

水紅花子의 抗癌活性 및 抗轉移 效果에 關한 研究

曹永周 · 金聖勳* · 金東熙

Abstract

Study on Antitumor Activity and Antimetastatic Effects of Polygoni Orientalis Fructus(POF)

Cho Young-joo · Kim Sung-hoon* · Kim Dong-hee

Dept. of Oriental Medicine Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

* Dept. of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University

To evaluate the antitumor activity and antimetastatic effects of Polygoni Orientalis Fructus(POF), studies were done experimentally.

The results were obtained as follows :

1. In cytotoxicity against A549, and XF498 cell concentration inhibiting cell growth up to below 30% of control was recognized at 200 μ g/ml of POF. Also POF inhibited cell growth up to below 30% of control against SK-OV-3, SK-MEL-2, HCT15 and MCF-7 cell at 100 μ g/ml.
2. The concentration inhibiting adhesion of A549 and SK-OV-3 to complex extracellular matrix up to below 70% of control was recognized at 100 μ g/ml of POF.
3. In pumonary colonization assay, a number of colonies in the lungs were decreased significantly in POF treated group as compared with control group.

These results suggested that POF extracts might be usefully applied for prevention and treatment of cancer.

I. 緒 論

新生物 또는 腫瘍은 正常細胞가 어떤 刺戟을 받아 遺傳子의 形質이 바뀌어 細胞의 模樣과 機能이 變하고, 이러한 變形細胞가 無節制한 增殖을 하여 생긴 組織 덩어리를 뜻한다. 人體의 모든 組織은

必要에 의해 增殖되지만 항상 適切한 狀態에서 그 成長이 멈추게 된다. 그러나 非正常的인 狀態에서 는 成長이 持續되어 腫塊를 形成하게 된다¹⁻³⁾.

癌이 發生하는 頻度는 地域, 人種, 生活 樣式에 따라 크게 다르나 一般的으로 人口 10만명당 연간 300~400명 정도가 된다. 따라서 남북한 6천만명 을 기준하면 연간 약 18~24만명의 癌患者가 發生 한다고 볼 수 있다. 惡性 腫瘍이 發生하는 頻度는 增加 趨勢를 보여 死亡 原因 중 循環器 疾患 다음

으로 2위이며, 現代醫學의 癌 診斷과 治療을 다 동원해도 癌 患者의 약 반수는 결국 癌으로 死亡하는 것이 現在의 실상이다²⁻⁴⁾.

現在 韓醫學系에서는 單味 藥材와 韓方 處方으로부터 抗癌劑를 開發하려는 研究⁵⁻¹³⁾가 遂行되어 왔으며, 다양한 實驗을 통하여 우수한 治療效果가 報告되고 있다.

本 實驗에 使用되는 水紅花子는 《名醫別錄》¹⁴⁾에서는 荳草라 하여 “味鹹, 微寒, 無毒. 主治消渴, 去熱, 明目, 益氣”라고 하였으며, 《本草衍義》¹⁵⁾에서는 水紅子라 하여 “治癰癤, 瘡破者亦治”라 하였고, 《滇南本草》¹⁶⁾에서는 “水紅花子, 味苦, 平, 性寒. 破血. 治小兒痞塊積聚, 消一切年深(日久)堅積, 療婦人石瘕症”라 言及되었다.

그 性味는 鹹 微寒 無毒하고, 活血消積, 健脾利濕, 清熱解毒, 明目하는 效能이 있어 腦腹癥積, 水臌, 胃脘痛, 食少腹脹, 火眼, 瘡腫, 癰癤 등을 治療하며, 그 藥理作用으로는 利尿, 抗菌, 抗癌作用이 있고¹⁷⁻¹⁹⁾, 특히 胃癌, 腸癌, 肝癌 등에 多用되고 있다¹⁹⁾.

