한국생물공학회지 제18권 제4호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 18, No. 4, 324-328(2003)

한국산 도꼬마리로부터 항암물질의 분리 및 특성

† 김 현 수 · [1]이 인 선 · [2]여 수 환 · 성 림 식 · 유 대 식
계명대학교 자연과학대학 미생물학과, [1]식품가공학과, [2]계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터
(접수 : 2003. 7. 15. 게재승인 : 2003. 8. 27.)

Isolation and Characterization of Antitumor Agents from *Xanthium strumarium* L.

† Hyun-Soo Kim, [1]In-Seon Lee, [2]Soo-Hwan Yeo, Lim-Shik Seong, and Tae-Shick Yu
Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
[1]Department of Food Science and Technology, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
[2]Traditional Microorganism Resources Center, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
(Received : 2003. 7. 15. Accepted : 2003. 8. 27.)

In a mutagenicity test using the *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, the *Xanthium strumarium* L. extracts had not a mutagenicity. The extracts were assayed that antioxidative effect using a colony formation assay. The extracts showed protective effects against the cytotoxicity of H_2O_2 and increased the immunity induced by TNF and IL-1β. The modulating effect of *Xanthium strumarium* L. extract on the induction of carcinogenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), was investigated in Wistar rats. The GSH content was found to be reduced by MNNG treatment, but increased on adding extract. In addition the *Xanthium strumarium* L. extract increased p53 expression versus MNNG alone.

Key Words : Antitumor agent, Purification, *Xanthium strumarium* L., Chemoprevention effect, MNNG, Antioxidative effect, p53

서 론

천연물을 이용한 생명공학분야 (BT)의 산업화 정책이 몇몇 지방자치에 의하여 특성화 분야로서 한방 바이오 등의 이름으로 지원함에 따라 학계와 산업계에서 신물질 개발에 대한 관심이 고조되고 있으며, 이에 부응하여 전통적으로 사용되어오던 생약 및 민간 처방약의 약효에 대한 관심도도 높아지고 있다. 실제 동서양을 막론하고 전통 약물은 현대 의학에 사용되고 있는 많은 의약품의 중요한 자원으로 이용되어왔으나, 항세균제의 분야에 있어서는 기존 항세균제의 낮은 생산경비와 우수한 효과 때문에 상대적으로 연구 실적이 미미한 점이 없지 않았다. 그러나 근래에 들어서 여러 가지 한약재들에 대해서 항세균, 항진균, 항산화 효과가 발표되고 있으며(1-3), 황백(4), 오미자(5), 대황 및 황련(6) 등이 광범위한 항균성을 나타낸다고 보고되었다. 또한 충치 유발균인 *Streptococcus mutans* 증식억제 효과를 가진 생약제 및 항신료(7), 초피 추출물의 항암효과(8), 심황 (turmeric)으로부터 분비된 phenol 화합물의 항암효과(9) 등에 관한 연구가 수행되고 있다. 본 연구에서 사용한 도꼬마리 (*Xanthium strumarium* L.)는 국내에 자원이 풍부하고 민간요법에서 창이자라 하여 감기, 두통, 류머티스, 관절염, 해열 및 발한 등 각종 질병에 빈번히 응용되고 있다(10). 이처럼 도꼬마리가 다양한 약리작용을 하는 것으로 보아 항균성 및 항암성 물질의 존재가 예상되어, 본 연구자는 한국산 도꼬마리로부터 새로운 항균 및 항암효과 등 다양한 생리활성기능이 있는 신규물질의 탐색과 응용을 위한 일환으로서 도꼬마리로부터 추출한 성분이 광범위한 항균효과 및 항암효과를 가진다는 사실과 더불어 분자량 386, 230 및 248인 항균 및 항암성 물질을 분리 · 정제한 결과를 보고하였다(11, 12). 따라서 본 연구에서는 도꼬마리 추출물과 정제물질을 부가가치가 높은 신규 약제로서 개발하고자 변이원성 등의 생리활성 효과를 검토한 결과를 보고하고자 한다.

