

소목 추출물의 세포독성 효과와 Topoisomerase I 억제 활성에 관한 연구

전원경*, 박갑주, 김수영¹, 마진열, 성현제

한국한의약연구원 연구부, ¹건국대학교 이과대학 생물학과

In Vitro Studies on the Anticancer Effect and Topoisomerase I Inhibition Activity of *Caesalpinia sappan* L. Extract

Won Kyung Jeon*, Kap Joo Park, Soo Young Kim¹, Jin Yeul Ma and Hyun Jea Sung

Department of Research, Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul 135-100, Korea and

¹Department of Biology, Kunkook University, Seoul 133-701, Korea

Abstract - To evaluate cytotoxic effect and topoisomerase I inhibition activity of *Caesalpinia sappan* L., both water and methanol extracts were examined using *in vitro* assay. The cytotoxic effect of *Caesalpinia sappan* L. examined using MTT and SRB assay and IC₅₀ values were measured against U937, HL60, HepG2, SNU-1, SNU-16 cancer cell lines. Among them the representative cytotoxic results are shown as follows: water extract (U937=13.39 µg/ml, HL60=8.65 µg/ml, HepG2=38.48 µg/ml, SNU-1=7.72 µg/ml, SNU-16=25.49 µg/ml), methanol extract (U937=13.35 µg/ml, HL60=9.43 µg/ml, HepG2=25.67 µg/ml, SNU-1=8.37 µg/ml, SNU-16=28.64 µg/ml). The inhibitory concentration of DNA topoisomerase I activity against water extract was 100 µg/ml and the inhibitory concentration of DNA topoisomerase I against methanol extract was 400 µg/ml.

Key words - *Caesalpinia sappan* L.; MTT and SRB assay; DNA Topoisomerase I.

소목(*sappan wood*)은 콩과(Legminosae)에 속한 낙엽소교목 또는 관목인 *Caesalpinia sappan* L.의 껍질을 제거한 심재를 건조한 한약재로 India, Malaysia 반도, 중국 남부 등 열대 아시아에 분포하는 식물이다.¹⁾ 중약대사전에는 소목의 약리작용으로서 항균작용, 중추억제작용, 심혈관에 대한 작용이 기록되어 있다.²⁾ 소목의 심재는 여러 가지 화학성분 즉, 페놀성 화합물, 정유, 배당체, 지방산 에테르로 구성되어 있다고 보고되어 있다.³⁾ 국내에서도 소목에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데 항산화 효과와 위암세포주에 대한 세포독성 효과, 항

염 효과 및 항균 소취 가공 등에 관한 보고가 있다.^{4,6)} 항암 화학요법 중 현재 임상적으로 이용하고 있는 약물 중 약 80%가 DNA를 표적으로 개발되었으며 그 작용기전에 따라 알킬화제, intercalator, topoisomerase 저해제, DNA 절단제 등으로 나눌 수 있다. 항암제의 표적분자로는 Topoisomerase 등 DNA metabolizing enzymes과 microtubule 등 여러 가지가 알려져 있으며 따라서 각각의 assay를 함으로써 항암제로서의 적용 가능성을 검정하고 있으나 이들 항암 성분의 표적분자 검색도 세포독성 효과 측정과 병행되어야 한다. 특히 최근에 항암 물질개발의 주요 표적으로 주목받고 있는 topoisomerase I 억제제는 DNA의 대사에서 중요

*교신지자 : Fax 02-3442-0220

한 역할을 수행하는 세포주기에 있어서 그 활성이 높을 것으로 예상되어지는 topoisomerase가 증식하는 것으로 알려져 암세포의 좋은 표적이 될 수 있다는 점을 이용한 항암 물질로서 점차 약재개발 및 임상치료 분야에도 적용되고 있다.⁷⁾ 따라서 본 연구는 소목 추출물에 대하여 topoisomerase I 억제 실험과 다양한 암세포주에 대한 세포독성 측정을 병행하여 실험을 하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 소목은 1997년 6월에 경동시장에서 구입하여 잡질을 제거한 후 실험에 사용하였다.

