

단삼 등 천연물의 항암작용

김옥희* · 정수연 · 박만기¹ · 류항목 · 양지선

식품의약품안전청 국립독성연구소, ¹서울대학교 약학대학

Anticancer Activity of Natural Products including *Salvia miltiorrhiza*

Ok Hee KIM*, Soo Youn CHUNG, Man Ki PARK¹, Hang Mook RHEU and Ji Sun YANG

Korea Food and Drug Administration, National Institute of Toxicological Research
Seoul 122-704, Korea,

¹College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received March 19, 1999; accepted March 29, 1999)

Abstract – The cellular growth inhibition of 20 natural products was screened using SRB (sulforhodamine B) assay against 4 human cancer cell lines(SNU-1, SNU-C₄, Hep3B, Kato III). Ethanol extracts of *Salvia miltiorrhiza*, *Saussurea lappa* and *Chelidonium majus* showed potent anticancer activity among them, and further, it was fractionated into methylene chloride, hexane and methanol. Methylene chloride and methanol fraction of *Salvia radix* showed significant inhibitory activity against 4 human cancer cell lines. The effect of *Salvia miltiorrhiza* on anticancer activity *in vivo* models was evaluated with methylene chloride fraction of *Salvia miltiorrhiza*. Life span of ICR mice implanted with sarcoma-180 was increased by 40-61% and BDF₁ mice implanted with L1210 was increased by 66-89% upon intraperitoneal administration with methylene chloride fraction of *Salvia miltiorrhiza*. Based on these result, we suggested that *Salvia miltiorrhiza* showed anticancer activity on the *in vivo* and *in vitro* models

Keywords □ anticancer activity, *Salvia miltiorrhiza*, sarcoma-180, L1210

암이나 각종 성인병은 식생활 습관의 변화와 평균수명의 연장으로 증가 추세에 있으며, 이러한 질병들의 치료제를 개발하기 위하여 많은 보고들이 발표되고 있다(Boyd와 Nash, 1989; Baguley 등, 1981; Geran 등, 1975; Thayer 등, 1971). 특히 천연물로부터 항암생리활성 물질을 찾기 위하여 많은 연구가 수행중에 있다. 항암작용 검색방법으로는 생체내(*in vivo*) 및 생체외(*in vitro*) 방법이 있는데 생체내방법으로는 transplanted mouse tumor system을 이용하는 방법 및 human tumor xenograft 등을 이용하는 방법이 있고(Gorelik 등, 1987; Fiebig 등, 1989), 생체외방법으로는 장기 검색방법인 clogenic 검사법과 단기검색방법인 dye exclusion 검사법, radionuclide metabolic 저해검사법 그리고 microculture tetrazolium(MTT) 및 sulforhodamine B(SRB) 검사법이 있다(Skehan 등, 1990; Rubirstein 등, 1990; Zeecheng과 Cheng, 1988; McCaffrey 등, 1988). 그 이외에 암 유전자와 관련된 물질로 알려진 protein kinase C 활성측정법, protein tyrosine kinase(PTK) 활성측정법, topoisomer-

ase 활성측정법 등이 있다(Chang과 Chi, 1981; Mark 등, 1991; Paola 등, 1991; Peter와 Leroy, 1989).

세계 각지에서 매년 수천종의 식물을 채집하여 항암효과를 검색하고 있으나 아직까지 항백혈병 이외에 괄목할 만한 항암물질이 나오고 있지 않아 많은 연구자들이 천연물에서 항암물질을 찾고자 노력을 기울이고 있다. 단삼은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본으로 적삼, 자단삼, 대홍포, 활혈근이라고도 부른다(Kim 등, 1993). 이것은 뿌리를 건조하여 사용하며 한방치료에서는 거담, 어혈, 월경불순, 고혈압, 관상동맥, 경화성 심장병 및 식도암에 쓰인다고 알려져 있다(Lee과 Lee, 1992). 단삼은 Tanshinone, maltinone, tansinonol, 비타민 E 등의 성분을 함유하고 있으며 항암효과는 항암활성이 있다고 하나(Lee 등, 1992) 그 과학적 자료는 미흡하다. 현재까지 밝혀진 바에 의하면 단삼 성분 중 dancinic acid B가 관상혈압을 높이며(Chen 등, 1981) methylenedanshiaquinone 등이 bioactivity가 있고(Chian 등, 1978), przewaquinone C가 항암활성이 있다고 발표된 바 있다(Yang 등, 1984). 또한 tanshinone 및 그 유도체가 *in vitro* 실험에서 KB cell, Hela cell, Colo-205 cell등에 효과가 있

* To whom correspondence should be addressed.