† Corresponding Author : Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
Tel : +82-53-580-5284, Fax : +82-53-580-6447
E-mail : hskim@kmu.ac.kr

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서 사용된 재료는 경남 · 경북 지역의 산야에 자

생하는 *Xanthium strumarium* L. (한국명: 도꼬마리)을 2000년 10월 중 채취하여 음건, 세절한 후 사용하였다.

시료의 조제

김 등(12)의 방법에 따라 도꼬마리 300 g (잎 및 열매)를 증류수를 사용하여 3회 열수 추출하여 감압 농축한 열수 추출액 (1 L)을 ether 및 ethylacetate를 이용하여 분별 추출하고, 각 추출물을 다시 중성, 산성, 염기성의 6개 fraction으로 나누어 추출하였다. 무수 Na_2SO_4로 건조한 후, 농축하여 항균 및 항암효과를 검토한 다음, 농축액을 소량의 methanol로 용해시켜 TLC (Silica gel 60 F_{254})를 사용하여 정성 분석하고 항균활성이 우수한 signal을 silica gel column을 사용하여 분리하였다. 분리된 물질은 HPLC (Shimadzu LC-10AD, Shimpak column C_{18}) 및 GC/MS를 통하여 분석하여 정제도와 분자량을 확인하였으며, 정제과정 중의 항균성 물질의 확인은 *E. coli* K-12 및 *B. subtilis* PCI-219주를 사용하여 agar diffusion법으로 확인하였다.

변이원성 검토

도꼬마리 추출물의 변이원성을 검토하기 위하여 Ames법 (13)을 이용하여 변이원성의 유무를 확인하였다. *Salmonella typhimurium* TA98 및 *Salmonella typhimurium* TA100을 하룻밤 배양시킨 배양액 100 μl을 가한 후 XE-N (ether 중성 추출물) 및 XEA-N (ethylacetate 중성 추출물)의 최종 농도를 각각 1 μg/ml, 10 μg/ml로 조제하여 분주하고, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 전체 용량이 700 μl가 되도록 하였다. 이것을 37℃에서 20분간 incubation한 후 histidine/biotin이 첨가된 top agar를 2 ml씩 가하여 잘 혼합한 후 minimal glucose agar plate 상에 평판 고화시킨 후, 37℃에서 48시간 배양하여 His^+ 복귀변이 colony수를 계측하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다. 변이원으로는 4-*nitro*-*o*-*phenylenediamine* (NPD), 4-nitroquinoline-N-oxide (NQNO) 및 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoquanidine (NTG)를 대조구로서 비교하였다.

세포배양

세포주는 Raw 264.7 (대식세포주) 그리고 Chinease Hamster V79 (lung fibroblast) 등을 동경공업대학으로부터 분양 받아 10% FBS (fetal bovain serum)와 1% antibiotics (streptomycin /penicillin)가 함유된 RPMI-1640 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2에서 배양하였다.

항산화능 검색

V79 cell을 2일간 배양한 후, 200 cells/ml이 되도록 조정하여 dish (60 mm)당 10% FBS가 함유된 MEM 배지에서 37℃, 5% CO_2 배양기에서 2시간 배양 후, 배지를 제거하고 무혈청 MEM배지에 시료를 첨가한 후 다시 4시간 동안 배양하였다. HBS (HEPES buffer saline: NaCl 0.8%, KCl 0.04%, $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.025%, Glucose 0.1%, HEPES 0.59%, pH 7.0)로 세척한 다음, 50 μM H_2O_2가 첨가된 HBS buffer를 넣고 30분간 다시 배양한 후 10% FBS가 첨가된 MEM배지를 넣어 5일간 배양하였다. 다시 MEM배지를 제거하고 99% 메탄올을 첨가하여 cell을 고정시킨 다음 Giemsa stain용액으로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 세포 생존율은 시료 무첨가 대조군에 대한 시료 첨가군의 세포수로 표시하였다.

