

비소세포 폐암 세포 (NCI-H520) 이식 마우스에서 포모사 자두 추출물의 면역활성 및 악액질 억제효과

손영숙^{1#}, 이상남², 박지하^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 대구한의대학교 한의과대학 기공학교실

Anticancer and Immunomodulatory Effects of Formosa Plum Extracts on Non-small Cell Lung Carcinoma, NCI-H520, Xenograft Mice

Young-Sook Son^{1#}, Sang-nam Lee², Ji-Ha Park^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Korea Medicine Daegu Haany University, Republic of Korea

2 : Department of Qigong, College of Korea Medicine Daegu Haany University, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The object of this study was to observe anticancer and immunomodulatory effects of Formosa plum aqueous extracts (PLe) on non-small cell lung carcinoma (squamous epithelial carcinoma), NCI-H520, xenograft Balb/c nu-nu nude mice.

Method : Three different dosages of PLe, 50, 100 and 200 mg/kg were orally administered once a day for 28 days from 11 days after tumor cell inoculation. Five groups, each of seven mice per group were used in the present study as follows. Tumor volume and weights, serum interferon (IFN)- γ levels, serum IL-6 were observed with tumor mass and lymphatic organ histopathology to detect anticancer and immunomodulatory effects.

Result : Although no meaningful changes on the tumor weights and volumes were observed after treatment of all three different dosages of PLe, decreases of tumor cell volumes in tumor masses were dose-dependently decreased mediated by increases of apoptosis among tumor cells by treatment of PLe 100 and 200 mg/kg as compared with tumor-bearing control. In addition, decreases on the body weight and gains were also demonstrated in tumor-bearing control with increases of serum IL-6 levels.

Conclusion : The results obtained in this study suggest that over 50 mg/kg of PLe showed favorable immunomodulatory and anticachexic effects with anticancer effects in 100 and 200 mg/kg of PLe treated groups on the NCI-H520 cell xenograft. However, detail mechanism studies should be conducted in future with the screening of the biological active compounds in this herb.

Key words : Formosa Plum Extracts, NCI-H520, Xenograft Mice, Cachexia

I. 서 론

2000년부터 우리나라의 암 사망률 1위를 차지하고 있는 폐암이며, 지속적인 증가 추세에 있다. 폐암은 진단 당시 15%만이 국소적인 병변을 가지고 있고, 약 25% 정도에서는

지역 림프절 침범이 있고, 나머지 55% 이상에서 이미 원격전이
이가 있기 때문에 조기 진단이 힘들어 치료가 어려운 질환으로
간주되고 있다. 1999년 세계보건기구가 제정한 분류법에 따
르면 원발성 폐암의 분류는 모두 9가지로 분류하고 있으며,
이중 소세포암, 대세포암, 편평세포암, 선암의 4가지 조직형이

*Corresponding author : Ji Ha Park, Department of Korea Medicine, Daegu Hanny University.
· Tel : +82-53-819-1874 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : circle36@dhu.ac.kr
#First author : Young Sook Son, 28-3, Ipseok-ro 1-gil, Dong-gu, Daegu, Republic of Korea.
· Tel : +82-53-819-1874 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : S678@daum.net
· Received : 12 Nov, 2020 · Revised : 19 Nov, 2020 · Accepted : 25 Nov, 2020

전체의 88%를 차지하고 있다. 세포암은 20% 정도에 해당하고, 대세포암, 편평세포암, 선암이 전체의 80%로 대부분을 차지한다. 소임상적으로 편평세포암, 선암, 대세포암은 병기판정 및 치료방법이 동일하기 때문에 비소세포암으로 총칭하고 있다¹⁾. NCI-H520은 사람의 폐암 세포에서 유래한 대표적인 편평세포암 세포주로 비소세포 폐암 연구에 가장 널리 사용되고 있는 세포 중 하나이다^{2,3,4)}.

종양 환자에게서 흔히 보이는 악액질은 종양으로 인해 전신 쇠약, 소화불량, 빈혈, 부종 등의 임상 증후군을 보이며, 각종 대사 장애를 일으킨다. 체중감소를 위한 식이조절이나 운동 없이도 근육량 및 체중이 감소하게 되어 암의 발병에 의한 항암치료를 견디지 못해 생존기간이 현저히 줄어들게 되며, 특히 위장관에 발생한 췌장암, 위암에서 많이 발생하는 것으로 알려져 있다.