시료의 조제 - 소목을 열수와 methanol을 이용하여 추출하였는데 열수로 추출한 경우는 소목 20g에 증류수 500 ml을 넣고 끓인 후 가제를 이용하여 1차 여과하고 8,000×g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 다음 이 추출여액을 rotary vacuum evaporator(Buchi RE 121, Switzerland)로 60℃ 수욕상에서 감압 농축한 후 freeze dryer로 동결건조하여 사용하였다. Methanol로 추출한 경우에는 소목 20g에 500 ml의 80% methanol을 넣고 항온기에서 60℃, 18시간 동안 침적하고 추출액을 여과지(Whatman No. 2)에 여과한 다음 8,000×g에서 15분간 원심분리하고 상층액을 evaporator로 감압 농축한 후 동결건조하여 사용하였다. 동결건조하여 가루상태가 된 시료를 0.5% DMSO 용액에 완전히 녹여 membrane filter(0.45 μm)로 여과멸균하여 assay에 사용하였다.⁸⁾

세포주 및 세포배양 - 실험에 사용한 세포주는 모두 인체 암세포주를 사용하였다. 간암 세포주 Hep G2(hepatoblastoma, ATCC HB-8065), 혈액암 세포주 U937(Lymphoma, ATCC CRL-1593)과 HL60(leukemia) 및 한국인에서 분리된 위암세포주 SUN-1과 SNU-16을 한국세포주은행에서 분양 받아서 사용하였다. 암세포주 증식을 위해서는 조직 배양용 플라스크에 0.2% sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum과 gentamicin(50 mg/ml)을 첨가한 RPMI 1640 배지 또는 DMEM 배지에 암세포주를 넣어 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

적정세포수 결정 - 96 well plate의 각 well에 첨가할 접종세포수를 결정하였는데 이 세포수는 약물 처리하지 않은 대조군(100% 생존군)에서 세포접종 당시와 4일간 배양한 후 실험 종료 시에도 세포가 활발히 증식하면서 흡광도가 충분히 높은 값을 나타낼 수 있는 최적의 접종 세포수(세포수/well)로 나타났다. 접종 세포수를 결정하기 위해 1~100×10³개/well의 범위에서 계단희석하여 96 well plate에 180 μl씩 접종하고 PBS를 20 μl 첨가하였다. 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 4일간 배양한 후 SRB 또는 MTT 검색법의 과정을 시행하였다. 실험종료 시 ELISA 판독기(Molecular Device, E max)로 흡광도를 측정하였고, 흡광도값이 0.8~1.0 범위에서 직선비례되므로 이 범위에서 적정세포수를 결정하여 실험에 이용하였다.⁹⁾

MTT 검색법^{10,11)} - 적정세포수의 세포가 포함된 180 μl의 배지를 96 well plate의 10개의 칼럼에 첨가하였고 한 칼럼에는 세포 부유액 대신 배지만을 가해 흡광도 측정시 blank로 사용하였다. 0.5% DMSO에 녹인 시료용액은 원하는 농도의 10배 용액으로 만들어 PBS로 계단희석하여 8가지 dose 농도로서 각 well에 20 μl씩 첨가하였고, 8개의 dose로 각 well에 첨가되어진 시료의 최종농도는 500, 250, 125, 63, 32, 13, 6.3, 3.25 μg/ml로 정하였다. 그리고 세포부유액을 넣은 plate의 마지막 칼럼에는 시료 대신 PBS를 20 μl 첨가하여 100% 생존군으로 삼았다. 검체투여가 끝난 plate를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 4일간 배양한 후 2 mg/ml MTT(3,4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) 용액 50 μl를 가하고 37℃ 배양기에 4시간 동안 방치하였다. 배양 종료시 plate를 450 g에서 5분간 원심분리한 후 배지를 30 μl 정도만 남기고 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 DMSO 용액을 150 μl씩 가한 후 formazan 결정을 잘 녹여내어 균일하게 만든 다음 ELISA 판독기로 540 nm 파장에서 OD₅₄₀ 값을 측정하였다.

