

팔선 양조용수의 세포독성 및 항암활성

한두석·한종현*·유 화**·김지주**·강길웅***·백승화****
원광대학교 치과대학 구강해부학교실, *한의과대학 약리학교실, ****자연과학대학 화학과,
**전북 부안군 상서면 변산팔선약주협회
(Received September 30, 1998)

The Cytotoxicity and Antitumor Activity of Palsun Brewing Water

Du Seok Han, Jong Hyun Han*, Hwa Yu**, Ji Ju, Kim**,
Kil Ung Kang*** and Seung Hwa Baek****

Department of Oral Anatomy, College of Dentistry and

*Department of Pharmacology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

**Byunsan Palsun Brewing Association, Sangseomyon, Buangun Chonbuk, 579-860, Korea

***Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract—In the present study, we have evaluated cytotoxic effects, antitumor activities and metastasis inhibitory effects of Palsun brewing water in NIH 3T3 cells, human oral epitheloid carcinoma cells, and human skin melanoma cells. The light microscopic study showed morphological changes, AG-NOR (argyrophilic nucleolar organizer region) by silver chloride stain, and glycoprotein by PAS (periodic acid stain) reaction of the treated cells. Disruptions in cell organelles were determined by colorimetric methods: MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide) and SRB (sulforhodamine B protein) assays. These results suggest that Palsun Brewing Water retains no cytotoxic effects in NIH 3T3 cells and a growth-inhibitory activity in cancer cell lines.

Keywords □ Cytotoxic effect, antitumor activity, metastasis inhibitory effect, palsun brewing water, AG-NOR, PAS reaction, MTT and SRB assays.

변산 전통 팔선주는 전라북도 부안군 상서면에서 조상대대로 이어져 내려온 민속주로서 농민들이 일상생활에서 기력이 떨어지거나 잔병치레를 할때 공복에 마시면 특효가 나타난다는 약주 중의 명약주로 알려져 왔으나¹⁾ 팔선주에 대한 기초적이고 과학적인 연구가 체계적으로 이루어져 있지 않은 실정이다.

암이란 조직의 자율적인 과잉성 성장이며, 이것은 개체에 대하여 의의가 없거나 이롭지 않을뿐더러 정상 조직에 대하여 파괴적인것이라고 정의하고 있으며, 그 발생원인과 기전이 명백히 밝혀져 있지 않은 질병이

다.²⁾ 치료요법으로 수술요법, 방사능요법, 화학요법과 면역요법 등이 주로 활용되고 있고, 그 중 화학요법의 활용도가 높으나 많은 부작용과 그 치료요법때문에 항암효과를 높이는 치료방법 및 면역요법과의 병합요법에 대한 연구가 절실하게 요구되고 있다.³⁻⁵⁾ 따라서, 이러한 항암치료의 부작용 때문에 최근에는 양방과 한방의 결합에 의한 치료방법으로 항암효과가 있는 한약재 및 복합처방을 이용한 실험적 연구가 많이 행해지고 있으며,⁶⁻¹²⁾ 그 결과 암세포의 동물이식에 대한 실험, 화학적 발암원에 의한 육종에 대한 효과, 배양한 종양 세포등에 대한 실험에서의 병용치료가 단독치료시보다 더 좋은 항암효과가 있음이 보고되고 있다.¹³⁻¹⁶⁾ 그러나 정상세포에는 손상을 주지 않고 오직 암세포만을

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0653-850-6225 (팩스) 0653-841-4893

살상하는 항종양성 약물은 아직까지 개발되지 않은 현 시점에서 항종양효과를 상승적으로 증진시키고, 부작용을 줄이는 항종양성 약물의 개발이 절실하다고 생각된다.

