

고삼의 인체 대장암세포에 미치는 효과

김민철 · 이희정 · 임보라 · 김형우¹ · 김병주*

부산대학교 한의학전문대학원 양생기능의학부, 1: 약물의학부

Effects of Sophorae Radix on Human Colorectal Adenocarcinoma Cells

Min Chul Kim, Hee Jung Lee, Bo Ra Lim, Hyung Woo Kim¹, Byung Joo Kim*

Division of Longevity and Biofunctional Medicine, 1: Division of Pharmacology School of Korean Medicine, Pusan National University

The purpose of this study was to investigate the anti-cancer effects of Sophorae Radix and the effects of 5-Fluorouracil (5-FU) in human colorectal adenocarcinoma cells (HT-29). We used human colorectal adenocarcinoma cell line, HT-29 cells. We examined cell death by MTT assay and caspase 3 assay with Sophorae Radix. To examine the inhibitory effects of Sophorae Radix, cell cycle (sub G1) analysis was done the HT-29 cells after three days with Sophorae Radix. The reversibility of Sophorae Radix was examined on one day to five days treatment with 150 μg Sophorae Radix. Sophorae Radix inhibited the growth of HT-29 cells in a dose-dependent fashion. Also we showed that Sophorae Radix induced apoptosis in HT-29 cells by MTT assay, caspase 3 assay and sub-G1 analysis. Sophorae Radix combined with 5-FU markedly inhibited the growth of HT-29 cells compared to Sophorae Radix or 5-FU alone. After 3 days treatment of HT-29 cells with Sophorae Radix, the fraction of cells in sub-G1 phase was much higher than that of the control group. Our findings provide insight into unraveling the effects of Sophorae Radix in human colorectal adenocarcinoma cells and developing therapeutic agents against colorectal cancer.

Key words : Sophorae Radix, human Colorectal Adenocarcinoma Cell, HT-29, 5-Fluorouracil

서론

대장암은 일반적으로 '선진국형' 암으로 인식되어 왔으나 우리나라에서도 생활방식이 점차 서구화되어 감에 따라 1980년대 이후 그 발병률이 꾸준히 증가하고 있는 실정이다. 암의 원인은 유전적 인자와 환경적 인자의 복합작용으로 발생하는데 대장암의 발병은 유전적 요인보다 식이, 환경적 요인이 크게 작용하는 것으로 생각되고 있다¹⁾. 육체적 활동량이 많은 직업에서 대장암 발병률이 낮아진다는 보고도 있고, 일본에 거주하는 일본인보다 하와이나 캘리포니아에 거주하는 이민간 일본인 1세와 2세에서 대장암의 발병률이 높거나²⁾ 동물성 지방질과 육류를 많이 섭취하는 미국이나 유럽에 사는 사람들에게 대장암이 많이 발생한다는 점을 들 수 있다³⁾.

대장암에 대한 치료법으로는 외과적 수술요법, 약물요법, 방사선요법 등이 시행되고 있고 최근에는 분자생물학의 발달에 힘

입어 유전자 치료법이 개발 중이나 아직 실용화단계에 들어서지 못하고 있다⁴⁾. 수술요법과 방사선요법은 국소적인 병소에는 유용하나 전이된 경우에는 여전히 약물요법에 의존하고 있으며⁵⁾ 치료에도 한계가 있다. 또한 현재의 화학요법은 항암제가 암세포 외에도 정상 세포에도 손상을 초래하는 부작용 때문에 면역기능 저하, 골수 기능 장애, 유전인자 손상 등을 야기한다. 따라서 부작용을 감소시키면서 암세포에 대한 특이적인 독성을 나타내는 항암제를 합성물질이 아닌 천연물질에서 개발하려는 노력이 시도되고 있다⁶⁾.

고삼은 콩과에 속하는 다년생 초본식물인 도독놈의 지황이 (*Sophora flavescens Ait*)라는 식물의 뿌리로 한방에서는 이 식물의 뿌리를 약재로 이용한다⁶⁾. 우리나라 전역에 자생하고 성질은 차고 무독하며 강한 쓴맛을 지니고 있으며⁷⁾ 항(抗)부정맥 등에 효능이 있다고 알려져 있다⁸⁾.

