

## Propolis의 인체 암세포 증식억제 효과에 대한 *In Vitro* 연구

이현수 · 이지영\* · 김동청\* · 인만진\*\* · 황우익

고려대학교 의과대학 생화학교실, 고려대학교 한국영양문제연구소,\* 청운대학교 식품영양학과\*\*

### The Inhibitory Effects of Propolis on *In Vitro* Proliferation of Human Cancer Cell Lines

Lee, Hyoen Soo · Lee, Ji Young\* · Kim, Dong Chung\* · In, Man-Jin\*\* · Hwang, Woo Ik

Department of Biochemistry, Medical College, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Korea Nutrition Research Institute,\* Korea University, Seoul, 136-701, Korea

Department of Human Nutrition and Food Science,\*\* ChungWoon University, Chungnam, 350-800, Korea

#### ABSTRACT

This study was undertaken to investigate the inhibitory effects of propolis on the *in vitro* proliferation of human colon(HT-29) and hepatoma(HepG2) cancer cell lines. The growth of the HT-29 and HepG2 cells was respectively inhibited by the administration of propolis in a concentration response-dependent manner. The distributions of HT-29 and HepG2 cells cultured in the medium containing propolis were shifted to the smaller sizes, and then HT-29 and HepG2 cells were shrunken under microscopic observations. The progression of cell cycle from G1 to S phase was significantly inhibited by propolis in the HT-29 and HepG2 cell lines, respectively. Those observations suggest that propolis has anticancer effect against some of cancer cell lines *in vitro*. (*Korean J Nutrition* 33(1) : 80~85, 2000)

**KEY WORDS** : propolis, anticancer activity, HT-29, HepG2.

#### 서론

Propolis는 꿀벌들이 박테리아로부터 벌집을 보호하기 위해 나무에서 분비되는 resin을 수집하여 체내에서 대사하여 만들어낸 물질로서 꿀, 화분, 봉납, balsam과 필수 방향족 oil을 주성분으로 하고, 아미노산과 미량 원소를 포함하며, 비타민 C, E와 베타-카로틴, bioflavonide 등이 상당량 혼합되어있어 건강증진<sup>1)</sup> 및 감염, 질병, 세포과피, 노화 등에 대항하는 면역계를 강화시킨다고 보고되어 있다.<sup>2-4)</sup> 또한 최근 Strehl<sup>5)</sup> 등은 propolis 추출물이 dihydrofolate reductase의 활성을 억제시킨다고 보고한 바 있고, Frenkel<sup>6)</sup> 등은 propolis의 조성분인 caffeic acid phenethyl ester (CAPE)에 의해 mouse skin tumor와 bovine lens의 tumor의 증식이 억제됨을 보고하였다. Mitamura<sup>7)</sup> 등은 propolis에서 분리한 clerodane diterpenoid에 의해 생쥐 피부암 세포의 DNA 합성이 억제됨을 밝혔고, Huang<sup>8)</sup> 등은 CAPE에 의해 HeLa cell의 DNA, RNA 및 단백질 합성이 억제 된다고 보고하였다. 그리고 Scheller<sup>9)</sup> 등은 propolis의 에탄올 추출물이 생쥐에서 항암효과를 가진다고 보고하였으

며, Grunberger<sup>10)</sup> 등은 CAPE가 암세포에 선택적으로 cytotoxicity를 나타낸다고 보고한 바 있다.

암에 관한 연구는 많은 연구자들에 의해 매우 활발히 진행되고 있으며, 항암제의 개발연구<sup>11-14)</sup>는 상당히 진전되어 여러가지 화학합성 항암제가 임상에서 사용되고 있으나 심각한 부작용을 보이고 있다. 그러므로 부작용의 문제점을 개선하기 위해서 우리 식생활에서 상용되는 식품 또는 전통적으로 상용되어온 자연산물로부터 항암성 성분을 규명하는 것은 항암제 개발에 있어 매우 바람직한 일면이라 하겠다. 이러한 관점에서 황<sup>15-22)</sup> 등은 우리나라 전통식품인 인삼을 비롯하여 한국산 생약제를 대상으로 항암성을 선별 실험하여 부작용이 적거나 없는 항암제의 개발을 시도하여 왔으며, 이러한 연구의 연장으로 다양한 효능을 가진 것으로 알려진 자연산물인 propolis의 인체 암세포에 대한 항암성을 확인하고자 하였다. 이제까지 propolis의 항암성 연구<sup>11-10)</sup>에서는 생쥐의 피부암세포에서 대해 암세포 증식억제 효과가 있는 것으로 보고되었는데, 본 연구에서는 한단계 더 나아가 인체의 간암 세포(HepG2)와 결장암 세포(HT-29)를 대상으로 propolis의 항암성을 연구하므로써 이를 토대로 새로운 항암제 개발의 기초자료를 확보하고, 식품 산업에서 항암효과를 보이는 기능성 식품으로의 응용 가능성을 제시

