

어성초 용매추출물과 메탄올 분획물의 암세포주에 대한 세포독성

이정호* · 백승화¹ · 임진아¹ · 천현자² · 이기남

원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과, 1: 한약자원개발학과, 2: 원광대학교 자연과학대학 자연과학기술학부

Cytotoxic Activity of Methanol Fractions and Solvent Extracts from *Houttuynia cordata* T_{HUNB} (IX) on Various Cancer Cells

Jeong Ho Lee*, Seung Hwa Baek¹, Jin A Lim¹, Hyun Ja Chun², Ki Nam Lee

Department of Third Medicine, 1: Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, 2: Division of Natural Science, Wonkwang University

This study was carried out to evaluate cytotoxic effects of *Houttuynia cordata* T_{HUNB} extracts on A549 (lung cancer), MDA-MB231 (breast cancer), SNU-C4 (colon cancer) and B16 (mouse melanoma) cell lines. We have determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT) assay. The 150 µg/ml concentration of methanol extract (63.81 %) of *Houttuynia cordata* T_{HUNB} was shown significantly antitoxic activity on A549 cell lines. The order of cytotoxicity fractions of methanol from *Houttuynia cordata* T_{HUNB} extracts against cancer cell lines in vitro is as follows : hexane fraction layer > chloroform fraction layer > ethyl acetate fraction layer > buthanol fraction layer > water fraction layer. These results suggest that the hexane fraction of methanol extract from *Houttuynia cordata* T_{HUNB} extract may be a valuable choice for the development of antitumor agents.

Key words : *Houttuynia cordata* T_{HUNB}, MTT assay, Cytotoxic effect.

서 론

현대사회는 환경오염, 잘못된 식생활습관 등으로 암환자가 증가하고 있으며, 암은 수술요법, 방사선요법, 면역요법, 약물요법 등으로 치료하고 있다. 현재 사용하고 있는 항암제는 세포독성을 이용하여 암세포의 사멸과 증식억제를 이용하는 것이지만 정상세포와 면역계 세포에도 독성을 발현하는 문제점을 나타내고 있다.¹⁻³⁾ 암세포에 손상을 주는 세포독성은 비특이적 방어기전을 갖고 있으며, 생체내 대식세포와 림프구와 같은 표적세포에 세포독성을 유발하여 세포를 자극하여 세포독성효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 천연물은 전통적으로 민간약이나 질병의 예방에 사용되어 왔으며, 인체에 부작용이 적고 강력한 항암작용을 나타내는 천연물에서 항암 활성성분에 대한 연구가 진행되고 있다. 썸버귀 뿌리 추출물이 폐암세포인 A549 세포에서 항암활성이 나타났다고 보고 되어 있으며, 식이 phenol이 항산화를 통

해 암예방에 영향을 미친다고 하였고, 녹차잎에 함유된 catechin 이 간암세포에 대하여 항암활성을 나타냈고, 감잎이 암세포의 증식 억제효과가 나타내었다고 보고되었다.^{3,5-7)} 굴피나무잎 methanol 추출물에서 인체 고형암 세포인 A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF-498, HCT-15 세포에서 활성을 나타낸 것으로 보고되었으며,⁸⁾ 백출 뿌리 추출물에서 SK-MEL-3세포에서 세포독성효과와 항균효과가 있는 것으로 보고되었다.⁹⁾ 어성초를 물과 유기용매로 추출한 추출물이 마우스의 백혈병 세포인 L1210세포, P388D1, Vero세포에 대하여 세포독성효과와 항균, 항진균 효과가 있는 것으로 보고되었으며, 어성초 추출물이 카드뮴에 대한 독성경감효과가 있는 것으로 보고되었다.¹⁰⁻¹²⁾

어성초 (*Houttuynia cordata* T_{HUNB})는 삼백초과 (Saururaceae)에 속하며, 잎과 줄기에서 생선비린내 같은 독특한 냄새가 나는 초본식물로서,^{1,2)} quercitrin, quercetin, reynoutrin, hyperin, aristolactams, isoquercitrin, myrcene, decanylacetaldehyde, 등이 함유되어 있다.^{1,3-5)} 어성초는 항염증 작용, 이뇨, 강심, 해열, 배농작용, 항균작용, 항암작용, 축농증, 협심증, 담석증, 신장병, 치질, 당뇨병, 고혈압, 중금속 해독작용,