이에 本 實驗에서는 이러한 本草學의 效能을 바탕으로, 水紅花子를 試料로 抗癌 및 抗轉移 效果를 實驗의으로 評價하고자 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, A549, B16-BL6 癌柱의 附着 阻止作用, 肺 癌柱 形成 抑制作用(pulmonary colonization assay) 등을 實施하였으며, 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 動 物

動物은 雄性 4주령의 ICR(International Cancer Research, U.S.A), C57BL/6 생쥐를 韓國化學研究所에서 供給받아 實驗 當日까지 固形飼料(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 供給하고 室溫 22±2℃를 계속 維持하면서 2 週日間 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 藥 材

本 實驗에 使用한 水紅花子(Polygoni Orientalis Fructus : POF)는 中國 上海中醫藥 學院 藥材部에서 購入하여 使用하였다

□ Prescription of Polygoni Orientalis Fructus(POF)

韓 藥 名	生 藥 名	分量(g)
水紅花子	Polygoni Orientalis Fructus	200

3) 試藥 및 機器

(1) 試 藥

試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), Hank's balanced salt solution(HBSS), tris-base, trypsin-EDTA, sulforodamine-B(SRB), anti-biotics (penicillin-streptomycin), formaldehyde, lysophosphatidic acid 및 trypan blue 등은 Sigma 製品, ethanol, HCl은 Merck 製品, sodium bicarbonate 는 Gibco 製品, acetic acid는 덕산 製品을 各各 使用하였다.

(2) 機 器

機器는 CO₂ incubator(Forma scientific model: 3546 S/N. U.S.A), clean bench(Vision scientific Co., KMC-14001. Korea), centrifuge(Beckman Co., GS-6R. U.S.A), inverted microscope (Nikon Co., Japan), bright microscope(UFX-DX, Nikon, Japan), ELISA-reader(Emax, U.S.A), rotary vaccum evaporator(Büchi 461, switzerland), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson, France), titer plate shaker(Labline Inst, U.S.A), camera(601S, Nikon, Japan), vaccum pump(Büchi Vac V-500, switzerland), freeze dryer(Eyela, FDU-540, Japan), Mupid-21, U.S.A), pipet aid(Falcon, U.S.A), shaking incubator(Intron, korea), 수술용 기구 (FST, U.S.A), water bath(Vision M :KHC-1205W), vortex mix(KMC-1300V), pH meter (Corning, U.S.A), deep freezer(Sanyo, MDF-U50V, Japan) 등을 使用하였다.

2. 方法

1) 試料의 製造

上記한 水紅花子(POF) 200g 分量을 各各 大雄藥湯器에 넣고 蒸溜水 1,500ml와 함께 넣은 다음 3 時間 동안 加熱하여 濾過한 濾液을 rotary vacuum evaporator (Büchi 461)에서 減壓 濃縮하였고, 이 round flask를 -70°C deep freezer (Sanyo, Japan)에서 24時間 동안 放置하고 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12時間을 凍結 乾燥하여 14.8g의 粉末을 얻어, 檢液으로 製造하여 使用하였다. 動物 實驗時에는 生理食鹽水에 溶解시켜 使用하였으며, 細胞 毒性 實驗시에는 RPMI 1640 free medium에 溶解시켜 syringe filter($0.22\mu\text{m}$, Falcon)로 濾過하여 使用하였다.

2) 癌柱 培養

細胞毒性 測定에서는 女性癌柱인 SK-OV-3(ATCC HTB 77)卵巢癌柱, MCF-7(ATCC CCL HTB-22)乳房癌柱 등을 使用하였고, 一般癌柱로는 A549(ATCC CCL185)肺癌柱, SK-MEL-2(ATCC HTB-68)皮膚癌柱, XF498, HCT-15(ATCC CCL225)大腸癌柱 등을 使用하였다.

이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 包含된 RPMI 1640培地에 56°C 수조에서 30분간 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum(FBS)을 10% 包含하고 1% 抗生劑(penicillin-G 10만 units/streptomycin 100mg)와 NaHCO_3 2g을 添加하여 製造하였다.

