, 2000.
22. Zhong, H., De Marzo, A.M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D.A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W.B., Semenza, G.L., Simons, J.W. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59:5830-5835, 1999.
23. Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Harris, A.L. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157:411-421, 2000.
24. Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5510-5514, 1995.
25. Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G., Semenza, G.L. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 59:3915-3918, 1999.
26. Semenza, G.L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:551-558, 1999.
27. Elson, D.A., Ryan, H.E., Snow, J.W., Johnson, R., Arbeit, J.M. Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res* 60:6189-6195, 2000.