최근 자신의 면역세포를 자극시켜 cytokine 생성을 유도함으로써 종양에 대한 생체 방어를 강화시키는 연구가 다양하게 진행되어 면역계 자극을 통한 항암제 개발이 주목 받고 있으나^{5,6)}, 대부분의 항암제들은 각종 부작용을 나타내고 있으므로, 최근 자연식품 중에서 기능성 물질을 섭취하려는 요구의 증가와 함께 노화와 암, 당뇨 등의 성인병에 대처방안으로 질병의 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물질들이 주목 받고 있다^{7,8)}.

자두는 미국 농무부에서 제시한 food pyramid에서 종양 발생 위험을 줄일 수 있는 과일로 권장되고 있으며⁹⁾, 자두의 폴리페놀 성분이 종양 형성을 억제하는 효과가 큰 것으로 보고된 바 있으며¹⁰⁾, 비교적 강한 면역활성 효과가 이미 인정되어 있다^{11,12,13,14)}. 또한 포모사 자두를 포함한 한국산 자두 추출물의 자궁경부암에 대한 항암효과가 실험적으로 보고되어 있고¹⁵⁾, 간암¹⁶⁾ 및 유방암¹⁷⁾에 대한 항암효과가 알려져 있으나, 현재 항암제의 효력평가에 가장 보편적으로 이용되고 있는 종양세포 이식모델^{18,19,20)}에 대한 자두 추출물의 항암효과는 찾아볼 수 없으며, 종양과 관련된 면역억제 및 악액질 등에 대한 효력 평가 역시 찾아볼 수 없다. 따라서 본 연구에서는 우리나라에서 많이 생산되는 *P. americana*, *P. simonii*와 *P. salicina*의 교잡종인 포모사 자두 물 추출물의 항암, 면역활성 및 종양관련 악액질 억제 효과를 사람의 폐암 세포에서 유래한 대표적인 편평세포암 세포주인 NCI-H520을 이식한 누드 마우스를 이용하여 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 포모사 자두 추출물 제조

본 실험에 사용된 포모사 자두는 경북 의성 농협에서 매입한 것을 관능검사를 통하여 선정하여 사용 하였으며, 선정된 포모사 자두 10 g을 취하여 증제수 100 ml로 80℃에서 3시간 동안 3번 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 감압 농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 동결 건조시켰으며 추출물은 2.16 g으로 수득율은 21.60%였다.

2. 실험동물 및 사육환경

70마리의 수컷 Balb/c nu-nu nude 마우스 (4-wk old upon receipt, SLC, Japan)를 14일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간 동안 온도 20-25℃와 습도 30-35%가 조절된 무균 사육실에서 마우스용 filtered cap polycarbonate 사육상자에 4마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기는 12시간 주기로 조절하였으며, 멸균 사료와 멸균 증류수는 자유롭게 공급하였다. 이중 7마리는 정상 대조군으로 사용하였으며, 53마리는 등쪽에 제모한 피하에 NCI-H520을 이식한 10일 후, 종양 volume이 대략 94 mm³ 되는 실험동물만 선정하여, 군당 7마리씩, 총 28마리의 종양 이식 마우스와 7마리의 정상 대조군을 실험에 사용하였다. 모든 실험동물은 투여 시작일 및 최종 부검일에 각각 18시간 정도 절식을 실시하였으며, 이 기간에도 음수는 자유롭게 공급하였고, picric acid로 개체를 식별하였다.

3. 실험군 분리 및 약물의 투여

실험군은 총 7마리씩 5개 군으로 종양세포 이식 대신 phosphate buffered saline (PBS)을 주입한 정상 대조군, 종양세포 이식 후 매체인 멸균 증류수 투여 대조군, 종양세포 이식 후 포모사 자두 추출물 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg 투여군으로 구분하여 실험하였다. 포모사 자두 추출물은 각각 적정량을 멸균 증류수에 용해시켜 동물 체중 kg 당 10 ml의 용량으로 종양세포 이식 11일 후부터 매일 1회씩 28일간 급속제 존재가 부착된 1 ml 주사기를 이용하여 강제 경구 투여하였다. 정상 및 종양 이식 대조군에서는 동일한 용량의 멸균 증류수를 각각 동일한 방법으로 투여하였다.