다고 보고되어 있다(Wu-Lung 등, 1984). 따라서, 본 실험에서는 한방에서 비교적 항암작용의 가능성이 인정되는 천연추출물 중 당귀(*Angelica gigas* Nakai), 목향(*Saussurea lappa* Clarke), 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge), 백굴채(*Chelidonium majus* Linne) 등 20여종의 천연물을 선택하여 위암세포주(SNU-1, KATO III) 대장암세포주(SNU-C₄) 그리고 간암세포주(Hep3B) 등에 대한 항암작용을 SRB법으로 비교 검토하였으며, 또한 이 천연물들에 의한 중앙 관련 유전자 산물이 protein tyrosine kinase(PTK)의 저해효과를 측정하였다. 또한 특히 가장 강한 효과를 보인 단삼의 유효성분을 추출 분리하여 *in vitro* 검색법인 SRB법으로 IC₅₀(50% growth inhibition concentration) 값 및 PTK 효소 활성 저해정도를 측정한 후 가장 강한 활성 분획을 선정하여 sarcoma 180(S-180) 고형암 세포주 및 L1210 백혈병 세포주 등으로 ICR 마우스와 BDF₁ 마우스를 이용하여 *in vivo* 항암효과를 비교 평가하고자 하였다.

실험방법

실험재료

실험에 사용한 천연물은 경동시장에서 구입하였고 의약품수출입협회 전문가에게 의뢰하여 확인하여 사용하였다. 배지는 RPMI 1640 배지(Gibco)에 10% bovine calf serum과 penicillin-streptomycin 혼합용액을 첨가하여 사용하였으며, penicillin-streptomycin 혼합용액은 penicillin(10,000 units/ml)과 streptomycin(10 mg/ml)의 혼합액(Sigma)을 RPMI 1640배지에 100배 희석하여 사용하였다. Trypsin-EDTA 용액은 10배 농축용액(Sigma)을 PBS(phosphate buffered saline)로 10배 희석한 후 사용직전까지 냉동보관하여 사용하였으며, SRB(sulforhodamine B; Sigma)염색용액은 1% acetic acid에 0.4%로 녹여 사용하였다. Trichloroacetic acid(TCA; Sigma)고정액은 100%용액을 증류수로 희석하여 50%와 80%용액으로 사용하였다. *In vitro* 시험중 PTK 측정에 필요한 효소는 미국 Purdue 대학의 Geahlen 박사로부터 입수하여 사용하였고 SRB 실험에 사용한 위암(SNU-1, Kato III), 대장암(SNU-C₄), 간암(Hep3B)세포주는 서울대학교 암연구소로부터 분양받아 사용하였다. 생체내(*in vivo*)실험에 사용한 동물은 식품의약품안전청 실험동물자원실에서 생산한 실험동물 BDF₁(C₅₇BL/6(F)×DBA/2(M)의 F₁)마우스와 ICR마우스이며, 시험개시전 최소 1주간 실험사육환경에 적응시킨 후 사용하였으며, 사육실내의 온도는 22±2°C, 상대습도는 50~60%로 조절하고 조명은 12시간 명·암 주기가 되도록 하였다.

천연물 추출물 엑기스 제조 및 분획추출

천연물 추출물 엑기스 제조는 건조된 천연물을 잘게 분쇄하여 갈아서 가루로 만든 후 95% 에탄올을 가하고 하루

Table I. Yield of natural product

Plant name	Part of use	Sample Wt.(g)	Yield (%)
인진	Herba	200	10.0
건강	Rhizoma	200	10.0
백강잠	Corpus	300	11.58
백하수오	Radix	200	13.55
양강	Rhizoma	200	14.34
오약	Radix	200	10.0
파고지	Fructus	200	28.59
혈갈	Resina	200	65.0
감초	Radix	200	21.14
고삼	Radix	200	5.8
백굴채	Herba	600	4.8
오배자	Rhois	200	35.4
원육	Arillus	300	19.4
소회향	Fructus	200	0.46
왕불유행	Herba	200	2.17
단삼	Radix	201	1.8
당귀	Radix	201	7.4
목향	Radix	201	5.3
울금	Rhizoma	200	2.5
필발	Fructus	201	3.5

