

중국 및 국산 백화사설초의 항암활성과 지표물질 연구

이효정 · 송규용 · 라정찬¹ · 안규석² · 김성훈*

경희대학교 동서의학대학원, 1:RNL생명과학(주), 2:경희대학교 한의과대학

Study on antitumor activity of Chinese and Korean Oldenlandiae Herba and its effective compound

Hyo Jeong Lee, Gyu Yong Song, Jeong Chan Ra¹, Kyoo Seok Ahn², Sung Hoon Kim*

Department of Oncology, Kyunghee university, 1:RNL Life Science Ltd, 2:Oriental Medical College, Kyunghee university

Oldenlandiae Herba has been used for the prevention or treatment of cancer in oriental medicine for years. Experimentally its antitumor activity was reported. However, in order to develop new Korean original plants, we tried to study the antitumor activity of Chinese and Korean origin Oldenlandiae Herba. We first evaluated the cytotoxicity of Oldenlandiae Herba originated from China and Korea on HT1080, U937 and SK-mel tumor cells. MeOH extract of Chinese Oldenlandiae Herba was more effective than MeOH extract of Korean Oldenlandiae Herba. Approximately IC50 of two species of Oldenlandiae Herba was 380-450 ug/ml. For evaluation of antiangiogenic activity, proliferation assay with HUVECs(Human umbilical vein endothelial cells) was done with three samples, Chinese Herba and Korean Herba and root. Korean root and herba was more effective than Chinese Herba. Thus, we found Korean Oldenlandiae was more effective on angiogenic activity than Chinese Oldenlandiae. In an analytical study on effective compounds from Oldenlandiae, the spot of ursolic acid was more marked by Korean Oldenlandiae than by Chinese Oldenlandiae, whereas the spot of asperuloside was more pronounced by Chinese Oldenlandiae than by Korean Oldenlandiae by TLC analysis.

Key words : Chinese Oldenlandiae Herba, Korean Oldenlandiae Herba, Korean Oldenlandiae root, cytotoxicity, proliferation, TLC

서 론

백화사설초는 꼭두서니과(茜草科; Rubiaceae)에 속하는 1년생 초본인 쌍낙시돌풀 (Hedyotis lindleyana var. hirsuta HARA or Oldenlandia diffusa L. ROXB.)의 일년생 전초로서 높이 20-40cm이고 밑부분이 옆으로 자리면서 가지가 갈라져서 비스듬히 서며 다세포로 된 백색털이 다소 있다¹⁾. 잎은 대생하고 난형이며 길이 2-4cm, 나비 1-2cm로서 끝이 뾰족하고 밑부분이 둥글고 좁다^{2,7)}. 털이 없거나 적고 잎의 길이가 4 cm정도이며 꽃받침통이 없는 것을 민탐라풀이라고 한다. 산지는 습기가 많은 산기슭에 자라는데 중국에서는 복건, 광둥, 광서, 운남 및 양장강 남쪽 지방에 주로 분포하며, 우리나라에서는 전남의 백운산, 제주도에

자생하고 있으며 김포, 진주에서 재배하고 있다³⁾. 백화사설초의 기미는 차가우나 독이 없고 맛은 달고 쓰며, 작용하는 경락은 위경, 대장경, 소장경 등이고, 본초학적으로 淸熱解毒, 利水通淋, 活血化癥, 消癰의 효능이 있어 폐열기침, 편도선염, 인후염, 충수염, 이질, 황달, 자궁부속기염, 관절염 등의 각종 염증 및 소화기암, 간암, 폐암, 임파암 및 인후암 등 각종 암에 활용되고 있다^{2,3)}. 백화사설초에 대한 연구로는 Yoshida등이 백화사설초가 마우스 비장세포 증식 효과가 있으며, SDS-PAGE gel에 의한 분석에서 백화사설초 유효 식물성단백질이 90-200 kD에 존재한다고 주장했으며, Nishihama등은 중국산 백화사설초(hedyotis diffusa)로부터 glucoside, asperuloside외에 6-O-p-coumaroyl, 6-O-p-methoxycinnamoyl, 6-O-feruloyl ester of scandoside methyl ester를 분리하였고, Tong 등은 중국산 백화사설초로부터 anthraquinone을 분리하였다. 또한 김등은 중국 백화사설초 핵산총과 다당체의 항암활성을 실험적으로 보고한 바가 있다. 이와

* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서천리 1, 경희대학교 동서의학대학원
· E-mail : sungkim7@khu.ac.kr · Tel : 031-201-2179
· 접수 : 2003/04/25 · 수정 : 2003/06/10 · 채택 : 2003/07/25