4. 종양세포 이식

동물 이식 전 NCI-H520 종양세포는 Balb/c nu-nu mouse의 피하에 7-10일 간격으로 계대 배양 하여 보존하면서 사용하였고, 마우스의 등쪽 제모 부위에 NCI-H520 종양세포 부유액 0.2 ml (1×10⁷ cell/mouse) 씩을 피하 이식하여, 고휘 종괴를 형성시켰다. NCI-H520 종양세포 주 이식 11일 (종양 volume; 94 mm³ 전후) 후부터 약물을 28일간 경구 투여하였다.

5. 종양 volume 측정

종양이식 후 정상 대조군을 제외한 모든 실험동물에서 종양의 volume을 투여 시작 1일전 (종양세포 이식 10일 후), 투여 시작일, 투여 2, 4, 7, 14, 21 및 최종 희생일에 측정하였다.

$$\text{Tumor Volume (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{length} \times \text{width}^2$$

6. 종양 중량 측정

정상 대조군을 제외한 모든 실험동물에서 최종 희생일에 종양을 적출하여, 주변 결합조직을 제거한 다음 절대 중량을 전자저울을 이용하여 측정하였다. 또한 각 개체의 체중에 따른 차이를 줄이기 위하여, 최종 희생의 체중에 대한 상대 중량

(% of body weight)을 각각 산출하였다.

$$\begin{aligned} &\text{Relative Tumor Weight (\% vs body weights)} \\ &= (\text{Absolute tumor weights} / \text{body weight at sacrifice}) \\ &\quad \times 100 \end{aligned}$$

7. 혈중 IL-6 함량 측정

정상 대조군을 포함한 모든 실험동물에서 최종 희생일에 25 mg/kg의 Zoletile mixture (Zoletile 50; Virbac Lab., France) 복강 주사로 마취한 다음, 개복하여 복대정맥을 노출하고, 1 mL의 혈액을 채취하고, 상온 13,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여, 혈청을 분리하였다. 혈중 IL-6 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit (R&D Systems Inc., MN, USA)를 이용하여, 각각 pg/mL 단위로 측정하였다²¹⁾.

8. 혈중 IFN- γ 함량의 측정

분리된 혈청에서, Mouse IFN- γ ELISA kit (BD Biosciences/Pharmingen, CA, USA)를 이용하여, 측정 manual에 따라 pg/mL 단위로 측정하였다.

9. 조직 병리학적 관찰

최종 희생일에 종양을 10% 중성 포르말린에 18시간 이상 고정시킨 다음, 탈수를 거쳐 일반적인 방법으로 파리핀 포매를 실시하고, 3-4 μ m의 절편을 제작하여, Hematoxylin 및 Eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 이후 광학현미경하에서 각각의 조

직 병리학적 관찰을 실시하였다.

세로로 절단한 1 mm²의 종양 조직에서 종양 세포가 차지하는 비율과 종양세포 중 apoptosis를 나타내는 세포의 비율을 각각 %/1 mm² 및 %/tumor cells 단위로 자동 조직영상분석장치 (DMI CCD image analyzer; DMI, Daegu, Korea)를 이용하여 측정하였다.

10. 통계처리

모든 수치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 다중비교 검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증 하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences (LSD) test로 사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U test를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

III. 결 과

1. 종양 volume의 변화

모든 3 용량의 포모사 자두 추출물 투여군에서는 종양이식 대조군과 유사한 종양 volume의 변화를 나타내었다 (Table 1).

Table 1. Changes on the Tumor Volume Changes after Formosa Plum Extracts Administrations in NCI-H520 Cell Inoculated Nude Mice

Groups	Tumor volumes at		Tumor volume changes (B - A)
	Start of administration (A)	Sacrifice (B)	
Controls			
Tumor-bearing	116.57 \pm 4.63	1880.74 \pm 42.13	1764.17 \pm 45.76
Formosa Plum extracts			
75 mg/kg	115.56 \pm 4.92	1886.91 \pm 71.54	1771.36 \pm 69.89
150 mg/kg	115.71 \pm 7.40	1873.46 \pm 46.39	1757.74 \pm 43.12
300 mg/kg	116.50 \pm 6.32	1876.17 \pm 31.58	1759.67 \pm 32.09

Values are expressed Mean \pm SD of seven mice, mm³.

