

## 목련과 수목의 추출성분에 대한 세포독성평가<sup>1</sup>

김영균<sup>2</sup> · 고영남<sup>2</sup> · 김용만<sup>3</sup> · 양현옥<sup>4</sup>

## Evaluation of Cell Cytotoxicity on the extractives of Magnoliaceae<sup>1</sup>

Young-Kyoon Kim<sup>2</sup> · Young-Nam Ko<sup>2</sup> · Yong-Man Kim<sup>3</sup> · Hyun-Ok Yang<sup>4</sup>

### 요 약

8가지 목련과 수목의 수피 및 잔가지를 채집하고 건조하여 MeOH로 열추출하고, 사람의 암세포에 대한 독성을 측정하였다. 이중 일본 목련이 강한 세포독성이 관찰되어 세포독성을 갖는 순수한 물질 즉, magnonol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether, linodenine, anonaine, asimilobine에 대한 세포독성을 측정하였다. 그리고 암세포 살해능 및 apoptosis 유도능을 측정한 결과 magnonol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether가 초기단계의 apoptosis 유도에 기인함을 밝혔다.

따라서 세포독성이 강한 물질로 판명된 magnonol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether에 대한 정량분석을 위해서 MeOH 추출물을 클로로포름, 에틸아세테이트, 수용성 분획으로 나누고, 에틸아세테이트 분획을 n-Hexane : Acetone(4:1, v/v)용매로 silica gel chromatography를 한 후, 이들 화합물이 함유된 분획을 만들었다. 이 분획을 HPLC system으로 이들의 함량을 측정한 결과 MeOH 추출물에 대하여 각각 0.9%, 0.3%, 0.24%가 있음을 밝혔다.

### ABSTRACT

The 90% methanol extracts of eight magnoliaceae plants were collected and tested the cytotoxicity against SK-OV-3 and SiHa cells. Also six pure compounds such as magnonol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether, linodenine, anonaine, asimilobine which were previously isolated from *Magnolia obovata* Thunb. were evaluated the cytotoxicities and their mechanism study using the Lactate dehydrogenase assay(LDH) and FACScan analysis system.

1. 접수 2001년 6월 14일 Received on June 14, 2001

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비 (KRF-99-G0087)에 의하여 연구되었음.

2. 국민대학교 삼림과학대학 임산공학과 Department of Forest Products, College of Forest Science, Kookmin University
3. 울산대학교 의과대학 산부인과학교실 Department of Obstetrics & Gynecology, College of Medicine, University of Ulsan
4. 울산대학교 아산생명과학연구소 전통의학 연구실 Department of Traditional Medicine, Asan Institute for Life Sciences, University of Ulsan

Of the tested six compounds, magnolol, honokiol and dihydroxybiphenyl ether showed high cytotoxicities against human cancer cell lines, SK-OV-3 and SiHa cells. In addition, one of the plausible mechanisms of their antitumor activities suggested that they could induce the early stage of apoptosis.

For the quantitative analysis, the methanol extractives were fractionated with chloroform, ethylacetate, H<sub>2</sub>O and then the ethylacetate fraction was chromatographed on silica gel using n-Hexane : Acetone(4:1, v/v) as eluent. This fraction was subjected for the quantitative analysis in the HPLC system.

The result suggested that the methanol extractives of *Magnolia obovata* Thunb. contained with magnolol, honokiol and dihydroxybiphenyl ether, 0.9%, 0.3% and 0.24%, respectively.

**Keywords :** Magnoliaceae, *Magnolia obovata* Thunb. cytotoxicity, apoptosis, Lactate dehydrogenase assay(LDH), FACScan analysis system, magnolol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether

## 서 론

예로부터 한방에서는 목련과 수종의 줄기껍질을 후박(厚朴 혹은 厚樸)이라는 이름의 약재로 널리 알려져 왔으며, 이는 주로 흉복부의 팽만감 해소, 급만성 복통의 치료 등의 목적으로 단방 혹은 복합제제로 오늘날까지도 한방에서 빈번하게 사용되고 있다. 또한, 일본목련(*Magnolia obovata* Thunb.)은 목련과(Magnoliaceae)의 대표적인 수목으로 높이가 20m 지름이 1m에 달하는 낙엽활엽교목이다. 일본이 원산지이나 우리나라 중부이남지역에 널리 분포하고 있다. 우리나라에서는 관상용으로 재배하기도 하지만 주로 해안지방, 도서지방에 널리 자생하고 있다. 이와 같은 연유로 일본목련 또는 일본목련의 줄기껍질 즉 후박에 대한 현대 과학적 연구는 1960대 이래 꾸준히 행하여져 왔으며, 특히, 이들의 약리 작용 및 성분연구들이 그 주종을 이루고 있다. 이러한 연구결과, 이제까지 밝혀진 일본 목련의 약리 작용으로는 여러 가지 병원균 및 진균류 등에 대한 항균 및 항진균 작용 등이 잘 알려져 있으며(Namba et al., 1982; El-Feraly et al., 1983), 그 외에 혈소판 응집억제작용(blood