같이 백화사설초에 대한 연구는 주로 중국산을 중심으로 이루어졌지만, 최근 국산 백화사설초의 재배가 이루지고 이의 활용이 늘면서 국산과 중국산 백화사설초의 효능 비교와 지표물질에 대한 연구를 통해 향후 WTO에 대비하여 국내 자생 식물의 활용을 증대할 필요성이 있어 먼저 국산과 중국산 백화사설초의 항암효과를 3종 암세포에 대한 세포독성과 제대내피세포(HUVEC)에 대한 증식억제 효능을 비교, S-180 암세포에 대한 생존비 측정으로 백화사설초의 항암효과 검증하고 TLC를 통해 대표적인 구성성분의 양을 간접비교하여 향후 HPLC정량의 기초를 수립하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 생약

백화사설초 국산 잎과 뿌리는 진주의 대도농산에서 공급받았으며, 중국산 백화사설초 잎은 대효제약으로부터 구입하여, 미세분말하여 실험에 사용하였다.

2. 시약 및 기기

추출 및 분획에 따른 유기용매 MeOH, n-BuOH(Buthanol), CHCl₃(Chloroform), MC(methylene chloride), EtOAc(ethyl acetate), n-Hx(Hexane) 시약은 대정화학의 EP급 1급 용매를 사용하였고, 분리에 사용된 silica gel은 230-400 mesh, thin layer chromatography(TLC)의 silica gel GF-254 precoated plates는 Merck 제품을 사용하였다. TLC의 UV absorption 확인을 위한 발색 10 % aq H₂SO₄는 역시 Merck를 이용하였다. 기타 시약은 RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), trypsin, EDTA, 5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), XTT, penicillin-streptomycin, antibiotics, gelatine, sodium bicarbonate, M199, heparine, ECGS(endothelial cell growth serum) 등은 Sigma 제품을 사용하였다. VEGF(vascular endothelial cell growth factor), bFGF(basic fibroblast growth factor)는 R&D에서 공급받아 실험하였다. 기기는 CO₂ incubator(vision scientific Co., Model VS-9108MS), clean bench((vision scientific Co., KMC-14001), centrifuge(Beckman Co., GS-6R), inverted microscope(Nikon Co., Japan), ELISA-reader(Emax, U.S.A), rotary vaccum evaporatoe(Buchi 461), autoclave(Hirayama, Japan), micro-pipet (Gilson, U.S.A), culture flask(Falcon3024), multiwell plate(96 well., Falcon) 등을 사용하였다.

3. 세포배양

백화사설초의 in vitro 세포독성 cytotoxicity 측정에는 사람의 Fibro sarcoma HT1080, U937 leukemia 혈액암주, SK-mel-2 melanoma 피부암주를 사용하였는데 이들의 배양액은 모두 l-glutamine이 포함된 RPMI 1640 배지에 56 °C 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 FBS를 10 % 혼합하고, 1 % 항생제(antibiotics)와 NaHCO₃ 2 g을 첨가하여 제조하였다. 정상 혈관 내피 세포인 HUVEC은 삼성산부인과에서 공급받아 분리하여

primary culture한 것을 2세대 배양 후 사용하였으며, 0.1 % gelatine coating한 plates에서 media인 M199에 ECGS와 5 unit heparin, antibioticcmf 첨가하여 배양하였다. 암 세포의 계대는 2-3일에 1회씩 하였으며, monolayer 암주를 부착면으로부터 분리하기 위하여 phosphate buffered saline 용액에 0.25 % trypsin과 EDTA를 녹인 용액을 사용하였다.

4. 백화사설초 중국산, 국산, 국산 뿌리로부터 유기용매 추출

백화사설초 중국산(C), 국산(K), 국산 뿌리(KR) powder를 1 kg 무게 달아 상온에서 100 % MeOH 10 L에 담가 성분 추출하였으며, 0.22um pore filter paper로 여과하고 남은 여액에 다시 10 L의 MeOH를 이용, 3번의 추출을 하였다. 이를 rotary vaccum evaporatoe를 이용하여 감압 농축하였다. 이를 100 % DW에 녹여 fluid로 만든 후 separating funnel에 넣어 비극성 용매부터 극성 용매로의 유기용매 분획하였는데, n-Hx, EtOAc, MC, n-BuOH, residual로 나누어 역시 각각 감압 농축하였다.(scheme 1, 2)

5. Thin layer chromatography

백화사설초 중국산(Ch), 국산(Ko), 국산 뿌리(KO-r)의 MeOH 추출물에 대한 구성 성분 비교를 위해 silica gel이 도포된 plate에 loading 후 mobile solvent로 CHCl₃ : MeOH 비율을 조절하여 TLC chamber에서 전개시켰으며, 이에 대한 UV 흡광도를 측정하였고, 10% 황산에 발색하였다.