SRB 검색법¹²⁾ - 적정세포수의 세포부유액 180 μl를 96 well plate의 각 well에 첨가하고 한 칼럼에는 세포 부유액 대신 배지만을 가해 흡광도 측정시 blank로 사용하였다. 적정세포수가 분주된 plate를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 0.5% DMSO에 녹인 시료용액은 원하는 농도의

10배 용액으로 만들어 PBS로 계단희석하여 8가지 dose 농도로서 각 well에 20 μ l씩 첨가하였고, 8개의 dose로 각 well에 첨가되어진 시료의 최종농도는 500, 250, 125, 63, 32, 13, 6.3, 3.25 μ g/ml로 정하였다. 그리고 세포부유액을 넣은 plate의 마지막 칼럼에는 시료대신 PBS를 20 μ l 첨가하여 100% 생존군으로 삼았다. 시료투여가 끝난 plate를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 더 배양하였다. 배양 종료시 50 μ l의 차가운 50% TCA(Trichloroacetic acid) 용액을 천천히 가해 주고 TCA가 96 well plate 바닥에 가라앉도록 잠시 기다린 후 조심스럽게 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 충분히 고정시켰다. 고정이 끝나면 96 well plate 세척장치를 이용하여 증류수로 5회 세척하고 잘 건조시켰다. 건조된 96 well plate에 1% acetic acid에 녹인 0.1% SRB (Sulforhodamine B, Sigma)용액 100 μ l를 첨가하였다. 실온에서 30분 이상 두어 충분히 염색시키고 1% acetic acid로 96 well plate 세척장치로 5회 세척한 다음 공기 중에서 잘 건조시켰다. 완전히 건조된 후 100 μ l의 10 mM Tris-base(pH 10.5) 용액을 각 well에 가해 생존세포 단백질에 부착된 SRB dye를 잘 녹여내어 균일하게 만들어 ELISA 판독기로 564 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결과 분석 - MTT와 SRB 검색에서 최종적으로 얻어지는 실험군의 평균 OD값을 구해 대조군(약물 비처리, 100% 생존군)의 평균 OD값에 대한 백분율값을 산출하였는데 이 백분율은 대조군과 비교한 실험군의 세포 생존율에 해당하는 것으로 Soft MAX pro version 2.2.1(Molecular Devices, E max. Inc) 프로그램을 이용하여 IC₅₀ 값을 계산하였다. 50% 억제농도(IC₅₀)는 세포생존율이 50%가 되도록 하는 약물의 농도로 정의하였고 이 IC₅₀ 값을 항암효과의 지표로 사용하였다.

DNA topoisomerase I inhibition activity 측정¹³⁾

-Topoisomerase I relaxation assay는 topoisomerase의 활성화에 의해 생기는 plasmid DNA의 relaxed form을 전기영동상에서 확인하는 것으로 relaxed form과 supercoiled form의 DNA의 분자형태에 따른 전기거리의 차이를 관찰하여 DNA topoisomerase I inhibition activity를 측정하는 방법이다. 실험에 사용된 DNA topoisomerase I은 calf thymus에서 유래된 것으로

Takara shuzo Co., LTD사 제품을 사용하였으며 pBR 322 DNA도 같은 회사 제품을 구입하여 사용하였다. Topoisomerase I 억제 활성은 Liu와 Miller의 방법을 사용하였는데, 실험군에는 10 \times 반응 완충액 1 μ l, 1% BSA 1 μ l, pBR 322 DNA(0.5 μ g/ μ l, TaKaRa) 1 μ l, DNA topoisomerase I (TaKaRa) 1 unit, 시료 1 μ l에 증류수로 최종용량이 10 μ l가 되도록 조정하였고 음성 대조군에는 pBR 322 DNA (0.5 μ g/ μ l, TaKaRa) 1 μ l, DNA topoisomerase I(TaKaRa) 1 unit와 시료 대신에 0.5% DMSO 1 μ l를 첨가하였고, 양성 대조군에는 pBR 322 DNA(0.5 μ g/ μ l, TaKaRa) 1 μ l와 시료 대신에 0.5% DMSO를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 다음 loading 용액(2% SDS, 20% glycerol, 0.05% bromophenol blue) 4 μ l를 첨가하여 반응을 정지시켰고, 0.8% agarose gel에서 100 V로 45분간 전기영동하였다. 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide 용액에서 15분간 gel을 염색한 후 Image master(Pharmacia biotech, USA)를 이용하여 DNA band를 관찰하고 사진촬영을 하였다. Topoisomerase I의 1 unit는 0.5 μ g의 초나선형 DNA를 30분 동안 반응하여 100% 이완된 형태로 전환시키는 효소량으로 정하였다.^{14,15)}