팔선 양조용수를 조제하는 재료로는 전복 부안군 상서면에서 자생하거나 재배하는 4본(오갈피, 마가목, 말오줌대, 개오동) 4근(창출, 위령선, 쇠무릎, 석창포)이 사용되는데, 오갈피는 항암효과, 말오줌대, 창출 및 석창포는 건위효과, 개오동은 해독효과, 창출, 쇠무릎 및 위령선은 이뇨효과가 있는 것으로 보고되었다.¹⁷⁻¹⁸⁾

이에 본 연구는 팔선 양조용수의 여러 가지 약리효과를 측정하여 건강식품을 개발할 목적으로 팔선 양조용수의 항암효과를 검색하기 위하여 인체 구강유상피암 세포와 인체 피부흑색종세포에 四本四根으로부터 조제한 팔선 양조용수를 적용하여 세포독성과 항암효과 측정에 다양하게 이용되며 민감도가 강한 MTT 법과 SRB 법과 암전이에 관여하는 부착단백량을 간접적으로 알아볼 수 있는 Ag-NOR 검사와 PAS 염색을 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

검액조제 - 실험에 사용한 약제는 부안군 상서면에서 자생하거나 재배한 4본 4근을 채취하여 음건한 4본4근 8가지 약재를 동량으로 지하수에 넣고 24시간 중간물로 달였다. 약 달이기는 75L의 물이 줄아서 25L(1/3)가 될때까지 달여서 차게 식힌 후,²⁰⁾ 이 추출액(100 ml)을 여지로 여과하고, 여액을 감압농축하여, 흑갈색 추출물(1.31 g)을 얻었다.

세포배양 - 세포독성을 측정하기 위하여 원광대학교 의과대학에서 분양받은 NIH 3T3섬유모세포를 항암작용을 측정하기 위하여 서울대학교 암연구소에서 분양 받은 인체 구강유상피암종세포(ATCC No. OCL 17)와 인체 피부흑색종세포(ATCC No. HTB 69)를 사용하였다. NIH 3T3섬유모세포는 Eagle's minimum essential medium(EMEM)에, 인체 구강유상피암종세포와 인체 피부흑색종세포는 RPMI-1640(Gibco, U.S.A)에 10% fetal bovine serum(Gibco, U.S.A)과 penicillin G(25 unit/ml), streptomycin(25 µg/ml)를 첨가하여 사용하였다.

각 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 CO₂ incubator를 사용하였다. 실험을 위하여

일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2×10⁴ cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

MTT정량분석법 - Mosmann의 방법²¹⁾에 의하여, 각 well에 4×10⁴ cells을 넣고 동시에 팔선 양조용수의 물추출물 10⁻²~10⁻⁶ mg/ml 농도가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT(Sigma) 50 µg/ml가 포함된 배양액을 well당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온방치하여 MTT formazan을 용해한 후, ELISA reader로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

Ag-NORs검사 - 6 well plate의 각 well에 8×10⁴ cells을 넣고 동시에 팔선 양조용수의 물추출물 10⁻²~10⁻⁶ mg/ml 농도가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 버리고 커버글라스에 부착된 세포를 인산완충액으로 세척하였고, 10% formalin용액으로 10분간 고정된 후 증류수로 수세하고, alcohol 및 증류수에서 함수시킨 후, 1% formic acid 용액에 gelatin을 2%가 되도록 녹인 용액과 50% silver nitrate 수용액의 비율이 1:2가 되도록 섞어 만든 은 콜로이드용액에 넣어 실온 암소에서 30분간 반응시킨 후, 증류수로 수세하고 탈수시켰다. 염색된 커버글라스를 유리슬라이드의 정 위치에 놓고 cannada balsam으로 봉인한 표본을 광학현미경(BH-2, Olympus, Japan) 유침렌즈하에서 암세포에 나타난 핵중 100개를 임의로 선정하여 개개의 세포핵 내에서 진하게 갈색으로 염색된 Ag-NOR의 수를 세어 통계처리 하였다.

SRB정량분석법 - Skehan *et al*의 방법²²⁾에 따라 세포를 팔선양조용수의 물추출물 10⁻²~10⁻⁶ mg/ml 농도가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 버리고 5회 세척한 후, 0.4% sulforhodamine B protein (SRB)를 200 µl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음, 1% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조하였다. 10 mM Tris base(tris(hydroxymethyl) amino-methane)로 결합된 protein stain을 녹인 후, ELISA reader로 측정하여 대조군과 비교하였다.