6. 활성성분인 Ursolic acid와 Asperuloside의 분리

백화사설초의 TLC 결과를 확인하여 major compound로 보여지는 두 가지 성분을 분리하였는데, ursolic acid의 경우 비극성인 관계로 Hexane과 Ethyl acetate 층으로부터 분리하였고, asperuloside의 경우는 그 극성이 높기 때문에 n-BuOH 분획으로부터 분리하였다. Ursolic acid와 Asperuloside의 분리는 모두 SiO₂ open column chromatography를 이용하였다. Ursolic acid의 경우, 100 % MeOH 추출물에 대해 n-hexane 1L를 가하고 흔든 후 방치하여 n-hexane 가용분 및 MeOH 가용분획으로 나누었다. 각 분획을 따로따로 취하여 농축하여 n-hexane 가용분 3.5 g과 MeOH 가용분 40 g을 얻었다. 이 중 항암활성이 나타난 핵산분획을 이용하여 유효 성분의 분리 작업에 들어갔다. 분리 방법으로는 SiO₂(70-230 mesh) chromatography 방법을 사용하였으며, 이 때 elution solvent로 n-Hexane : EtOAc 혼합용매를 이용하여 점차 ethyl acetate의 비율을 높여가며 elution하여 총 4개 분획(ODH-1...ODH-4)으로 나누었다.(scheme 1)

Asperuloside의 경우, 100 % MeOH 추출물에 EtOAc 1L를 가하여 비극성 성분을 제거하고, 남은 용액에 n-BuOH를 1L 가하여 n-BuOH 가용분 5.2 g과 MeOH 가용분을 얻었다. 이 중 asperuloside가 포함되어 있는 n-BuOH 분획을 silica gel 600 ml에 직경 5.0 cm의 open column chromatography를 이용하였으며, eluent solvent로 CHCl₃ : MeOH = 7 : 1 조건의 혼합용매를 쓰며 점차 극성의 비율을 높여 elution하며 총 6개의 소분획

(ODB-1... ODB-6)의 분획을 얻었으며 이중 ODB-5에서 asperuloside를 분리하였다.(scheme 2)

7. 백화사설초 중국산(C), 국산(K), 국산 뿌리(KR)의 MeOH 추출물의 암세포에 대한 세포독성 측정

Solid tumor인 HT1080 암주와 SK-mel-2 암주에 대한 세포독성은 MTT(5-diphenyl-tetrazolium bromidw) assay로 HT1080과 SK-mel-2가 confluent하게 자란 T75 plate에 trypsin EDTA를 처리하여 cell을 떼어내고 centrifuge 1000 rpm, 3 min 에서 cell을 수거, 이를 hematocytometer로 세어 96 well plate에 1 X 10⁴ cell/ well로 나누고 24 시간 배양한 후, PBS를 대조군으로 하여 백화사설초 중국산(Ch), 국산(Ko), 국산 뿌리(Ko-r)를 농도별로 처리, 다시 24시간 배양하고 MTT를 10 ul씩 처리한다. Mitochondria로부터 formagen이 형성될 때까지 다시 incubator에서 4 시간 배양 후 aspirator로 suction하여 살아있는 세포만을 남기고 DMSO 100 ul를 처리하여 formagen을 풀어준다. 이를 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도 측정하여 대조군과 비교하였다. Suspension tumor인 U937 혈액암주에 대한 세포독성은 MTT assay와 유사한 XTT assay를 이용한다. 암세포가 부착하여 자라지 않기 때문에 confluent하게 자란 cells을 바로 centrifuge 800 rpm, 3 min에서 수거하여 96 well에 약제인 백화사설초 중국산(C), 국산(K), 국산 뿌리(KR)를 농도별로 2 X 10⁵ cell과 함께 처리하여 24 시간 배양한다. 그 후 XTT solution을 PMS와 100:1 희석하여 10 ul 씩 처리하고 살아있는 세포수에 대한 XTT의 확산을 위해 90 min incubation 한 후, ELISA reader 470-640 nm의 reference를 잡아 흡광도 측정하였다.