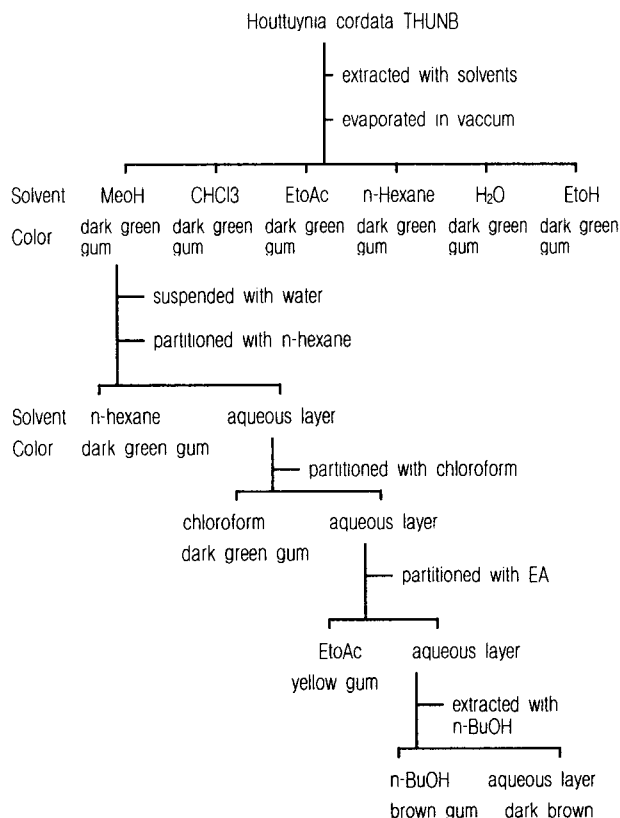
* 교신저자 : 이정호, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의학전문대학원
· E-mail : jeongho@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-850-
· 접수 : 2003/07/28 · 수정 : 2003/08/30 · 채택 : 2003/10/06

임병 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다.¹³⁻¹⁷⁾ 본 연구에서는 어성초추출물과 methanol 추출물을 분획하여 A549 (lung cancer), B16 (mouse melanoma), MDA-MB-231 (breast cancer), SNU-C4 (colon cancer) cell에 대하여 MTT 정량분석법으로 세포독성을 측정하였다.

실 험

1. 재료

전북 익산에서 자생하는 어성초를 채취하여 외부형태를 검정한 후, 음건한 시료를 hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol, ethanol, 물로 추출하였고, 분획물은 methanol 추출물을 물로 현탁한 후, hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol순으로 계통 분획하여 얻어진 시료를 4℃ 냉장 보관하여 사용직전에 에틸알콜로 동량희석하여 사용하였다.(Scheme 1)



Scheme 1. Extraction and fractionation of Houttuynia cordata THUNB.

2. 시약 및 기기

추출 및 분리에 사용한 시약은 hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol, ethanol, 물, butanol을 사용하였고, FBS (fetal bovine serum), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide, PRMI medium 1640, antibiotic- antimyzolic, Herpes, L-glutamine, Mueller Hinton broth (Difco), HBSS (Hanks balanced salt solution)등은 Gibco제 GR급, 0.4 % trypan

blue solution (MTT), dimethylsulfoxide (DMEM)등은 Sigma사에서 구입하였으며. 세포배양은 CO₂ incubator (Shellab Co., U.S.A.), Turk형 혈구계산기, 도립현미경 (Inverted Microscope, Olympus), ELISA reader (Spectra Max 250, U.S.A.)를 사용하였다.

3. 암세포배양

A549 (lung cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), SNU-C4 (colon cancer)세포는 10 % fetal bovine serum (FBS)이 포함된 RPMI-1640 (Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.)배지를, B16 (mouse melanoma)세포는 10 % FBS가 포함된 DMEM (Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.)배지를 사용하여 CO₂ 배양기 (37℃, 5 %)에서 배양하였다. 각 세포는 약 72시간을 주기로 trypsin-EDTA Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A) 용액을 사용하여 계대 배양한 후 포집하여 사용하였다.

