

## 조각인 (Gleditsiae Semen) 추출물의 대장암 세포주에 대한 세포독성효과

차미란 · 윤미영 · 김주영 · 황지환 · 박해룡\*

경남대학교 식품생명학과

## The Cytotoxic Effect of the Gleditsiae Semen Extracts on Human Colon Carcinoma Cells

Mi-Ran Cha, Mi-Young Yoon, Ju-Young Kim, Ji-Hwan Hwang and Hae-Ryong Park\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Received August 8, 2006; Accepted September 6, 2006

The present study describes the preliminary evaluation of the cytotoxicity from Gleditsiae Semen extracts. G. Semen was extracted with methanol, ethanol, and acetone, and then cytotoxic effect of these extracts was measured by the MTT reduction assay and phase-contrast microscopy on the HT-29 human colon carcinoma cells. Among these extracts, methanol extract showed the highest cytotoxic activity on the HT-29 cells. The methanol extract was further fractionated with *n*-hexane, diethyl ether, ethyl acetate, and water layer according to the degree of polarity. The water layer showed the highest inhibitory activity on the growth of HT-29 cells, but the other fractions indicated the low cytotoxic activity. In addition, water layer also showed the cytotoxic activity against SW620 human colon carcinoma cells. Based on these results, we suggest that extracts of G. Semen may contain bioactive materials and are potential candidates as chemotherapeutic agents against human colon carcinoma cells.

**Key words:** Cytotoxicity, Gleditsiae Semen, MTT reduction assay, HT-29 cells, SW620 cells

### 서 론

암은 전 세계적으로 위협적인 존재로 인식될 만큼 현대 사회에서 심각한 문제로 대두되고 있다.<sup>1)</sup> 암 환자의 비율은 매년 증가하고 있고,<sup>2,3)</sup> 또한 암은 유력한 사망 원인으로 보고되고 있으며,<sup>4)</sup> 암을 치료하기 위한 연구는 세계 각지에서 활발히 이루어지고 있다.<sup>5,7)</sup> 그러나 이러한 암의 종류는 매우 다양하고,<sup>8)</sup> 그에 따른 약리작용 또한 다양하여 치료에 많은 어려움을 겪고 있다. 특히 대장암의 경우 혈관을 중심으로 많은 수의 세포들이 서로 덩어리진 형태로 성장하는 대표적인 고형암 세포로서,<sup>9)</sup> 치료방법이 극히 제한적이고 완치가 어려운 암 중 하나이다. 즉, 덩어리진 대장암 세포의 중심부까지 약물이 제대로 투과하지 못하기 때문에 대장암 세포를 완전히 제거하기란 쉬운 일이 아니다.<sup>10)</sup> 현재 약물으로써 대장암을 치료할 수 있는 방법은 거의 없는 실정이고, 수술요법이나 방사선요법 등과 같은 외과적인 치료만이 대장암을 치료하는 제한적인 방법이며, 또한 이러한

치료법으로는 대장암의 완치가 어렵다.<sup>11)</sup> 따라서 많은 연구자들이 대장암 세포의 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 방법을 개발함으로써 대장암 세포뿐만 아니라 대부분의 암세포들의 성장을 효과적으로 억제시키기 위해서 많은 연구를 수행하고 있다.<sup>12-14)</sup> 암의 치료에 있어서 또 하나의 문제점으로 지적되는 것이 바로 항암제의 자체독성이다.<sup>15)</sup> 이러한 항암제의 자체 독성으로 암세포는 물론 정상세포까지 손상시키게 되고, 이로 인하여 오심·구토, 탈모 및 피부손상 등과 같은 부작용이 발생할 수 있다.<sup>16)</sup> 물론 이러한 부작용들은 항암제의 무분별한 세포독성으로 발생하기도 하지만 항암제로 사용하는 재료의 독성이 강할 경우 그 부작용은 더욱 심각해진다. 따라서 이러한 항암제의 부작용을 최소한으로 줄이기 위하여 여러 가지 천연 자원으로부터 정상세포에는 독성이 적으며 암세포에 있어서는 선택적인 항암활성을 가지는 효과적인 항암제를 찾고자하는 시도가 계속해서 이루어지고 있는 실정이다.<sup>17-19)</sup>

본 연구팀에서는 국내·외에서 자생하고 있는 435가지의 약용식물 추출물을 대상으로 인간 대장암 세포주의 성장을 효과적으로 저해하는 천연추출물을 찾는 탐색을 시도하였다. 그 결과 조각인(Gleditsiae Semen) 추출물로부터 강력한 대장암 세포주에 대한 세포독성을 확인 할 수 있었다. 본 연구에 사용된