결과 및 고찰

적정세포수의 결정 - 적정세포수가 10개의 칼럼에 걸쳐 1~100 \times 10³개/well이 되도록 단일 세포부유액을 2배 계단희석하여 96 well plate에 접종하고 항암제나 검체 대신 PBS만을 가해 주어 4일간 배양하였다. 실험 종료시 OD값이 0.8~1.0이면서 활발히 증식하는 각 세포주의 적정세포수는 Hep G2는 2 \times 10³개/well, U937은 4 \times 10³개/well, HL60은 4 \times 10³개/well, SNU-1과 SNU-16도 각각 4 \times 10³개/well로 결정하였다.

인체 암세포주에 대한 세포독성 - U937과 HL60 세포주는 혈액암세포주로 MTT assay로 세포독성을 측정하였는데 결과는 Table I과 같다. U937 혈액암세포주의 소목 추출물에 대한 IC₅₀값은 열수추출물이 13.39 \pm 0.91 μ g/ml, 메탄올 추출물이 13.35 \pm 0.75 μ g/ml에서 세포독성을 나타내어 추출방법에 따른

Table I. Cytotoxic effect of *Caesalpinia sappan* L. extract on human cancer cell lines

Cancer cell line	IC ₅₀ ^a (μg/ml)	
	Water extract	Methanol extract
U 937	13.39±0.91	13.35±0.75
HL 60	8.65±0.71	9.43±0.53
Hep G2	38.48±0.02	25.67±0.63
SNU-1	7.72±0.14	8.37±0.30
SNU-16	25.49±1.56	28.64±2.07

^aIC₅₀: 50% inhibition of cell growth. IC₅₀ values were calculated from soft MAX program. Means ± standard deviation of triplicate experiments.

차이가 없었다. HL60 혈액암세포주의 소목 추출물에 대한 IC₅₀값은 열수추출물이 8.65±0.71 μg/ml, 메탄올 추출물이 9.43±0.53 μg/ml로 열수 추출물의 세포독성이 약간 높게 나타났다. Hep G2 세포주는 간암세포주로 SRB assay로 세포독성을 측정하였는데 결과는 Table I과 같다. Hep G2 간암세포주의 소목 추출물에 대한 IC₅₀값은 열수추출물이 38.48±0.02 μg/ml, 메탄올 추출물이 25.67±0.63 μg/ml로 열수 추출물보다 메탄올 추출물이 더 높게 측정되었다. SNU-1은 한국인 암환자로부터 수립된 위암 세포주로 MTT assay로 세포독성을 측정하였는데 결과는 Table I과 같다. SNU-1 위암세포주의 소목 추출물에 대한 IC₅₀값은 열수 추출물이 7.72±0.14 μg/ml, 메탄올 추출물이 8.37±0.3 μg/ml에서 세포독성을 나타내었다. SNU-16 세포주는 위암 세포주로 SRB assay로 세포독성을 측정하였는데 결과는 Table I과 같다. SNU-16 세포주의 소목 추출물에 대한 IC₅₀값은 열수 추출물이 25.49±1.56 μg/ml, 메탄올 추출물이 28.64±2.07 μg/ml에서 세포독성이 측정되었다. 위의 결과로 볼 때 성장속도가 빠르고 비교적 항암제 감수성이 예민하여 주로 1차 항암검색 측정에 주로 이용되는 SNU-1이 다른 암세포주에 비교하여 세포독성효과가 높게 측정되었다.¹⁶⁾ 혈액암세포주에 대한 세포독성 효과도 높게 측정되어 위암과 혈액암에 대한 항암제 개발을 시사해 주고 있다. 또한 추출 방법에 따라 세포독성효과가 다르게 측정되었는데 열수 추출물이 메탄올 추출물보다 효과가 다소 높게 측정되어 향후 열수 추출물로부터 활성 단일 분질 분리에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