PAS stain - 커버글라스에 부착된 세포를 인산완충액으로 세척하였고, 10% formalin에 10분간 고정하였다. 그 후 증류수로 수세하여 periodic acid에 2분간 처리하였고, 증류수로 잘 세척해 schiff용액에서 8분간 반응시켰다. 5~10분간 흐르는 물로 수세한 다음, 핵을 구

분하기 위하여 harris's hematoxylin에 2분간 대조 염색한 후, 탈수과정을 거쳐 canada balsam으로 봉입하여 광학현미경(BH-2, Olympus, Japan)적으로 관찰하였다.

통계처리 - 실험결과의 통계처리는 Student's t-test에 준하였고, P-value가 0.05미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

천연물을 이용하여 건강식품이나 각종 치료약물을 개발하기 위한 노력이 계속되고 있다. 본 연구도 그 일환으로 팔선 양조용수의 재료인 四本四根으로부터 물추출물을 조제하여 NIH 3T3 섬유모세포, 인체 구강유상피암종세포 및 인체 피부흑색종세포에 적용한 후, MTT 정량분석, Ag-NOR 수 산정, SRB정량분석 및 PAS 염색을 실시하여, 통계처리한 결과는 Table 1~6과 사진 1~6과 같다.

팔선 양조용수에 의한 실험결과는 Table I에서 보는

Table I—The MTT assay of Palsun Brewing Water on NIH 3T3 fibroblast

Concentration (mg/ml)	MTT quantity	
	Mean±S.D. ^a	% of control
Control	4.17±0.00	100.0
10 ⁻²	4.17±0.00	100.0
10 ⁻³	4.17±0.00	100.0
10 ⁻⁴	4.17±0.00	100.0
10 ⁻⁵	4.17±0.00	100.0

Cells were incubated for 48hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. ^aThe values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: (student's t-test).

Table II—The MTT assay of Palsun Brewing Water on human oral epitheloid carcinoma cell

Concentration (mg/ml)	MTT quantity	
	Mean±S.D. ^a	% of control
Control	3.51±0.13	100.0
10 ⁻²	2.80±0.41**	79.8
10 ⁻³	3.12±0.28*	88.8
10 ⁻⁴	3.35±0.43	95.4
10 ⁻⁵	3.59±0.21	102.5

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. ^aThe values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: *p <0.05, **p<0.01 (student's t-test).

바와 같이, 추출물을 NIH 3T3섬유모세포, 인체 구강유상피암종세포 및 인체 피부흑색종세포에 적용하여 MTT분석법으로 검색한 결과, NIH 3T3섬유모세포 (Table I)에 대한 세포독성은 무독성이었으나, 인체 구강유상피암종세포 (Table II)에 대한 항암활성은 대조군의 흡광도를 100%로 하여 mg/ml 농도에 대한 흡광도를 비례적으로 측정한 결과, 팔선양조용수 추출물의 10⁻³~

Table III—The MTT assay of Palsun Brewing Water on human skin melanoma cell

Concentration (mg/ml)	MTT quantity	
	Mean±S.D. ^a	% of control
Control	4.16±0.01	100.0
10 ⁻²	2.73±0.40***	65.7
10 ⁻³	2.76±0.34***	66.5
10 ⁻⁴	2.89±0.06***	69.6
10 ⁻⁵	3.05±0.29***	73.3

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. ^aThe values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: ***p<0.001 (student's t-test).

Table IV—Number and distribution of Ag-NORs per nucleus on NIH 3T3 cells, KB cells and SK-MEL-3 cells

Concentration (mg/ml)	Ag-NORs/Nucleas		
	Mean±S.D. ^a (% of control)		
	NIH 3T3	KB	SK-MEL-3
Control	2.87±0.77 (100.0)	3.55±0.10 (100.0)	3.50±0.56 (100.0)
10 ⁻²	2.84±0.98 (99.9)	2.67±0.99* (75.2)	2.51±0.27* (71.7)
10 ⁻³	2.84±0.76 (99.0)	2.87±0.78 (80.8)	2.94±0.56 (84.0)
10 ⁻⁴	2.86±0.21 (99.7)	3.33±0.69 (93.8)	3.42±0.24 (97.7)
10 ⁻⁵	2.88±0.54 (100.3)	3.48±0.23 (98.0)	3.46±0.47 (98.9)

Cells were in cubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. ^aThe values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: *p<0.05, (student's t-test).