면역증강 효과

대식세포의 IL-1β, IL-2 및 TNFα의 활성은 rat anti mouse IL-1β 단클론항체 (Endogen), rat anti mouse IL-2 단크론항체 및 rat anti mouse TNFα 단크론항체와 ELISA법을 이용하여 측정하였다. 먼저 5×10^5 cells/ml로 대식세포를 조정하여 96 well culture plate의 각 well에 180 μl씩 분주하고 적당한 농도로 조절한 각 시료들을 20 μl씩 넣어 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 상층액을 취하여 실험에 바로 사용하거나 -20℃에서 보관하면서 사용하였다. IL-1β, IL-2 및 TNFα에 대한 면역증강 효과검색은 각각의 monoclonal antibody가 coating된 polystyrene microtiter plate에 배양 상층액과 표준 용액을 각각 넣고 37℃에서 2시간 반응시킨 후 세척하였다. 세척 후 streptavidin-HRP가 결합된 anti-rat 이차항체 (Endogen)를 부가하여 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 다시 세척한 다음 100 μl의 TMB substrate 용액을 넣어 20~25℃에서 30분 동안 반응시킨 후, 반응 정지액을 첨가하여 ELISA reader로 450~550 nm에서 30분 이내로 그 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 recombinant IL-1β, IL-2 및 TNFα를 각각 사용하여 작성하였고, 단위는 pg/ml로 나타내었다.

Wistar rat을 이용한 chemoprevention mechanism의 규명

6주령된 Wistar male rat을 SLC, Inc. (Shizuoka, Japan)으로부터 분양받아 사용하였고, 이들 rat은 23±2℃, 상대습도 55±10%를 유지하고 밤, 낮의 길이를 12시간씩 인공조명으로 조절하여 사육하였다. 이 때 사료 (CRF-1, Japan Charles River Co., Japan)와 정제수는 자유로이 공급하였다. 실험동물은 각각 5마리씩 네 군으로 나누었으며, 도꼬마리의 정제물과 추출물은 각각 사료의 0.2% 및 1% 농도로 첨가하여 제공하였고 발암물질인 MNNG는 10% DMSO에 용해한 후 150 mg/kg b. w.으로 1회 경구 투여하였다. 즉 MNNG 투여 4시간 후부터 시료가 혼합된 사료를 3일간 공급하였으며, 이때 대조군은 10% DMSO를 150 mg/kg b. w.으로 1회 경구 투여한 다음 사료만 3일간 공급하였다. 동물의 처치는 CO_2로 마취시켜 복부 정중선을 따라 개복하였다.

분리한 간은 생리식염수로 표면에 묻은 혈액을 씻은 후 여지로 압박하여 생리식염수를 가능한 모두 제거한 후 무게를 칭량하였다. 적출한 간조직 1 g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 가한 후 glass teflon homogenizer로 빙냉하에 마쇄하여 간 균질액 (20% w/v)을 만들어 glutathione 함량 측정에 사용하였다.

조직 중의 glutathione 함량은 Ellman의 방법(14)에 의하여 측정하였고, 그 함량은 조직 1g 당 μmole로 나타내었다.

암억제 유전자인 p53 발현 측정

간 microsomal fraction의 단백질 양이 10 μg이 되도록 조정한 다음 2배의 sample buffer와 혼합하여 95℃에서 5분간 가열한 후 준비된 acrylamide gel에 60 volts에서 2시간 전기

영동 (Electrophoresis Unit, Hoefer Co., USA)하였다. 전기영동한 gel의 단백질을 PVDF membrane으로 전사시킨 후, 이 membrane을 5% skim milk가 함유된 TBS buffer에 넣어 4℃에서 1일간 방치하여 membrane의 비특이성 부위들을 차단하였다. 이 skim milk를 제거한 후 membrane을 1차 항체인 p53 (Ab-3)을 1 : 500 비율로 희석한 용액에 담가 실온에서 2시간 반응시킨 후 세척하여 2차 항체인 peroxide Goat anti Mouse IgG를 넣어 실온에서 1~2시간 반응하였다. 세척한 membrane을 ECL detection kit (Amersham Co., USA)의 발색시약 혼합액으로 도포한 다음, X-ray 필름에 노출하여 현상한 후 필름상의 띠를 관찰하였다.