\*Corresponding author  
Phone: 82-55-249-2689; Fax: 82-55-249-2995  
E-mail: parkhy@kyungnam.ac.kr

조각인은 주엽나무(*Gleditsia japonica* Miquel var. *koraiensis* Nakai)의 씨에 해당하는 것으로써 주로 풍을 다스리고 장을 윤택하게 한다 하여 민간에서 약용으로 사용한다. 그러나 주엽나무의 열매나 잎, 가시를 이용한 여러 가지 생리 활성 물질에 관한 연구는 활발히 이루어지고 있으나<sup>20,23)</sup> 주엽나무의 씨에 대한 연구는 성분분석에 관한 연구<sup>24)</sup>만이 선행된 것으로 아직 조각인의 생물학적 특성에 관한 연구는 많이 진행되지 않았다.

본 연구에서는 대장암 세포주에 대해서 항암활성을 가지는 천연 항암물질을 탐색하기 위한 목적으로 지금까지 연구된 바 없는 조각인의 추출물을 이용하여 대장암 세포주에 대한 항암 활성 효과를 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

**시약 및 실험재료.** 본 실험에 사용한 조각인은 2006년 5월 경남 마산시 (주)금강제약으로부터 제공받아 추출·분획하여 실험에 사용하였다. 대장암 세포주 배양을 위해 필요한 RPMI1640 medium, fetal bovine serum(FBS) 및 penicillin-streptomycin 등은 Gibco-BRL(Grand Island NY, USA)에서 구입하였고, 암 세포의 세포독성 효과를 실험하기 위한 시약으로 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)는 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)로 부터 구입하였으며, LDH(Lactate Dehydrogenase) release assay kit는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)로부터 구입하였다. 그 외의 연구에 사용된 여러 가지 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

**추출물 및 분획물 제조.** 조각인 5g에 methanol, ethanol, acetone 용매를 각각 100 ml씩 가하여 상온에서 3일 동안 정치시켜 추출 한 후, 여과지(5C. 110 mm, Advantec, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하였다. 여과된 추출액은 회전감압농축기(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 40°C에서 감압 농축하여 각 용매 추출물을 얻었다. Methanol 추출물에서 다음 단계의 분획물을 얻기 위하여 용매의 극성을 달리하여 순차적으로 용매분획 하였다. 즉, *n*-hexane과 물을 같은 비율로 분획 추출하여 *n*-hexane층을 분리하였고, 동일한 방법으로 diethyl ether, ethyl acetate 및 물 층으로 분획하여 얻어진 각각의 용매 분획물을 감압 농축시켜 용매를 제거한 분획물을 얻었다. 각 추출물 및 분획물은 5 mg/ml로 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

**암세포배양.** 조각인의 세포독성을 실험하기 위해 한국세포주 은행(KCLB, Seoul)으로부터 인간 대장암 유래의 세포주 HT-29와 SW620을 분양받아 본 실험에 사용하였다. 세포배양을 위해 RPMI1640 medium에 10% fetal bovine serum(FBS) 및 100 unit/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(MCO-18AIC, SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

**암세포의 형태학적 변화 관찰.** 조각인의 각 용매별 추출물 및 분획물을 다양한 농도로 처리했을 때, HT-29 세포주의 형태학적인 변화를 관찰하기 위해 6 well plate에 1 × 10<sup>5</sup> cells/well로

2 ml씩 첨가하여 24시간 동안 배양하여, 적당한 농도로 제조된 추출물 및 분획물을 12시간 처리한 후, phase-contrast microscope(Nikon, Japan)를 이용하여 변화된 HT-29 세포주의 형태학적 특징을 촬영하였다.

**MTT 분석을 통한 세포 생존율 측정.** 조각인 추출물 및 분획물의 세포독성을 측정하기 위하여 MTT reduction assay를 실시하였다. 세포주를 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml로 맞추고 96 well plate에 각각 100 µl씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 각 용매별 추출물 및 분획물을 각각 1, 5, 10, 25 µg/ml의 농도로 제조하여 암세포주에 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후, 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT(5 mg/ml) 용액을 10 µl씩 첨가하여 다시 1시간 동안 배양 시킨다. Formazan 형성을 확인한 후, 배지를 완전히 제거하고, well 바닥에 형성된 formazan을 녹이기 위해 100 µl의 DMSO를 첨가한 후, ELISA reader(Model 680, BioRad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 조각인 추출물을 처리하지 않고 배양시킨 대조군 세포를 100%로 하였을 때의 상대적인 세포성장 억제율로 나타내었다.