4. 세포독성 측정

암세포의 세포독성 측정은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide 검정법^{18,19)}으로 96 well plate에 A549, B16, MDA-MB-231, SNU-C4를 2 × 10⁴ cells/ml로 분주시켜 48시간동안 배양한 후 시료를 25, 50, 100, 150 µg/ml 농도로 처리하여 24시간동안 배양시켜 상등액을 제거하고 tetrazolium bromide salt 0.2 µg/ml 농도를 처리한 후 4시간동안 배양시켰다. 생성된 formazan 결정을 DMEM에 용해시켜 ELISA reader를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 대조군 (100 % 생존군)에 대한 백분율로 환산하였다.

5. 통계학적 해석

실험결과의 통계학적처리는 Student's t-test를 이용하였으며, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 추출 및 계통분획

어성초 (30 g)를 hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol, ethanol, 물을 이용하여 상온에서 24시간 3회 반복 추출하여 0.4 µm필터로 여과한 후 진공증류기로 35 °C에서 감압 농축시켜 hexane 추출물, chloroform 추출물, ethyl acetate 추출물, methanol 추출물, ethanol 추출물, 물 추출물을 얻었으며, 계통분획은 methanol 추출물 296.47 g을 물 3,000 ml로 현탁한 후 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol로 3회 반복 분획하여 무수망초로 탈수시켜 감압농축하여 hexane 분획물, chloroform 분획물, ethyl acetate 분획물, butanol 분획물과 잔류하는 수층액기스를 얻었으며 수율은 Table 1과 같다.

2. 어성초 추출물의 항암효과

암세포주들에 대한 어성초의 hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol, ethanol, 물 추출물들의 세포독성을 MTT 정량분석법으로 측정한 결과는 Table 2와 같다.

Table 1. Extraction and fraction yield of *Houttuynia cordata* T_{HUNB}.

	Solvent	Yield (%)
Extraction	water	7,120 mg (23.73)
	chloroform	1,110 mg (3.70)
	ethyl acetate	530 mg (1.76)
	hexane	380 mg (1.26)
	methanol	2,360 mg (7.86)
	ethanol	1,860 mg (6.20)
Fraction	hexane	127,290 mg (43.11)
	chloroform	4,940 mg (1.68)
	ethyl acetate	11,110 mg (3.79)
	butanol	60,300 mg (20.56)
	water	89,620 mg (30.56)

Table 2. Effect of solvent extracts from *Houttuynia cordata* T_{HUNB} extracts on the viability of cancer cells.

Extract	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	0	25	50	100	150
A549					
water	100.00	100.18±2.12	100.18±1.76	101.01±1.89	101.29±0.21
chloroform	100.00	97.01±2.14	91.44±7.24	84.4±12.10	66.78±6.92
ethyl acetate	100.00	95.22±0.79	88.17±2.09	71.54±3.24	60.07±0.49
hexane	100.00	94.97±2.49	92.00±3.01	91.66±1.75	91.39±1.07
methanol	100.00	96.64±7.22	84.54±1.23	82.56±2.31	63.81±7.37
ethanol	100.00	103.25±3.80	98.55±3.16	92.93±6.11	81.24±4.70
MDA-MB-231					
water	100.00	104.04±2.11	98.76±2.82	98.62±3.76	91.17±3.84
chloroform	100.00	111.91±9.56	101.37±9.27	93.43±3.67	65.95±5.68
ethyl acetate	100.00	119.02±5.47	106.16±8.73	101.12±4.54	91.54±8.41
hexane	100.00	107.37±0.79	107.17±3.97	103.13±3.72	98.48±2.68
methanol	100.00	102.06±3.18	98.02±9.46	92.23±8.79	77.35±2.82
ethanol	100.00	102.51±4.01	112.53±8.85	104.9±9.65	99.57±0.67
SNU-C4					
water	100.00	102.83±6.17	99.46±7.24	99.01±5.60	95.63±9.68
chloroform	100.00	89.94±4.58	85.96±5.50	81.27±7.46	55.94±7.39
ethyl acetate	100.00	108.12±9.89	99.21±5.88	88.19±5.59	68.95±5.18
hexane	100.00	101.79±6.90	101.20±6.54	99.56±8.11	98.80±8.80
methanol	100.00	98.86±7.46	98.03±2.69	80.80±4.34	71.53±9.70
ethanol	100.00	105.36±0.25	103.66±1.80	90.24±5.22	84.32±8.65
B16					
water	100.00	99.79±5.34	99.79±6.23	99.68±2.34	99.47±4.97
chloroform	100.00	108.74±5.87	107.07±5.56	103.86±7.97	83.45±8.51
ethyl acetate	100.00	109.96±2.63	130.80±3.97	125.74±3.27	110.65±7.52
hexane	100.00	109.68±9.42	102.36±7.16	99.41±4.92	97.94±8.23
methanol	100.00	107.78±0.82	99.21±9.76	96.69±6.40	78.83±5.75
ethanol	100.00	101.81±7.22	103.43±6.24	107.88±8.32	111.54±8.47