2. 종양 증량의 변화

모든 3가지 용량의 포모사 자두 추출물 투여군에서 각각 종양이식 대조군과 유사한 종양 상대 및 절대 증량의 변화를 각각 나타내었다.

3. 혈중 IL-6 함량의 변화

종양이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는

($p < 0.01$) 혈중 IL-6 함량의 증가가 인정되었고, 3가지 용량의 포모사 자두 추출물 투여군에서 각각 종양이식 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 혈중 IL-6 함량의 감소가 인정되었다 (Fig. 1).

혈중 IL-6 함량은 정상 대조군, 종양이식 대조군, 포모사 자두 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여군에서 각각 1.98 \pm 1.26, 12.15 \pm 1.72, 10.11 \pm 0.96, 9.16 \pm 1.14 및 8.03 \pm 1.45 pg/mL로 관찰되었다 (Fig. 1).

Groups	Tumor weights	
	Absolute weights (g)	Relative weights (% of body weights)
Controls		
Tumor-bearing	1,485 ± 0.149	8.165 ± 0.765
Formosa Plum extracts		
75 mg/kg	1,539 ± 0.183	7.895 ± 0.784
150 mg/kg	1,550 ± 0.170	7.862 ± 0.965
300 mg/kg	1,566 ± 0.133	7.547 ± 0.695

Values are expressed Mean ± SD of seven mice, mm³.

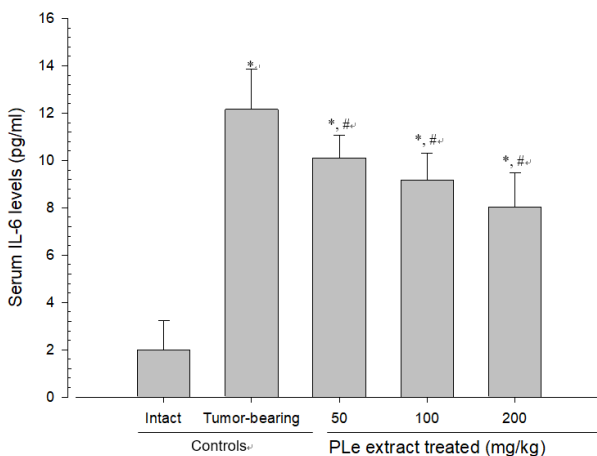


Fig 1. Changes of the Serum IL-6 Levels after Fomosa Plum Extracts Administrations in NCI-H520 Cell Inoculated Nude Mice PLe, Formosa plums aqueous extracts; IL, interleukin; Values are expressed mean ± SD of seven mice, pg/ml of sera; *p < 0.01 compared with intact control; #p < 0.01 compared with tumor-bearing control.

4. 혈중 IFN-γ 함량의 변화

종양이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 (p < 0.01) 혈중 IFN-γ 함량의 감소가 인정되었고, 3가지 용량의 모든 포모사 자두 추출물 투여군에서 각각 종양이식 대조군에 비해 유의성 있는 (p < 0.01 또는 p < 0.05) 혈중 IFN-γ 함량의 증가가 인정되었다 (Fig. 2).

혈중 IFN-γ 함량은 정상 대조군, 종양이식 대조군, 포모사 자두 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여군에서 각각 165.63 ± 30.91, 87.20 ± 12.05, 103.86 ± 10.48, 117.83 ± 14.88 및 126.96 ± 11.08 pg/ml로 관찰되었다 (Fig. 2).

5. 종괴의 조직병리학적 변화

종양이식 대조군에서는 비교적 잘 분화된 NCI-H520 암세포로 치밀하게 구성되어 있었으며, 일부 세포에서 apoptosis에 의한 호산성 및 핵 농축이 인정되었다. 한편 포모사 자두 추출물 100 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 종양이식 대조군에 비해 apoptotic 세포의 현저한 증가가 인정되었고, 결과적으로 NCI-H520 세포가 차지하는 비율 역시 현저히 감소되었다.