**LDH 측정에 의한 세포독성 확인.** 조각인 분획 추출물의 세포독성을 측정하기 위한 방법으로 LDH release assay를 실시하였다. SW620 세포주를 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml로 맞추고, 100 µl씩 96 well plate에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양한 뒤, 1, 5, 10, 25 µg/ml의 농도로 제조한 조각인 분획 추출물을 세포주에 처리하였다. 다시 24시간 동안 배양한 후, 배양액을 새로운 96 well plate에 50 µl 분주하고, 이 배양액에 LDH reagent를 50 µl씩 첨가하여 상온에서 정치시킨 후, 20분간 반응하였다. 반응이 완료되면 stop solution인 1 N HCl을 100 µl씩 첨가하여 반응을 중지시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 살아남은 세포의 LDH 측정을 위해 배양액을 제거한 후, 0.5% Triton X-100용액을 50 µl 첨가하여 40 rpm으로 10분 동안 shaking시켜 의도적으로 세포벽을 깨트린 다음, 같은 방법으로 LDH reagent 50 µl를 첨가하여 반응 시키고, 반응이 끝나면 반응 정지액을 넣은 뒤, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH에 의한 세포독성의 백분율은 배양액과 살아있는 세포에서 유리된 총 LDH에 대한 배양액으로 부터 유리된 LDH의 값으로 계산하여 무처리 대조구와 비교한 값을 나타내었다.

**통계처리.** 모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준편차(SD)를 구하고 각 추출물의 세포독성 정도를 비교하기 위해 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고 Scheffe's test를 이용하여 대조군과 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

## 결과 및 고찰

**조각인 추출물의 암세포 성장 억제 저해 활성 측정.** 조각인 추출물의 인간 대장암 유래의 세포주인 HT-29에 대한 세포독성을 조사하기 위하여 MTT reduction assay와 위상차 현미경을 이용한 형태학적 관찰의 결과는 Fig. 1과 Fig. 2와 같다. 각

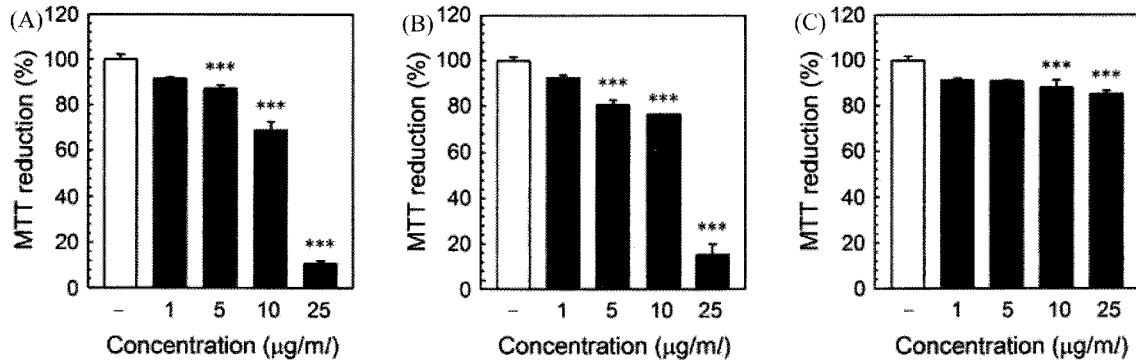


Fig. 1. Effect of *G. Semen* on the growth inhibition in HT-29 cells. The cells were treated with various concentrations of each extracts of *G. Semen* (A: methanol extract, B: ethanol extract, C: acetone extract). After MTT assay, the MTT reduction rate (means  $\pm$  S.D. of triplicate determination) were calculated by setting each of control survivals in the absence of *G. Semen* extracts. \*\*\*significant vs. control untreated cells ( $p < 0.001$ ).