The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Houttuynia cordata* T_{HUNB} extracts for 48 hrs. The viability of the cells were measured by MTT assay. Result were expressed as % control and data were mean ± S.D. of at least five different experiments.

A549 세포에서 chloroform 추출물, ethyl acetate 추출물, methanol 추출물의 처리농도가 25 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 비슷한 세포독성이 관찰되었고 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 ethyl acetate 추출물은 60.07 %, methanol 추출물은 63.81 %의 세포독성이 나타났으며 물 추출물에서는 처리농도가 증가할수록 오히려 증식되는 경향으로 나타났다. B16 세포에서는 대부분의 추출물에서 세포독성이 거의 나타나지 않았으며, hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol 추출물에서는 오히려 세포가 약간 증식되는 현상을 보였다. Methanol 추출물은 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 78.83 %의 세포독

성을 보였다. MDA-MB-231 세포에서는 hexane, ethanol, ethyl acetate 추출물의 경우에는 저농도에서 세포가 약간 증식되는 현상을 보이며 세포독성을 나타내지 않았다. Methanol과 chloroform 추출물에서는 세포독성이 나타났고 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 chloroform 추출물은 65.95 %, methanol 추출물은 77.35 %의 세포독성을 보였다. SNU-C4 세포에서는 MDA-MB-231 세포와 마찬가지로 methanol과 chloroform 추출물에서는 세포독성이 나타났으며 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 chloroform 추출물은 55.94 %, methanol 추출물은 71.53 %의 세포독성을 보였다.²⁰⁻²⁴ 이상의 실험 결과를 종합한 결과 어성초의 methanol 추출물과 chloroform 추출물에서 가장 좋은 세포독성이 나타났으며 이중에 먼저, methanol 추출물을 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol로 계통 분획하여 세포독성을 평가하였다.

3. 어성초분획물의 항암효과

Methanol 추출물을 계통 분획하여 얻은 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 분획물에 대한 세포독성을 측정 한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. Effect of solvent fractions prepared from methanol extract of *Houttuynia cordata* T_{HUNB} on the viability of cancer cells