8. HUVEC에 대한 백화사설초의 proliferation 억제효과 검색

HUVEC은 정상 세포이기 때문에 암처럼 계대하여 매번 쓸 수 있는 세포가 아니며, 일정 계대수 안의 세포(passage 4-5)를 사용하도록 하였으며, proliferation에 대한 stimulation은 VEGF 10 ng으로 처리하였다. proliferation에 대한 효과는 XTT assay를 사용하였다. ECGS가 함유된 M199로 세포를 배양하여 T75에 confluent하게 자랐을 때 96 well 에 1 X 10³ cells/well로 분주하여 24 hr 동안다시 배양한다. 그 후 백화사설초 sample 약제를 농도별로 VEGF가 포함된 M199와 함께 처리하며 48 시간 후 XTT로 HUVEC의 proliferation 정도를 검증한다. 중요한 것은 sample의 농도를 암주에서의 독성을 보이는 IC/50보다 낮은 수준에서 처리하여 정상 세포인 HUVEC에 영향이 없도록 하였다.

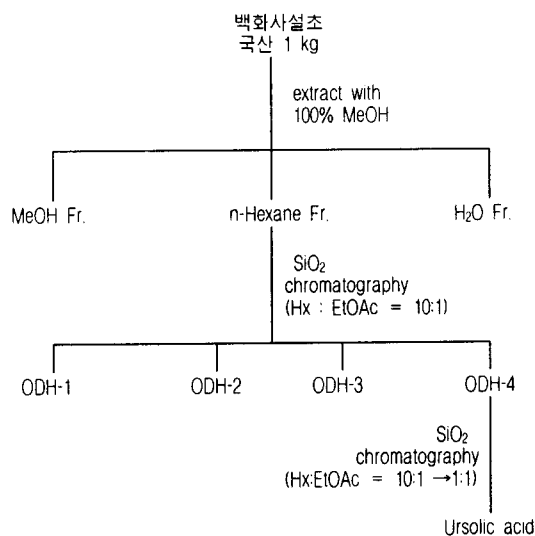
9. S-180 암세포에 대한 생존비 측정

ICR 마우스의 복강내에 7일간 배양된 sarcoma 180 세포를 복수와 함께 취하여 멸균된 냉생리식염수를 가하여 원심분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포를 냉멸균 생리식염수에 부유시켜 다시 원심분리하여 상층액을 제거한후 혼재된 적혈구를 용혈시키고 sarcoma 180 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 3회 세척한 후 hemacytometer로 10⁷cell/ml의 농도가 되도록 세포 부유액을 만들고 이 부유액을 0.1ml씩 복강내에 이식하

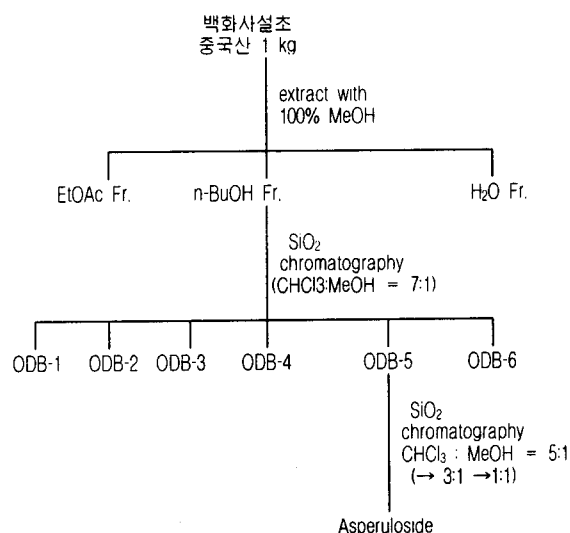
였다. 이식 후 24시간부터 각 군당 7마리씩 배정하였다. 시료는 생리식염수로 용해시켜 보존용액(25mg/mouse, 50mg/mouse)을 만든 후 4℃에 보존하였으며 0.2ml씩 일주일간 연속 투여하였으며 대조군에는 동량의 생리식염수액을 투여하였다. 생존비(T/C%)는 미국립 암연구소 protocol에 언급된 식¹⁰⁾에 따라 계산하였다.

