

七葉一枝花의 抗腫瘍 效果

李鎭在 · 金東熙 · 柳同烈*

Abstract

Study on Antitumor Activity of *Paridis Rhizoma*

Lee Ho-jai, O,M,D.*, Kim Dong-hee**, O,M,D.,Ph.D, Yoo Dong-Yeol*, O,M,D.,Ph.D

*Dept. of Oriental Gynecology, **Dept. of Oriental Pathology,

College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

To evaluate the antitumor activity of *Paridis Rhizoma*(PR), studies were done experimentally. The results were obtained as follows:

1. In cytotoxicity against MCF-7, SK-OV-3, HCT15, concentration inhibiting cell growth up to below 50% of control was recognized at 100-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PR and also against A549, XF498 was recognized at 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
2. In Inhibitory effect on activity of DNA topoisomerase I, the IC₅₀ was shown 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PR.
3. The concentration inhibiting adhesion of A549 and SK-OV-3 to complex extracellular matrix up to below 50% of control was recognized at 10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PR.
4. The T/C% was 137.9 in PR-treated group in S-180 bearing ICR mice.

From above results it was concluded that PR could be usefully applied for the prevention and treatment of cancer.

I. 結 論

抗癌劑 開發方法은 細胞分化 增殖 抑制作用, 細胞 殺害 機轉 研究 등 多樣한 方法으로 많은 抗癌劑 開發이 이루어졌으며¹⁾, 最近 慢性 骨髓性 白血病에 1次的으로 使用할 수 있는 藥劑로 安全性과 有效性이 立證된 글리벡(gleevec)이 市販되어 治療劑로 活用되고 있다.

또한 最近 새로운 抗癌劑의 開發을 위하여 抗癌劑의 副作用^{2,3)}을 줄이면서 抗腫瘍 效果를 極大化하기 위해 生藥을 이용한 研究가 比較的 활발히 進行되어 taxol, camptothecin류, vincristine, vinblastine 등의 抗癌劑 등이 각각 주목, 喜樹,

長春花로부터 分離되었다⁴⁾.

따라서 向後 生藥의 抗腫瘍 研究는 無限한 可能性을 지니고 있으며, 特히 現在 韓醫學에서 抗癌 處方에 자주 使用되고 있는 抗癌 藥材는 더욱 研究할 價値가 있다.

이에 著者는 中國 抗癌 藥材 40餘種을 細胞毒性 爲主로 探索하여 8種의 藥物을 항 후 研究 試料로 設定하여 檢索中이며, 特히 本 實驗의 試料인 七葉一枝花는 女性 生殖器 疾患에 效果의 이라는 報告⁵⁻⁷⁾를 바탕으로 抗腫瘍 作用을 檢索하여 有意性있는 結果를 얻었다.

向後 이러한 結果를 中心으로 더욱 深度있는 研究를 進行하여 有意性있는 結果가 導出되면 多樣한 實驗을 通하여 抗癌 作用機轉을 檢索할 豫定이며, 有效한 單一 物質 檢索까지 接近하여 抗腫瘍 物質을 分離하고 安定性 研究를 持續하고자 한다.

* 大田大學校 韓醫科大學 婦人科學教室

** 大田大學校 韓醫科大學 病理學教室

이 논문은 2000학년도 교내학술연구비의 지원을 받아 수행되었습니다.

II. 實驗方法

1. 試料의 製造

七葉一枝花(*Paridis Rhizoma*-이하 PR) 200g 분량을 각각 대용약탕기에 넣고 증류수 1,200ml와 함께 넣은 다음 3시간 동안 가열하여 여과한 여액을 rotary vacuum evaporator (Büchi 461)에서 감압 농축하였고, 이 round flask를 -70℃ deep freezer(Sanyo, Japan)에서 24시간 동안 방치하고 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12시간을 동결 건조하여 각각의 약물의 분말을 얻어, 검액으로 제조하여 사용하였다. 동물 실험시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였으며, 세포독성 실험시에는 RPMI 1640 free medium에 용해시켜 syringe filter(0.22 μ m, Falcon)로 여과하여 사용하였다.