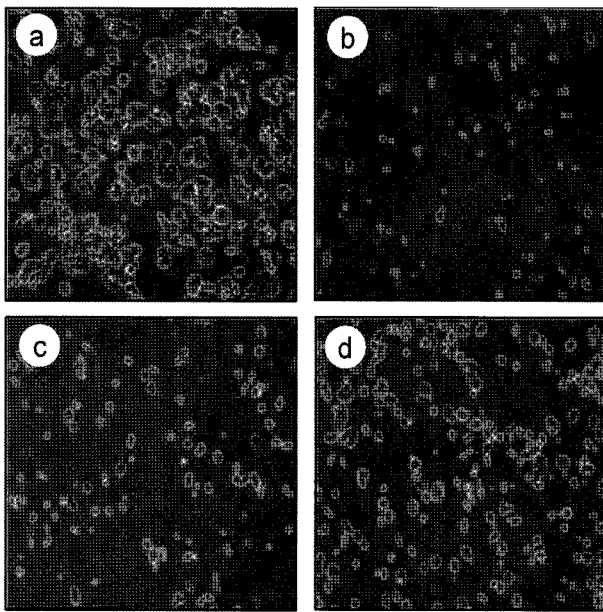
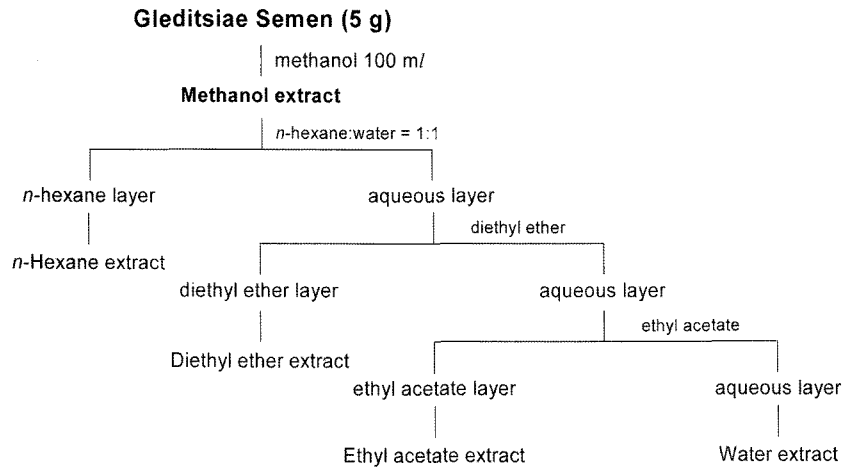


Fig. 2. Morphology of HT-29 cells treated which cytotoxicity of addition with different extracts under a phase-contrast microscope. Cells were exposed to extracts of *G. Semen* (25  $\mu$ g/ml) for 12 h. a: control cells, b: methanol extract, c: ethanol extract, d: acetone extract.

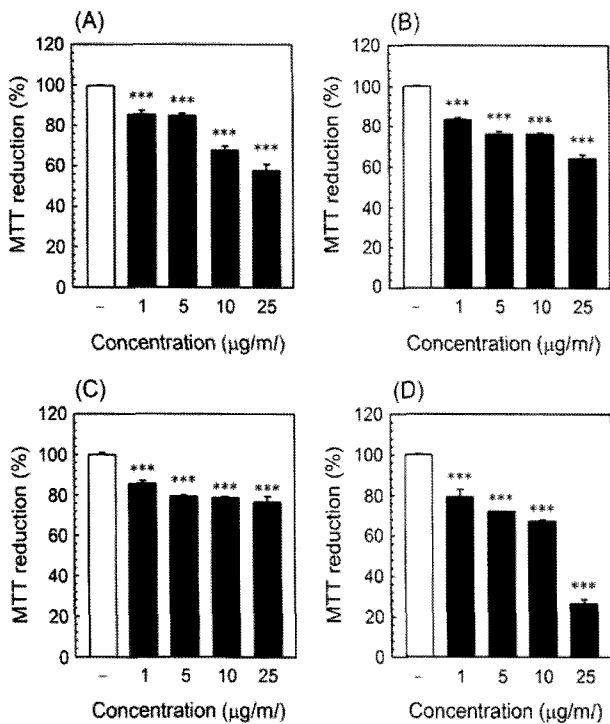
용매별 조각인 추출물을 1, 5, 10, 25  $\mu$ g/ml의 농도로 각각 대장암 세포주에 처리하고 MTT reduction assay 방법을 통하여 무처리한 대조군과 비교하여 활성을 확인하였다(Fig. 1). 그 결과, methanol 추출물에서 농도 의존적으로 아주 강력한 세포독성을 확인할 수 있었고, ethanol 추출물 역시 높은 항암활성을 나타내었다. 그러나 acetone 추출물에서는 조각인 추출물을 농도별로 처리하여도 대조군과 비교하여 활성이 크게 증가하지 않는 것으로 보아 조각인 acetone 추출물에서는 아주 낮은 세포독성을 보이는 것을 알 수 있었다. 즉, 조각인 methanol 추출물을 25  $\mu$ g/ml로 세포주에 처리했을 때 암세포 생존율은 10.3%로 1  $\mu$ g/ml로 처리했을 때의 91.4%에 비해 약 9배 이상의 증가된 세포독성을 확인할 수 있었다. Ethanol 추출물에서도 조각인 추출물의 농도가 25  $\mu$ g/ml일 때의 활성이 15.3%로 높은 세포독성을 나타내었지만, methanol 추출물에 비해서는 상