platelet aggregation inhibition, Yamahara et al., 1986) 및 그 작용 mechanism(Tsai et al., 1995)과 항궤양효과(antiulcer effect, Chen et al., 1986), 항암효과(antitumor activity, Konoshima et al., 1991), 면역억제효과(immunodepressant activity, Hirano et al., 1991), 심혈관확장효과(vasodilator, Watanabe et al., 1983) 등이 잘 알려져 있다. 특히 후박이 탁월한 항궤양효과를 보여주는 연유로 일본에서는 이미 습관성음주로 야기된 위장관 질환의 예방 및 치료목적으로 후박을 주원료로 사용한 의약품 제제가 특허를 얻어놓은 상태이다(Kudo et al., 1990). 또 후박의 항균효과 특히 치주염균(*Streptococcus mutans*)에 대한 항균효과는 현재 우리나라 및 일본의 제약회사들이 경쟁적으로 후박을 함유하는 치약을 개발하게 하는 원동력이 되고 있다. 한편 일본목련에 함유된 성분들에 관한 연구들도 오래 전부터 진행되어 왔으며 그 결과  $\alpha$ -eudesmol,  $\beta$ -eudesmol,  $\gamma$ -eudesmol 등의 정유성분이 이미 오래 전부터 알려져, magnolol, hinokiol 등 phenylpropanoid계 lignan의 dimer 및 magnocurarine 등 4급 혹은 3급 alkaloid 성분, 그 밖에도 여러 가지 sesquiterpenoid 및 triterpenoid 들이 보고되고 있다(Kijjoa et al.,

1989; Nitao et al., 1989; Fukuyama et al., 1990).

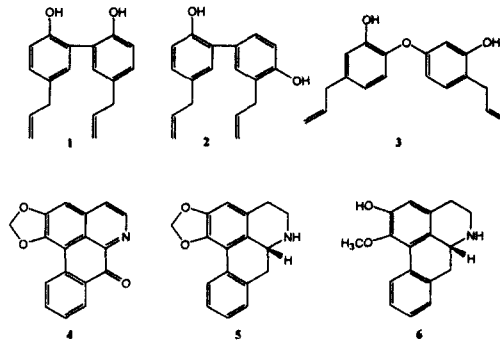
한편, 현재 악성종양에 대한 다각적인 치료 방법은 수술요법, 방사선요법 같은 국소요법과 화학요법 및 면역요법 등의 전신요법이 사용되고 있는데 이중 항암제를 이용한 화학요법은 생존율을 높이는 데 큰 역할을 하고 있다. 화학요법제들은 암세포뿐만 아니라 골수세포와 같이 활발히 분열하는 세포에 대해 독성 및 부작용이 강하여 빈혈이나 기타 진균 등의 기회감염증과 소화기 장애, 신 장애 등을 유발시키기 때문에 임상적 응용에 문제가 되고 있다. 이러한 이유 때문에 독성 및 부작용이 적은 천연 신물질이 합성 화합물보다는 새로운 항암제로 발견될 가능성이 매우 높기 때문에 새로운 작용을 하는 화합물을 천연자원에서부터 창출하려는 것이 현재의 일반적인 연구추세라고 할 수 있다. 본 저자는 이미 일본목련에서 6가지의 생리활성화합물을 분리, 보고하였다(Kim · Ryu, 1999). 본 논문은 이들 화합물의 세포독성효과를 평가하고 정량적으로 분석하고 국내의 여러 가지 목련과 수목의 추출물을 대상으로 암세포에 대한 세포독성을 평가하고 유효성분이 다량 함유되어 있는 수목을 대상으로 고가의 생리활성물질을 다량 생산할 수 있는 기반을 조성하고자 본 연구를 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 2.1 공시재료