2. 세포 배양

In vitro 세포독성 측정과 세포 부착저지 측정 실험에는 A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT15, MCF-7 암주를 사용하였는데, 이들의 배양액은 모두 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640배지에 56℃ 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 fetal bovine serum(FBS)을 10% 포함하고 1% 항생제(penicillin-G 10만 units/ streptomycin 100mg)와 NaHCO₃ 2g을 첨가하여 제조하였다.

3. 암주에 대한 세포독성 측정

A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT15, MCF-7 암주에 대한 세포독성 측정은 Solid tumor에 대한 세포독성은 1989년 미국의 국립암 연구소에서 약물의 in vitro 함암 활성도를 측정하기 위하여 개발된 sulforhodamine-B (SRB) assay 법⁹⁾을 사용하였다.

계대중인 이들 세포들을 실험에 사용하기 위하여 trypsin-EDTA용액으로 부착면으로부터 분리시키고, 96-well flat-bottom microplate(Falcon)에 well당 세포수가 2×10⁴개가 되도록 분주하였다.

분주된 세포들은 CO₂ incubator내에서 24시간 배양하여 바닥면에 부착시킨 후, medium에 농도별(6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/ml, 단 MCF-3는 25, 50, 100 μ g/ml로 처리)로 희석된 시료용액을 세포가 들어있는 well에 각각 200 μ l씩 넣어주고, 다시 48시간 동안 배양하였다.

시료는 가하기 전에 0.22 μ m filter로 여과하여 실험의 무균상태를 유지하였다. 약물과 함께 48시

간 배양이 끝난 후, 각 well의 medium을 제거하고, 10% trichloroacetic acid(TCA)를 well당 100 μ l씩 가하여 4℃에서 1시간 동안 방치하여 세포들을 plate의 바닥 면에 고정시켰다. 세포의 고정이 끝난 후 plate를 물로 5~6회 세척하여 남아 있는 TCA 용액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate는 well당 200 μ l의 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색 용액을 가하여 30분간 세포를 염색하고 다시 1% acetic acid 용액으로 5~6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 SRB를 제거하였다.

염색된 cell plate들은 다시 실온에서 건조시킨 후, control의 O.D.(optical density) 값이 520nm에서 0.8~1.0A(흡광도) 값이 되도록 일정량의 10mM Tris로 염색액을 잘 녹여 낸 다음 520nm에서 0.8~1.0A(흡광도) 값을 얻었다. 암 세포들에 대한 약물의 효과를 평가하기 위하여 세포수의 측정은 약물을 가할때의 세포수(Tz)와 약물이 들어 있지 않은 medium을 가하여 48시간동안 배양했을 때의 세포수(C) 및 각 농도의 약물과 함께 48시간 배양했을 때의 세포수(T) 등을 측정하였다(Scheme 1).

다음의 수식에 의해 함암활성 정도를 측정하였다. 즉, Tz \geq T 인 경우에는 (T-Tz)/(C-Tz)×100의 수식으로 계산하였고, Tz<T 인 경우에는 (T-Tz)/Tz×100의 수식으로 계산하였으며, 이렇게 계산된 값들로부터 lotus program의 data regression 기능을 이용하여 약물의 암세포 성장을 50% 억제하는 농도인 50% effective dose (ED₅₀)값을 계산하여 각 약물의 세포독성 정도를 비교하였다. ED₅₀값은 대조군의 50% 수준으로 암세포의 성장을 억제하는 시료의 농도(μ g/ml)로 주어지며, 미국립암연구소인 NCI(National Cancer Institute, U.S.A) manual의 방법⁹⁾에 따라서 결정하였다. 시험군의 각 농도에 대한 성장률 Y(%)는 다음과 같이 계산하였다.

$$Y(\%) = [(T - C_0) / (C - C_0)] \times 100$$

T = 시험군의 48시간 배양후 평균 세포수(cells/ml)
C = 대조군의 48시간 배양후 평균 세포수(cells/ml)
C₀ = 배양 시작시 평균 세포수 (cells/ml)

각각 농도의 Y(%)값과 Log₁₀ dose를 도식화하고 다음과 같은 식에 의하여 회귀선을 구했다. 이때 각각의 농도에 대하여 계산한 Y(%)값이 모두 50%보다 작으면 재실험을 실시하였다.