이처럼 고삼은 味苦性寒하여 燥濕清熱하는 작용을 하며, 歸經이 大腸, 心, 肝, 胃, 膀胱經으로 들어가며⁹⁾ 황달, 간질, 해열, 이뇨, 진통, 구충제 내복용으로 쓰이고 있으며, 강장제로 민간 약제로 이용되어 왔다¹⁰⁻¹²⁾. 그리고 고삼의 뿌리에는 alkaloid로

* 교신저자 : 김병주, 경남 양산시 물금읍, 부산대학교 한의학전문대학원

· E-mail : vision@pusan.ac.kr, · Tel : 051-510-8469

· 접수 : 2012/02/13 · 수정 : 2012/03/20 · 채택 : 2012/04/04

d-matrine, d-oxymatrine, d-sophoranol, l-anagryne, l-methylcytisine, l-baptifoline, l-sophocarpine 등이 함유되어 있고 falvonode류로 xanthohumol, isoxanthohumol 등이 함유되어 있다⁹⁾. 그 중에서 matrine 성분은 항암작용을 한다¹³⁾는 보고도 있으며 고삼이 항독성을 가져 항암작용을 한다는 보고도 있다¹⁴⁾. 하지만 항암제로서의 고삼 효과와 항암제의 효과를 증가시키는 보조제로서의 역할에 관한 체계적인 연구는 활발히 이루어지지 않고 있다.

이에 본 연구에서는 고삼추출물을 이용하여 현재 발생비율이 꾸준히 증가하고 있어 사회적인 문제가 되고 있는 대장암세포에서의 항암효과를 알아보고 항암제에 대한 병용투여로 항암의 효과를 증진시키는 효과를 관찰하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 고삼(苦蔘, *Sophorae radix*, SR)은 콩과에 속한 고삼 *Sophora flavescens* Aiton의 주피를 벗긴 근으로 2010년 10월 경북 상주에서 생산된 것을 화림제약 (부산, 한국)을 통하여 구입하였다. 세척되고 세절된 상태로 구입된 苦蔘 50 g을 분쇄기로 분쇄한 다음, 에탄올 1,000 ml를 이용하여 상온에서 48시간 추출하였다. 추출액을 원심분리하여 얻은 상층액을 왓만지 (Watman paper)를 이용하여 2회 반복 여과한 후, 감압농축기 (EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축하였다. 감압 농축된 추출액은 동결 건조되었으며, 최종적으로 얻어진 추출물은 6.43 g으로 수율은 12.9%였다.

2) 대상 세포주

이 실험에 사용한 인체 위암세포는 서울대학교 암세포주 은행에서 구입한 대장암 세포주 HT-29이며, adenocarcinoma의 histopathology 특징을 나타내고 있다.

2. 방법

1) 암세포의 배양

암세포주는 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, MD), 1% broad-spectrum antibiotics (Gibco BRL, MD)가 함유된 RPMI-1640 (Gibco BRL, MD) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Precision Scientific Inc. NY)에서 배양하였고, 세포는 0.1% Trypsin-EDTA (Sigma, MD)를 이용하여 37°C에서 5분간 처리한 후 회수하였다.

2) MTT assay

세포 생존율 측정은 세포 배양판 (12-well)에 암세포를 1 ml 씩 분주하여 24시간 이상 배양 후 고삼추출물을 다양한 농도로 처리한 다음, 37°C, 5% CO₂ 하에서 48시간 또는 72시간 배양한 후, MTT용액 (5 mg/ml)을 배양액 최종 부피의 1/10되게 첨가하였다. 3시간 후 배양액을 제거하고 형성된 formazan 침전물을 dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 ml로 녹여서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Caspase 3 assay 측정

Caspase 3 assay kits를 BioMol (Plymouth, PA, USA)에서 구입하여 측정하였다. 405 nm의 흡광도에서 여러 번 측정하였다.

4) Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

고삼추출물이 HT-29세포의 증식을 억제하는데 있어서 세포 주기의 어느 단계를 지연시키는지 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. 고삼추출물을 첨가한 배지에서 3일간 배양된 AGS세포를 PBS용액으로 세척한 후, 4°C에서 30분간 70% ethanol로 고정하였다. 고정후 propidium iodide (Sigma, USA)로 DNA를 염색하여 Becton Dickinson FACStar Flow Cytometry를 이용하여 세포주기를 비교 분석하였다.

5) 통계 분석

대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago)의 Independent t-test를 사용하였으며 유의수준 p<0.05를 사용하였다. 실험결과는 mean±SD 또는 빈도 (%)로 기재하였다.

결 과

1. 암세포 살상 효과

암세포 살상 효과를 측정하기 위하여 50, 100, 150, 200 µg/ml의 농도로 각각 3회씩 시험한 결과 고삼추출물에 의한 HT-29에서의 효과 2일후인 (A)에서는 150 µg/ml 이상에서 암세포 살상 효과를 볼 수 있었으며, 4일후인 (B)에서는 50 µg/ml 이상에서 뚜렷한 암세포 살상 효과를 볼 수 있었다(Fig. 1). A에 있어서는 MTT assay로 50 µg/ml에서 99.1±3%, 100 µg/ml에서 98.1±1.0%, 150 µg/ml에서 65.1±8.1%, 200 µg/ml에서 58.2±5.3%의 세포 생존 결과를 보였다. B에 있어서는 50 µg/ml에서 69.4±3.1%, 100 µg/ml에서 55.3±2.0%, 150 µg/ml에서 35.3±3.2%, 200 µg/ml에서 28.3±2.1%의 결과를 보였다. 이러한 결과는 A, B 모두 통계적으로 유의하게 암세포 살상 효과가 있다는 것을 확인한 결과로 HT-29에서는 고삼추출물에 의해서 2일후에는 150 µg/ml 이상 농도에서 항암작용이 나타나고, 4일후에서는 50 µg/ml 이상 농도에서 뚜렷한 항암작용이 있음을 의미한다.

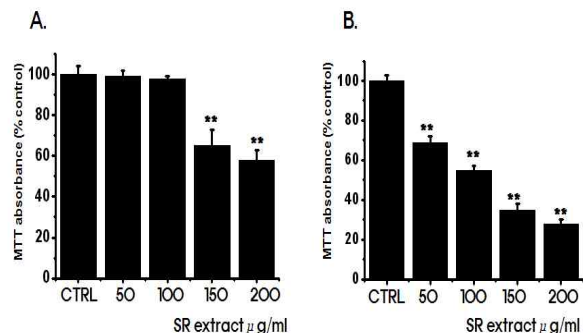


Fig. 1. Effect of *Sophorae Radix* extract on cytotoxicity in HT-29 cells. HT-29 cells were incubated with *Sophorae Radix* extract as indicated dose (µg/ml). After 2 days (A) or 4 days (B), cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. The values are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean±S.D. *P<0.05. **P<0.01.

2. Caspase 3를 통한 암세포 사멸 확인

고삼추출물에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 농도별로 세포사멸의 진행 정도를 알아보았다. Caspase는 cystinyl aspartate-specific protease로 세포질에서 pro-form으로 존재하고 특정 위치의 proteolytic 과정에 의해 활성화된다. 이로 인해 세포의 DNA 복제 및 유전자 발현과 관련된 단백질 및 핵의 구조 유지, 세포의 항상성 유지 등과 관련된 단백질들을 파괴시키거나 관련된 단백질을 활성화시켜 apoptosis를 유도하게 된다. Caspase 3 activity를 측정할 결과 고삼추출물에 의해 caspase 3 activity가 증가함을 알 수 있다(Fig. 2).

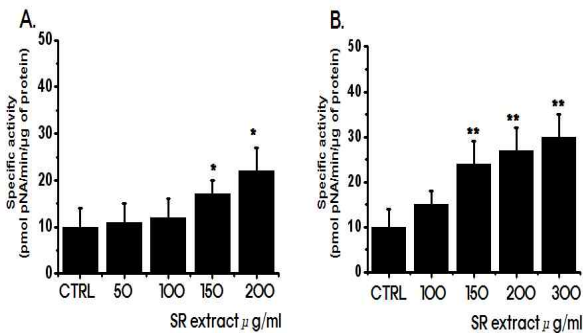


Fig. 2. Sophorae Radix extract induces apoptosis in HT-29 cells. Caspase 3 activities measured by enzyme assays. The specific activity was obtained from three samples per group. CTRL: MCF-7 cells. *P<0.05. **P<0.01.

3. Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

고삼추출물에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 flow cytometry를 이용한 세포주기 sub-G1 분석을 실시하였다. Apoptosis가 일어나면 기존의 fluorescence peak가 왼쪽으로 이동해 새로운 sub-G1 fluorescence peak가 만들어 진다. 고삼추출물에 의한 Sub-G1 분석 결과 고삼추출물 농도에 비례해서 sub-G1 peak가 증가함을 알 수 있다(Fig. 3).

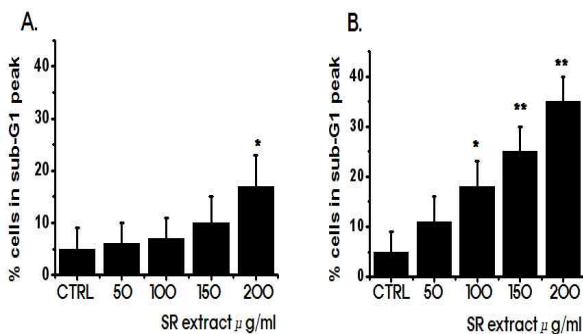


Fig. 3. Sophorae Radix extract leads to increase apoptosis in HT-29 cells. HT-29 cells were incubated with Sophorae Radix extract as indicated dose (μg/ml). After 2 days (A) or 4 days (B), sub-G1 peak was measured by FACScan as described in materials and methods. The values are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean±S.D. *P<0.05. **P<0.01.

4. 고삼추출물의 세포 증식억제 효과의 가역성

고삼추출물이 HT-29세포의 증식 억제 작용의 가역성을 보기 위해, 대조군과 고삼추출물 150 μg/ml을 첨가하여 24시간 동안

배양시킨 후 고삼추출물을 제거한 군, 그리고 고삼추출물 150 μg/ml을 첨가해서 계속 그대로 두 군으로 나누어 관찰하였다. 접종 후 24시간 뒤에 고삼추출물을 첨가하여 24시간 배양했다가 첨가한 고삼추출물을 제거한 날, 즉 접종 1일째는 제거군과 제거하지 않은 군에서의 억제성이 차이가 없었고, 대조군 보다는 유의하게 낮았다. 고삼추출물을 제거한지 3일째 즉 접종 4일째 제거군의 세포억제는 거의 회복되었고 제거하지 않았던 군의 세포억제 약 46 % 보다 세포수가 현저히 많았다. 이러한 경향은 시간이 흐를수록 더욱 현저해짐을 알 수 있다(Fig. 4).

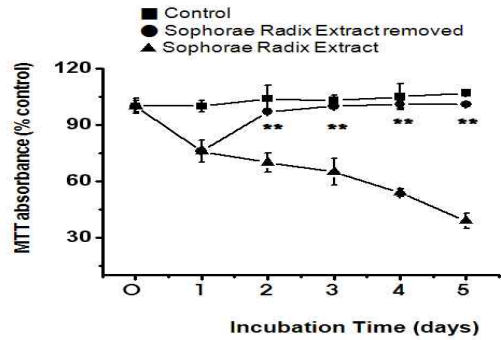


Fig. 4. Reversibility of effects of Sophorae Radix extract in HT-29 cells. Closed squares, control group; closed circles, Sophorae Radix treatment for 24 hours followed by replacement with Sophorae Radix free medium; closed triangles, Sophorae Radix treated group. *P<0.05. **P<0.01.