본 연구에 사용된 수목은 목련과에 속하는 것들로서 분류학적으로 분명하고 채집이 비교적 용이한 수종으로서 경기도 포천군 소흘면 일대의 2-3m 크기의 수목 잔가지를 채집하여 사용하였다. 이들 잔가지중 직경이 2-3cm 되는 것은 박피하여 추출할 재료로 하였고, 2 cm 이하의 것은 그대로 잘게 부수어 건조한 후, 튜

박크기로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다. 8가지의 실험대상 식물은 *Magnolia denudata*(백목련), *Magnolia liliflora*(자목련), *Magnolia obovata*(일본목련), *Magnolia sieboldii*(합박꽃나무), *Magnolia kobus*(목련), *Magnolia stellata*(별목련), *Magnolia grandiflora*(태산목), *Liriodendron tulipifera*(튤립) 등이며, magnolol(1), honokiol(2), dihydroxybiphenyl ether(3), linodenine(4), anonaine(5), asimilobine(6) 등 순수 분리된 6종 화합물을 대상으로 실험하였다.



### 2.2 추출물의 조제

각 수종을 분쇄하여 4일간 음건한 재료를 90% 메탄올에 충분히 잠기게 한 후 45-60℃의 열판위에서 3시간씩 3회 환류 추출하였고, 추출액은 진공회전 농축기로 농축하였다.

농축된 추출물은 세포독성 측정용으로 사용하였으며, 성분의 분리 및 정량 분석은 다음의 2.3 조건을 따랐다.

### 2.3 추출성분의 분리 및 HPLC를 이용한 정량분석

Magnolol, honokiol 등이 있는 에틸아세테이트 가용성 추출물을 Kim과 Ryu(1999)의 방법으로 성분을 분리하였다. 또한 각 물질의 함

량을 알아보기 위하여 에틸아세테이트 가용성 추출물을 n-Hexane : EtOAc(4 : 1, v/v)로 vacuum column chromatography를 하여 magnolol과 honokiol 화합물이 있는 분획을 얻었다. 이 분획을 HPLC 시스템을 이용하여 각 화합물의 정량분석을 하였다. HPLC에서 column은 Nova-Pak Silica(4 $\mu$ m, 60Å) 3.9×150mm를 사용하였고, pump는 Waters 501을, flow rate는 0.3ml/min이었다. detector는 Refractive index Waters R401을 사용하였으며, 용매는 n-Hexane : Acetone(4:1, v/v)을 사용하여 분석하였다.

#### 2.4 암세포 살해능(LDH, Lactate dehydrogenase assay, Koh et al., 1987)

세포주는 난소암 세포주인 SK-OV-3, 자궁암 세포주인, SiHa 와 HeLa 세포는 모두 서울대학교 암연구소 세포주 은행에서 구입하여 사용하였다. 각 시료들의 암세포 살해능 실험은 다음과 같이 시행하였다. 즉, 96-well plate에 human 암세포 (SK-OV-3, SiHA, HeLa)를 1×10<sup>4</sup>cells/well씩 분주하여 RPMI, MEM 배지 등을 사용하여 24시간 배양 후 시료를 1-40  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하여 20시간 배양하였다. 배양액을 50 $\mu$ l씩 취하여 동량의 substrate를 넣어 30 분간 암소에서 반응시켰다. 반응중단 용액 50  $\mu$ l를 가하여 반응을 중단시키고 590 nm에서 OD 값을 측정하여 암세포 살해활성을 검색하였다.

#### 2.5 Apoptosis 유도능 실험: FACScan analysis(Vermes et al., 1999)

24 well plate에 난소암세포인 SK-OV-3세포를 well당 1×10<sup>6</sup> cells씩 분주하여 24시간 배양하고 시료를 1-40 $\mu$ g/ml의 농도로 처리하였다. 시료처리 20시간 후 세포를 모아 cold PBS로 세척하였다. Annexin-V-FITC (Pharmington, Becton Dickinson, USA) 와 PI를 각각 5 $\mu$ l, 2

$\mu$ l씩 가하여 혼합한 뒤 암소에서 15분 동안 반응시켰다. Annexin binding buffer 200 $\mu$ l를 첨가한 후 유세포분석기 (FACScalibur, Becton, Dickinson, USA)를 사용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 3.1 정량분석