$$B = \text{slope} = \frac{N \cdot \sum(X_i \cdot Y_i) - (\sum X_i) \cdot (\sum Y_i)}{N \cdot \sum(X_i)^2 - (\sum X_i)^2}$$

$$A = \text{intercept} = \frac{\sum Y_i}{N} - B \frac{\sum X_i}{N}$$

이때, N=number of points selected

[≤ number of dose level & > 2]

X_i = log dose i

Y_i = growth ratio calculated dose i

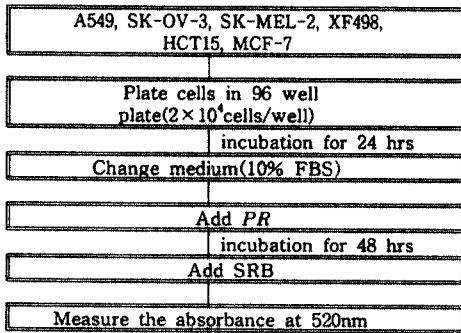
여기서 구한 기울기와 절편을 이용하여 회귀선 Y = A + BX 를 얻었으며 이 회귀선의 기울기와 절편으로부터 ED₅₀값을 계산하였다.

$$50 = A + B (\log_{10} ED_{50})$$

$$\log_{10} ED_{50} = (50 - A) / B$$

$$ED_{50} = 10^{\log_{10} ED_{50}} \mu\text{g/ml}$$

NCI manual에 따르면 세포독성 평가는 식물 추출물인 경우 20μg/ml 이하, 합성물인 경우 4μg/ml 이하일 경우 항암 작용이 있다고 규정⁹⁾하고 있다.



Scheme 1. The experimental scheme for cytotoxicity of PR on A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT15 and MCF-7

4. 암주의 세포 부착 저지작용 측정¹⁰⁾

SK-OV-3, A549 세포를 cell culture dish에 monolayer로 자라도록 세포 농도를 조절하면서 키웠다. 암세포는 2% FBS로 조절된 배지에 현탁시켜 96 well plate의 각 well에 100μl 씩 가한(5 × 10⁴ cells/well) 후 100, 10, 1μg/ml 농도의 시료를 녹인 배지 100μl를 가하고 5% CO₂, 37°C 에서 배양하였다. 4시간 후 배양액을 제거시키고 96 well plate의 바닥을 2% FBS로 세척한 다음 24 시간 배양시킨 후 SRB법에 의하여 바닥에 붙어

있는 세포수를 관찰한다.

5. DNA topoisomerase I assay 방법

실험에 사용된 DNA topoisomerase I는 calf thymus에서, pBR 322 DNA는 E.coli C 600에서 유래된 것으로 topoisomeras I 저해 IC₅₀값을 결정하기 위해 relaxation assay를 실시하였다. Topo I 활성의 측정은 Liu와 Miller의 방법¹¹⁾에 따랐다. 즉, 50mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol, 5mM spermidine, 0.01% bovine serum album, 0.5μg pBR 322 DNA와 효소(1unit)만 가하여 총 반응액을 20μl가 되게 한 것을 대조군으로, 효소와 시료를 가하여 총 반응액을 20μl되게 한 것을 시험군으로 하여 이들을 37°C에서 30분간 배양하였다. 반응은 2% SDS(sodium dodecyl sulfate), 20% glycerol 및 0.05% bromophenol blue를 포함하는 용액 5μl를 첨가하여 반응을 종결시키고, 이를 TBE running buffer(50mM Tris base, 50mM boric acid, 2.5mM EDTA)로 평형된 1% agarose gel에 전기영동을 한 후 agarose gel을 0.5μg/ml의 ethidium bromide용액에서 1시간동안 염색, 자외선 하에서 사진을 찍은 다음 scanner를 사용하여 활성 밴드를 측정했다. 이때 Topo I의 1unit는 37°C에서 30분간 반응시킬 때 supercoiled pBR 322 DNA를 100% relaxation을 촉매하는 효소의 양을 의미한다.