5. 고삼추출물과 5-Fluorouracil의 세포 증식에 미치는 상호 작용

5-Fluorouracil (5-FU) 10 μM과 고삼추출물 50 μg을 같이 첨가한 군의 세포억제는 약 31%로 5-FU만을 첨가한 군(약 11% 억제) 및 고삼추출물만을 첨가한 군(약 15% 억제)에 비해서 세포억제가 현저히 증가하였다. 고삼추출물의 농도를 높였을 때는 더욱 현저하여, 고삼추출물 150 μg을 5-FU 10 μM과 병용 첨가했을 때에는 배양 3일째 대조군에 비해서 약 62%의 억제 작용을 보였다. 그리고 5-FU 100 μM과 고삼추출물을 병용 첨가했을 때에도 농도에 따르는 증식억제 효과가 각각을 따로 첨가 했을 때보다도 현저하게 증식억제 효과가 증가함을 알 수 있었다. 5-FU 100 μM과 고삼추출물 150 μg을 병용 투여 하였을 때에는 약 93% 억제로 세포가 거의 없을 정도로 그 증식 억제 작용이 뚜렷하였다 (Table 1).

Table 1. Effects of Sophorae Radix Extract(SR) and/or 5-Fluorouracil (5-FU) at varied concentrations on growth of HT-29 human colorectal adenocarcinoma cells after 3 days of treatment

SR(μg)± 5-FU	Inhibition rate(%)
Control	0
SR (50)	15
SR (150)	39
5-FU (10 μg)	11
5-FU (100 μg)	41
5-FU (10μg) + SR (50)	31
5-FU (10μg) + SR (150)	62
5-FU (100μg) + SR (50)	73
5-FU (100μg) + SR (150)	93

고찰

대장암은 대장의 가장 안쪽 표면인 점막에서 발생하는 아주 흔한 암으로써 최근 식생활 등의 환경요인이 서구화되어 감에 따라 그 발생빈도는 계속 증가하고 있어 우리나라의 경우 소화기암 중에서는 위암 다음으로 두 번째로 흔히 발생하는 병이다¹⁵⁾. 대장암의 치료는 수술적 요법에 방사선 치료 및 화학요법을 병행하여 사용하고 있으며 대부분 효율적이지만 잘 알려진 바와 같이 심각한 부작용을 가지는 cytotoxic 화학 치료 요법에 기반을 두고 있기 때문에 문제가 되고 있다. 따라서 최근에는 한방추출물로부터 항암활성을 갖는 물질을 분리하고 이를 암치료에 적용하려는 시도가 많이 이루어지고 있는 추세이다¹⁶⁾.

도독놈의 지팡이(*Sophora Flavescens* Ait)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 초본식물로 너삼 이라고도 부르며 우리나라 전역에 자생한다. 한방에서는 이뿌리의 주피를 거의 벗긴 뿌리를 고삼(*Sophora Radix*)이라 한다. 고삼은 예전부터 한방에서 황달, 간질, 나력, 헤열, 이뇨, 진통, 구충제 내복용으로 쓰이고, 또한 강정제로 민간 약제로 이용되어 왔으며, 또한 흉복부의 병증에서 心腹結氣, 癰, 疔 및 積聚 등의 치료에 사용해 왔으며¹⁷⁾, 소염(消炎)작용이 뛰어나고 심한 가려움증의 피부 질환에 전액을 외용한다고 알려지고 있다. 현재까지 알려진 고삼의 성분으로는 alkaloid, flavonoid, saponine¹⁸⁾ 등이 알려져 있다. 또한 다양한 연구가 진행되어 심장내피세포에서 xanthine의한 세포독성을 막는 작용¹⁹⁾, 항균 작용²⁰⁾, 항염증 작용²¹⁾, 피부 미생물의 억제 효과²²⁾ 등이 보고되고 있고, 또한 항암작용도 알려지고 있다²³⁾. 하지만 다른 작용보다 항암에 대한 연구는 거의 되어 있지 않는 실정인데 반해 대장암 발병률은 급증하고 있다. 2008년 1년간 대장암으로 진료받은 환자는 7만5822명으로 2001년(2만8000명)보다 세 배 가까이 늘었다²⁴⁾. 한국을 비롯한 아시아 각국에서는 서구에 비하여 발생률이 낮으나 근래에는 식생활이 점차 서구화 되어감에 따라 대장암의 발생률이 증가하고 있다²⁵⁾. 따라서 대장암의 치료 및 예방에 많은 연구가 진행중에 있으며 본 연구에서도 고삼에 의한 대장암 세포에서의 효과를 알아 보았다.