조추출물 25g을 용매분획하여 에틸아세테이트 가용성 분획을 9.625g을 얻었으며, 에틸아세테이트 가용성 분획을 n-Hexane : EtOAc(4:1, v/v)로 silica gel column chromatography를 수행하여 magnolol을 비롯한 dihydroxybipheyl ether, honokiol이 함유되어 있는 fraction 800mg을 얻었다. 이 fraction을 n-Hexane : Acetone(4:1, v/v) 용매로 flow rate을 0.3ml/min으로 HPLC를 실시하였을 경우 magnolol은 9.66 min에 dihydroxybipheyl ether는 10.06 min honokiol은 12.57 min에서 피크가 나왔으며, 양은 각각 30%와 10%, 8%로 분석되었다. 따라서 총 crude에 대한 각 화합물의 비율은 0.9%, 0.3%, 0.24%였다. 즉 1g의 crude에서 magnolol와 dihydroxybipheyl ether, honokiol이 각각 9mg, 3mg, 2.4mg을 얻을 수 있다.

### 3.2 목련과 식물 추출물의 암세포 살해능

목련과 식물의 생리활성성분 연구의 일환으로 목련과 식물 추출물 자체 혹은 목련과 식물로부터 순수 분리된 6가지 화합물들에 대한 항암 활성을 탐색하였다. 특히, 초기에 발견된 경우를 제외하고는 일단 발병 확인 후 5년 생존율이 지극히 저조한 난소암 등은 아직도 그 예방 및 치료에 적용할 수 있는 새로운 물질의 탐색이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 이에 본 저자 등은 목련과 식물 추출물 혹은 순수분

**Table 1. Cytotoxicity of six Magnoliaceae plants-derived compounds against SK-OV-3, SiHa and HeLa cells.**

Samples	Concentration ( $\mu$ g/ml)	Inhibition rate(%)		
		SK-OV-3	SiHa	HeLa
Magnolol	7.5	80.7	100.0	97.9
Honokiol		90.0	78.8	95.4
dihydroxybiphenyl ether		61.3	89.2	52.2
Anonaine	40	26.8	71.5	89.5
Asimilobine		5.8	6.0	67.0
Liriodenine		-	14.7	73.5

**Table 2. Cytotoxicity of Magnoliaceae plants methanol ext. against SK-OV-3 and SiHa cells.**

Samples (20 $\mu$ g/ml)	Inhibition rate(%)	
	SK-OV-3	SiHa
<i>Magnolia stellata</i>	-	-
<i>Magnolia liliflora</i>	1.8	-
<i>Magnolia kobus</i>	3.6	3.1
<i>Liriodendron tulipifera</i>	-	3.8
<i>Magnolia denudata</i>	-	6.0
<i>Magnolia sieboldii</i>	-	14.7
<i>Magnolia grandiflora</i>	-	-
<i>Magnolia obovata</i>	70.5 (IC <sub>50</sub> =16.9 $\mu$ g/ml)	96.6 (IC <sub>50</sub> =23.4 $\mu$ g/ml)

**Table 3. Inducing effects of early stage of apoptosis with SK-OV-3 cells.**

Samples	Concentration ( $\mu$ g/ml)	Inducing Effects of early stage of apoptosis
control	-	10.76
magnolol	1.5	22.72
	3.0	36.67
honokiol	1.5	22.37
	3.0	26.36
dihydroxybiphenyl ether	2.5	19.76
	5.0	35.03

리, 정제된 목련과 식물 유래 화합물을 대상으로 1차적으로 난소암 또는 자궁경부암 세포의 성장억제 혹은 살해능이 있는지를 검색하였고, 그 결과를 Table 1과 2에 나타내었다. 단일 물질인 magnolol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether의 경우, SK-OV-3 암세포 살해능은 IC<sub>50</sub>가 각각 5.5, 4.5, 7.6  $\mu\text{g/ml}$ 로, 강한 활성을 보였으며, 이는 문헌에서의 결과와도 일치함을 알 수 있었다(Kim · Ryu, 1999). 또한, Table 1에서 보는 바와 같이 magnolol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether의 경우, 7.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 낮은 농도에서 SK-OV-3, SiHa, HeLa의 3가지 암세포 모두에 대한 강한 암세포 살해능을 보였으며, anonaine의 경우는 40  $\mu\text{g/ml}$ 에서 실험했을 때 자궁암 세포주인 SiHa와 HeLa 세포 모두에 대하여, asimilobine과 linodenine의 경우는 HeLa 세포에 대하여 강한 암세포 살해능을 나타냄을 알 수 있었다.