6. S-180 암세포에 대한 생존비 측정

ICR 마우스의 복강내에 7일간 배양된 sarcoma 180 세포를 복수와 함께 취하여 멸균된 냉생리식염수를 가해 400 × g로 2분간 원심 분리하여 세포 침전물을 분리했다. 분리된 세포 침전물을 냉멸균 생리식염수에 부유시켜 다시 원심분리하여 상정액을 제거한 후 혼재된 적혈구를 용혈시키고 sarcoma 180 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 3회 세척한 후 hemacytometer로 세어 10⁷ cells/ml의 농도가 되도록 세포 부유액을 만들고 이 부유액을 0.1ml씩 복강내에 이식하였다. 이식 후 24시간부터 각 군을 8마리로 배정하였다. 시료는 생리식염수로 용해시켜 보존용액 (24.90mg/20g/day)을 만든 후 4°C에 보존하였으며 0.2ml씩 경구로 10일간 연속 투여하였으며 대조군에는 동량의 생리식염수액을 투여하였다. 생존비(T/C%)는 미국립 암연구소 protocol에 언급된 식¹²⁾에 따라 계산하였다.

III. 實驗成績 및 考察

A. 細胞毒性

1. MCF-7에 대한 細胞毒性

100, 50, 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 濃度에서 對照群에 비해 각각 59.84, 88.94, 91.55%의 生存率을 나타내었다 (Table 1).

Table 1. Cytotoxic Effect of PR on MCF-7 Cells

Concentration($\mu\text{g/ml}$)	% of control
Con.	100
25	91.55
50	88.94
100	59.84

☐ : 40% 이상 세포독성을 나타낸 농도

2. SK-OV-3에 대한 세포독성

6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 對照群에 비해 각각 97.49, 100.48, 95.30, 87.30, 54.31, 7.15%의 生存率을 나타내었다(Table 2).

Table 2. Cytotoxic Effect of PR on SK-OV-3 Cells

Concentration($\mu\text{g/ml}$)	% of control
Control	100
6.25	97.49
12.5	100.48
25	95.30
50	87.30
100	54.31
200	7.15

☐ : 40% 이상 세포독성을 나타낸 농도

3. A549에 대한 細胞毒性

6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 對照群에 비해 각각 100.10, 102.09, 99.02, 90.74, 43.35, -60.77%의 生存率을 나타내었다(Table 3).

Table 3. Cytotoxic Effect of PR on A549 Cells

Concentration($\mu\text{g/ml}$)	% of control
Control	100
6.25	100.10
12.5	102.09
25	99.02
50	90.74
100	43.35
200	-60.77

☐ : 40% 이상 세포독성을 나타낸 농도

4. SK-MEL-2에 대한 細胞毒性

6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 對

照群에 비해 각각 99.56, 101.43, 97.21, 97.48, 83.65, 48.33%의 生存率을 나타내었다(Table 4).

Table 4. Cytotoxic Effect of PR on SK-MEL-2 Cells

Concentration($\mu\text{g/ml}$)	% of control
Control	100
6.25	99.56
12.5	101.43
25	97.21
50	97.48
100	83.65
200	48.33

☐ : 40% 이상 세포독성을 나타낸 농도

5. XF498에 대한 細胞毒性

6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 對照群에 비해 각각 100.23, 101.04, 94.09, 84.22, 49.72, 3.83%의 生存率을 나타내었다(Table 5).

Table 5. Cytotoxic Effect of PR on XF498 Cells

Concentration($\mu\text{g/ml}$)	% of control
Control	100
6.25	100.23
12.5	101.04
25	94.09
50	84.22
100	49.72
200	3.83

☐ : 40% 이상 세포독성을 나타낸 농도

6. HCT15에 대한 細胞毒性

6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 對照群에 비해 각각 97.84, 93.92, 99.41, 99.57, 85.17, 39.92%의 生存率을 나타내었다(Table 6).

Table 6. Cytotoxic Effect of PR on HCT15 Cells

Concentration($\mu\text{g/ml}$)	% of control
Control	100
6.25	97.84
12.5	93.92
25	99.41
50	99.57
100	85.17
200	39.92

☐ : 40% 이상 세포독성을 나타낸 농도

7. DNA topoisomerase I 에 미치는 영향

50mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol, 5mM spermidine, 0.01% bovine serum album, 0.5 μg pBR 322 DNA와 효소(Iunit)만 가하여 총 반응액

을 20 μ l가 되게 한 것을 대조군으로, 효소와 시료를 가하여 총 반응액을 20 μ l되게 한 것을 시험군으로 하여 활성을 측정했다. 전기영동을 실시하여 사진 촬영한 결과 figure 1에서 보는 바와 같이 DNA만을 처리한 실험군은 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 topo-I을 처리한 대조군은 모두 relaxed form으로 전환되었다.