대적으로 낮은 세포독성을 보였다. 반면 acetone 추출물을 1, 5, 10, 25  $\mu$ g/ml의 농도로 처리했을 때, 각각 91.6, 91.2, 88.3, 85.1%로 활성이 크게 증가하지 않았고 대체적으로 낮은 암세포 증식 억제 활성을 보임을 확인하였다. 이러한 조각인의 각 용매별 추출물이 HT-29 세포주에 대해 어떠한 형태학적 변화를 일으키는지 확인하기 위하여 위상차 현미경을 이용하여 무처리한 대조군과의 비교를 통해 세포의 형태를 관찰하였다. 각 용매별 추출물을 25  $\mu$ g/ml의 농도로 각각 처리한 결과, 무처리한 대조군과 비교하였을 때 확인한 형태학적 변화가 나타났다(Fig. 2). Methanol과 ethanol 추출물에서 대조군과 비교하여 볼 때, 전체적인 세포의 수가 적은 뿐 만 아니라 그 형태가 응축되어 있고, 불규칙적인 형태를 가지면서 세포사멸이 나타난 것을 관찰할 수 있다. 특히 methanol 추출물을 처리한 세포에서는 더 많은 세포사멸이 일어나는 것으로 보아 MTT reduction assay 결과와 동일한 양상으로 조각인 methanol 추출물에서 암세포 성장 억제 능력이 가장 강함을 확인할 수 있었다. 한편 acetone 추출물을 처리했을 때는 세포사멸이 다른 추출물에 비해 적고, 세포독성을 거의 나타내지 않았다.

**조각인 분획물의 세포독성 효과.** 조각인의 세포독성을 나타내는 물질의 특성을 확인하기 위하여 각 용매별 추출물 중에서 세포독성 효과가 가장 좋았던 methanol 추출물을 극성도에 따라 Fig. 3과 같이 *n*-hexane, diethyl ether, ethyl acetate 및 water 순서로 용매 분획하여 그 분획물을 얻었다. 각 분획물의 용매를 제거한 후, 1, 5, 10, 25  $\mu$ g/ml의 농도로 제조하여 HT-29 세포주에 처리하였을 때의 세포독성을 나타낸 결과 Fig. 4와 같이 water층 분획물에서 가장 높은 항암 활성을 가짐을 확인할 수 있었다. 즉, water층 분획물을 처리했을 때 농도 의존적으로 암세포의 생육이 억제 되었으며, 특히 25  $\mu$ g/ml의 농도로 처리했을 때의 활성을 26.4%로 1  $\mu$ g/ml로 처리했을 때인 79.3%보다 3배 정도로 세포독성 효과가 증가한 것을 알 수 있었다. 또한 Fig. 5와 같이 water층 분획물을 농도별로 처리한 후, 위상차 현미경을 이용하여 암세포 성장 억제 효과를 확인한 결과 세포응축이나 단일화와 같은 형태학적인 변화를 보임을 알 수 있었다. 따라서 조각인의 세포독성 효과를 나타내는 물질은 아주 강한 극성의 성질을 나타낸다는 것을 강력하게 시사하고 있었다.

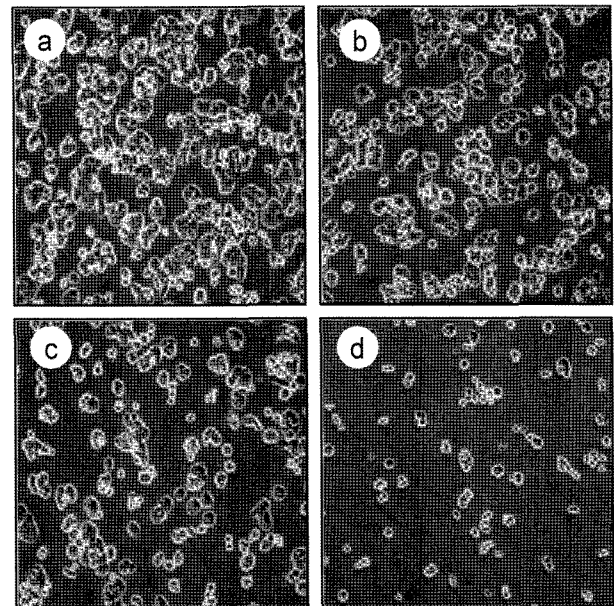


**Fig. 3. Fractionation of the methanol extract from G. Semen.** The extract was fractionated in sequence with *n*-hexane, diethyl ether, ethyl acetate, and aqueous layer according to degree of polarity.