결과 및 고찰

1. 백화사설초 n-Hexane, n-BuOH(buthanol)분획으로 부터 활성 물질의 분리



Scheme 1. Isolation of antitumor compound from Oldenlandia diffusa Herba as non polar property



Scheme 2. Isolation of antitumor compound from Oldenlandia diffusa Herba as polar property

2. 백화사설초 중국산, 국산, 국산 뿌리의 TLC profile

백화사설초 중국산, 국산, 국산 뿌리의 TLC를 보면, 동종임에도 불구하고 지역별, 약용 부위별 그 성분의 차이가 보임을 알

수 있다. 같은 성분이라 할 지라도 그 성분의 함량 차이를 확인할 수 있는데, 이로부터 항암활성이 달라질 수 있다. Fig 1. A의 경우는 극성 성분의 확인을 위해 mobile phase의 극성을 높였을 때 중국산 국산, 국산 뿌리의 극성 성분이 많이 전개되었음을 확인할 수 있다. Fig 1. A의 TLC에서 보면, 국산 백화사설초의 연두색으로 발색된 성분이 다른 중국산이나 국산 뿌리에 비해 다른 특이 성분으로 보여지며, 마찬가지로 중국산의 경우 국산 백화사설초에는 뿌리에서나 전초에서 보여지지 않는 성분이 포함되어 있음을 알 수 있다. Fig 1. B는 비극성 성분의 확인을 할 수 있는데 전개된 TLC를 보면, 특히 국산 전초에서의 분홍색 성분인 ursolic acid가 가장 그 성분 함량이 높은 것을 알 수 있다(Fig 1-2).

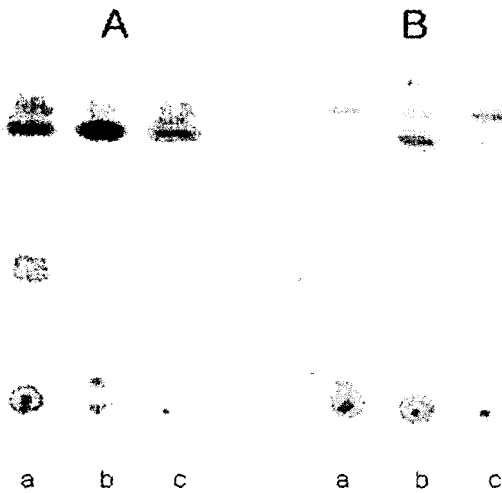


Fig. 1. Thin Layer chromatography of *Oldenlandia diffusa* (WILLD.) Mobile solvent (A) CHCl₃ : MeOH = 3:1, (B) CHCl₃ : MeOH = 7:1, a : China leaf, b : Korea leaf, c : Korea root : ursolic acid, asperuloside

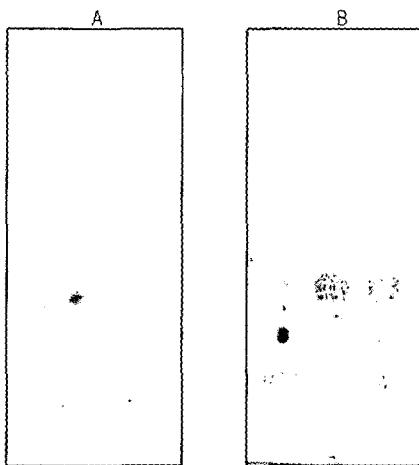


Fig. 2. Thin Layer chromatography of Asperuloside and Ursolic acid from *Oldenlandia diffusa* (WILLS.). A: Asperuloside, left: ODB-5, right: asperuloside, B: Ursolic acid, left: ODH-4, middle: Ursolic acid, right: ursolic acid

또한 국산 백화사설초 전초와 뿌리의 성분은 비극성 쪽의 구성성분은 다만 그 함량의 차이만을 보이지만, 극성 성분에 있어서는 국산 전초에 더 많은 물질이 포함되어 있음을 확인하였

다. 이 TLC를 정리하여 그 구성성분과 함량을 비교하면 중국산의 경우, 극성 성분의 asperuloside가 특히 그 함량이 높으며 국산의 경우 진한 분홍색으로 발색되는 ursolic acid의 함량이 높은 것을 확인할 수 있었다.

3. 백화사설초 중국산(C), 국산(K), 국산 뿌리(KR)의 MeOH 추출물의 암세포에 대한 세포독성 측정

암주에 대한 세포 독성은 항암성을 평가하는데 가장 기반이 되는 실험으로 약제의 독성을 검증하여 항암 실험에 대한 방향을 설정하게 해줄 수 있다. 본 실험에서는 각지 다른 origin을 갖고 있는 암주 세가지 HT1080, SK-mel-2, U937에 대한 세포 독성을 실험하였다. HT1080은 전이성이 강한 암주인데 이에 대해서는 중국산 잎, 국산 뿌리, 국산잎의 순 이였고, 사람의 백혈병 암주인 U937과 사람의 피부암주인 SK-MEL에 대해서는 3가지 백화사설초 시료간에 큰 유의적인 차이가 없었다. 그러나 암세포에 대해 다소 차이를 보였지만 대체로 세 암주 모두에 대해 IC/50이 350-420 ug/ml인 것을 확인할 수 있었으며, 이는 직접적으로 암세포에 대한 독성을 통해 항암 효과를 보이는 것이 아니라는 것을 알 수 있었다(Fig. 3,4,5).