이에 비해 실험군은 50, 100, 500 μ g/ml 농도에 서 농도 의존적으로 topo-I의 활성을 억제 하였고, IC₅₀은 50-100 μ g/ml에서 나타났다(Fig 1).

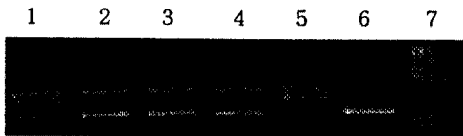


Fig. 1. Effect of CYIJH on the DNA topoisomerase I from calf thymus

Lane 1-4 : DNA + DNA topoisomerase I (1 unit) 10, 50, 100, and 500 μ g/ml of PR

Lane 5 : DNA + DNA topoisomerase I (2 unit)

Lane 6 : DNA (0.5 μ g) only

Lane 7 : size marker

以上 6種의 癌柱에 대한 細胞毒性에서는 대부분 100 μ g/ml 以上の 濃度에서 40%이상 細胞毒性을 나타내었고, MCF-7, SK-OV-3, HCT15 등은 IC₅₀이 100-200 μ g/ml에서, A549, XF498은 이보다 效果的인 50-100 μ g/ml으로 나타났다. 이와 더불어 topoisomerase의 抑制劑는 DNA 損傷 그 自體에 의해 細胞가 죽는 것이 아니라, 이 可逆性 cleavable complex가 細胞內의 다른 相互作用을 함으로써 細胞毒性을 일으킨다고 推測¹³⁻¹⁵⁾되고 있는데, 本 實驗에서 IC₅₀은 50-100 μ g/ml에서 나타나(Fig 1), 上記한 細胞毒性 結果와 附合되는 結果를 나타내었다.

이 같은 結果는 既存의 여러 結果¹⁶⁻¹⁸⁾ 등과 比較하여 볼 때 有意性있는 結果로 비추어진다. 단 本 試料가 本草學에서 小毒으로 評價되고 있고, 생쥐를 이용한 實驗에서 LD₅₀이 口服인 경우 2.68g/kg으로 나타나, 正常 細胞를 이용한 藥物 自體 毒性에 대한 研究가 進行되어야 할 것으로 보이며, 他 藥物과의 併用 過程에서의 藥性 變化에 대한 研究도 持續되어야 할 것으로 보인다.

B. 抗轉移 作用

1. A549의 細胞附着 阻止 效果

100, 10, 1 μ g/ml의 濃度에서 대조군에 비해 42.2 \pm 0.29, 82.6 \pm 1.79, 91.8 \pm 2.08%의 세포 부착 저지 效果를 나타내었다(Table 7)

Table 7. Inhibitory Effect of PR on Cell Adhesive of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(μ g/ml)	Percent of control
Control	100 \pm 0.02
1	91.8 \pm 2.08
10	82.6 \pm 1.79
100	42.2 \pm 0.29

▨ : 40% 이상 세포부착 저지효과를 나타낸 농도

2. SK-OV-3의 細胞 附着 阻止 效果

100, 10, 1 μ g/ml의 濃度에서 대조군에 비해 20.6 \pm 0.11, 73.1 \pm 0.38, 82.6 \pm 0.64%의 세포 부착저지 效果를 나타내었다(Table 8).

Table 8. Inhibitory Effect of PR on Cell Adhesive of SK-OV-3 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(μ g/ml)	Percent of control
Control	100 \pm 1.94
1	82.6 \pm 0.64
10	73.1 \pm 0.38
100	20.6 \pm 0.11

▨ : 40% 이상 세포부착 저지효과를 나타낸 농도

이상의 結果로 보아 복합 기질에서의 2종 세포에 대한 부착 저지 效果는 IC₅₀이 모두 10-100 μ g/ml으로 나타나 이 역시 기존의 연구 結果¹⁶⁻¹⁸⁾ 보다 有意性있게 나타났다. 비록 단편적이기는 하지만 유방 암주에서 매우 效果적인 저농도를 나타낸 점은 주목할 만 하여, 항 후 angiogenesis 등 항전이 작용에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 보인다.