3) 數種 癌柱에 對한 細胞毒性 測定

女性癌柱 SK-OV-3, MCF-7, 一般 癌柱 A549 SK-MEL-2, XF498 및 HCT-15 癌柱에 對한 細胞毒性 測定은 1989년에 美國의 國立癌研究所에서 藥物의 in vitro 抗癌 活性度를 測定하기 위하여 開發된 sulforhodamine-B(SRB) assay²⁰⁾을 使用하였다. 계대중인 이들 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여 trypsin-EDTA溶液으로 附着面으로부터 分離시키고, 96-well flat-bottom microplate (Falcon)에 well당 細胞數가 2×10^4 개가 되도록 分주하였다.

분주된 細胞들은 CO_2 incubator내에서 24시간 培養하여 바닥 면에 附着시킨 후, A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT-15細胞는 50, 100, $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 로, MCF-7는 100, 10, 1, $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 稀釋된 試料 溶液들을 각각의 細胞가 들어있는 well에 각각 $200\mu\text{l}$ 씩 넣어주어 다시 48시간 동안 培養하였다.

試料는 가하기 전에 $0.22\mu\text{m}$ filter로 濾過하여 實驗의 無菌 狀態를 維持하였다. 藥物과 함께 48 시간 培養이 끝난 후, 각 well의 medium을 除去하고, 10% trichloroacetic acid(TCA)를 well당 $100\mu\text{l}$ 씩 가하여 4°C 에서 1시간 동안 放置하여 細胞들을 plate의 바닥 면에 고정시켰다. 細胞의 고정이 끝난 후 plate를 물로 5~6회 洗滌하여 남아 있는 TCA溶液을 완전히 除去하고 室溫에서 남은 물기가 없도록 乾燥시켰다. 완전히 乾燥된 plate는 well당 $200\mu\text{l}$ 의 1% acetic acid 溶液에 0.4% SRB를 녹인 染色 溶液을 가하여 30분 간 細胞를 染色하고 다시 1% acetic acid 溶液으로 5~6회 洗滌하여 細胞에 結合하지 않은 SRB를 除去하였다.

染色된 cell plate들은 다시 室溫에서 乾燥시킨 후, 對照群의 O.D.(optical density) 값이 520nm 에서 0.8~1.0A(흡광도) 값이 되도록 一定量의 10mM Tris로 染色液을 잘 녹여 낸 다음 520nm에서 0.8~1.0A(흡광도) 값을 얻었다.

癌 細胞들에 대한 藥物의 效果를 評價하기 위하여 細胞數의 測定은 藥物을 가할 때의 細胞數(T_z)와 藥物이 들어 있지 않은 medium을 가하여 48시간 동안 培養했을 때의 細胞數(C) 및 各 濃度의 藥物과 함께 48시간 培養했을 때의 細胞數(T) 등을 測定하였다(Scheme 1).

다음의 數式에 의해 抗癌活性 정도를 測定하였다. 즉, $T_z \geq T$ 인 경우에는 $(T - T_z)/(C - T_z) \times 100$ 의 數式으로 計算하였고, $T_z < T$ 인 경우에는 $(T - T_z)/T_z \times 100$ 의 數式으로 計算하였으며, 이렇게 計算된 값들로부터 lotus program의 data regression 機能을 利用하여 藥物의 癌細胞 成長을 50% 抑制하는 濃度인 50% effective dose

(ED₅₀)값을 計算하여 각 藥物의 細胞毒性 정도를 比較하였다. ED₅₀값은 對照群의 50% 水準으로 癌細胞의 成長을 抑制하는 試料의 濃度(μg/ml)로 주어지며, 美國立癌研究所인 NCI(National Cancer Institute, U.S.A) manual의 方法²¹⁾에 따라서 決定하였다. 實驗群의 各 濃度에 대한 成長率 Y(%)는 다음과 같이 計算하였다.