채택일 : 1999년 11월 25일

하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 시약

Propolis는 Beehive Botanical사(Hayward, WI)의 제품을 사용하였고, Dulbeco's modified eagle 배지(DMEM), 말혈청(horse serum), 소태아혈청(fetal bovine serum), trypsin-EDTA는 GIBCO(Grand Island Biological Co.) 제품을 사용하였다. 인체의 결장암 세포인 HT-29는 고려대학교 의과대학 생화학교실에서 *in vitro*로 배양해 오던 것을 사용하였고, 인체 간암 세포인 HepG2는 ATCC(America type culture collection)에서 구입하였다. 그 외 시약은 Sigma사의 1급 시약을 사용하였다.

### 2. Propolis의 농도별 시료조제

Propolis는 65% 에탄올로 추출하고 항량을 측정한 후, 10~30µg/ml이 되도록 증류수로 희석하여 실험에 사용하였다. 암세포 배양액에 propolis 첨가시 최종 에탄올의 농도는 0.02% 미만이 되도록 하였다.

### 3. 암세포의 배양 및 배가시간(Doubling time) 측정

본 실험에 사용한 암세포는 인체 결장암 세포인 HT-29와 간암 세포인 HepG2로, 암세포 배양은 황의 방법<sup>21)</sup>에 따라 배양하였다. HepG2 및 HT-29는 10% 소태아혈청, 100units/ml penicillin, 10µg/ml streptomycin이 함유된 DMEM으로 T-75 플라스크에 이식한 후, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 37°C 항온기에서 monolayer로 배양하면서 플라스크에 암세포가 5 × 10<sup>6</sup>cells/ml 정도 증식되면 완충염수(phosphate buffered saline)로 세척하고 0.05% trypsin-EDTA로 분리시켜 새 배지에 계대 배양하였다.

T-75 플라스크에서 계대 배양 중인 각 암세포에 trypsin을 처리하여 바닥에서 분리한 후 배양액으로 희석하여 35mm 페트리접시에 각 암세포수가 4 × 10<sup>4</sup>cells/dish 되도록 이식하였다. 그리고 다시 배양하면서 24시간 간격으로 trypsin을 처리하여 세포를 페트리접시에서 분리하고 일정량의 0.9% NaCl에 희석하여 세포수 측정기로 각 페트리접시의 세포수를 측정하였다. 측정된 세포수를 semilogarithmic paper에 도시하여 증식곡선을 만들고 이 곡선으로부터 세포수가 2배로 증식하는데 소요되는 시간인 배가시간(doubling time)을 산출하였다.

### 4. 암세포 증식에 미치는 Propolis의 효과 측정

T-75 플라스크에서 배양한 HT-29와 HepG2 인체 암세포는 trypsin으로 처리하여 분리한 후 배양액으로 희석하

고, 35mm 페트리접시에 각 3ml씩 분배 이식시킨 후, 약 24시간 배양하여 각 암세포가 각 접시에 부착, 증식되어 세포수가 HT-29의 경우 약 1~2 × 10<sup>5</sup>cells/dish 및 HepG2의 경우 약 3~4 × 10<sup>5</sup>cells/dish 되었을 때, propolis가 농도별(10µg/ml, 20µg/ml, 30µg/ml)로 함유된 배양액으로 교체하였다. 그후 72시간 배양하면서 24시간마다 각 접시에 증식된 암세포를 trypsin으로 처리하여 분리하고, 0.9% NaCl로 희석하여 세포수 측정기로 각 군의 세포수를 측정하였다. 이때 3개의 페트리접시의 값을 측정하여 평균을 구하였다. 대조군은 실험군에서 각각의 propolis 첨가량에 해당되는 양의 에탄올(0.02% 미만)을 첨가하여 동일한 조건에서 측정하였다. 대조군의 세포수를 기준하여 다음 식에 의하여 각각의 propolis 첨가 배양군의 세포 증식을 또는 사멸을 산출하였다. 증식율은 대조군과 비교하여 propolis 첨가 배양군의 세포 증식 및 증식억제의 정도를 나타내고, 사멸율은 propolis 첨가 배양시 초기의 세포수에 비해 감소된 세포수의 비율로써 (-)값으로 나타나며 이는 세포가 사멸한 정도를 나타낸다. Propolis 첨가 배양군의 배양시간에 따른 증식 세포수가 초기 세포수보다 늘어나면 증식율로 나타내었고, 초기 세포수보다 사멸되어 줄어들면 사멸율로 나타내었다.