본 연구에서는 고삼추출물에 의한 대장암 세포인 HT-29세포에서의 항암작용을 조사해 보았다. 2일과 4일후에 농도에 의존적으로 고삼추출물에 의해 HT-29세포가 사멸되는 효과를 보았고, caspase 3과 sub-G1 analysis를 통해서 세포 사멸에 apoptosis가 관여함을 알 수 있었다. 또 고삼추출물에 의한 세포독성에 가역성이 존재함을 확인하였고, 고삼추출물과 5-FU와의 병용투여로 5-FU만 투여시보다 좀 더 나은 세포 사멸을 확인 하였다.

김²⁶⁾, 한²⁷⁾ 등이 발표한 논문을 보면 홍화추출물에 의한 항암제와의 병용투여로 위암세포주인 AGS, 대장암세포주인 HT-29에서는 cisplatin, 위암세포주인 MKN45, 대장암세포주인 Widr에서는 Doxorubicin에 의한 세포 사멸효과가 탁월함을 확인하였다. 앞서 말한 논문들에서도 홍화추출물 단독 투여보다는 항암제와의 병용 투여시 상승효과가 있어 증식 억제 작용이 뚜렷하였음을 알 수 있듯이 고삼과 같은 한약재도 항암제와의 병용투여로 눈에 띄는 상승효과를 확인할 수 있었다. 또한 그 외 다양한 한약재제

에 의한 항암제와의 병용효과는 많이 연구되고 있는데 Mitomycin C를 이용하여 백혈구병 세포인 MOLT-4에 9가지 보익제들의 효과를 본 연구도 있고²⁸⁾, 생약복합제제와 항암제의 병용투여로 효과를 본 연구²⁹⁾도 있다. 본 논문은 고삼에 항암제의 효과를 본 논문으로 많이 사용되는 항암제중에 고삼과 함께 투여시 좋은 병용효과를 보이는 것을 확인했고, 암세포중에서도 현재 급증하고 있는 대장암에서의 효과를 본 점에 의의가 있다고 사료된다.

결론

최근 식생활의 변화는 순환기계 질환, 암, 뇌졸중 등 성인병의 증가를 초래하게 되었으며, 이러한 성인병의 치료에 기존의 약물이나 치료방법보다는 식생활의 조절에 의한 예방의학(preventive medicine)에 관심이 높아지고 있다. 최근 이러한 관심에 천연물 식품 및 신약의 개발이 급속히 증가하고 있다. 따라서 고삼과 같은 한약재를 이용한 항암효과에 대한 체계적인 연구가 이루어진다면, 그리고 항암작용이 있는 고삼을 이용한 천연물 신약이 개발된다면 많은 암환자들의 삶의 질 향상에 도움이 될 것이다. 더 나아가 치료약물로서의 개발 이외에도 고삼의 효능을 이용하여 사전에 암 발생을 차단할 수 있는 예방약물로서의 역할도 기대해 볼만하다.

참고문헌

- Potter, J.D., Slattery, M.L., Bostick, R.M., Gapstur, S.M. Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev.* 15(2):499-545, 1993.
- 김미숙, 전점미, 손경희. 대장암 환자의 생활양상에 관한 연구. *성인간호학회지* 14(3):390-400, 2002.
- 김병완, 윤현정, 전현숙, 유형중, 김창현, 박선동. 당귀보혈탕(當歸補血湯)의 배합비율에 따른 대장암 세포주 HCT116 세포사멸 효과. *대한분초학회지* 21(1):37-46, 2006.
- Wu, L., Sato, M.D. Integrated, Molecular Engineering Approaches to Develop Prostate Cancer Gene Therapy. *Curr Gene Ther.* 3(5):452-467, 2003.
- 김홍태, 서창인, 김시영, 허대석, 방영주, 김노경. 진행대장암 환자에 대한 5-flourouracil 및 제조합 감마 인터페론 병용요법의 치료효과. *대한암학회지* 24(5):743-758, 1992.
- 한약조제사고시연구회. 한약재감별능력평가. 학문사, 1996.
- 신민교. 임상분초학. 남산당, pp 314-316, 1986.
- Kee, C.H. The Pharmacology of Chinese Herbs. CRC Press 63, 1993.
- 한의학대학 분초학 편집위원회. 분초학. 2판. 서울, 정음사, p 225, 2011.
- 이현옥, 박남규, 정승일, 김윤철, 백승화. 고삼의 에틸 아세테이트 추출물로부터 항균물질의 분리. *약학회지* 45: 587-590, 2001.