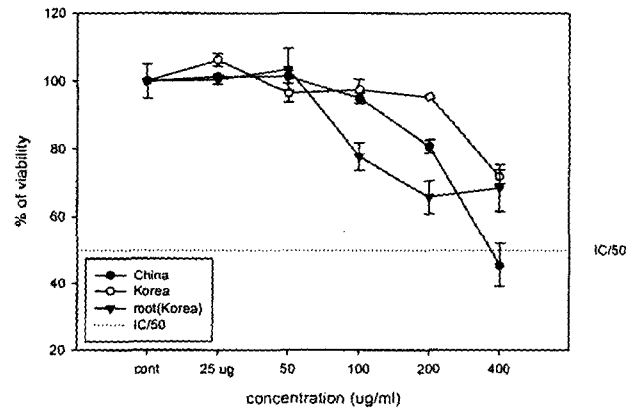


Fig. 3. Cytotoxicity of *Oldenlandia* Herba from China and Korea on HT1080

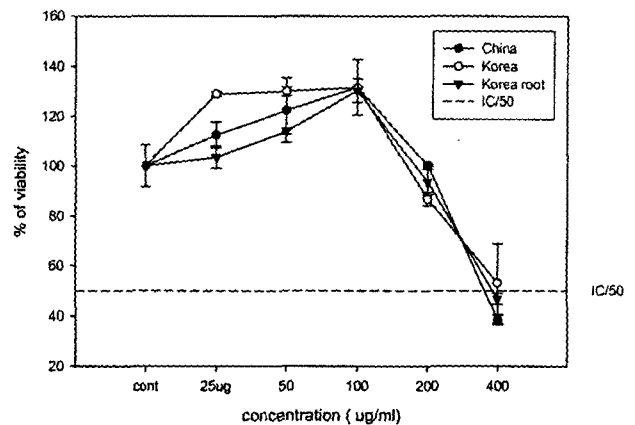


Fig. 4. Cytotoxicity of *Oldenlandia* Herba from China and Korea on U937 cells

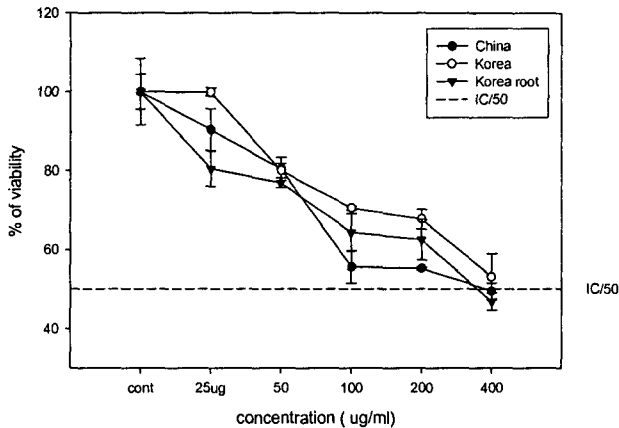


Fig. 5. Cytotoxicity of Oldenlandia Herba from China and Korea on SK-mel-2

4. HUVEC에 대한 백화사설초의 proliferation 억제효과

비교적 국산 뿌리와 중국산 백화사설초가 그중 독성이 높게 보여지나 이 역시 세포 독성이 큰 것이 아니라고 하였다. 이에 백화사설초가 임상에서 항암효과를 보여 빈번하게 쓰여지는 원인을 직접적인 암세포에 대한 독성이 아니라 암세포의 증식이나 암세포로의 혈관 형성을 차단하는 것이라 추론하여 angiogenesis의 억제 효과를 검증해 보기로 하였다. 백화사설초 중국산, 국산, 국산 뿌리에 대한 혈관 내피세포의 세포 proliferation 증식 억제 효과를 확인하기 위해서 암세포에 대한 독성정도가 IC50 정도의 농도인 400-500 ug/ml의 농도보다 낮은 농도에서의 proliferation을 검증이 필요하다. 250 ug/ml부터 유효 농도도 잡기 위해서 500 ug/ml에서부터 농도를 낮추어 가며 실험하였다.