방치한 후 4°C에서 12시간 sonication시키고 여지로 걸러낸 후 진공 농축시켜 용매를 제거하고 동결 건조시켜 -20°C에서 보관 사용하였으며 각 수득률은 Table I과 같다. 천연물 분획추출물은 단삼 에탄올 추출물을 CH₂Cl₂:H₂O=(1:1)로 추출하고 CH₂Cl₂ 층을 다시 MeOH:Hexane=(1:1)로 추출하여 각 분획별로 항암효과를 측정하였다.

In vitro 항암효과 측정

Skehan의 방법(Skehan 등, 1990)을 변형하여 사용하였으며 요약하면 아래와 같다. SRB법은 96-well plate의 각 well에 예비실험에서 결정된 적정수의 세포가 포함된 180 µl의 배지를 가하고, 각 well에 각 칼럼 별로 서로 다른 농도의 천연물 추출물이 들어있는 20 µl의 PBS를 가하여 최종농도가 6, 20, 60, 200, 600, 2000 µg/ml이 되도록 한 후 37°C, 5% CO₂ 존재하에서 96시간 배양하였고 배양이 종료된 후 50 µl의 cold 50% TCA를 넣어 고정시키고 증류수로 5회 이상 세척하여 잘 건조시켰다. 각 well에 1% acetic acid에 녹인 0.4% SRB용액 100 µl를 가하여 염색하고 1% acetic acid로 5회 세척하여 잘 건조시키고 150 µl의 10 mM unbuffered Tris용액으로 SRB dye를 잘 녹여내어 96-well plate용 microplate reader(Molecular Devices, Emax-model)로 490-540 nm의 범위에서 흡광도를 측정하였다. 시험군에서의 평균 OD값을 구해 대조군(약물 비처리, 100% 생존군)의 평균 OD값에 대한 백분율 값을 산출하여 항암 효과의 지표로 사용하였다. PTK assay는 Geahlen의 방법(Cushman 등, 1991)을 이용하였다. 각 농도에 따른 천연추

출물을 2 µl씩 넣고 6.3 µCi의 ATP³²(Amersham, U.K.)가 첨가된 반응혼합액을 21 µl씩 넣었다. 이에 p56^{lck} PTK kinase 2 µl씩 넣고 30°C에서 5분간 반응시켰다. 70 µl 3.2% TCA로 반응을 종료시키고 10 mg/ml BSA용액 10 µl를 첨가한 후 1분간 원심분리, 이중 상등액 50 µl를 P81 filter paper(Whatman, U.S.A.)에 점적시켰다. 이 paper를 0.5% phosphoric acid 용액 500 ml에 4번 씻어내고 95% 에탄올로 다시 씻어 말린 후 scintillation cocktail 용액 5 ml를 넣고 방사능을 측정하였다.

In vivo 항암효과 측정

Chung의 방법(Chang 등, 1981; Kim 등, 1995)을 이용하였는데 마우스 고형암 세포주인 sarcoma-180는 ICR 마우스의 복강에, 마우스 백혈병 세포주인 L1210은 BDF₁ 마우스 복강에 각각 1×10⁶개, 1×10⁵개씩 주사하여 계대하였고, 항암 효력시험시 각 암종은 적어도 3회 이상 *in vivo* 계대후 사용하였다. 약물의 조제는 투여당일 각 용량별로 corn oil (Sigma, U.S.A.)에 녹인 후 사용하였다. 대조군에는 corn oil을 복강투여하였으며, 양성대조군은 doxorubicin(2 mg/kg)을 사용하였고 투여용량은 20 ml/kg으로 복강투여하였다. 항암효과는 대조군의 평균생존일(C)을 약물대조군의 평균 생존일(T)을 비교하여 연명일수(ILS: Increase in Life Span)로 나타내 비교 평가하였다. 단삼 분획물의 투여는 암세포 이식후 125-500 mg/kg의 농도로 3회(1, 5, 9일 후) 복강투

여 하였고 doxorubicin의 경우는 단회 복강투여하였다.