또한 목련과 식물 추출물 자체에 대한 암세포 살해능에 대한 실험결과는 Table 2와 같다. 실험 사용한 8가지 목련과 식물 추출물 중 일본 목련 추출물만이 강한 활성을 나타내었다(SK-OV-3, IC<sub>50</sub>=16.9  $\mu\text{g/ml}$ , SiHa, IC<sub>50</sub>=23.4  $\mu\text{g/ml}$ ). 따라서 본 실험에 사용한 일본목련을 비롯한 다른 7개의 목련과 수목의 추출물을 co-TLC로 비교하여 TLC 상에서 나타나는 이들의 특징적인 피크를 분석하였으나, 이들의 함량이 일본목련에 비해 상당히 적음을 알 수 있었다. 이것은 일본목련추출물의 상대적 강한 활성이 일본목련의 주성분인 magnolol과 honokiol의 활성에 기인한 것으로 여겨진다.

### 3.3 Apoptosis 유도능 실험(FACScan analysis)

세포가 죽으면 세포막이 파괴되면서 세포표면에 Phosphatidyl serine(PS)의 노출이 일어나는데 여기에 Annexin-V의 결합정도로 cell의 초기 apoptosis를 관찰할 수 있다. 그러나 PS의 노출은 apoptotic cell에만 일어나는 것이 아니라 세포괴사(Necrosis)에서도 관찰할 수 있

는 현상이므로 초기 apoptosis에 의한 PS 노출 정도만을 측정하기 위해 Propidium iodide를 동시에 염색시켜 관찰하였다.

본 연구에서는 난소암세포주인 SK-OV-3를 사용하였으며 그 결과는 Table 3과 같다. 즉, magnolol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether 등 세 가지 화합물이 SK-OV-3 세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 관찰되었으며, 특히 magnolol과 dihydroxybiphenyl ether는 3.0  $\mu\text{g/ml}$ 과 5.0  $\mu\text{g/ml}$ 에서 30% 이상의 효과를 나타내었다. 이는 현재 임상에서 난소암 환자에게 사용되고 있는 cisplatin(1.0  $\mu\text{g/ml}$ 에서 37% apoptosis 유도) (Kim · Ryu, 1999; Liu et al., 1998)과 거의 유사한 정도의 활성이 있음을 알 수 있다. 이로써 magnolol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether 등의 강한 암세포 살해능은 항암활성을 나타낼 수 있는 여러 가지 작용기전 중의 하나인 초기단계의 apoptosis 유도에 의한 기전임을 밝혔다. Apoptosis과정은 죽음의 신호에 반응하여 일어나는 능동적 죽음의 과정으로 비정상적인 세포의 제거를 위한 방어적인 기전으로 이 과정이 손상되면 항암제에 내성이 생긴다고 할 수 있다. 본 실험 결과, 목련과 식물 추출물과 이들 식물로부터 순수분리 정제된 화합물들이 apoptosis 기전에 의한 항암활성을 나타냄을 알 수 있었으며, 나아가, 이들 물질들이 면역효과도 증진시킬 수 있는지 더 규명할 필요가 있으며, 또한 Western blotting을 통해 apoptosis에 관련된 어떤 특정한 protein level의 변화가 있는지에 대한 규명연구가 필요하리라 생각된다.

## 결론

우리나라에 많이 자생하며 예로부터 민간에서 약용으로 이용되어 온 목련과 수목을 대상으로 수피 및 잔가지를 MeOH 용액으로 열추출을 한 후, 세포독성을 측정하였다. 세포독성을 측정된 결과 일본목련을 제외한 다른 목련

과 수목에서는 뚜렷한 활성이 나타나지 않았다. 이는 일본목련의 주성분인 magnonol, honokiol 때문인 것으로 여겨진다.

일본목련에 분리한 magnonol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether, linodenine, anonaine, asimilobine 등 6가지 물질에 대한 암세포 살해능을 검정하였다. magnonol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether의 경우, SK-OV-3 암세포 살해능은 IC<sub>50</sub>가 각각 5.5, 4.5, 7.6 μg/ml 로, 강한 활성을 보였으며, anonaine는 40 μg/ml에서 자궁암 세포주인 SiHa와 HeLa 세포에 대하여, asimilobine과 linodenine는 HeLa 세포에 대하여 강한 암세포 살해능을 나타냈다.