Fraction	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	0	25	50	100	150
A549					
hexane	100.00	50.78±3.13	45.75±9.96	45.19±8.37	34.36±6.09
chloroform	100.00	105.01±5.34	99.84±9.12	92.87±6.79	53.06±2.83
ethyl acetate	100.00	89.70±2.72	86.11±0.64	85.83±3.21	85.00±4.33
butanol	100.00	101.08±5.19	96.67±6.25	94.39±1.20	85.35±3.09
water	100.00	99.90±3.47	100.74±4.21	101.01±4.68	102.67±5.85
MDA-MB-231					
hexane	100.00	89.04±8.76	85.14±7.02	54.76±8.96	37.36±8.53
chloroform	100.00	112.31±4.75	110.18±5.75	91.78±2.70	65.53±3.80
ethyl acetate	100.00	89.07±5.01	87.06±3.93	84.74±2.27	84.67±3.17
butanol	100.00	111.97±3.16	112.98±3.42	116.27±4.18	120.06±6.78
water	100.00	106.18±5.74	112.61±7.14	112.76±5.75	114.20±6.99
SNU-C4					
hexane	100.00	94.23±5.54	77.39±2.81	60.50±6.67	44.50±6.47
chloroform	100.00	99.27±4.01	98.97±5.01	85.49±4.44	63.57±3.01
ethyl acetate	100.00	87.49±3.81	82.76±2.74	75.54±2.91	74.43±4.01
butanol	100.00	98.93±9.65	91.36±3.99	89.80±1.98	87.75±8.67
water	100.00	105.05±4.92	100.71±1.29	93.74±3.50	92.12±6.24
B16					
hexane	100.00	91.42±1.95	86.26±7.85	82.11±1.89	66.18±7.94
chloroform	100.00	104.71±7.37	81.62±6.50	80.88±7.07	59.93±3.49
ethyl acetate	100.00	80.93±5.26	75.95±4.71	68.22±3.27	66.00±3.62
butanol	100.00	105.72±3.16	102.07±4.63	101.06±6.03	91.95±7.92
water	100.00	100.00±3.25	99.68±4.15	99.47±6.65	99.26±4.89

The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Houttuynia cordata* T_{HUNB} extracts for 48 hrs. The viability of the cells were measured by MTT assay. Result were expressed as % control and data were mean ± S.D. of at least five different experiments.

A549 cell에서는 물 분획물을 제외하고 모든 추출물에서 세포독성을 나타냈으며 특히, hexane 분획물의 경우에 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 34.35 %의 가장 높은 세포독성을 나타냈다. B16 세포에서는 hexane, chloroform, ethyl acetate 분획물에서 처리농도가 증가할

수록 세포독성이 증가하였다. MDA-MB-231 세포에서는 hexane, chloroform, ethyl acetate 분획물에서는 A549에서와 마찬가지로 농도가 증가할수록 세포독성이 증가하였으며 특히, hexane 분획물의 150 µg/ml 농도에서 37.36 %로 가장 높은 세포독성이 나타났다. Butanol 분획물과 수층액기스에서는 처리농도가 증가 할수록 세포가 더 증식되는 현상으로 나타났다. SNU-C4 세포에서도 처리농도가 증가할수록 모든 분획물의 세포독성이 증가하였고, hexane 분획물에서 가장 높은 세포독성을 보였다.^{29,30)}

결 론

어성초 (*Houttuynia cordata* THUNB)의 hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol, ethanol, 물추출물을 이용하여 A549 (lung cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), SNU-C4 (colon cancer), B16 (mouse melanoma) cell에서 세포독성을 측정할 결과 chloroform 추출물과 methanol 추출물에서 가장 좋은 세포독성이 나타났다. 이중 methanol 추출물을 다시 계통 분획하여 얻은 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 분획물의 암세포주에 대한 세포독성을 측정할 결과 hexane 분획물이 모든 세포주에 가장 좋은 세포독성을 보였고, hexane 분획물 > chloroform 분획물 > ethyl acetate 분획물 > butanol 분획물 > 수층액기스 순으로 세포독성이 나타났다.

이상의 결과에서 어성초의 methanol 추출물과 methanol 추출물의 hexane 분획물에서 암세포들에 대한 세포독성이 높게 나타났으므로 어성초의 methanol 추출물을 분획한 분획물중 hexane 분획물에 항암활성을 갖는 물질이 가장 많이 함유되어 있는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Park, J. S., Shin, M. K., Shn, H. S., Park, R. K., Kim, M. S and eong, W. H. (2002): Green tea(-)EGCG induces the apoptotic death og lung cancer cells via activation of c-Jun N-terminal 1 and activating protein-1. *Korean Nutrition Society*, 35(1), 53-59.
2. Rhee, H. Jin., Kim, S. W., Lee, S. O., Park, Y, M. and Na, D. S. (1999): Translocation of annexin I to the nucleus by epidermal growth factor in A547 cells. *J, Biochemical and Molecular Biology*, 32(1), 28-31.
3. Choe, W. K., Park, J. H., Kim, S. H., Lee, D. Y, and Lee, Y. C. (1999): Antitumor effects of green tea catechin on different cancer cells. *Korean Nutrition Society*, 32(7), 838-843.
4. Mun, Y. J., Nam, Y. J., Lee, K. G., Chol, D. H., Lee, S. W., Ahn, S. H., Chol, M. K. and Woo, W. H. (2002): The water extract of caesalpinia sappan induces apoptosis on human lung cancer call line, A549 cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 16(3), 521-527.