$$ILS(\%) = (T/C - 1) \times 100$$

실험결과

In vitro 항암효과

위암세포주 SNU-1, KATOIII, 대장암세포주 SNU-C₄ 및 간암세포주 Hep3B에 대한 20여종 천연물추출물의 IC₅₀값을 측정했다. 위암세포주 SNU-1에서 단삼, 목향, 백굴채, 오배자, 당귀의 IC₅₀ 값은 10, 12, 30, 47, 59 µg/ml로 나타났으며 그외는 100 µg/ml을 넘어섰다(Table II). 천연물의 항암작용 검색에서 유효성분의 존재가능성을 나타내는 범위가 일반적으로 100 µg/ml이내 인 것으로 볼 때 본 연구에서 검색한 20여종의 천연물중 단삼등 5종이 이에 포함되는 것으로 보였다. 위암세포주 KATO III에서 목향, 당귀, 오배자, 단삼, 백굴채, 인진, 혈갈의 IC₅₀값은 각각 11, 16, 23, 45, 45, 48, 50 µg/ml, 대장암 세포주 SNU-C₄에서 단삼, 당귀, 목향, 인진, 쫄밭, 오배자의 IC₅₀ 값은 각각 30, 49, 49, 54, 63, 65 µg/ml, 간암세포주 Hep3B에서는 목향, 오배자, 인진, 단삼, 백굴채, 파고지, 혈갈의 IC₅₀값은 각각 8, 23, 31, 45, 59, 77, 77 µg/ml로 나타났다(Table II). PTK 저해효과를 측정된 결과 인진의 IC₅₀는 2.4 mg/ml로 좋은 저해작용을 나타내었다(Table III). SRB법에서 우수한 항암효과가 관찰

Table II. Effects of natural product extracts on the growth inhibition of SNU-1, KATO III, SNU-C₄ and Hep3B cancer cell lines

Plant name	IC ₅₀ (µg/ml)			
	SNU-1	KATO III	SNU-C ₄	Hep3B
인진	61±21	48±12	54±9	31±12
건강	579±95	443±30	1437±136	209±126
백강잡	401±153	369±59	1606±352	1043±600
백허수오	286±118	353±75	322±42	386±70
양강	239±98	117±30	419±51	117±69
오약	312±73	101±12	191±58	110±67
파고지	434±84	175±29	2485±156	77±56
혈갈	147±82	50±21	170±99	77±48
감초	904±57	2949±419	1477±405	2534±87
고삼	325±43	198±7	441±83	104±63
백굴채	30±2	45±4	227±67	59±27
오배자	47±7	23±5	65±8	23±19
원육	2490±491	2442±2236	4686±291	1363±1230
소회향	319±64	287±95	936±28	575±393
왕불유행	324±24	296±50	1146±18	354±73
단삼	10±4	45±20	30±7	45±4
당귀	59±20	16±0	49±17	117±93
목향	12±4	11±3	49±12	8±3
울금	133±5	141±38	246±114	123±89
쫄밭	123±18	144±6	63±15	182±53

IC₅₀ values are expressed as means ± S.E. of three to five experiments.

Table III. Inhibitory effects of natural product extracts on the protein tyrosine kinase activity

Plant name	Protein Tyrosine Kinase activity (IC ₅₀ , mg/ml)
인진	2.4
건강	21.72
백강잡	11.11
백하수오	18.86
양강	3.45
오약	12.17
파고지	5.20
혈갈	29.35
감초	3.09
고삼	1.96
백굴채	17.21
목향	28.5
단삼	8.9

IC₅₀ values are expressed as means ± S.E. of three to five experiments.

된 단삼의 에탄올분획을 계통적으로 분획하여(Kim 등, 1995) 추출분획층에 대하여 검색한 결과 CH₂Cl₂과 MeOH 층에서 우수한 항암효과를 보였다(Table IV).