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

이때, T = 實驗群의 48時間 培養後 平均 細胞數(cells/ml)

C = 對照群의 48時間 培養後 平均 細胞數(cells/ml)

C₀ = 培養 始作時 平均 細胞數 (cells/ml)

各各 濃度의 Y(%)값과 Log₁₀ dose를 圖式化하고 다음과 같은 식에 의하여 回歸線을 구했다. 이때 各各의 濃度에 대하여 計算한 Y(%)값이 모두 50%보다 작으면 再實驗을 實施하였다.

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

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

이 때, N=number of points selected

[≤ number of dose level & > 2]

X_i = log dose i

Y_i = growth ratio calculated dose i

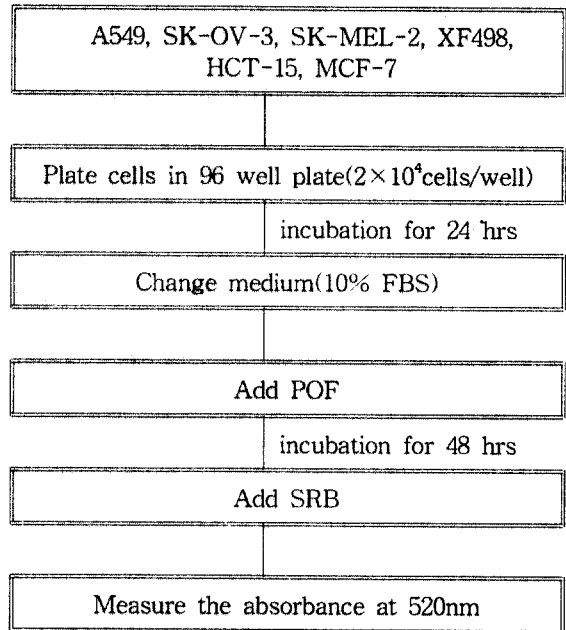
여기서 구한 기울기와 切片을 利用하여 回歸線 Y = A + BX 를 얻었으며 이 回歸線의 기울기와 切片으로부터 ED₅₀값을 計算하였다.

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

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

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

NCI manual에 따르면 細胞毒性 評價는 植物 抽出物인 경우 20μg/ml 以下, 合成物인 경우 4μg/ml 以下일 경우 抗癌 作用이 있다고 규정²²⁾하고 있다.



Scheme 1. The experimental scheme for cytotoxicity of POF on A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT-15 and MCF-7 cells

4) A549, SK-OV-3 細胞의 附着 阻止作用 測定²³⁾
A549, SK-OV-3 細胞를 cell culture dish에 monolayer로 자라도록 細胞 濃度를 調節하면서 키웠다. 癌細胞는 10% FBS로 調節한 배지에 懸濁시켜 96 well plate의 각 well에 100μl 씩 가한 (5×10⁴cells/well) 후 100, 10, 1μg/ml 濃度의 試料를 녹인 배지 100μl를 가하고 5% CO₂, 37℃ 에서 培養하였다. 4시간 후 培養液을 除去시키고 96well plate의 바닥을 2% FBS로 洗滌한 다음 24시간 培養시킨 후 SRB法에 의하여 바닥에 붙어 있는 細胞數를 觀察한다.

5) B16-F10에 의한 pulmonary colonization 測定²⁴⁾
In vitro에서 계대배양한 B16-F10(ATCC CRC 6322) 肺癌細胞를 實驗에 사용하였다. 계대중인 이들 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여, trypsin-EDTA溶液으로 부착면으로부터 分離시켜 HBSS溶液으로 細胞數가 2×10⁴cells/ml이 되도록 細胞

懸濁液을 만들었다. 18~20g인 C57BL/6에 細胞懸濁液 0.2ml을 尾靜脈 注射하였다. 檢液은 B16-F10 癌細胞를 移植한 後 24시간 부터 1일 1회씩 10mg/20g/day의 試料를 生理食鹽水에 녹여 4℃에서 보관하면서, 10일간 매일 zonde를 使用하여 經口 投與하였다. 癌移植 14일 후에 頸椎脫骨로 致死시킨 다음 開腹하여 肺에 轉移된 癌細胞 colony數를 測定하였다.