C. 생명연장율

S-180이 移植된 생쥐에 10日間 經口 投與한 後 持續的으로 觀察하였던 바, 腹水癌으로 인하여 對照群에서는 癌柱 移植 後 10日에 급격히 體重이 增加하여 平均 生存日數에서 16.85일로 나타났고, PR 投與群은 23.1일로 나타나, T/C%는 137.9%로 나타나 NCI⁹⁾가 設定한 再實驗 可能 T/C%인 140%를 넘지 않았다(Table 9).

이 같은 結果가 藥物 自體에 의한 副作用으로 인한 것인지, 아니면 다른 이유로 인한 것인지에

대한 연구가 必要할 것으로 보여, 機轉 研究에 앞서 再實驗을 實施하고자 한다.

Table 9. Effect of PR on MST and T/C% in ICR Mice Bearing Sarcoma 180

Group	No. of animals	MST(day)	T/C(%) ^a
Control	8	16.85	100
PR	8	23.1	137.9

IV. 結 論

七葉一枝花를 試料로 抗腫瘍 效果를 檢索하였던 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 細胞毒性에서는 MCF-7, SK-OV-3, HCT15 癌柱에서 100-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, A549, XF498 癌柱 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC50을 나타내었다.
2. DNA topoisomerase I assay에서는 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC50을 나타내었다.
3. 複合基質에서의 A549, SK-OV-3 細胞에 대한 附着 阻止效果는 모두 10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC50을 나타내었다.
4. S-180을 이용한 抗癌 動物實驗에서 T/C% 가 137.9%로 나타났다.

參 考 文 獻

1. Vincent T et al : Cancer(Principles & prctices of oncology), LIPPNCOTT, 139-142, 1993.
2. 金秀眞 : 補中益氣湯 및 少陰人補中益氣湯이 S-180에 對한 抗腫瘍 效果와 cyclophosphamide에 의한 副作用에 미치는 影響, 大田大學校 碩士學位論文, 1993.
3. Job G, Pfreundschuh M, Bauer M, Winkel KZ, Hunstein W : The influence of radiation therapy on T-lymphocyte subpopulations defined by monoclonal antibodies. Int J Radiant Oncol Biol Phys 10: 2077, 1984.
4. Hideji Itokawa, : Anthraquinones-naphtho-hydroquinones and naphtho-hydroquinone-dimers from Ribia corifolia and their cytotoxic activity, Chem. Pharm. Bull. 41(10), 1869-1872, 1993
5. 楊宗正 : 赤脚醫生雜誌, (3), p. 48, 1980.
6. 全凱 等 : 中醫雜誌, (3), p. 37, 1984.
7. 聯茂榮 等 : 中華皮膚科雜誌, (1), p. 21, 1984.
8. Rubinstein, L.V., Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Simmon, R.M., Skehan, P. and Boyd, M.R. : Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay(MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 30, p.2418, 1989.
9. National Cancer Institute, Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600, Cancer Chemother. Res., (part 3), 3, p.17, 1972.
10. Mary K. Chelberg, Effie C. Tsilibary, Alan R.Hauser, James B. McCarthy ; Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration : Involvement of multiple, distant domanes of the collagen molecule. *Cancer Reserch*, 49, 4796-4802, 1989.
11. Higgins, N. P., Ferro, A. M. and Olivera, B. M. : In DNA Topolgy and its Biological Effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) pp.361-370, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
12. Hellmann, K. and Carter, S.K. : Fundamentals of cancer chemotherapy, McGrawHill Book Company, New York, pp.132-140, 1987.
13. Liu, L. F., In DNA Topology and its Biological Effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) pp.371-389, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
14. Champoux, J. J. : In DNA Topology and its Biological Effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) pp.217-242, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
15. Hsieh, T. : In DNA Topology and its Biological Effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) pp.243-263, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
16. 康圻林 : 數種 韓藥劑의 抗癌活性 研究, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集, 3(2), pp.315-321, 1995.
17. 서울大學校 天然物科學研究所 篇 : 傳統東洋醫學研究 및 新東醫藥開發, pp. 166-201, 1995.
18. 孫甲鎬 外 : 柴胡 茵陳의 肝癌細胞에 對한 抗癌活性 및 抗癌劑와의 相乘效果, 大韓韓醫師協會誌, 16(2), pp.414-432, 1995.