In vivo 항암효과

단삼의 *in vitro* 시험과 병행하여 *in vivo* 실험을 실시하였다. ICR을 이용하여 sarcoma-180 고형암에 대한 단삼의 CH₂Cl₂분획물의 간헐투여효과는 doxorubicin투여에서 76%, 단삼 CH₂Cl₂ 분획물 125 mg/kg투여에서 40%, 250 mg/kg 투여에서 46%, 500 mg/kg 투여에서 61%로 농도 의존적 생명연장효과를 보였다(Table V). BDF₁을 이용하여 단삼 CH₂Cl₂ 분획물의 L1210에 대한 생체내 항암효과 시험의 결과에서는 암세포 이식 후 3회 투여(1, 5, 9일)처치한 시험에서의 생존율은 대조군에 비해 각 용량마다 65~89%까지 연장됨을 보여주었다(Table VI).

고찰

In vitro 항암 시험결과를 종합해 보면 SNU-1에서는 단삼이, KATO III에서는 목향이, SNU-C₄에서는 단삼이, Hep3B에서는 목향의 항암효과가 가장 높았으며, 전반적으로 단삼, 목향, 백굴채의 항암효과가 높은 것으로 나타났다. 항암활성을 나타내는 물질들은 그 작용이 DNA damage나 면역증강효과 혹은 다른 생리활성물질의 생성 촉진 및 저해에 기인하는 것이 대부분이다. Cell cycle regulation에 중

Table IV. Effects of *Salviae radix* fraction on the growth inhibition of SNU-1, KATO III, SNU-C₄ and Hep3B cancer lines

Plant name	IC ₅₀ (μg/ml)			
	SNU-1	KATO III	SNU-C ₄	Hep3B
단삼 EtOH extracts	13±2	36±4	43±10	46±4
CH ₂ Cl ₂ fraction	14±9	14±8	13±8	9±9
Hexane fraction	295±298	327±124	256±56	96±41
MeOH fraction	5±2	11±6	3±1	7±7

IC₅₀ values are expressed as means ± S.E. of three to five experiments.

Table V. Anticancer activities of *Salviae radix* CH₂Cl₂ fraction (1, 5, 9 day, i.p.) against sarcoma-180 in ICR

Tumor	Drug	Dose (mg/kg)	MST (days)	ILS (%)
Sarcoma-180	Control	0	20.5±3.3	0
	<i>Salviae radix</i> CH ₂ Cl ₂ fraction	125	28.8± 9.4	40.5
	<i>Salviae radix</i> CH ₂ Cl ₂ fraction	250	30.0±11.9	46.3
	<i>Salviae radix</i> CH ₂ Cl ₂ fraction	500	32.9±8.8	60.5
	Doxorubicin	2	36.1±9.1	76.1

Values are expressed as means ± S.E. of ten mice. MST : Mean Survival Time. ILS : Increase in Life Span.

Table VI. Anticancer activities of *Salviae radix* CH₂Cl₂ fraction and doxorubicin administered i.p. on days 1, 5, 9 against L1210 in BDF₁

Tumor	Drug	Dose (mg/kg)	MST (days)	ILS (%)
L-1210	Control	0	29.0±2.2	0
	<i>Salviae radix</i> CH ₂ Cl ₂ fraction	125	48.0±12.4	65.5
	<i>Salviae radix</i> CH ₂ Cl ₂ fraction	250	54.7±4.1	88.6
	<i>Salviae radix</i> CH ₂ Cl ₂ fraction	500	48.7±7.6	67.9
	Doxorubicin	2	59.9±3.4	106.5

Values are expressed as means ± S.E. of ten mice. MST : Mean Survival Time. ILS : Increase in Life Span.