III. 成績 및 考察

1. 數種 癌柱에 對한 細胞毒性

本 試料의 A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT15, MCF-7 癌柱에 對한 細胞毒性은 濃度에 比例하여 癌細胞 成長을 抑制하였는데, A549 癌柱에 對한 細胞毒性은 高濃度인 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 30% 以上の 細胞毒性을 나타내었으며(Table 1, Fig. 1), SK-OV-3, SK-MEL-2 癌柱에 對한 細胞毒性은 모두 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の 濃度에서 30% 以上 細胞毒性을 나타내었다(Table 2, 3, Fig. 2, 3).

XF498 癌柱에 對한 細胞毒性은 高濃度인 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 30% 以上の 細胞毒性을 나타내었으며(Table 4, Fig. 4), HCT15, MCF-7 癌柱에 對한 細胞毒性은 모두 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の 濃度에서 30% 以上 細胞毒性을 나타내었다(Table 5, 6, Fig. 5, 6).

本 試料는 實驗에 使用된 모든 癌柱에서 細胞毒性을 發揮하였고, 특히 高濃度에서 더욱 顯著한 細胞毒性을 나타내었으며, 既存의 抗癌 活性 研究⁵⁻¹³⁾에 비해 效果의인 結果로 特異할만하다.

Table 1. Cytotoxic Effect of POF on A549 Cells

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control
Control	100
50	101.69
100	86.72
200	63.57

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

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control
Control	100
50	95.61
100	63.37
200	27.48

Table 3. Cytotoxic Effect of POF on SK-MEL-2 Cells

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control
Control	100
50	106.76
100	70.84
200	17.91

Table 4. Cytotoxic Effect of POF on XF498 Cells

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control
Control	100
50	88.49
100	83.62
200	30.96

Table 5. Cytotoxic Effect of POF on HCT15 Cells

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control
Control	100
50	89.84
100	64.42
200	48.19

Table 6. Cytotoxic Effect of POF on MCF-7 Cells

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control
Control	100
1	101.45
10	94.33
100	11.45

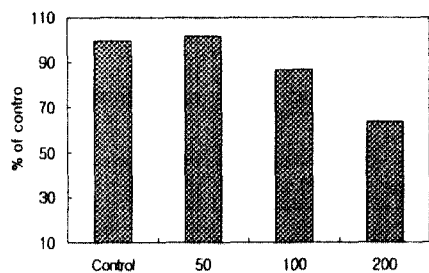


Fig. 1. Cytotoxic effect of POF on A549 cells.

Control : No treated group

50 : POF(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated group

100 : POF(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated group

200 : POF(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated group

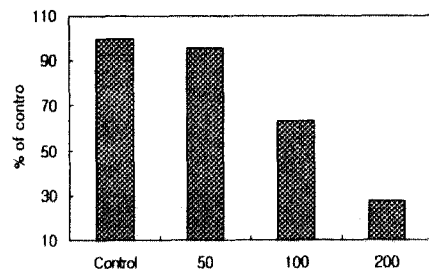


Fig. 2. Cytotoxic effect of POF on SK-OV-3 cells.

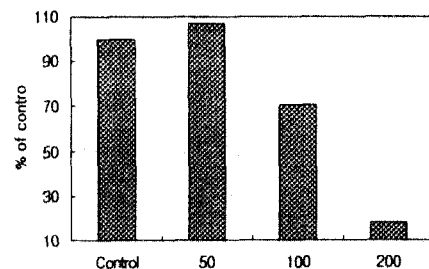


Fig. 3. Cytotoxic effect of POF on SK-MEL-2 cells.

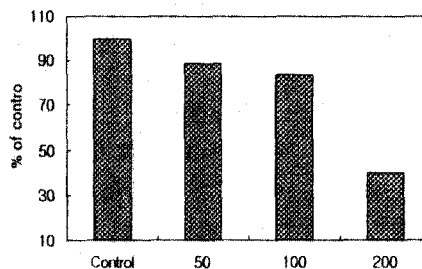


Fig. 4. Cytotoxic effect of POF on XF498 cells.