DNA topoisomerase I inhibition activity 측정

-Topoisomerase relaxation assay는 0.5 μg pBR 322 DNA와 topoisomerase I을 1 unit만 가하여 총 반응액을 10 μl가 되게 한 것을 음성 대조군으로 정하였고 pBR 322 DNA만을 첨가한 것은 양성대조군으로 정하였으며, 실험군에는 pBR322 DNA, topoisomerase와 시료를 첨가하여 총 반응액을 10 μl되게 한 것을 비교하여 활성을 측정하였다. DNA만을 처리한 양성대조군은 대부분 supercoiled form으로 나타났고 DNA에 topoisomerase I을 처리한 음성대조군은 모두 relaxed form으로 전환되었다. 대조군을 기준으로 하여 양성 대조군과 같은 결과를 나타내는 농도를 Topoisomerase I의 활성 억제 농도로 정하였는데 이는 약 99.9%를 억제하는 것으로 판단하였다. 결과는 Table II와 같고 Topoisomerase I의 활성을 99.9% 저해하는 소목의 농도는 열수 추출물이 100 μg/ml, 메탄올 추출물이 400 μg/ml로 측정되었다. 열수 추출물이 메탄올 추출물보다 효과적으로 DNA topoisomerase I의 활성을 억제하는 결과를 얻은 바 한방에서는 전통적으로 열수 추출물을 복용하는 점을 살펴보면 향후 약제를 개발함에 있어 기초자료가 될 것으로 사료된다. 천연물로부터 Topoisomerase I 억제제로 개발된 예를 들어보면 camptothecin이 1966년에 *Camptothecin acuminata* 라는 열대식물에서 분리되었으며 암세포주에 대한 세포독성효과도 보고되어 있다.¹⁷⁾ Camptothecin은 고형암에 대한 항암활성으로 관심을 끌어들였으나 독성문제로 약으로 개발되지 못했지만, topoisomerase I의 기작이 밝혀짐에 따라 독성문제를 해결할 수 있는 유도체의 개발이 활발하게 진행되어 왔다. Topotecan과 irinotecan 등이 campto-

Table II. Inhibitory effect of *Caesalpinia sappan* L. water extract and methanol extract on activity of DNA topoisomerase I

Traditional Herb	Inhibitory Concentration ^a (μg/ml)	
	Water extract	Methanol extract
<i>Caesalpinia sappan</i>	100	400

^aInhibitory Concentration was determined that inhibits 99.9% of topoisomerase I activity.

thecin의 대표적인 유도체로 항암효과가 우수하여 새로운 항암제로 분류되고 있다.¹⁸⁾ 식물에서 유래하는 항암제의 연구성고가 우수하다고 볼 때 한약재를 이용한 새로운 항암제 연구는 가능성이 있다고 할 수 있다. 본 실험에서 소목의 열수 추출물에 대해 *in vitro*에서 다양한 인체 암세포주에 대한 세포독성과 topoisomerase I 활성억제 효과가 측정됨으로써 향후 새로운 항암치료제로 개발가능성을 제시해 주고 있다. 따라서 소목의 열수 추출물에서 topoisomerase I 활성 억제 성분을 분리하고, topoisomerase I 활성 억제의 분자 생물학적 작용기전에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되며, 현재 이에 대한 연구를 진행 중에 있다.