요한 역할을 하는 것으로 추정되는 PTK의 활성변화에 있어서 P56^{lck}PTK는 T림프구가 활성화될 때 CD4 수용체를 통하여 신호전달을 중재하는 역할을 하는 것으로 알려져있다(Voronova 등, 1986; Rudd 등, 1988; Veillette 등, 1988). Lck 유전하는 사람의 T cell 백혈병 환자에서 발현되었고 사람의 대장암 종양세포에서도 관찰되었다(Koga 등, 1988). 근래에는 이 효소가 항종양검사에서 관심을 끌고 있는 실정이므로, 10여종의 천연물이 SRB법에서 나타난 항암작용과 PTK assay에서 나타난 작용이 어떠한 관계를 갖는가 비교하기 위하여 PTK저해효과를 측정하였다. 인진의 IC₅₀는 2.4 mg/ml로 좋은 저해작용을 나타낸 것으로 보아 인진의 항암작용이 이 단백질과 관련되어 있을 것으로 추측된다. 그러나, 고삼의 경우 SRB assay 측정값이 그리 높지는 않았으나, PTK 저해 측정값이 인진보다 높은 1.9 mg/ml를 나타내었다. 이것은 고삼추출물이 세포에 독성을 나타내지는 못하나 효소의 작용에는 영향을 미쳐서 항암작용을 나타낼 가능성을 보이고 있는 것으로 좀 더 이 추출물을 순수분리하여 검색할 필요가 있는 것으로 추정되나 단삼의 항암작용이 종양 유전자 관련효소로 알려진 PTK와 관련되어 작용을 나타내는 것 같지는 않았다. 단삼 분획물들이 순수하게 분리되어 항암활성이 커져도 PTK저해작용이 크게 달라지지 않는 것으로 보아 단삼의 작용은 다른 기전에 의한 세포독성을 일으키는 것으로 생각된다. SRB법에서 우수한 항암효과가 관찰된 단삼의 에탄올분획을 계통적으로 분획하여 추출분획층에 대하여 검색한 결과 Table IV에서 보는 바와 같이 CH₂Cl₂층에서 좋은 항암효과를 나타냈고, MeOH층에서 강한 효과를 보였다. 따라서 MeOH층을 chromatography로 성분을 분리하여 단삼의 항암효과를 나타내는 물질을 정확히 밝힐 필요가 있다고 사료된다. *In vivo* 항암 시험결과를 보면 sarcoma-180와 L1210에 대한 항암효과는 단삼 분획물 용량에 따른 효과가 비교적 용량 의존적이었다. Table VI에서 나타난 고용량에서 연장을 저하는 단삼 분획물 자체의 독성에 기인할 수 있다고 생각되는데 500 mg/kg이상의 용량은 검체와 vehicle자체의 점도 때문에 투여가 불가능하였다. 단삼의 분획물이 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 항암효과가 매우 우수한 것으로 나타났으며 이에 더욱 순수 분리하여 여러 인체 암세포까지 확대 실시하여야 할 것으로 생각된다.

결 론

In vitro 항암효과를 SRB법으로 검색한 결과, SNU-1의 경우 단삼은 10 µg/ml, KATO III의 경우 목향은 11 µg/ml, SNU-C₄의 경우 단삼이 30 µg/ml, Hep3B의 경우 목향이 8 µg/ml의 IC₅₀값을 나타냈으며, 전반적으로 단삼, 목향, 백굴채가 항암작용이 높은 것으로 나타났다. 또한 PTK assay에

서는 IC₅₀값이 고삼 1.9 mg/ml, 인진 2.4 mg/ml으로 나타났으며, 단삼의 단계적 분획추출물에서는 CH₂Cl₂층과 최종 MeOH층에서 가장 항암효과가 강하게 나타났다. *In vivo* 항암효과를 관찰한 결과 단삼 CH₂Cl₂(125, 250, 500 mg/ml)분획물은 고형암세포 sarcoma 180에 대한 생체내 항암효과시험에서 대조군에 비해 생존율(T/C%)을 40-61% 증가시켰으며, 백혈병세포 L1210에 대한 생체내 항암효과시험에서 대조군에 비해 생존율(T/C%)을 66-89% 증가시켰다. 따라서 단삼의 분획물이 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 항암효과가 매우 우수한 것으로 나타났다.

참고문헌

Baguley, B. C. and Nash, R. (1981). Antitumor activity of substituted 9-anillinoacridines comparison of *in vivo* and *in vitro* testing system. *Eur. J. Cancer* **17**, 671-679.

Boyd, M. R. (1989). Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screen. *Principles and Practice of Oncology* **3**, 1-12.

Chang, I. Moo. and Chi, H. J. (1981). Toxicity and antitumor activities of Korean medicinal plants. *Kor. J. Pharmacol.* **12**(3), 125-130.

Chen, Z. X., Gu, W. H., Huang, H. Z., Yang, X. M., Sun, C. J., Chen, W. Z., Dong, Y. L. and Ma, H. L. (1981). *Chinese Pharmaceutical Bulletin* 536-541.

Chian, M. K., Yang, B. J., Gu, W. H., Chen, X. D. and Ye, X. Q. (1978). *Acta Chimica Sinica.* **36**, 199-204.