결과 및 고찰

변이원성

도꼬마리 추출물의 발암성의 유무를 검토하기 위하여 시험균 *S. typhimurium* TA98 및 TA100에 대한 변이원성 실험 결과를 Table 1에 나타내었다. 변이원으로는 NPD, NQNO 및 NTG를 사용하여 대조구로서 비교하였으며, 시료인 추출물 XE-N과 XEA-N의 농도가 증가해도 TA 98 및 TA100 두 균주의 복귀변이 colony수가 대조구에 비해 변화가 크지 않은 점을 미루어 보아 각 추출물은 변이원성이 없는 것으로 확인되었다.

Table 1. Mutagenicity test of XE-N and XEA-N using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

Samples \ Strains		TA 98	TA 100
Control		8[1]	67
4-nitro-o-phenylenediamine (NPD)		1304	196
4-nitroquinoline-N-oxide (NQNO)		> 3000	552
N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoquanidine (NTG)		5	199
XE-N[2]	1 μg	9	40
	10 μg	12	14
XEA-N	1 μg	20	27
	10 μg	23	61

[1] : Revertant colony count
[2] : XE-N; Ether neutral extract, XEA-N; Ethylacetate neutral extract

항산화능 검색

Chinese hamster V79 cell을 이용하여 H_2O_2로 유도된 세포독성에 대한 도꼬마리 추출물 및 정제물의 억제효과를 colony formation assay로 조사하였다. Table 2에서 보는바와 같이 H_2O_2만 처리시 세포의 생존율은 23.5% 정도인데 비하여 H_2O_2와 XEA-A, XEA-B 및 XE-A 추출물을 함께 처리하였을 때는 각각 58%, 53%, 63%로서 생존율이 2배 이상 증가하여 H_2O_2에 의해 야기된 cytotoxicity를 예방할 수 있다고 사료되었다. 한편 XE-N 및 XE-N에서 분리된 항균, 항암효과를 가지는 XE-N-S1(12)은 대조구에 비하여 약 10% 정도의 항산화 효과가 있다고 추정되었다.

Table 2. Effects of XE and XEA series against H_2O_2 induced cytotoxicity

Samples	S cell count (SR %)[1]	SH cell count (SR %)[2]
Control	98±3 (100)	23±3 (23.5)
XEA-N[3]	66±6 (67)	25±3 (26)
XEA-A	84±7 (86)	57±2 (58)*
XEA-B	80±4 (82)	52±8 (53)*
XE-N	81±6 (83)	29±2 (30)
XE-A	88±3 (90)	62±6 (63)*
XE-B	62±5 (63)	26±1 (27)
XE-N-S1[4]	89±9 (91)	32±5 (33)

Control : S; no sample group, SH; no sample + 50 μM H_2O_2 group (positive control)
Sample : S; sample group, SH; sample + 50 μM H_2O_2 group
[1] S SR(Survival rate) %= sample group cell / control group cell × 100
[2] SH SR(Survival rate) %= sample + H_2O_2 group cell / control group cell ×100
[3] XEA-N, A, B; Ethylacetate neutral(N), Acidic(A) and Basic(B) extract, respectively
XE-N, A, B; Ether neutral(N), Acidic(A) and Basic(B) extract, respectively
[4] XE-N-S1; purified XE-N-S1 from Kim et al.(12)
* Significantly different from the control by Student's t-test($p<0.05$)

면역증강 효과

도꼬마리 추출물 및 정제물이 TNFα, IL-1β 및 IL-2의 생성에 미치는 영향으로 면역 증강 활성을 검토하였다. Fig. 1에서 보는바와 같이 TNF의 경우 XE-N 추출물에서 1,400 pg/ml (2.7배 증가)로 가장 높은 활성을 나타내었으며, XEA-N 추출물에서도 1,240 pg/ml (2.4배 증가)으로 높은 활성을 나타내었다. IL-1β의 생성은 XE-B 추출물에서 높게 나타났으며(Fig. 2), IL-2의 생성에는 뚜렷한 활성을 나타내지 않았다(Fig. 3). 따라서 도꼬마리 추출물 중 몇 종이 대식세포 활성화 및 cytokine류 생성에 관여한다고 사료되었으며, XE-N의 경우 대식세포를 활성화하여 가장 높은 cytokine류를 유리함을 확인하였다.