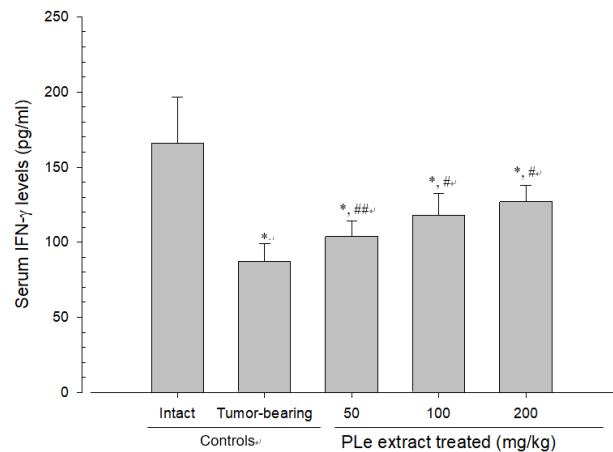


Fig 2. Changes of the Serum IFN-γ Levels after Fomosa Plum Extracts Administrations in NCI-H520 Cell Inoculated Nude Mice PLe, Formosa plums aqueous extracts; IFN, interferon; Values are expressed mean ± SD of seven mice, pg/ml of sera; * p < 0.01 compared with intact control; #p < 0.01 and ##p < 0.05 compared with tumor-bearing control.

포모사 자두 추출물 50 mg/kg 투여군에서는 종양 이식 대조군과 유사한 종괴의 조직병리학적 변화를 나타내었다 (Fig. 3).

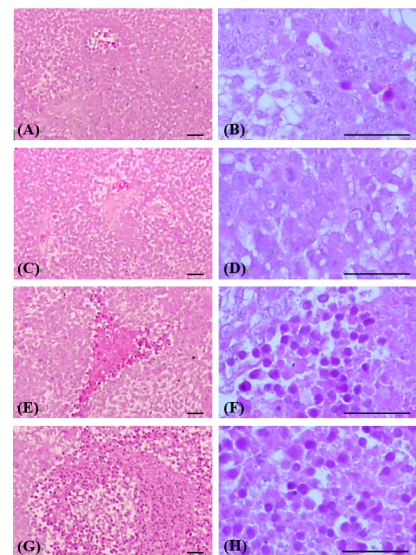


Fig 3. Changes on the Tumor Mass Histopathological Profiles after Fomosa Plum Extracts Administrations in NCI-H520 Cell Inoculated Nude Mice PLe, Formosa plums aqueous extracts; A, B: tumor-bearing control; C, D: PLe 50 mg/kg treated mice; E, F: PLe 100 mg/kg treated mice; G, H: PLe 200 mg/kg treated mice.

6. 종양조직에서 종양세포가 차지하는 세포의 비율 및 apoptotic 세포의 수

포모사 자두 추출물 100 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 종양이식 대조군에 비해 유의성 있는 (p < 0.01) 종양 조직 1 mm² 당 NCI-H520 세포가 차지하는 비율의 감소 및 apoptotic 세포의 수적 증가가 인정되었다. 한편 포모사 자두 추출물 50 mg/kg 투여군에서는 종양이식 대조군과 유사한 종양 조직내

종양세포비율의 감소와 apoptotic 세포의 수적 변화를 각각 나타내었다.

종양 조직에서 종양세포가 차지하는 세포의 비율은 종양이식 대조군, 포모사 자두 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여군에서 각각 86.76 ± 8.66 , 84.78 ± 9.08 , 70.10 ± 6.60 및 54.45 ± 8.84 %/2 of tumor mass로 관찰되었다 (Fig. 4).

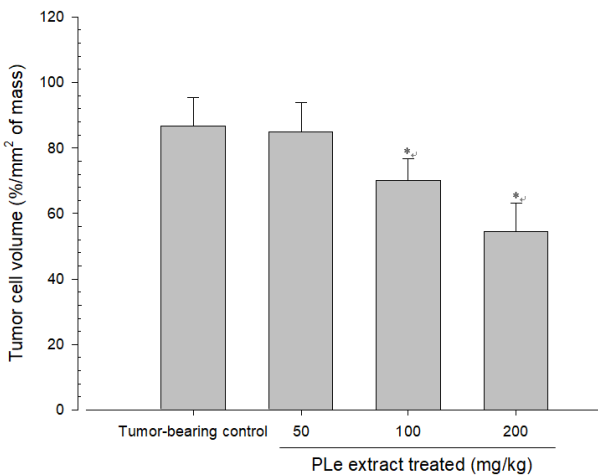


Fig 4. Changes of the Tumor Cell Volumes in the Tumor Masses after Fomosa Plum Extracts Administrations in NCI-H520 Cell Inoculated Nude Mice

PLe, Formosa plums aqueous extracts; Values are expressed mean \pm SD of seven mice, %/2 of mass; *p < 0.01 compared with intact control.