11. 조 훈, 원성란, 양은영, 김종수, 유일수, 류도곤, 이정호, 강길웅, 백승화. 고삼추출물의 항균효과(I). 약학회지 43: 419-422, 1999.
12. 한지숙, 신동화. *Listeria monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 뽕나무 및 고삼 에틴을 추출물의 분획별 효과. 한국식품과학회지 26: 539-545, 1994.
13. Kojima R., Fukushima S., Ueno A., Saik Y. Antitumor activity of Leguminosae plants constituents. I. Antitumor Activity of Constituents of *Sophora subprostrata*. Chem Pharm Bull. 18(12):2555-2563, 1970.
14. Ki Hwan BAE. Antitumor constituents from some Korean medicinal plants. 한국응용약물학회 pp 57-58, 1998.
15. http://www.cancer.go.kr/ncic/cics_f/01/012/index.html
16. 권은미, 정의민, 김경석, 이수경, 최원철, 윤성우. 알리젠 제거 율나무 추출물 위주의 한방치료와 항암화학요법을 병용한 폐암 환자 2례. 대한암한의학회지 14(1):13-20, 2009.
17. 김정아, 한송이, 송호준, 채 한, 권영규, 김병주. 홍화가 인체 위암세포에 미치는 효과. 동의생리병리학회지 25: 466-470, 2010.
18. 정명채, 김진성, 윤상협, 류봉화, 류기원. 반모가 수종의 인체 암세포에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 25(2):202-213, 2004.
19. 육창수, 김성만, 정진모, 정명숙, 김정화, 김승배. 한약의약리 성분. 임상응용, 계축문화사, pp 414-416, 1995.
20. Woo, E.R., Kwak, J.H., Kim, H.J., Park, H. A new prenylated flavonol from the roots of *Sophora flavescens*. JNat Prod. 61(12):1552-15554, 1998.
21. 권강범, 이호승, 김인수, 김인규, 류도곤. 고삼 추출물이 XO/HX에 의해 손상된 혈관내피세포에 미치는 영향(I). 동의생리병리학회지 17: 549-552, 2003.
22. 백승화, 강길웅, 최은영. 고삼 메탄올 추출물의 항균효과에 관한 연구. 기초과학연구지 18: 111-114, 2000.
23. 우무륜, 구영선, 김동희. 고삼이 알리지성 염증 반응에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구원 논문집. 15: 135-148, 2006.
24. 국민건강보험공단, <http://www.nhic.or.kr/portal/site/main/>
25. 이주영, 정성창, 박순홍, 김보완, 김정국, 하승우, 이신원, 정귀화. 말단비대증 환자에서 대장용종의 유병율에 영향을 미치는 요인. 대한내과학회지 68(7):55-60, 2005.
26. 김정아, 한송이, 송호준, 채한, 권영규, 김병주. 홍화가 인체 위암세포에 미치는 효과. 동의생리병리학회지 25: 466-470, 2011.
27. 한송이, 김정아, 송호준, 채한, 권영규, 김병주. 홍화가 인체 대장암세포에 미치는 효과. 한국 한의학 연구원 논문집, 17(2):129-134, 2011.
28. 안문생, 문병순, 김세길. 항암제(抗癌劑) Mitomycin C와 수종(數種) 보익제(補益劑)의 병용투여(併用投與) 효과(效果)에 대한 연구(研究). 대한한방내과학회지 15(1):60-79, 1994.
29. 홍남두, 김종우, 김남제. 생약복합제제(生藥複合製劑)와 항암제(抗癌劑)의 병용투여(併用投與)에 관한 연구(研究). 생약학회지 23(2):89-95, 1992.