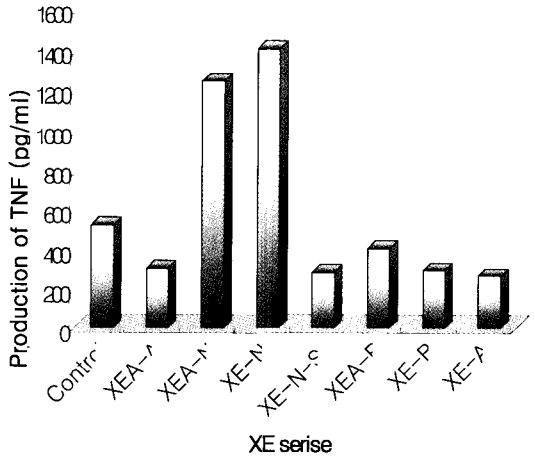

Figure 1. Production of tumor necrosis factor (TNF) in macrophage cell culture by XE series

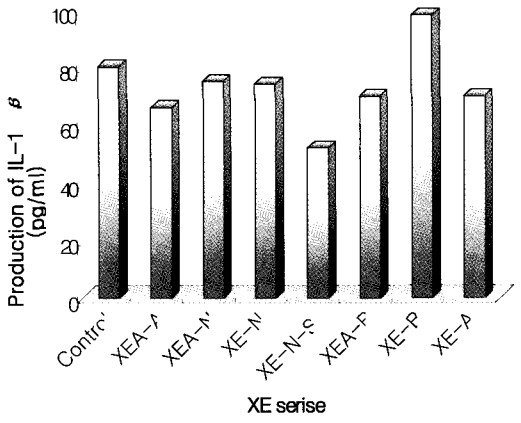

Figure 2. Production of inerleukin-1β (IL-1β) in macrophage cell culture by XE series.

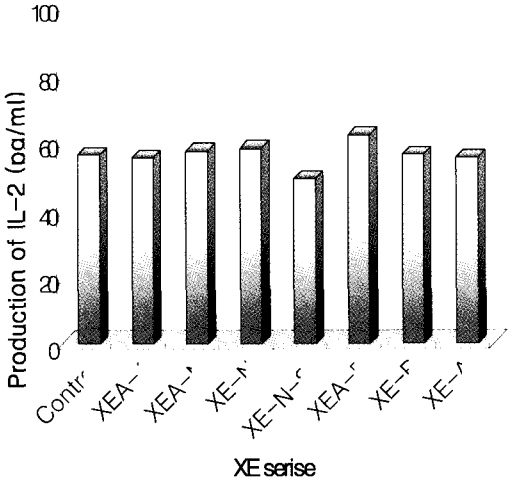

Figure 3. Production of interleukin-2 (IL-2) in macrophage cell culture by XE series

Chemoprevention 기전

도꼬마리 추출물 (XE-N) 및 정제물 (XE-N-S1)의 GSH의 함량변화에 대한 영향을 MNNG를 투여한 rat을 통하여 살펴본 결과, Fig. 4와 같이 MNNG를 투여한 GSH 함량을 살펴보면 MNNG 단독 투여로 감소한 GSH 함량이 도꼬마리 정제물 0.2% 투여군에서 약 44.6%, 도꼬마리 추출물 투여군에서 약 41.5% 증가되었음을 알 수 있었다. GSH는 생체 내에서 환원상태로 존재하며 DNA 합성물질의 이동, 효소활성 조절, 활성산소나 free radical에 의한 세포손상 예방 등에 직접 또는 간접적으로 관여한다(15). 따라서 산화상태 혹은 산화적 스트레스의 영향을 받아 그 함량이 낮을 경우, 세포손상 및 독성에 대한 민감도가 높아져 간 질환, AIDS 등의 질병을 일으키게 된다(16). 따라서 MNNG가 체내로 흡수되면서 조직에 산화상태 혹은 산화적 스트레스 환경을 유발하여 이를 해독하기 위한 GSH의 소모로 인해 체내 GSH가 감소하였으며, 도꼬마리 정제물 및 추출물의 투여로 체내의 GSH 소모를 덜어주어 그 함량이 증가된 것으로 추측된다.