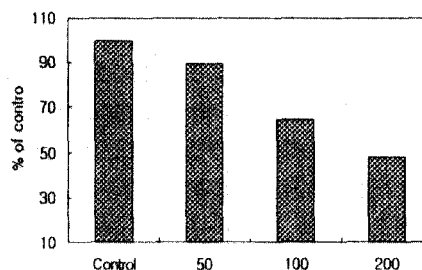


Fig. 5. Cytotoxic effect of POF on HCT15 cells.

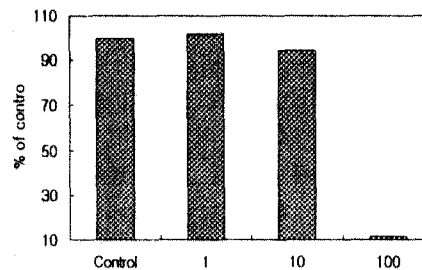


Fig. 6. Cytotoxic effect of POF on MCF-7 cells.

Control : No treated group

1 : POF(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated group

10 : POF(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated group

100 : POF(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated group

2. A549, SK-OV-3 細胞의 附着沮止 效果

轉移란 惡性 腫瘍의 代表的인 生物學的 特徵으로²⁵⁻²⁸⁾, 診斷된 患者의 30% 以上이 이미 轉移가 이루어진 것으로 보고 있다. 癌의 轉移는 直接 播種性 轉移, 림프성 轉移, 血行性 轉移 중 어느 하

나를 통해서 일어나는데, 이러한 過程에서 먼저 細胞外基質을 通過하여야 한다.

따라서 本 實驗에서는 抗轉移 作用을 評價하기 위하여 먼저 複合基質에서의 附着阻止效果를 探索하였다. A549, SK-OV-3 細胞에 대하여 全體 細胞數를 100으로 하여 附着狀態의 細胞比/浮游狀態의 細胞比로 表示하였는데, 모든 實驗群에서 濃度依存的으로 細胞附着을 抑制하였으며, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 濃度에서는 모두 70% 以上の 附着阻止 效果를 나타내었다(Table 7, 8, Fig. 7, 8).

이같은 結果는 pulmonary colonization assay 結果와 附合되며, 本 試料가 直接的인 細胞毒性 등을 통한 抗癌作用과 轉移 抑制를 통한 抗癌作用이 있음을 示唆하고 있다.

Table 7. Inhibitory Effect of POF on Cell Adhesion of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control	
	A549	
Control	100 \pm 0.02	
1	89.9 \pm 1.72	
10	86.4 \pm 2.64	
100	26.6 \pm 0.08	

▨ : 30% 이상 附着阻止 效果를 나타낸 濃度

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

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control	
	SK-OV-3	
Control	100 \pm 0.02	
1	81.5 \pm 0.02	
10	73.9 \pm 0.07	
100	11.8 \pm 0.05	

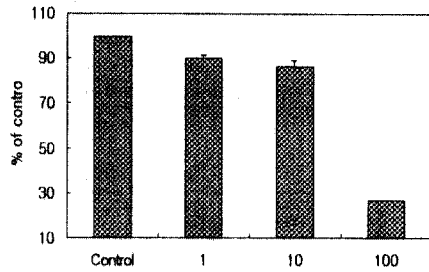


Fig. 7. Inhibitory effect of POF on cell adhesion of A549 cells to complex extracellular matrix.

Control : No treated group

1 : POF(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated group

10 : POF(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated group

100 : POF(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated group

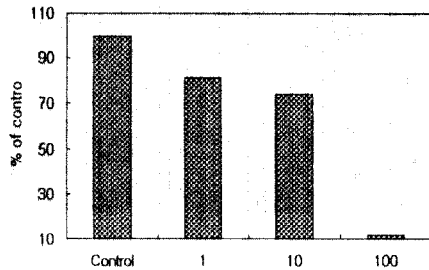


Fig. 8. Inhibitory effect of POF on cell adhesion of SK-OV-3 cells to complex extracellular matrix.