10^{-2} mg/ml 농도에서만 88.8% ($p < 0.05$)와 79.8% ($p < 0.01$)로 유의성있는 항암활성이 있으나, 10^{-4} mg/ml 농도에서는 MTT 농도가 대조군(control)의 95.4%로 감소하여 유의적인 항암활성을 보이지 않았으나, 10^{-5} mg/ml 농도에서는 대조군과 비슷한 MTT 농도를 나타내었다. 인체 피부흑색종세포에 대하여 팔선 양조용수 추출물의 농도 $10^{-5} \sim 10^{-2}$ mg/ml에서 MTT 농도가 대조군의 73%~66%로 감소하여 유의적인($p < 0.001$) 항암활성을 보였다(Table III).

Ag-NOR 수는 세포내 단백질 합성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있어, 팔선 양조용수 농도별로 NIH 3T3 섬유모세포, 인체 구강유상피암종 및 인체 피부흑색종세포에 적용하고 48시간이 지난후, Ag-NOR 염색을 실시하였다. 핵내 Ag-NOR 수를 산정하여 통계처리한 결과, 10^{-2} mg/ml 농도에서 NIH 3T3 섬유모세포는 Table IV에 보는 바와 같이 통계적으로 수적 변화가 없었으나, 인체 구강유상피암종세포와 인체 피부흑색종세포에서는 통계적으로 유의하게 감소하였다.

핵소체 형성부위는 rRNA 전사활동 증가시 은 콜로이드에 염색되므로, 이와 관련된 단백질들을 간접적으로 확인할 수 있어, 핵내 단백질인 sulforhodamine B protein량을 측정하는 방법인 SRB법을 이용하여 SRB량을 측정한 결과, Ag-NOR 수의 증감과 일치하는 결과를 얻었다(Table IV와 V). NIH 3T3 섬유모세포에서는 MTT 분석에서와 유사하여 세포독성이 없었으며 (No data), 인체 구강유상피암종세포(Table V)와 인체 피부흑색종세포(No data)에서는 10^{-3} mg/ml 농도와 10^{-2} mg/ml 농도에서 통계적으로 97%와 87%로 SRB량이 유의하게 감소하였으며, 농도를 희석

Table V—The SRB assay of Palsun Brewing Water on human oral epitheloid carcinoma cell

Concentration (mg/ml)	SRB quantity	
	Mean \pm S.D. ^a	% of control
Control	2.99 \pm 0.03	100.0
10^{-2}	2.61 \pm 0.01**	87.2
10^{-3}	2.73 \pm 0.03*	97.2
10^{-4}	2.94 \pm 0.03	98.1
10^{-5}	2.95 \pm 0.02	98.7

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. ^aThe values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (student's t-test).

Table VI—Degree of Reaction intensity of glycoprotein on NIH 3T3 cells, KB cells and SK-MEL-3 cells after PAS stain

Groups Concentration (mg/ml)	NIH 3T3	KB	SK-MEL-3
	PAS reaction	PAS reaction	PAS reaction
Control	++	++	++
10^{-2}	++	-	-
10^{-3}	++	-	-
10^{-4}	++	+	+
10^{-5}	++	++	++

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. Degree of reaction density: +: weak, ++: moderate, -: negative.

시킴에 따라 SRB량이 증가하였다.

붉은색으로 염색되는 세포내기질 당단백의 반응 정도는 Table VI와 같으며 NIH 3T3 섬유모세포는 모든 농도에서 ++ 반응을 나타냈다. 인체 구강유상피암종세포(사진 6)와 인체 피부흑색종세포에서는 10^{-2} mg/ml 농도와 10^{-3} mg/ml 농도에서 반응을 나타냈으나,⁹⁾ 10^{-4} mg/ml 농도에서는 + 반응이 나타났으며, 10^{-5} mg/ml 농도에서는 대조군과 ++ 반응으로 나타났다.