증식율(%)=

$$\frac{\text{실험군의배양시간별증식세포수} - \text{초기세포수}}{\text{대조군의배양시간별증식세포수} - \text{초기세포수}} \times 100$$

사멸율(%)=

$$\frac{\text{실험군의배양시간별증식세포수} - \text{초기세포수}}{\text{초기세포수}} \times 100$$

### 5. Propolis에 의한 각 암세포의 크기 분포 변화 및 형태의 조직학적 관찰

HT-29와 HepG2를 propolis가 농도별(20 및 30µg/ml)로 첨가된 배양액에서 72시간 배양하면서 24시간마다 암세포의 모양을 현미경(Olympus사)으로 관찰 및 촬영하고, 암세포의 크기 분포를 세포크기 분포측정기(size distribution analyzer)와 X-Y recorder를 이용하여 측정하였다.

### 6. 암세포의 세포주기에 미치는 Propolis의 영향

Propolis가 20 또는 30µg/ml 첨가된 배양액에서 HT-29와 HepG2를 72시간 배양한 후 각 암세포를 trypsin 처리하여 수집한 후 세포주기를 분석하였다.<sup>23)</sup> 수집한 세포현탁액(2.5 × 10<sup>6</sup>cells/ml) 0.2ml에 1.8ml trypsin 용액을 넣고 실온에서 10분간 방치한 후, RNase와 trypsin inhi-

bitor가 포함된 용액을 최종 농도 0.1mg/ml 첨가하여 다시 10분간 상온에서 반응시켰다. Propidium iodide 염색용액을 최종 농도 50µg/ml 되도록 처리하고 어두운 곳에서 10분간 반응시킨 후, 세포주기분석기(cell cycle analyzer, Becton Dickison사)로 585nm에서 나오는 형광을 측정함으로써 세포주기 각 단계의 분포를 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Propolis의 암세포 증식 억제 효과

HT-29 및 HepG2 암세포의 배가시간(doubling time)은 각각 22 및 40시간으로 암세포가 정상적으로 증식됨을 알 수 있었다.

인체 결장암 세포인 HT-29를 propolis가 10, 20 및 30µg/ml씩 함유된 배양액에서 24, 48 및 72 시간 배양하면서 증식율을 비교한 결과는 Fig.1에 나타내었다. 대조군에서는 출발시 세포수  $1.3 \times 10^5$  cells/dish에서 24, 48 및 72 시간 배양 후 각각  $2.2 \times 10^5$ ,  $4.3 \times 10^5$  및  $8.2 \times 10^5$  cells/dish가 배양되어 배양시간의 경과에 따라 점차로 증식되었다. 그리고 10µg/ml propolis의 첨가 배양시에는 대조군과 큰 차이가 없이 증식되었으나, 20µg/ml 첨가 배양시에는 24, 48 및 72시간에 각각 증식율이 89%, 50% 및 19%로 나타나 증식이 11~81% 억제되었다. 그리고 30µg/ml 첨가 배양시에는 각각 증식율이 67%, 30% 및 10%로 암세포 증식

이 33~90% 억제되었다.

인체 간암 세포인 HepG2를 대상으로 propolis를 10, 20 및 30µg/ml 첨가한 배양액에서 24, 48 및 72 시간 배양하면서 증식율과 사멸율을 비교한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 출발시 세포수  $3.3 \times 10^4$  cells/dish에서 24, 48 및 72 시간 배양시 대조군은 각각  $1.1 \times 10^5$ ,  $2.1 \times 10^5$  및  $5.0 \times 10^5$  cells/dish로 배양시간에 따라 점차 증식하였다. Propolis를 10µg/ml 첨가 배양시에는 대조군에 비해 증식율이 약간 감소되었으나 비슷한 경향의 증식곡선을 나타내었다. 그러나 propolis를 20µg/ml 첨가 배양시에는 대조군의 증식율에 비해 24, 48 및 72시간에 각각 증식율이 56%, 24% 및 16%로 증식이 44~84% 억제되었다. 그리고 30µg/ml 첨가 배양시에는 24시간에 증식율이 25%로 나타나 증식이 75% 억제되었고, 48과 72시간에는 각각 출발시 세포수의 36%와 78%가 감소되어 세포가 현저하게 사멸되는 현상을 보였다.