결 론

소목 추출물을 대상으로 인체 암세포주 5종에 대한 세포독성과 Topoisomerase I 활성 억제에 대한 효과를 측정하였다. 소목 추출물의 세포독성 효과는 메탄을 추출물보다 열수 추출물에서 높게 측정되었고, 특히 인체 암세포 중에 SNU-1에서 세포독성이 가장 높게 측정되었다. Topoisomerase I 활성 억제에 대한 결과는 열수 추출물(100 µg/ml)이 메탄을 추출물(400 µg/ml)보다 낮게 측정되어 열수 추출물이 효과적으로 억제하였다.

인용문헌

1. 전국한의학대학 본초학교수 (1995) 본초학. 438. 영림사. 서울.
2. 신문농출판공가 (1995) 중약대사전. 2782. 일중사.
3. Namikosi, M., Saitoh, T. (1987) Homoisoflavonoids and related compound. IV. Absolute configurations of homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan* L. *Chem. Pharm. Bull.* 35 (9): 3579-3602.
4. Lim, D. K., Choi, L. U., Shin, D. H. (1996) Antioxidative activity of some solvent extract from *Caesalpinia sappan* L. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 28(1): 77-82.
5. Park, K. J., Kim, E. H., Eun, Y. A., Kang, B. J., Sung, H. J. (1997) Cytotoxic effect of Korean traditional prescription on the human gastric cancer cell lines. *Kor. J. Pharmacogn.* 28(4): 233-238.
6. Kim, Y. S., Noh, Y. K., Lee, G. I., Kim, Y. K., Lee, K. S., Min, K. R. (1995) Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. *Kor. J. Pharmacogn.* 26(3): 265-272.
7. Andoh, T., Ikeda, H., Oguro, M. (1991) Molecular biology of DNA topoisomerase and its application to chemotherapy- Proceedings of the international symposium on DNA topoisomerases in chemotherapy. Nagoya, Japan, November. 18-20. CRC Press. Boca Raton.
8. Nagai, T., Yamada, H. (1994) *In vivo* anti-influenza virus activity of kampo (japanese herval) medicine "Sho-seiryu-to" and its mode of action. *Int. J. Immunopharmac.* 16(8): 605-613.
9. Hyun, J. W., Lim, K. H., Shin, J. E., Sung, M. S., Oh, J. H., Yang, Y. M., Won, Y. J., Kim, Y. S., Kang, S. S., Chang, I. M., Paik, W. H., Kim, H. J., Woo, E. R., Park, H., Park, J. G. (1994) Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants (II). *Kor. J. Pharmacogn.* 25(4): 382-387.
10. Rubinstein, L. V., Shemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D. A., Monks, A. and Boyd, M. R. (1990) Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data general with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1113.
11. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. (1987) Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assesment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 9368.
12. Skehan, P., Storeng, R., Scudeiro, D. A., Monks, A., McMahon, J., Vistica, A. D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 10710.
13. Higgings, N. P., Ferro, A. M., Olivera, B. M. (1990) *In* DNA topology and its biological effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.). 361-370. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
14. Lee, J. B., Kweon, G. R., Lim, K., Hwang, B. D. (1992) Studies on DNA topoisomerase I from human term placenta. *Kor. Biochem. J.* 25(4):

- 300-309.
15. Lee, D. S., Ha, S. C., Lee, S. Y., Kim, J. G., Hong, S. D. (1996) DNA topoisomerase I inhibitor by *Streptomyces* sp. 7489. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24(1): 101-104.
 16. Yang, Y. M., Hyun, J. W., Lim, K. H., Sung, M. S., Kang, S. S., Paik, W. H., Bae, K. W., Cho, H., Kim, H. J., Woo, E. R., Park, H., Park, J. G. (1996) Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants (III). *Kor. J. Pharmacogn.* 27(2): 105-110.
 17. Li, L. H., Fraser, T. J., Olin, E. J., Bhuyan, B. H. (1972) Action of camptothecin on mammalian cells in culture. *Cancer Research* 32: 2643-2650.
 18. Bonnetterre, J. (1995) Topoisomerase I inhibitors. Review of phase II trials with irinotecan (CPT-11) and topotecan. *Bull. Cancer* 82(8): 632-628.

(1998년 12월 23일 접수)