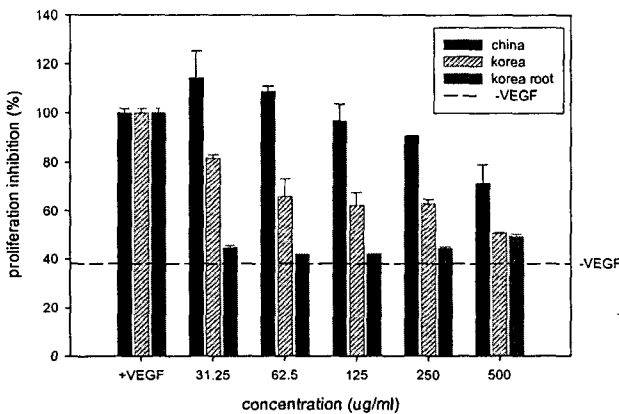


Fig. 6. Inhibition of HUVEC proliferation treated with OD-C, K, KR.

HUVEC proliferation 결과를 보면 혈관내피세포의 증식을 촉진하는 성장인자 VEGF(vascular endothelial growth factor)를 10 ng 처리했더니, 암주에 대한 독성 실험에서 세가지 중국산, 국산, 국산 뿌리 중 가장 강한 독성 효과를 보였던 물질이 중국산인 것에 비해, 국산 뿌리가 가장 그 효과가 큰 것으로 나타났다. 그러나 국산 뿌리는 31.25 ug/ml의 농도에서부터 250

ug/ml의 농도에까지 모두가 비슷하게 HUVEC proliferation을 억제하여 VEGF가 처리되지 않은 정상군 정도까지 억제하는 효과를 보였고, 국산 전초의 경우도 농도 의존적인 방법으로 VEGF로 유도된 HUVEC cell의 증식 효과를 유의적으로 억제함을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 즉 암주에 대한 독성은 가장 많이 보였던 중국산 백화사설초의 경우 오히려 HUVEC에 대해서는 억제 효과보다 낮은 농도에서는 증식효과를 보이며, 그 혈관형성 저해 작용에서는 국산 전초나 국산 뿌리에 비해 약함을 확인할 수 있었다. 이는 TLC 확인상 보여지는 각각의 성분 함량 비율과 구성 성분의 차이 때문인 것으로 추정된다. 국산 백화사설초의 경우 다른 중국산이나 국산 뿌리에 비해 ursolic acid의 함량이 가장 컸던 것과 극성의 연두색 성분 함량이 정상 혈관 세포에 대한 proliferation 억제에 효과를 주는 원인 물질인 것으로 사료되지만, HPLC를 통해 확인하고자 한다. 또한 S-180이 이식된 생쥐의 생존비에 미치는 효과에서는 생리식염수만을 경구 투여한 control군보다 백화사설초를 경구투여한 모든 군에서 T/C%가 높게 나왔으며 그 중에서도 중국산과 국산 백화사설초 50mg/mouse 농도에서 각각 219%, 171%로 가장 높게 나왔다.

5. S-180이 이식된 생쥐의 생존비에 미치는 효과

S-180 이 이식된 생쥐에 국산 및 중국산 백화사설초를 7일간 경구투여한후 체중증가를 측정하였던바, 복수암으로 인한 체중증가는 대조군에서는 암주 이식 후 8일에 급격히 증가하여 10일에 모두 죽었다.

Table 1. Effect of Oldenlandiae Herba on MST and T/C% in ICR Mice Bearing

Group	No. of animals	MST(day)	T/C %
Control	7	8.3	100
K25	7	10.6	127.7
K50	7	11.2	134.9
C25	7	11.5	138.5
C50	7	18.25	219.9
KR25	7	10.6	127.7
KR50	7	14.2	171

MST: mean survival time, T/C% = MST of sample/ MST of Control x100

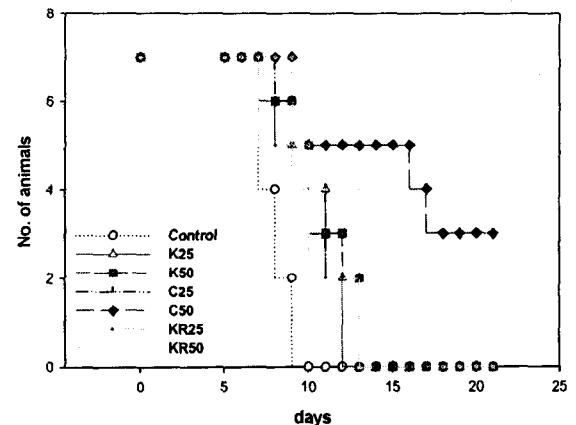


Fig. 7. Effect of Oldenlandiae Herba on the survival of sarcoma 180 tumor bearing mice. (K: 국산 백화사설초, KR: 국산 백화사설초 뿌리, C: 중국산 백화사설초, 25: 25mg/mouse, 50:50mg/mouse)