이상의 결과로 보아 propolis는 *in vitro*에서 인체 결장암 세포인 HT-29와 인체 간암 세포인 HepG2의 증식을 억제시키는 작용이 있는 것으로 평가된다. 각종 항암제의 암세포 사멸작용의 유형을 살펴보면 첫째, 약제의 농도에 의존하는 경우로 단시간에 세포가 사멸되어 시간이 경과되어도 세포 생존율이 일정치 이하로 감소하지 않는 경우이고, 둘째는 작용시간에 의존하는 경우로 농도보다는 시간에 따라 세포사멸 작용이 커지는 경우이며, 셋째는 농도와 시간 동

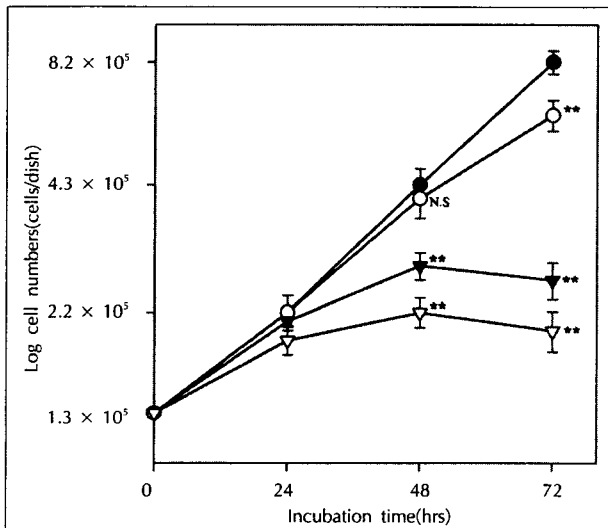


Fig. 1. Growth curves of HT-29 cells in the culture medium containing propolis. Data were presented as mean  $\pm$  SD (n = 3). Closed circle, control group without the addition of propolis; Open circle, treated group with 10µg/ml of propolis; Closed triangle, treated with 20µg/ml of propolis; Open triangle, treated with 30µg/ml of propolis. \*\*Significantly different between control and treated groups by t-Test at  $p < 0.01$ , <sup>N.S</sup>Not significant.

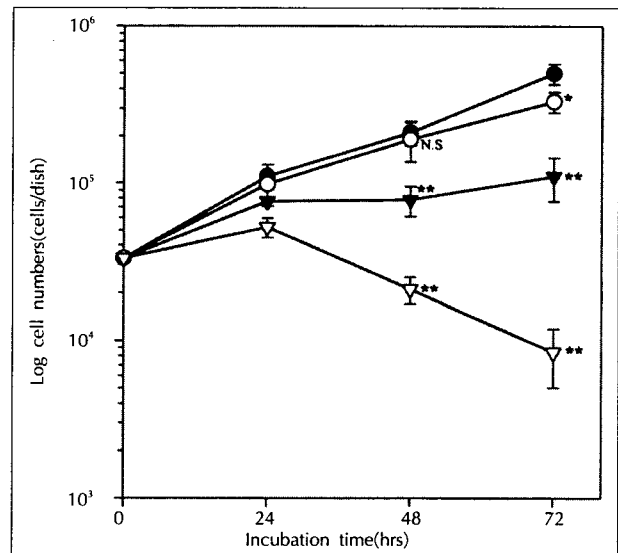


Fig. 2. Growth curves of HepG2 cells in the culture medium containing propolis. Data were presented as mean  $\pm$  SD (N = 3). Closed circle, control group without the addition of propolis; Open circle, treated group with 10µg/ml of propolis; Closed triangle, treated with 20µg/ml of propolis; Open triangle, treated with 30µg/ml of propolis. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , <sup>N.S</sup>Not significant.

시 의존성으로 고농도에서는 단시간에 저농도에서는 시간에 따라 사멸작용이 비례되는 등으로 구분할 수 있는데<sup>24)</sup>, 본 실험의 결과는 셋째 경우에 해당되는 것으로 보여진다.