5. Kim, M. J., Kim, J. S., Jeong, D. M., Ham, S. S. and Yu, C. Y. (2002): Effects of antioxidant, antimutagenicity and anticancer of root extract from *Ixeris dentate* Nakai. *Kreean J. Medicinal Crop Sci.* 10(3), 222-229.
6. Kim, G. S. (1997): Effect of dietary phenols on body tissue oxidative state and cancer prevention. *Korean J. Food & Nutr*, 10(1), 74-81.
7. Moon, S. H., Kim, K. H. and Park, K. Y. (1996): Antitumor effect of persimmon leaves in vivo using Sarcoma-180 cells. *J. Korean Soc Food Sci. Nutr.* 25(5). 865-870.
8. Kim, Y. I., Lee, S. H. and Cho, T. S. (1996): Isolation of anticancer agents from the leaves of *Platycarya strobilacea* S. et Z. *Kor. J. Phramacogn*, 27(3), 238-245.
9. Choi, E. Y., Oh, H. J., Park, N. K., Chun, H. J., Ahn, J. W., Jeon, B. H., Han, D. S., Lee, H. D. and Baek, S. H. (2002): screening of Cytotoxicity and Antimicrobial effects of extracts from *Atractylades macrocephala* Koidz, *Kor. J, Orient. Physiol. & Pathol.* 16(2), 348-352.
10. Lee, J. H., Park, N. K., Yang, E. Y., Lee, H. O., Han, D. M. and Baek, S. H. (2000): Studies on the cytotoxicity and antimicrobial effects of the extract of *Houttuynia Cordata* (IV). *Kor. J. Oriental Preventive Medical Society.* 4(1), 144-151.
11. Lee, J. H., Jeong, S. I., You, I. S., Kim, S. K., Lee, K. N., Han, D. S., and Baek, S. H. (2000): The inhibitory effects of the methanol extracts of *Houttuynia cordata* THUNB against cadmium induced cytotoxicity (V). *Kor, J, Pharmacogn*, 32(1), 61-67
12. Lee, J. H., Lee, K. N., Lee, C. W., Chun, H. J., You, I. S. Lim, J. A. and Baek, S. H. (2003): The inhibitory effects of quercitrin fron *Houttuynia Cordata* against cadmium induced cytotoxicity (VII). *J. Korean Chemical Society.* 47(2), 175-178.
13. 신민교 (1994): 임상본초학, 영림사, pp. 13-32.
14. Lee, J. H., You, I. S., Kim, J. S., Lee, K. N., Chung, W. Y., Han, D. S. and Baek, S. H. (2000): The inhibitory effects of *Houttuynia cordata* THUNB against cadmium induced cytotoxicity (II). *Yakhak Hoeji*, 44(5), 432-439.
15. Chung, C. K., Han, S. S., Lee, S. Y., Oh, D. H., Choi. S. Y., Kang, I. J. and Nam, S. M. (1999): Effects of *Houttuynia cordata* ethanol extracts on serum lipids and antioxidant enzymes in rats fed high fat diet. *J. Kor, Soc, Food Sci. Nutr.* 28(1), 205-211.
16. Nishiya, H., Ishiwata, K., Komatsu, K., Nakata, O., Kitamura, K. and Fujh, S. (1988): Platelet aggregation inhibitors from *Jyu-yaku* (*Houttuyniae* Herb). *Chem. Pharm. Bull*, 36(5), 1902-1906.
17. Lee, J. H., You, I. S., Kim, J. S., Lee, K. N., Chung, W. Y.,