NIH 3T3 섬유모세포, 인체 구강유상피암종세포 및 인체 피부흑색종세포를 24시간 배양하면, well 바닥에 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로 단층을 이루며, 48시간 배양하면 여러형태의 세포들이 층을 이루며(사진 1, 인체 구강유상피암종세포), Ag-NOR 염색과 PAS 염색을 위하여 커버글라스를 well 바닥에 놓고, 배양하면 세포의 증식 속도가 느려 48시간 배양후 단층을 이루었다(사진 3, 5).

팔선 양조용수 추출물을 농도별로 첨가하여 배양하면, 사진 2 (10^{-3} mg/ml 농도)에서 보는 바와 같이 세포수는 감소하고, 세포형태는 원형으로 변형되며 세포들이 서로 응집하는 경향이었으나, 10^{-5} mg/ml 농도에서는 대조군과 유사한 형태를 관찰 할 수 있었다. Ag-NOR 염색에 있어서도 사진 4 (10^{-3} mg/ml 농도)에서 보는 바와 같이 세포수가 감소하고 핵내 핵소체 형성부위의 수도 감소하나, 10^{-5} mg/ml 농도에서는 대조군과 거의 일치하였다. 당단백질량을 확인할 수 있는 PAS 염색을 실시하면, 대조군에서는 세포질내에 PAS 양성 반응이 뚜렷하고, 핵주위에는 더욱 뚜렷하며, 일부 세포에서는 염색액이 뭉치는 경향이 있으나(사진 5, 화살표), 팔선 양조용수 추출물 10^{-2} mg/ml 농도와 10^{-3} mg/ml 농도를 처리한 군(사진 6)에서는 PAS 음성반