천연물인 쑥과 인삼 등의 추출물도 효과적인 항암효과를 나타낸다고 보고되었는데,<sup>20-23)</sup> propolis와 쑥의 추출물을 HepG2 암세포에 처리하여 72시간 배양한 결과를 비교하여 보면, propolis의 경우 30 $\mu$ g/ml 처리시에 사멸율이 -78%로 나타난 반면, 쑥의 경우는 10배 높은 농도인 300 $\mu$ g/ml 처리시에 사멸율이 -61%로 보고되었으며,<sup>21)</sup> propolis 및 인삼의 추출물을 HT-29 암세포에 처리하여 72시간 배양한 결과를 비교하여보면, propolis의 경우 30 $\mu$ g/ml 처리시에 증식이 90% 억제되는 것으로 나타났고, 인삼의 경우는 3.3배 높은 농도인 100 $\mu$ g/ml 처리시에 증식이 89% 억제된다고 보고된 바 있어,<sup>23)</sup> propolis 추출물은 보고된 다른 천연 추출물과 비교하여 우수한 암세포 증식억제 효과를 가짐을 알 수 있었다.

### 2. 암세포 크기 분포에 미치는 Propolis의 영향

propolis를 20 및 30 $\mu$ g/ml 첨가한 배양액에서 HT-29와 HepG2를 72시간 배양한 후 암세포의 크기 분포를 도시한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. HT-29의 경우 대조군의 상대 세포수(relative cell number)의 최대치는 95%로 이는 propolis 20 $\mu$ g/ml 첨가군과는 비슷하였으나, 30 $\mu$ g/ml 첨가군에서는 약 80%로 감소되었다. 그리고 세포크기 분포의

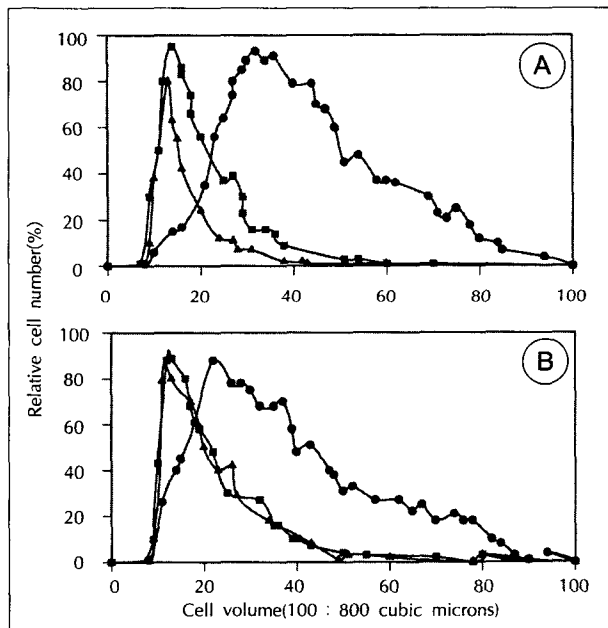


Fig. 3. Size distribution curves of cancer cells incubated with and without propolis for 24 hours. (A)HT-29 cell line, (B)HepG2 cell line. Closed circle, control: Closed rectangle, 20 $\mu$ g/ml: Closed triangle, 30 $\mu$ g/ml.

최대 피크는 대조군에서 248 $\mu$ m<sup>3</sup>이었고 20 $\mu$ g/ml 첨가군에서는 112 $\mu$ m<sup>3</sup>, 30 $\mu$ g/ml 첨가군에서는 96 $\mu$ m<sup>3</sup>으로 각각 크기가 작은 쪽으로 이동되었고, 이때 세포크기 분포는 대조군이 160~560 $\mu$ m<sup>3</sup> 범위인데 비해 20 및 30 $\mu$ g/ml 첨가군은 64~240 $\mu$ m<sup>3</sup> 범위로 세포의 크기가 많이 줄어들었음을 알 수 있었다(Fig. 3A). HepG2의 경우에도 유사한 결과를 얻었는데, 이때 세포크기 분포의 최대 피크는 대조군에서 160 $\mu$ m<sup>3</sup>이었고, 20 $\mu$ g/ml과 30 $\mu$ g/ml 첨가군에서는 128 $\mu$ m<sup>3</sup>으로 대조군에 비해 크기가 작은 쪽으로 이동되었으며, 세포 크기 분포는 대조군이 96~624 $\mu$ m<sup>3</sup> 범위인데 비해 20 및 30 $\mu$ g/ml 첨가군에서는 72~312 $\mu$ m<sup>3</sup> 범위로 나타났다(Fig. 3B). 이상의 결과로 보아 propolis의 처리시에 대조군에 비해 전체 암세포의 크기가 많이 줄어드는 것으로 나타나, propolis의 활성성분이 암세포에 손상을 끼쳤다는 것을 알 수 있었다.