- Han, D. S. and Beak, S. H. (2000): The inhibitory effects of *Houttuynia cordata* THUMB against cadmium induced cytotoxicity (II). *Kor. J. Pharm.* 44, 432-439.
18. Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
 19. Keepers, Y. P., Pozao, P. E., Peters, G. T., Otte, J. A., Winograd, B. and Pinedo, H. M. (1991): Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTI) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer*, 27, 897-900.
 20. Kyoko Hayashi, Mioko Kamiya and Toshimitsu hayashi (1995): Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia Cordata* and its components on HSV-1, influenzae Virus, and HIV, *Planta Med.* 61, 237-241.
 21. Sakaii, E., Shibata, T., Kawamura, T., Hisata, Y., Noro, Y., Yoshida, M. and Tanaka, T. (1996): Pharmacognostical studies of *Houttuyniae Herba* (2) Growth and flavonoid glycoside contents of *Houttuynia cordata* THUNB. Cultivated under shade condition. *Natural Medicines*, 50(1), 45-48.
 22. Mun, Y. J., Nam, Y. J., Lee, K. G., Choi, D. H., Lee, S. W., Ahn, S. H., Choi, M. K. and Woo, W. H. (2002): The water extract of *caesalpinia sappan* induces apoptosis on Human lung cancer cell Line, A 549 Cells. *Kor. J. Orient. Physiol. & Pathol.* 16(3), 521-527.
 23. Choi, E. Y., Oh, H. J., Park, N. K., Chun, H. J., Ahn, J. W., Jeon, B. H., Han, D. S., Lee, H. D. and Baek, S. H. (2002): screening of Cytotoxicity and Antimicrobial effects of extracts from *Atractylades macrocephala* Koidz, *Kor. J. Orient. Physiol. & Pathol.* 16(2), 348-352.
 24. Chun, H. Y., Hwang, S. G., Kim, C. K., Jeon, B. H., Baek, S. H. and Woo, W. H. (2002) : In vitro modulation of proliferation and melanization of B16/F10 melanoma Cells by quecetin. *Yakhak Hoeji*, 46(1), 75-80.
 25. Park, J. G., Park, J. C., Hur, J. M. and Kim, M. S. (2000): Phenolic compounds from *Orostachys japonicus* having Anti-HIV-1 protease activity, *Natural Product Science*, 6(3), 117-121.
 26. Watanabe, N., Forman H.J. (2003): Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. *Arch Biochem. Biophys.* 411(1), 145-57.
 27. Croute, F., Poinso, J., Gaubin, Y., Beau, B., Simon, V., Murat, J. C. and Soleilhavoup, J. P. (2002): Volatile organic compounds cytotoxicity and expression of HSP72, HSP90 and GRP78 stress proteins in cultured human cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1591(1), 147-155.
 28. Johnstone, E. C., Lind, M. J., Griffin, M. J. and Boddy, A. V. (2000): Ifosfamide metabolism and DNA damage in tumour and peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 46(6), 433-41.
 29. Leland, P., Taguchi, J., Husain, S. R., Kreitman, R. J., Pastan, I. and Puri, R. K. (2000): Human breast carcinoma cells express type II IL-4 receptors and are sensitive to antitumor activity of a chimeric IL-4-Pseudomonas exotoxin fusion protein in vitro and in vivo. *Mol. Med.*, 6(3), 165-178.
 30. Carretero, J., Obrador, E., Esteve, J. M., Ortega, A., Pellicer, J. A., Sempere, F. V. and Estrela, J. M. (2001): Tumoricidal activity of endothelial cells. Inhibition of endothelial nitric oxide production abrogates tumor cytotoxicity induced by hepatic sinusoidal endothelium in response to B16 melanoma adhesion in vitro. *J. Biol. Chem.* 276(28), 25775-25782.
 31. Nakamura, K., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Kwon, Y. M., Shinozuka, K. and Kunitomo, M. (1999): Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* on spontaneous liver metastasis of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells in syngeneic mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 79(3), 335-34