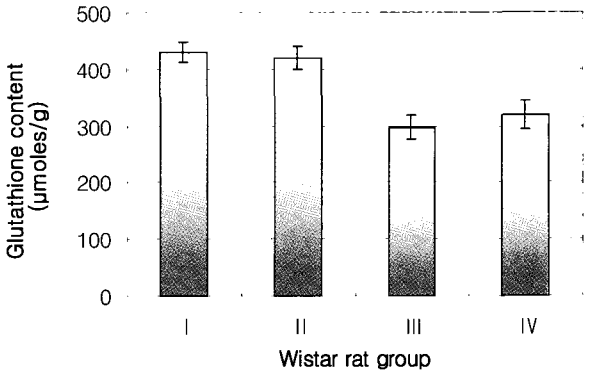

Figure 4. Effect of XE series on glutathione the content in liver of rats treated with MNNG

Ⅰ : XE-N-S1 purified group 0.2% + MNNG group
Ⅱ : XE-N extract group 1% + MNNG group
Ⅲ : MNNG group
Ⅳ : Control group

p53 발현에 미치는 영향

p53 유전자는 세포분화과정 중 G1기에서 손상된 DNA가 있을 때는 세포 조절물질들과 결합하여 이 물질들을 불활성화시켜 G1기에서 S기로의 진입을 억제하며, 또한 PCNA와 결합하여 이를 불활성화시킴으로서 손상된 DNA가 증식되는 것을 차단시키는 이중 작용을 한다. 또한 DNA 손상정도가 심하여 복구가 불가능할 경우 세포사 (apoptosis)를 일으켜 손상된 DNA로부터 증식되는 세포를 미리 제거시키는 암억제 유전자로 알려져 있다(17). 도꼬마리 정제물 (XE-N-S1) 및 추출물 (XE-N)과 MNNG를 투여한 rat의 microsome을 이용한 immunoblot 분석에서 p53의 수준이 MNNG 투여군에 비하여 도꼬마리 추출물을 함께 투여한 경우에 증가하였다(Fig. 5). 이는 p53 암억제 유전자의 발현으로 MNNG에 의해서 손상된 세포의 무절제한 증식이 억제되어 종양으로의 발전이 차단된 효과로 생각된다.

이상의 결과에서 도꼬마리 추출물은 전반적으로 항산화능, 면역증강효과, 암 예방효과 등의 기능성이 있는 것으로 입증되었으며, 각 기능에 따른 다양한 물질을 분리하여 신소재로의 개발 가능성이 큰 약제임이 확인되었다.

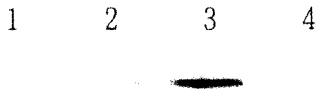

Figure 5. Immunoblot analysis of p53 expression in rats treated with MNNG and/or XE series. Each lane was loaded with 10 μg of rat liver microsomes. p53(Aab-3) antibody(diluted 1 : 500) was used.

Lane 1 : Control group
Lane 2 : 0.2% purification of XE-N-S1 in diet + MNNG
Lane 3 : 1% extract of XE-N in diet + MNNG
Lane 4 : MNNG (150 mg /kg) treatment

요 약

도꼬마리 추출물의 발암성의 유무를 검토하기 위하여 시험균 *S. typhimurium* TA98 및 TA100에 대한 변이원성 실험 결과, 추출물 XE-N과 XEA-N의 농도가 증가해도 TA 98 및 TA100 두 균주의 복귀변이 colony 수가 대조구에 비해 변화가 크지 않은 점을 미루어 보아 각 추출물은 변이원성이 없는 것으로 확인되었다.