종양 조직에서 apoptotic 세포의 수는 종양이식 대조군, 포모사 자두 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여군에서 각각 16.60 ± 5.25 , 16.92 ± 3.96 , 30.49 ± 3.51 및 42.85 ± 5.62 %/tumor cells로 관찰되었다 (Fig. 5).

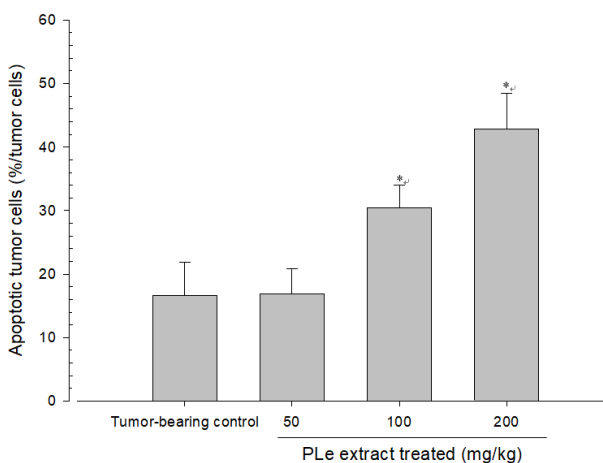


Fig 5. Changes of the Apoptotic Tumor Cell Numbers in the Tumor Masses after Fomosa Plum Extracts Administrations in NCI-H520 Cell Inoculated Nude Mice

PLe, Formosa plums aqueous extracts; Values are expressed mean \pm SD of seven mice, %/tumor cells; *p < 0.01 compared with intact control.

IV. 고찰

누드 마우스는 동종 유래의 종양 세포뿐만 아니라, 사람 유래의 종양세포 역시 이식 가능하며, 항암제 개발 시 가장 흔히 사용되는 실험동물이며^{18,19,20}, 이 모델에서 항암효과에 대한 평가는 주로 이식한 종괴의 성장 억제를 기준으로 이루어지고 있다^{22,23}. 본 실험의 결과, 종양 상대 중량에 대한 성장 억제가 포모사 자두 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여군에서 각각 -3.30, -3.72 및 -7.57%로 관찰되어, 포모사 자두 추출물 투여군에서는 의미 있는 종괴 중량의 변화는 인정되지 않았으며, 종괴 volume 역시 실험 전 기간 동안 종양 이식 대조군과 유사하게 관찰되었다. 이를 통해 볼 때 포모사 자두 추출물의 직접적인 항암 효과는 인정되지 않았으나, 조직 병리학적으로 종괴내 apoptosis 세포의 증가에 의한 종양 세포의 수적 감소가 포모사 자두 추출물 100 및 200 mg/kg 투여군에서 인정되어, 어느 정도의 함암 효과가 인정되었다.

IFN- γ 는 CD8+ T 림프구, Th1 세포 및 natural killer (NK) 세포에서 분비되며, B 및 T 세포의 기능에 영향을 미치고, NK 세포와 대식세포의 기능을 강화시킨다²⁴. 본 실험의 결과, 이전의 보고들^{25,26,27}과 유사하게, 사람 비소세포 폐암 세포인 NCI-H520의 이식에 의해 면역활성cytokine인 IFN- γ 의 혈중 함량의 감소가 관찰되었으며, 3가지 용량의 모든 포모사 자두 추출물 투여에 의해 매우 효과적으로 억제되었다.

종양에 있어서 매우 중요한 부작용의 일환인 악액질은 악성 종양 환자에서 삶의 질을 저하시키는 중요한 원인이 되고 있으며, 현저한 영양실조, 탈수, 체중감소 등을 포함한 각종 만성 합병증을 초래하는 것으로 알려져 있다^{28,29,30}. 현재까지의 다양한 연구^{31,32,33}에 따르면, 종양세포에서 생산 분비되는 IL-6는 종양 악액질의 원인 중 하나로 알려져 있으며, 실제 종양 환자에서도 현저한 혈중 IL-6 함량의 증가가 일어나는 것으로 알려져 있다³⁰. 본 실험의 결과에서도, 현저한 혈중 IL-6 함량의 증가와 함께, 체중의 감소, 축적 지방조직의 위축과 감소가 각각 인정되었다. 이러한 종양관련 악액질 현상이 포모사 자두 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 유의성 있게 억제되었으며, 포모사 자두 추출물이 종양환자의 삶의 질을 높이기 위해 적용 가능할 것으로 판단된다.