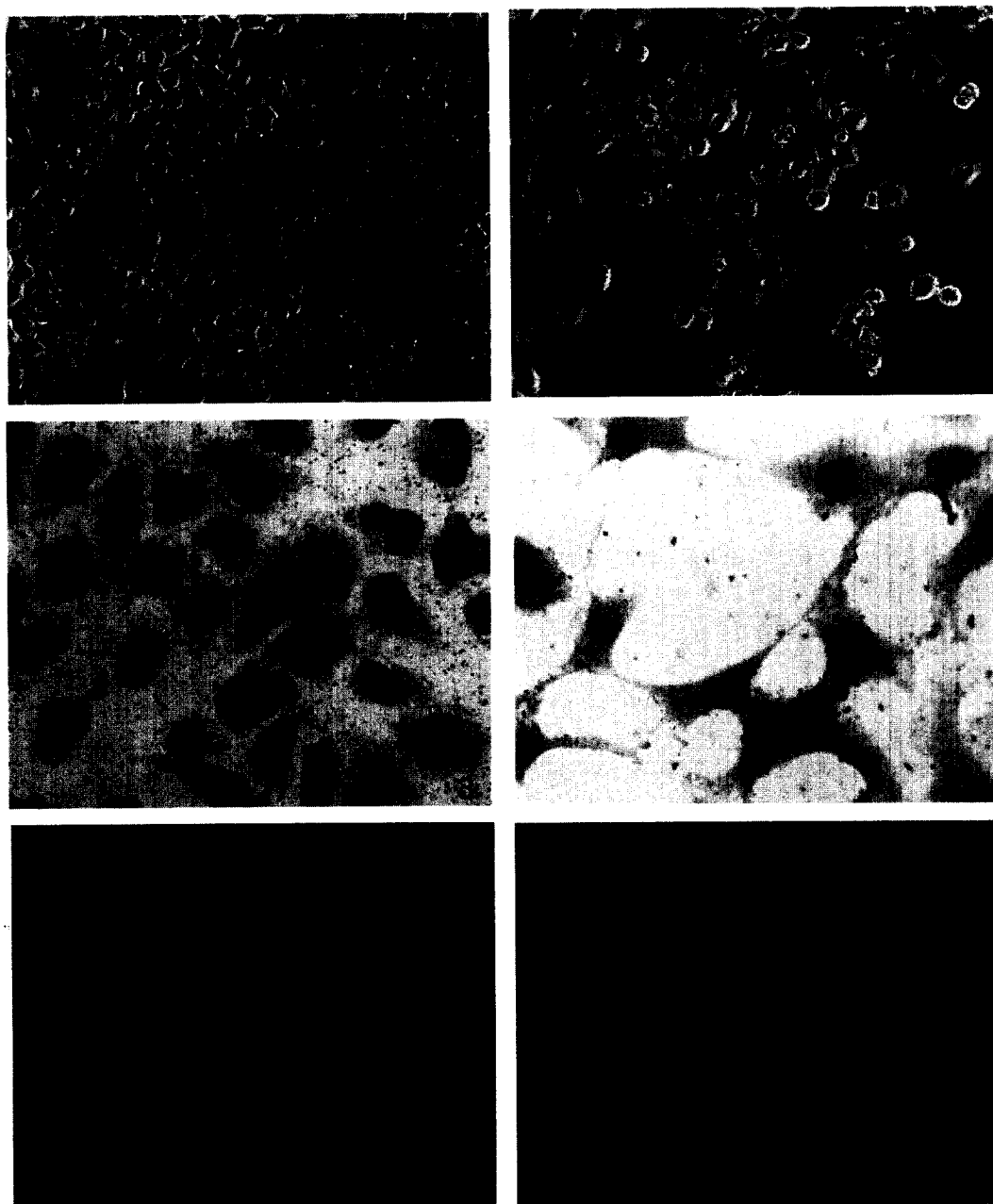


Fig. 1— Inverted photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells after incubation in unmodified medium(control) for 2 days. $\times 400$. Most cells had abundant cytoplasm and formed spindle shape (1). Inverted photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells after incubation in the medium containing 10^{-2} mg/ml concentration of Palsun Brewing Water for 2 days. $\times 400$. Most cells were shown degenerative change and number of cells were decreased (2). Photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells after incubation in unmodified medium (control) for 2 days. silver colloids stain. $\times 400$. Most cells had abundant cytoplasm and nucleus were contained Ag-NORs (arrow) (3). Photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells after incubation in the medium cotaining 10^{-2} mg/ml concentration of Palsun Brewing Water for 2 days. silver colloid stain. $\times 400$. Number of cells were decreased. also, number of Ag-NOR were decreased (4). Photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells after incubation in unmodified medium (control) for 2 days. PAS stain. $\times 400$. Most cells showed PAS positive reaction. Sometime, Some cells had crumbled PAS positive stain (arrow) (5). Photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells after incubation in the medium cotaining 10^{-2} mg/ml concetration of Palsun Brewing Water for 2 days. PAS stain. $\times 400$. Most cells showed PAS negative reaction (6).

응이 나타나고, 10^{-5} mg/ml 농도에서는 다시 PAS 양성반응이 나타났다.

이상의 결과는 四本四根에서 추출한 팔선 양조용수에는 NIH 3T3 섬유모세포에 영향을 미치는 세포독성 물질은 거의 없는 것으로 생각되나, 인체 구강유상피암 종세포와 인체 피부흑색종세포에 미치는 항암활성물질과 암전이 억제물질은 함유되어 있는 것으로 생각한다. 四本四根의 재료인 8가지 약제에 대하여 문헌을 찾아본 결과 오갈피^{18,23,24}에만 항암활성물질이 함유되어 있는 것으로 밝혀져 있으나, 앞으로 8가지 약제 각각으로부터 추출물 및 분획을 만들어 항암활성물질의 함유유무를 확인할 계획이다.

결 론

팔선 양조용수의 재료인 四本四根으로부터 물추출물을 조제하여 세포독성과 항암활성 및 암전이 억제물질을 조사하기 위하여, 팔선 양조용수를 농도별로 NIH 3T3 섬유모세포, 인체 구강유상피암종세포 및 인체 피부흑색종세포에 적용한 후, MTT정량분석법, Ag-NOR검사, SRB정량분석법 및 PAS염색을 실시하였다. NIH 3T3 섬유모세포에 대한 세포독성은 무독성이었으나, 인체 구강유상피암종세포와 인체 피부흑색종세포에 대한 항암활성은 유의하였고, Ag-NOR수의 감소와 PAS음성반응은 암전이에 관여하는 부착단백질에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단, 전라북도청후원, 의약자원 연구센터의 연구지원(98-16-01-04-A-3)에 의해 이루어졌으며, 이에 깊이 감사드립니다.