Cushman, M., Nagaratham, D., Burg, D. L. and Geahlen, R. L. (1991). Synthesis and protein kinase inhibitory activities flavonoid analogues, *J. Med. Chem.* **34**, 798-806.

Fiebig, H. H., Winterhalter, B. and Berger, D. (1989). Properties of 6 human tumor xenografts *in vivo* from which cell lines were developed. *Cancer Res* **30**, 612-615.

Geran, R. I., Greenberg, N. H., Macdonald, M. M. and Abbott, B. J. (1975). Modified protocols the testing of new synthetics in the L1210 lymphoid leukemic murine model in the DR & D program. *Cancer Chemother. Rep.* **3**(5), 15-19.

Gorelik, E., Ovejera, A. and Shoemaker, R. (1987). Microencapsulated tumor assay: New short term assay for *in vivo* evaluation of the effect of anticancer drugs on human tumor cell lines. *Cancer Res.* **47**, 5739-5745.

Kim, O. H., Yang, J. S., Jung, E. J., Kim, H. S., Kang, S. Y., Rho, Y. N., Yi, S. Y., Park, J. G. and Rheu, H. M. (1993). *In vitro* anticancer screening and evaluation of natural products in human tumor cell lines. *Report National Institute Safety Research* **6**, 201-207.

Kim, O. H., Yang, J. S., Rho, Y. N. and Rheu, H. M. (1995). The anticancer activity of *Salvia miltiorrhiza* *in vivo*. *The Report National Institute of Safety Research* Vol. 8, 243-248.

Koga, Y., Kimura, N., Minowada, J. and Mak, T. W. (1988). Expression of the human T cell specific tyrosine kinase YT 16(lck) message in leukemic T-cell lines *Cancer Res.* **48**,

- 856-859.
- Lee, Y. J. and Lee, S. Y. (1992). Pharmacognosy, *Dong Myeung Sa.*, 131-137.
- Mark, C., Dhanapalan, N., Debra, L. B. and Robert, L. Geahlen. (1991). Synthesis and Protein-Tyrosine Kinase Inhibitory Activities of Flavonoid Analogues. *J. Med. Chem.* **34**, 798-806.
- McCaffrey, T. A. Agarwal, L. A. and Weksler, B. B. (1988). A Rapid fluorometric DNA assay for the measurement of cell density and proliferation *in vitro*. **24**, 247-252.
- Paola, D. I., Giovanni, C. and Franco. Z. (1991). The Role of Topoisomerase it in Drug Resistance, *Life Sciences.* **48**, 2195-2205.
- Peter, D. and Leroy, F. L. (1989). Topoisomerase-targeting antitumor drugs, *Biochem. Bioph. Acta.* **989**, 163-177.
- Rubinstein, L., Shoemaker, R. and Paul. K. (1990). Comparison of *in vitro* anticancer-drug screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines., *J. Nat. Ins.* **82** (13), 1113-1118.
- Rudd, E. E., Trevillyan, J. M., Dasgupta, J. D., Wong, L. L. and Schlossman, S. F. (1988). The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase from human T lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci.* **85**, 5190-5194.
- Skehan, P., Storeng, R. and Scudiero. D. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Can. Ins.* **82**(13), 1107-1112.
- Thayer, P. S., Himmelfarb, P. and Watte G. L. (1971). Cytotoxicity assay with L1210 *in vivo* and KB cell *in vitro*. *Cancer Chemother. Pep.* **2**(2), 1-25.
- Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M. and Bolen, J. B. (1988). The CD₄ T and CD₈ T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine protein kinase p56^{lck}. *Cell.* **55**, 301-308.
- Voronova, A. F. and Sefton, B. M. (1986). Expression of a new tyrosine kinase is stimulated by retrovirus promotor insertion *Nature.* **292**, 682-685.
- Wu-Lung, W., Wen-Liang, C. and Chia-Fu, C. (1991). *American Journal of Chinese Medicine.* **3-4**, 207-216.
- Yang, B. J., Huang, X. L. and Zhou, Q. R. (1984). *Acta Pharmaceutica Sinica.* **19**, 294-298.
- Zee-cheng, R. K. Y. and Cheng, C. C. (1988). Screening and evaluation of anticancer agents. *Met. Exp. Clin. Pharmacology.* **10**(2), 67-101.