Apoptosis 유도능 검정에서는 magnonol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether만이 SK-OV-3 세포에서 활성을 나타냈다. 특히 magnolol과 dihydroxybiphenyl ether는 3.0 μg/ml과 5.0 μg/ml에서 30% 이상의 효과를 나타내었다.

강한 활성을 갖는 magnonol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether 물질의 정량분석을 위해서 일본목련의 메탄올 추출물을 클로로포름, 에틸아세테이트, 수용성 분획으로 나누고, 에틸아세테이트 분획을 실리카겔 컬럼크로마토그래피하여 활성 분획을 만들었다. 세 가지 물질을 확인하기 위해서 실리카겔 박층 크로마토그래피를 수행하였으며, 전개용매로는 n-Hexane:Acetone(4:1, v/v)를 사용하였다. 이 분획을 n-Hexane:Acetone(4:1, v/v)로 HPLC하여 추출물에 대한 magnonol, honokiol, dihydroxybiphenyl ether 비율을 0.9%, 0.3%, 0.24%가 함유되어 있는 것으로 밝혔다.

### 참고문헌

1. Bissonnette, R. P., Shi, Y., Mahboubi, A., Glynn, J. M. and Green, D. R. 1994. Tomei, Cope L. D. and Cope, F. O. ed. Cold Spring Harbor Lab. Press pp327-356.
2. Chen Q. S., Pharmacology and application of Chinese Merteria Medica, Vol 2. (H.M. Chang, P.P.H. But. eds.) 878-880, World Scientific, Singapore (1986).
3. El-Feraly F. S. , S. F. Cheatham and R. L. Breedlove, J. Nat. Prods. 46, 493-498 (1983).
4. Fukuyama Y., Y. Otoshi, K. Nakamura, M. Kodama, M. Sugawara, M. Nagasawa, Chem. Letter., 295-296 (1990).
5. Hirano T., A. Wakasugi, M. Oohara, K. Oka, Y. Sashida, Planta Medica 57, 331-334 (1991)
6. Kijjoa A., M. M. Pinto, B. Tantisewie and W. Herz., Phytochemistry, 28, 1284 (1989)
7. Kim Young-Kyoon and Ryu Shi Yong , "Cytotoxic Components from Stem Bark of *Magnolia ovobata*", Planta Medica, 1999, 65, 291-292.
8. Koh, JY, Choi, DW, Quantitive determination of glutamate medicated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay, J. Neuroscience Methods, 1987;20:83-90
9. Konoshima T., M. Kozuka, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima, M. Haruna, K. Ito, M. Tanabe, J. Nat. Prods. 54 816-822 (1991).
10. Kudo K., M. Nomura, Japan Kokkai Tokkyo Koho JP 02193926 [90193926] (IPC A61K- 033/06), 1990.
11. Liu J. R., B. Fletcher, C. Page, C. Hu, G. Nunez, V. Baker, Bcl-XL is expressed in ovarian carcinoma and modulates chemotherapy-ionduced apoptosis, Gynecological Oncology 70, 398-403 (1998).
12. Namba T., M. Tsunezuka and M. Hattori. Dental Caries Prevention by traditional chinese Medicine, Planta Medica 44,

- 100-106 (1982) .
13. Nitao J. K., M. G. Nair, D. L. Thorgood, K. S. Johnson and J. M. Schreiber, *Phytochemistry*, 30, 2193-2195 (1989)
  14. Skehan, P., Streng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. (1990). *J. Natl. Cancer. Inst.* 82, 1107-1112.
  15. Teruakai, H., Yuji F. and Yoshio, I. *Cancer* 65: 1263-1272, 1990.
  16. Tsai T. H., J. Westly, T. F. Lee, C. F. Chen and L. C. H. Wang, *Planta Medica*, 61, 477-479 (1995).
  17. Vermes I., Haanen C., Nakken HS, Reutelingsperger CPM. A novel assay for apoptosis: FLOW cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using Fluorescence labelled annexine V. *J. Immunol. Methods.* 1995; 184:39-51
  18. Watanabe K., H. Watanabe, Y. Koto, M. Yamaguchi, N. Yamamoto and K. Hagino, *Planta Medica*, 49, 103-108 (1983).
  19. Yamahara J., S. Miki, H. Matsuda and H. Fujimura, *Yakugaku Zasshi*, 106, 888-893 (1986)
  20. Yen. A., Mary, F., Gwen, D., and Justin, F. *Cancer Res.* 47: 129-134, 1987.