3. B16-F10에 의한 pulmonary colonization 抑制 效果
Pulmonary colonization assay에서는 B16-F10 癌柱를 尾靜脈에 注射하여 14일째 肺臟의 colony 數를 測定하였는데 對照群은 55.42 \pm 3.26개의 colony 數가 觀察되었고, POF 投與群은 46.66 \pm 5.21개로 나타나 有意性 있는 肺癌轉移의 抑制效果를 보였다 (Table 9, Fig 9).

Table 9. Inhibitory Effect of POF on Lung in C57BL/6 Injected i.v. with B16-F10 Cell

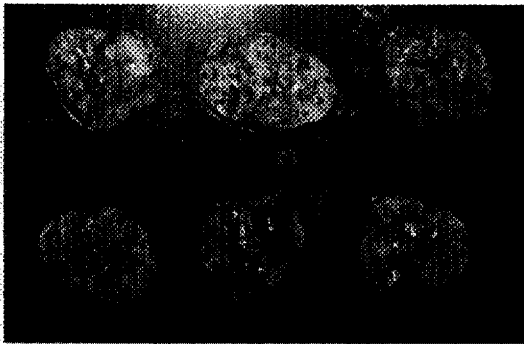
Group	No. of animals	NO. of colonies
Control	10	55.42±3.26
POF	10	46.66±5.21*

Control : Saline treated group

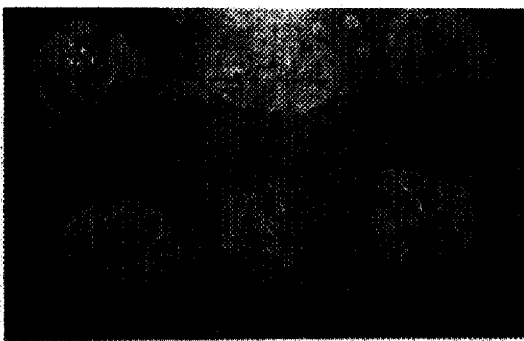
POF : POF(10mg/20g/day) treated group

* : Statistically significant value compared with control data

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)



Control



POF

Fig 9. Inhibitory effect of POF of lung colonies in C57BL/6 injected i.v. with B16-F10 cell.

Control : Saline treated group

POF : POF(10mg/20g/day) treated group

IV. 結 論

水紅花子の抗腫瘍效果를 探索하기 위하여 數種 癌柱에 對한 細胞毒性, A549, SK-OV-3 癌柱의 附着 阻止作用 및 肺癌柱 形成 抑制作用(pulmonary colonization assay) 등을 測定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. A549, XF498 癌柱에 對한 細胞毒性은 高濃度인 200 μ g/ml에서 30% 以上の 細胞毒성을 나타내었고, SK-OV-3, SK-MEL-2, HCT15, MCF-7 癌柱에 對한 細胞毒性은 100 μ g/ml의 濃度에서 30% 以上の 細胞毒성을 나타내었다.
2. A549, SK-OV-3 癌柱에 對한 細胞附着 阻止效果는 對照群에 比하여 100 μ g/ml 以上の 濃度에서 70% 以上の 附着 阻止效果를 나타냈다.
3. Pulmonary colonization assay에서는 對照群에 比하여 colony 形成에 있어 有意性있는 減少를 나타내었다.