도꼬마리 추출물 XEA-A, XEA-B 및 XE-A)의 H_2O_2로 유도된 세포 독성에 대한 억제효과는 각각 58%, 53%, 63%로서 생존율이 2배 이상 증가하였다. 면역 증강 활성은 TNF의 경우 XE-N 추출물에서 2.7배로 가장 높은 활성을 나타내었으며 XEA-N 추출물에서도 2.3배로 높은 활성을 나타내었다. IL-1β의 생성은 XE-B 추출물에서 높게 나타났으며, IL-2의 생성에는 뚜렷한 활성을 나타내지 않았다. 도꼬마리 추출물 및 정제물을 이용하여 동물에 강력한 발암물질인 MNNG를 투여한 후 항산화 효소계를 측정한 결과, 조직의 해독물질인 glutathione (GSH)의 함량이 도꼬마리 정제물 0.2% 투여군에서 약 44.6%, 도꼬마리 추출물 투여군에서 약 41.5% 증가되었다. 또한 도꼬마리 추출물 및 정제물질은 암억제 유전자인 p53의 발현을 매우 증가시켰다.

이상의 결과에서 도꼬마리 추출물은 전반적으로 항산화능, 면역증강효과, 암 예방효과 등의 기능성이 있는 것으로 입증되었으며, 각 기능에 따른 다양한 물질을 분리하여 신소재로의 개발 가능성이 큰 약제임이 확인되었다.

감 사

본 연구는 농림부 농림기술관리센터의 농림기술개발연구과제와 과학기술부 한국과학재단지정 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 연구비 일부지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Oh, D. H., S. S. Ham, B. K. Park, C. Ahn, and J. Y. Yu (1998), Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms, *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 957-963.
2. Shin, D. W., M. S. Kim, and J. S. Han (1997), Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-borne bacteria, *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**. 808-816.
3. Odachi, J., E. Ishii, A. Fukumoto, and M. Tanaka, (1993), Antimicrobial activity of medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aures, Seikatsu Eisei.* **37**, 15-19.
4. Park, W. Y., D. S. Chang, and H. R. Cho (1992), Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **21**, 91-97.
5. Lee, S. H. and Y. S. Lim (1998), Antimicrobial effect of Schizandra chinensis extract on pathogenic microorganism, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 239-243.
6. Chung, S. K., S. J. Lee, Y. J. Chung, W. P. Park, D. S. Lee, and S. H. Cho (1998), Antimicrobial effect of Korean medicinal herb extracts for preserving greenhouse fresh produce, *Kor. J. Postharvest Sci. Technol.* **5**, 13-21.
7. You, Y. S., K. M. Park, and Y. B. Kim (1993), Antimicrobial activity of some medical herbs and spices against *Streptococcus mutans, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 187-191.
8. Kim, S. H. and K. Y. Park (1993), Inhibitory effects of chinese pepper on the mutagenicity and the growth of MG-63 human osteosarcoma cells, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 628-634.
9. Nagabhushan, M. and S. V. Bhide (1992), Curcumin as an inhibitor of cancer, *J. Am. Coll. Nutr.* **11**, 192-198.
10. Yook, C. S. (1990), Coloured medicinal plants of Korea, p553, Academy Press, Seoul.
11. Kim, H. S. and J. O. Shin (1997), Isolation and antimicrobial activity of *Xanthium strumarium* L. extract, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 183-188.
12. Kim, H. S., T. S. Yu, I. S. Lee, Y. W. Kim, and S. H. Yeo (2003), Screening of the antimicrobial and antitumor activity of *Xanthium strumarium* L. extract, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 55-61.
13. Maron, D. M. and B. N. Ames (1983), Revised mehods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.* **113**, 173.
14. Ellman, G. L. (1959), Tissue sulfhydryl group, *Arch. Biochem. Biophysics.* **82**, 70-77.
15. Lasini, A. F., A. Pompella, and M. Comporti (1985), Liver glutathione depletion induced by bromobenzen, iodobenzen and diethylmalate poisoning and its relation to lipid peroxidation and necrosis, *Am. J. Pathol.* **118**, 225-237.
16. Lee, U. W. and L. L. Ji (1996), Alteration of glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats, *J. Nutr.* **126**, 1833-1843.
17. Kuerbiz, S. J., B. S. Plunkett, and W. V. Walsh (1992), Wild type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation, *Proc, Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7491-7495.