### 3. 암세포의 형태에 미치는 영향

Propolis가 암세포의 형태변화에 미치는 영향을 보기 위해 propolis를 30 $\mu$ g/ml로 HT-29와 HepG2의 세포 배양액에 첨가하여 72시간 동안 배양하면서 관찰한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. HT-29와 HepG2 배양에서 72시간까지의 대조군(A1-3, C1-3) 세포들은 모두 배양시간의 경과에 따라 정상적으로 증식하였음을 볼 수 있었으나, propolis를 넣고 배양한 경우(B1-3, D1-3)에는 HT-29와 HepG2 모두 손상을 받아 증식이 억제되었고 남은 세포도 기형적으로 변형되었으며, 사멸한 세포들이 배양용기에서 떨어져 배지 중에 부유하는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과 역시 propolis가 암세포의 손상을 유도하였음을 의미한다.

### 4. Propolis가 암세포 주기에 미치는 영향

인체 결장암 세포인 HT-29와 간암 세포인 HepG2를 propolis가 20 및 30 $\mu$ g/ml 첨가된 배양액에서 72 시간 배양시 세포주기의 변화는 Table 1에 나타내었다. HT-29의 경우 G1 단계 세포는 대조군의 55.7%에서 propolis를 20 및

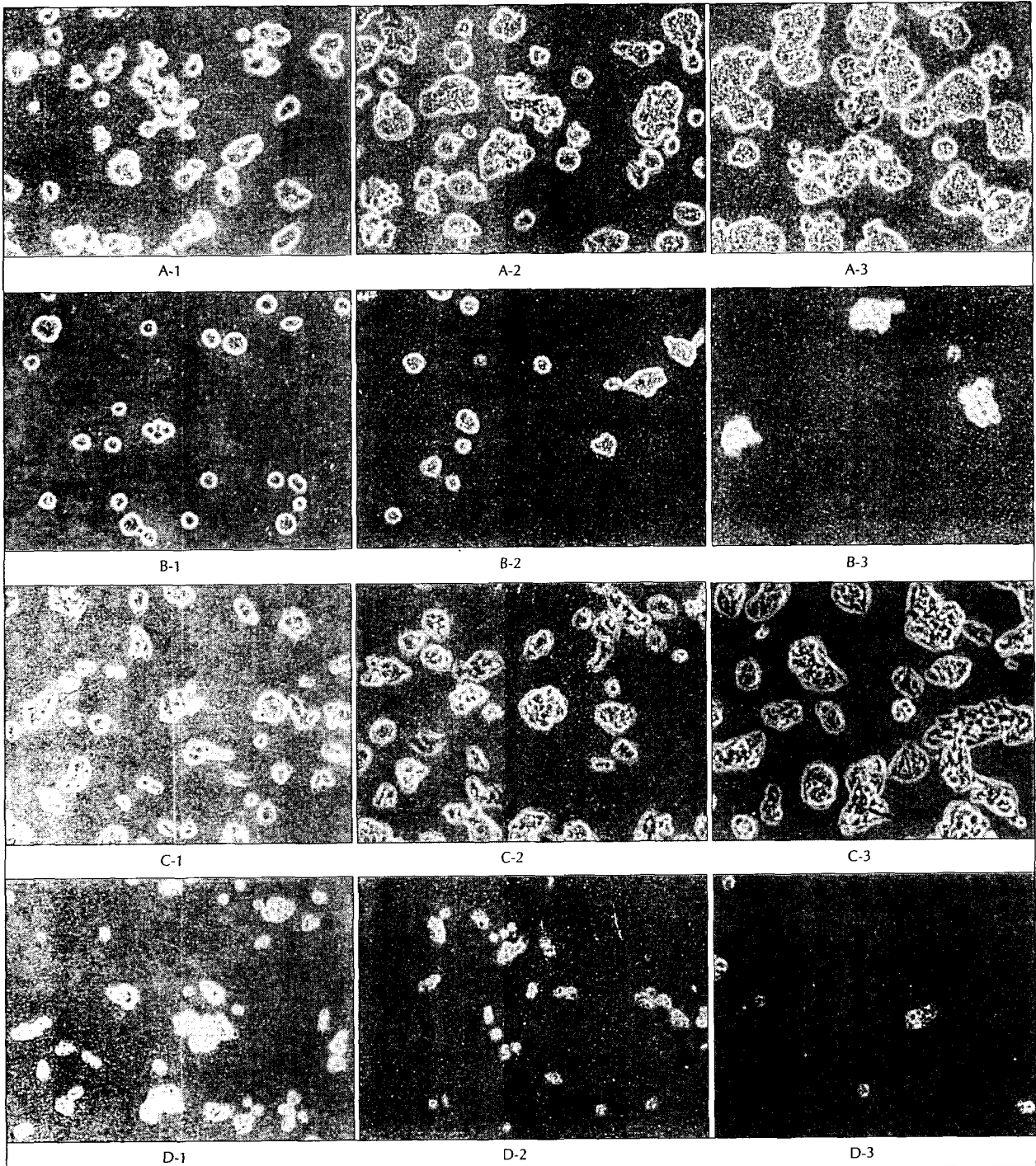
Table 1. Effects of propolis on the cycle distribution of cells in different stages of cell cycle