문 헌

- 1) 식생활 개선 국민운동본부 : 식생활, 월간 식생활. **12**, 14 (1996).
- 2) 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울, 서울대학교 학교출판부, 27, p. 1 (1990).
- 3) 박문호 외 : 내과학, 서울, 박애출판사, p. 2446, 2466 (1976).
- 4) 張代鈞 : 中西醫結合治療癌症, 山西, 山西人民出版社, 25, p. 1, (1984).
- 5) 鄭顯明 : 扶正培本法在癌症治療的應用和地位, 雲南中醫雜誌(第14卷4期), (1994).
- 6) 하대유 외 : 고려인삼이 3-Methylcholanthrene의 發癌能에 미치는 影響, 한의학협회지, **27**, 541 (1984).
- 7) 金光湖 外 : 數種 韓藥材가 制癌劑 및 Glucocorticoid의 抗體生產抑制作用에 미치는 影響, 趙永植 博士 華·甲記念論文集, p. 1041 (1981).
- 8) 任帝訓 : 數種의 韓藥物이 癌細胞 感受性에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校大學院 (1986).
- 9) 尹相協 : 六君子湯, 小元柴胡湯, 魚腥草 및 加味方의 抗癌作用과 免疫反應에 關한 實驗的 研究, 서울, 慶熙大學校大學院 (1991).
- 10) 金尙勳 : 紫菀이 抗癌作用 및 免疫反應에 미치는 影響, 서울, 慶熙學校大學院 (1990).
- 11) 李學喆 : 東風菜가 抗癌作用 및 免疫反應에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校大學院 (1990).
- 12) 吳千植 : 靈芝 山慈姑 仙草 卷柏 瓦松이 癌細胞 感受性에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校大學院 (1987).
- 13) 陳長懷 外 : 養正消瘤湯伍用化療治療中晚期胃腸癌臨床觀察, 論文選集, 中國中醫研究院 廣安門醫院, p. 86 (1993).
- 14) 陳長懷 : 清開靈灌湯治療化療所致轉 異常, 論文選集, 中國中醫研究院廣安門醫院, p. 88 (1993).
- 15) 劉炳學 中 外 : 朮鬱靈丹伍用化療治療食管癌30例療效觀察, 醫中西醫結合腫瘤新進展研討會 論文集, 中國中西醫結合學會腫瘤專業委員會 中國中醫研究院廣安門醫院, p. 33 (1993).
- 16) 程劍華 外 : 湯豫防順 腎毒性和治療化療性腎功能衰竭的臨床研究, 中醫中西醫結合 腫瘤新進展研討會論文集, 中國中醫結合學會腫瘤專業委員會, 中國中醫研究院廣安門醫院, p. 77 (1993).
- 17) 이창복 : 대한식물도감, 향문사 (1980).
- 18) 신민교, 김창민, 안덕균, 이경순 : 중약대사전, 도서출판 정담 (1997).
- 19) 한두석, 추광문, 김영일, 이종섭, 유일수, 오인교, 강길웅, 백승화 : 한국산 생약으로부터 항암물질의 개발 (제 10보), 인체 피부흑색종세포에 대한 포공령 추출물의 성장억제효과, 한국독성학회, **14**, 489 (1998).
- 20) 전북 부안군 상서면 번산팔선약주협회에서 전통적인 용매 추출방법에 의하여 4본4근을 추출하였다.
- 21) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55 (1983).

- 22) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Visteca, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.*, **82**, 1107 (1988).
- 23) 육창수, 김선창, 김창중, 한덕용 : 쯤가시 오갈피나무의 성분연구, *약학회지*, **35**, 147 (1991).
- 24) 육창수, 노영수, 서성훈, 임재윤, 한덕용 : 개오가피의 성분 및 항암효과, *약학회지*, **40**, 251 (1996).