V. 결론

포모사 자두 추출물의 NCI-H520 이식 동물모델에서 효과 검증에 위한 연구 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 포모사 자두 추출물에 의한 종양의 중량 및 volume의 의미 있는 감소는 인정되지 않았다.
2. 포모사 자두 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여군에서 각각 종양이식 대조군에 비해 유의성 있는 혈중 IL-6 함량의 감소가 인정되었다.
3. 포모사 자두 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여군에서 각각 종양이식 대조군에 비해 유의성 있는 IFN- γ 함량의

증가가 인정되었다.

- 100 mg/kg 이상의 포모사 자두 추출물은 apoptosis 증가 및 면역 활성화에 의해 조직병리학적으로 종양세포의 수적 감소를 일으키는 것으로 관찰되었으며, 중앙관련 면역 억제 및 악액질 현상을 비교적 효과적으로 억제하는 것으로 관찰되었다.

References

1. In Jae oh, Investigation of Effective Combination of Anti-cancer Drugs and Radiation Therapy against Non-small Cell Lung Cancer using Cell Lines, Chonnam Nation University Graduate School, 2008, pp. 1-32.
2. Shimizu Y, Kinoshita I, Kikuchi J, Yamazaki K, Nishimura M, Birrer MJ, Dosaka-Akita H, Growth inhibition of non-small cell lung cancer cells by AP-1 blockade using a cJun dominant-negative mutant, *Br J Cancer*. 2008;98:915-922.
3. Cooks T, Schmidt M, Bittan H, Lazarov E, Arazi L, Kelson I, Keisari Y. Local control of lung derived tumors by diffusing alpha-emitting atoms released from intratumoral wires loaded with radium-224. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009;74:966-973.
4. Curran W, Scott C, Langer C, Komaki R, Lee JS, Hauser S. Phase III comparison of sequential vs concurrent chemoradiation for patients (Pts) with unresected stage III non-small cell lung cancer (NSCLC): Initial report of radiation therapy oncology group (RTPG) 9410. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2000;19:484a, Abstract 1891.
5. Ha ES, Hwang SH, Shin KS, Yu KW, Lee KH, Choi JS, Park WM, Yoon TJ. Anti-metastatic activity of glycoprotein fractionated from *Acanthopanax senticosus*, involvement of NK-cell and macrophage activation, *Arch Pharm Res*. 2004;27:217-224.
6. Yu GM, Hwang IG. In vitro effect of Yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) extracts on proliferation of human prostate cancer cells and antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 2004;36:339-344.
7. Lee SH, Lillehoj HS, Lillehoj EP, Cho SM, Park DW, Hong YH, Chun HK, Park HJ. Immunomodulatory properties of dietary plum on coccidiosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2008;31:389-402.
8. Ham YA, Choi HJ, Kim SH, Chung MJ, Ham SS. Antimutagenic and antitumor effects of *Adenophora triphylla* Extracts, *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2009;38:25-31
9. USDA, Food and Nutrition Information Center, Food Guide Pyramid, Steps to a healthier you, 2005, Available from <http://www.mypyramid.gov>.
10. Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: Evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:284-291.
11. Puri A, Sahai R, Singh KL, Saxena RP, Tandon JS, Saxena KC. Immunostimulant activity of dry fruits and plant materials used in indian traditional medical system for mothers after child birth and invalids. *J Ethnopharmacol*. 2000;71:89-92.
12. Safonova GM, Shilov Y, Perevozchikov AB. Protective effects of plant polyphenols on the immune system in acute stress. *Dokl Biol Sci*. 2001;378:233-235.
13. Lee HB, Kim HJ, Chong MS, Cho HE, Choi YH, Lim KS, Lee KN. Physiological activity of extracts from mixed culture of medical herbs and mycelia of *Tricholoma matsutake* and *Cordyceps militaris* by fermentation. *Kor J Herbology*. 2008;23:1-8.
14. Lee SH, Lillehoj HS, Cho SM, Chun HK, Park HJ, Lim CI, Lillehoj EP. Immunostimulatory effects of oriental plum (*Prunus salicina* Lindl.), *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2009;32:407-417
15. Man-Deuk Han, Dur-Han Kweon, Byung-Tae Kang, Jae-Woo-Lee, Ok Hyun Yoon. The Effects of Plum Extracts on the Proliferation of Human Epithelial Cell and Human Cervical Cancer Cells. *J East Asian Soc Dietary Life*. 2007;17:710-718.
16. Yu MH, Gwon Im H, Gyu Lee S, Kim DI, Jeong Seo H, Lee IS. Inhibitory effect of immature plum on PMA-induced MMP-9 expression in human hepatocellular carcinoma. *Nat Prod Res*. 2009;23:704-718.
17. Yu MH, Im HG, Lee SO, Sung C, Park DC, Lee IS. Induction of apoptosis by immature fruits of *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Int J Food Sci Nutr*. 2007;58:42-53.
18. Foster PA. Steroid metabolism in breast cancer. *Minerva Endocrinol*. 2008;33:27-37.
19. Clark JC, Dass CR, Choong PF. Development of chondrosarcoma animal models for assessment of adjuvant therapy. *ANZ J Surg*. 2009;79:327-336.
20. Kim S. Animal models of cancer in the head and neck region. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2009;2:55-60.
21. Iizuka N, Miyamoto K, Hazama S, Yoshino S, Yoshimura K, Okita K, Fukumoto T, Yamamoto S, Tangoku A, Oka M. Anticachectic effects of *Coptidis rhizoma*, an anti-inflammatory herb, on esophageal cancer cells that produce interleukin 6. *Cancer Lett*. 2000;158:35-41.
22. Nishimura G, Yanoma S, Mizuno H, Kawakami K,