Cell line	Propolis ( $\mu$ g/ml)	Cycle distribution(%) <sup>1)</sup>		G <sub>1</sub> : S ratio
		G <sub>1</sub>	S	
HT-29	0	55.7	35.8	1.6
	20	58.9	24.3	2.4
	30	62.5	25.5	2.5
HepG2	0	37.3	36.6	1.0
	20	42.2	35.6	1.2
	30	51.2	26.0	2.0

<sup>1)</sup>After the cells were fixed and stained with propidium iodide, the DNA content of each cell was measured by flow cytometry

30 $\mu$ g/ml 첨가배양시 각각 58.9% 및 62.5%로 증가하였고 S단계 세포는 대조군의 35.8%에서 각각 24.3% 및 25.5%로 현저히 감소하였다. 그리고 G1 : S비는 대조군의 1.6에서 각각 2.4 및 2.5로 증가하였다. 인체 간암 세포인 HepG2에

서도 HT-29의 경우와 같은 결과를 얻었다. G1 단계 세포는 대조군의 37.3%에서 propolis를 20 및 30 $\mu$ g/ml 첨가배양시 각각 42.2% 및 51.2%로 증가하였고 S단계 세포는 대조군의 36.6%에서 각각 35.6% 및 20.0%로 감소하였다. 그리고



**Fig. 4.** Photomicrographs (X 100) of HT-29 and HepG2 cells incubated with and without propolis. A-1, 2, 3: HT-29 cells incubated without propolis for 24, 48, 72, hrs., respectively. B-1, 2, 3: HT-29 cells incubated with 30 $\mu$ g/ml of propolis for 24, 48, 72, hrs., respectively. C-1, 2, 3: HepG2 cells incubated without propolis for 24, 48, 72, hrs., respectively. D-1, 2, 3: HepG2 cells incubated with 30 $\mu$ g/ml of propolis for 24, 48, 72, hrs., respectively.

G1 : S 비는 대조군의 1.0에서 각각 1.2 및 2.0으로 증가되었다. 이 결과는 propolis가 세포주기 중 G1단계에서 S단계로 진행을 지체시킴으로써 HT-29 및 HepG2 암세포 증식 억제 효과를 나타내는 것으로 여겨진다.

이상의 결과를 종합해 보면 propolis가 인체 결장암세포인 HT-29와 간암세포인 HepG2의 증식을 효과적으로 억제함을 알 수 있었고, 그 작용기전은 세포주기의 진행 중 G1 단계에서 S단계로 진행을 지체시킴으로써 세포증식이 억제되는 것으로 여겨진다. 앞으로 세포증식 억제의 작용기전에 대한 생화학적 분자 수준의 연구는 더 추구할 과제라 하겠다. 또한, 동물 실험에서의 독성 및 유효성을 *in vitro* 결과와 비교하여 *in vivo*에서의 적용가능성을 검토해보아야 할 것이다.

## 결론

Propolis가 인체 결장암세포인 HT-29 및 인체 간암세포인 HepG2의 증식에 미치는 영향을 *in vitro*에서 확인하였다. 그 결과 propolis는 HT-29 및 HepG2 암세포의 증식을 효과적으로 억제 및 사멸시키는 현상을 보였다. Propolis를 HT-29와 HepG2에 첨가 배양시 세포수가 현저히 감소되었고, 세포의 모양도 변형, 위축되었으며, 암세포의 크기 분포가 현저히 감소되는 세포 조직학적 현상을 관찰할 수 있었다. Propolis는 세포주기 중 G1 단계에서 S단계로의 진행을 지체시킴으로써 암세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다.