以上の 結果로 보아, 水紅花子는 癌細胞에 對해 강한 細胞毒性和 細胞附着 阻止效果를 나타내었으며, 他 實驗에 比해 顯著한 抗癌活性이 認定된다. 따라서 向後 臨床에서 抗癌處方에 加味를 통하여 癌의 轉移豫防 및 治療에 活用可能할 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 문형배 : 一般 病理學, 高文社, pp.75-90, 2001.
2. 해리슨 翻譯 編纂委員會 : 해리슨 內科學, 도서출판 정담, pp.1963-2005, 1997.
3. 강병철 : 오늘의 診斷 및 治療, 도서출판 한우리, pp.69-107, 1999.
4. 大韓病理學會 : 病理學, 高文社, pp.179-233, 2000.
5. 金弘振 : 抗癌 및 免疫에 對한 托裡消毒散의 效果, 東新大學校 大學院, 2000.
6. 정국찬 : 丹蔘의 抗癌性에 關한 研究, 高麗大學校 大學院, 2000.
7. 이선미 : 향고(표고) 다당체의 抗癌活性和 免疫調節作用에 關한 研究, 大田大學校 大學院, 2000.

8. 裴文庸 : 活血大補湯의 抗癌活性, 抗轉移 및 免疫調節 作用에 關한 研究, 大田大學校 大學院 韓醫學科 博士學位論文, 2002.
9. 金鎮雄 : 淸金湯의 抗腫瘍 및 免疫調節作用에 關한 研究, 大田大學校 大學院 韓醫學科 博士學位論文, 2002.
10. 李泰亨 : 加味紅蔘大補湯의 抗癌活性, 抗轉移 및 免疫調節 作用에 關한 研究, 大田大學校 大學院 韓醫學科 博士學位論文, 2002.
11. 임의수 : 상항버섯의 抗轉移와 免疫增進에 關한 研究, 大田大學校 大學院, 2000.
12. 최우진 : 冬蟲夏草의 抗轉移와 免疫增進에 關한 研究, 大田大學校 大學院, 2000.
13. 李善熙 : 抗癌 및 免疫效果에 覆盆子藥鍼이 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 2000.
14. 陶弘景 : 名醫別錄, 人民衛生出版社, p.158, 1986.
15. 寇宗奭 : 本草衍義, 人民衛生出版社, pp.75-76, 1990.
16. 蘭茂 : 滇南本草, 云南人民出版社, pp.73-76, 1977.
17. 王冰 : 抗癌中藥方選, 人民軍醫出版社, pp.25-26, 1995.
18. 中華本草編委會 : 中華本草(2), 上海科學技術出版社, pp.682-683, 1999.
19. 李岩 : 腫瘤臨症略要, 人民衛生出版社, p.363, 1996.
20. Padron JM, van der Wilt CL, Smid K, Smitskamp-Wilms E, Backus HH, Pizao PE, Giaccone G, Peters GJ. : The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening., *Crit Rev Oncol Hematol.* Nov;36: 141-57. Review, 2000.
21. National Cancer Institute U.S.A. ; Cell culture technical procedures, 1972.
22. Hellmann, K. and Carter, S.K. : Fundamentals of cancer chemotherapy, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132-140, 1987.
23. Gude RP, Binda MM, Presas HL, Klein-Szanto AJ, Bonfil RD. : Studies on the mechanisms responsible for inhibition of experimental metastasis of B16-F10 murine melanoma by pentoxifylline., *Biomed Sci.* 6(2): 133-41, 1999.
24. Humphries. M. J., Matsumoto. K., White. S.L., and Olden. K. Oligosaccharide modifications by swainsonine treatment inhibits pulmonary colonization by B16-F10 murine melanoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, pp.1752-1756, 1986.
25. 大韓病理學會 大邱·慶北支部學會 : 간추린 病理學, 정문각, pp.133-161, 2000.
26. Thomas, K., Ronald, V., Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins, p.3, 1993.
27. Saito N, Mitsunashi M, Hayashi T, Narumo C, Nagata H, Soyama K, Kameoka S, Harumiya S, Fujimoto D. : Inhibition of hepatic metastasis in mice treated with cell-binding domain of human fibronectin and angiogenesis inhibitor TNP-470. *Int J Clin Oncol.* 6(5):215-20, 2001.
28. Zhong S, Zhang Z, Li S. : Significance of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 40(8):514-6, 2001.