평균 생존일수에서 대조군의 MST는 8.3일, 국산 백화사설초 전초 25mg, 50mg에서 각각 10.6일, 11.2일로 중국산 백화사설초 전초 25mg, 50mg는 각각 12일 18.3일, 국산 백화사설초 뿌리 25mg, 50mg의 농도 각각에서 10.1일, 14.2일로 나타났다. (Table 1., Fig. 7.)

감사의 글

본 연구는 2002년 농림기술개발연구과제 첨단기술과제의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Yoshida Y, Wang MQ, Liu JN, Shan BE, Yamashita U; Immunomodulating activity of Chinese medicinal herbs and *Oldenlandia diffusa* in particular, *Int J Immunopharmacol.* 19(7) 359-370, 1997
2. Nishihama Y, Masuda K, Yamaki S, Takagi, Sakina, K; three new iridoid glucosides from *Hedyotis diffusa*, *Planta Medica* 43, 28-33, 1981
3. Tong Ing-Ho, Gen-Phon Chen, Yuan-Chuan Lin, Yuh-Meei Lin, Fa Ching Chen, An anthraquinone from *Hedyotis Diffusa*, *Phytochemistry* 25, 1988-1989, 1986.
4. 김성훈, 송규용, 유시용 ; 백화사설초 핵산분획과 다당체가 항암 및 항전이에 미치는 영향, *동의병리학회지* 13(1), 65-75, 1999
5. 이창복: 대한식물도감, 향문사, 1993, p.693
6. 王浴生 : 中藥藥理與應用, 人民衛生出版社, 北京, 344-349, 1983.
7. 江蘇新醫學編 : 中藥大辭典(上), 上海科學技術出版社, 754, 1979.
8. Huang, J.T. : New iridoids from *Oldenlandia diffusa* ROXB, *Arch. Pharmacol.* 314(10), 831-836, 1981.
9. H. Kim, and B. Z. Ahn, Antitumor effect of acetylshikonin and synthesized naphthazarins on L1210 and S-180 systems, *Yakhak Hoeji*, 34, 262-266, 1990.
10. Hellmann, K., Carter, S.K. : *Fundamentals of cancer chemotherapy*, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132-140, 1987.
11. Shan BE, Yoshida Y, Stimulating activity of chinese medicinal herbs on human lymphocytes in vitro, *Int J Immunopharmacol.* 359-70, 1997.
12. Ohtaka, K., Watanabe, S., Iwazaki, R., Hirose, M., and Sato, N. Role of extracellular matrix on colonic cell migration and proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 220:346-352, 1996.
13. Papetti, M., and Herman, I.M., Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282:C947-970, 2002.
14. Kallmann BA, Wagner S, Hummel V, Buttmann M, Bayas A, Tonn JC, and Rieckmann P. Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells. *FASEB J.* 16(6): 589-91, 2002.
15. Zang, H.Y., Theoretical elucidation of activity differences of five phenolic antioxidants. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 20(4): 363-6, 1999.
16. Folkman, J.: Tumor angiogenesis : Therapeutic implications, *N Engl J Med.*, 285, pp.1182-1186, 1971.
17. Yoshida Y, Wang MQ, Liu JN, Shan BE, Yamashita U Immunomodulating activity of Chinese medicinal herbs and *Oldenlandia diffusa* in particular. *Int J Immunopharmacol.* Jul;19(7):359-70, 1997.
18. Shan BE, Zhang JY, Du XN. Immunomodulatory activity and anti-tumor activity of *Oldenlandia diffusa* in vitro *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* May;21(5):370-4. 2001.
19. Wong BY, Lau BH, Jia TY, Wan CP. *Oldenlandia diffusa* and *Scutellaria barbata* augment macrophage oxidative burst and inhibit tumor growth. *Cancer Biother Radiopharm.* Feb;11(1):51-6. 1996.
20. 商務印書館編: 中藥大辭典, p.754, 1978.
21. 福島清吾譯 : 抗癌中藥의 臨床應用, 醫藥出版社, 81, 1987.