## Literature cited

- 1) Sabatier S, Amiot M, Tacchini M, Aubert S. Identification of flavonoids in sunflower honey. *J Food Sci* 57(3): 733-734, 1992
- 2) Pepljnjak S. Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis* identification of pinocembrine and galangin as antiseptic compounds. *Pharmazie* 40(2): 122-123, 1985
- 3) Morse RA, Culloney TW, Gutenmann WH, Littman CB, Lisk DJ. Polychlorinated biphenyl in honey bees. *Bulletin of Environ. Contamination and Toxicol* 38(2): 271-276, 1987
- 4) Yamauchi R, Kato K, Oida S, Kamaeda I, Ueno Y. Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. *Biosci Biotechnol Biochem* 56(8): 1321-1322, 1992
- 5) Strehl E, Volpert R, Elstner EF. Biochemical activities of propolis-extract. III. Inhibition of dihydrofolate reductase. *Z Naturforsch C J Biosci* 49: 39-43, 1994
- 6) Frenkel K, Wei H, Bhimani R, Ye J. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res* 53: 1255-1261, 1993
- 7) Mitamura T, Matsuno T, Sakamoto S. Effect of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumors in mice. *Anticancer Res* 16: 2669-2672, 1996
- 8) Huang MT, Ma W, Yen P, Xie IG. Inhibitory effects of Caffeic acid phenethyl ester(CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells. *Carcinogenesis* 17: 761-765, 1996
- 9) Scheller S, Krol W, Swiacik J, Owczarek S, Gabrys J, Shani J. Antitumor property of ethanolic extract of propolis in mice-bearing Ehrlich carcinoma, as compared to bleomycin. *J Biosci* 44: 1063-1065, 1989
- 10) Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efron L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated
- 11) Walsh SJ, Begg CB, Carbone PP. Cancer chemotherapy in the elderly. *Semin Oncol* 16: 66-75, 1989
- 12) Lipschitz DA, Goldstein S, Reis R, Weksler ME, Bressler R, Neilan BA. Cancer in the elderly: Basic science and clinical aspects. *Ann Intern Med* 102: 218-228, 1985
- 13) Walters RS, Kantarjian HM, Keating MJ, Estey EH, McCredie KB, Freireich EJ. Intensive treatment of acute leukemia in adults. 70years of age and older. *Cancer* 60: 149-155, 1987
- 14) Robert J, Hoerni B. Age dependence of the early-phase pharmacokinetics of doxorubicin. *Cancer Res* 43: 4467-4469, 1983
- 15) Son HS, Hwang WI. A study on the cytotoxic activity of Galic (*Allium sativum*) extract against cancer cells (in Korean). *Korean J Nutrition* 23(2): 135-147, 1990
- 16) Hwang WI, Oh SK. Effects of petroleum ether extract of ginseng root on some enzyme activity in human colon cancer cells (in Korean). *Korean J Ginseng Sci* 8(2): 153-166, 1984
- 17) Hwang WI. A study on the growth inhibition of human colon cancer cells by eucommial
- 18) Lee JY, Hwang WI, Lim ST. Effect of *Platycodon grandiflorum* DC extract on the growth of cancer cell lines(in Korean). *Korean J Food Sci Technol* 30(1): 13-21, 1998
- 19) Hwang WI, Lee SD, Oh SK. A study on the pharmacological activities of Korean medicinal herbs. Mainly on the antitumor activities (in Korean). *Korean Biochem J* 15(3): 205-219, 1982
- 20) Hwang WI. A Study on the antitumor activity of *Panax ginseng*. *Korean J Ginseng Sci* 17(1): 52-60, 1993
- 21) Hwang YK, Kim DC, Hwang WI, Han YB. Inhibitory effect of *Artemisia princeps* Pampan. extract on growth of cancer cell lines. *Korean J Nutrition* 31(4): 799-808, 1998
- 22) Hwang YK, Kim DC, Hwang WI. Antitumor effect of mugwort (*Artemisia princeps* Pampan.) *in vivo*. *Natural Product Sciences* 5(1): 1-6, 1999
- 23) Chung HR, Lee JY, Kim DC, Hwang WI. Synergistic effect of *Panax ginseng* and *Cinnamomum bume* mixture on the inhibition of cancer cell growth *in vitro*(in Korean). *J Ginseng Res* 23(2): 99-104, 1999
- 24) Ohoshi A, Sugeno HG. *Culture of human cancer cells*, 1st ed., Asagurashoten, Tokyo, Japan, 1975