- Tsukuda M. An antioxidant, probucol, induces anti-angiogenesis and apoptosis in athymic nude mouse xenografted human head and neck squamous carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90:1224-1230.
23. Liu L, Jiang Z, Teng GJ, Song JZ, Zhang DS, Guo QM, Fang W, He SC, Guo JH. Clinical and experimental study on regional administration of phosphorus 32 glass microspheres in treating hepatic carcinoma. *World J Gastroenterol.* 1999;5:492-505.
 24. Isaacs A. Lymphokines and Cytokines. In: *Immunology an introduction* (Tizard IR editor), 4th edition, Saunders: Philadelphia, 1995;155-169.
 25. Sogn JA. Tumor immunology: the glass is half full. *Immunity.* 1998;9:757-763.
 26. Finke J, Ferrone S, Frey A, Mufson A, Ochoa A. Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol Today.* 1999;20:158-160.
 27. Pawelec G, Heinzl S, Kiessling R, Müller L, Ouyang Q, Zeuthen J. Escape mechanisms in tumor immunity: a year 2000 update. *Crit Rev Oncog.* 2000;11:97-133.
 28. Tisdale MJ. Biology of cachexia. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:1763-1773.
 29. Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: are neuropeptides the key? *Cancer Res.* 1999;59:4493-4501.
 30. Okie WR, Weinberger JH. Plums. In Janick J and Moore N (eds). *Fruit breeding, Vol (I), Tree and tropical fruits.* John Wiley & Sons, Inc., New York, 1996, pp 559-607.
 31. Fujita J, Tsujinaka T, Yano M, Ebisui C, Saito H, Katsume A, Akamatsu K, Ohsugi Y, Shiozaki H, Monden M. Anti-interleukin-6 receptor antibody prevents muscle atrophy in colon-26 adenocarcinoma-bearing mice with modulation of lysosomal and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways. *Int J Cancer.* 1996;68:637-643.
 32. Kurebayashi J, Yamamoto S, Otsuki T, Sonoo H. Medroxyprogesterone acetate inhibits interleukin 6 secretion from KPL-4 human breast cancer cells both in vitro and in vivo: a possible mechanism of the anticachectic effect. *Br J Cancer.* 1999;79:631-636.
 33. Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE, Hus sain EA, Damayanti-Wood BI, Farnsworth NR. Chemical composition and potential health effects of prunes: A functional food? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2001;41:251-286.