**Fig. 4. Cytotoxicity of the each fraction of methanol extract from the G. Semen.** A: *n*-hexane layer, B: diethyl ether layer, C: ethyl acetate layer, D: water layer. After MTT assay, the MTT reduction rate (means  $\pm$  S.D. of triplicate determination) were calculated by setting each of control survivals in the absence of extracts. \*\*\*significant vs. control untreated cells ( $p < 0.001$ ).

**활성 분획물의 다른 대장암 세포주에 대한 암세포 증식 억제 효과.** HT-29 세포주에 대해 높은 세포독성을 보인 water 분획물이 다른 종류의 암세포에서도 이와 같은 암세포 성장억제능을 나타내는지 확인하기 위하여 HT-29 세포주와는 다른 인간 유래의 대장암 세포주인 SW620 세포주를 이용하여 다음과 같은 실험을 실시하였다. Fig. 6A와 같이 MTT reduction assay를 통하여 water 분획물을 각각 1, 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 SW620 세포주에 대한 세포독성을 확인한 결

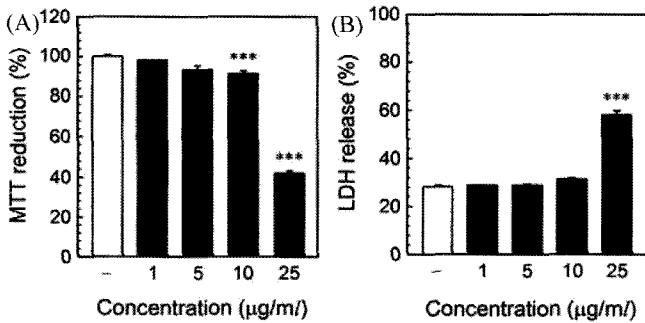


**Fig. 5. Morphology of HT-29 cells treated with water extract under a phase-contrast microscope.** Cells were treated with different concentration of water fraction. a: control cells, b: 5  $\mu\text{g/ml}$ , c: 10  $\mu\text{g/ml}$ , d: 25  $\mu\text{g/ml}$ .

과, 농도 의존적으로 높은 세포독성을 가짐을 확인할 수 있었고, 특히 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리했을 때는 42.0%로 강력한 암세포 생육저해능을 가지는 것을 알 수 있었다. 또한 LDH release assay를 통하여 세포독성을 확인한 결과, 마찬가지로 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포독성을 보임을 알 수 있었다(Fig. 6B). 따라서 조각인은 다양한 종류의 대장암 세포주에 대해 강력한 항암활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

## 초 록

조각인(Gleditsiae Semen)은 동아시아 지역에서 장 기능을 향상시키는 등의 여러 가지 민간요법으로 사용되는 한약재이다.



**Fig. 6. Antiproliferation effect of water fraction from *G. Semen* in SW620 cells.** Cytotoxic effect was determined using MTT reduction assay and LDH release assay (A: MTT assay, B: LDH assay). After MTT assay, the MTT reduction rate (means  $\pm$  S.D. of triplicate determination) were calculated by setting each of control survivals in the absence of water extracts. Data were normalized to the activity of LDH release from vehicle-treated cells (100%) and expressed as percentage of the control (obtained separate plating). \*\*\*significant vs. control untreated cells ( $p < 0.001$ ).

본 연구에서는 조각인의 항암활성을 검색하기 위한 목적으로 methanol, ethanol, acetone으로 추출한 뒤, 인간 유래의 대장암 세포주 HT-29에 처리하여 각 추출물의 암세포 성장 억제능을 확인하기 위하여 MTT-dye reduction assay를 이용하여 실험하였다. 그 결과, methanol 추출물에서 가장 높은 세포독성을 확인할 수 있었고, ethanol 추출물에서도 비교적 높은 암세포 성장 억제능을 볼 수 있었으나, acetone 추출물에서는 거의 세포독성이 나타나지 않았다. 그리고 추출물들을 25 µg/ml의 농도로 암세포에 처리하여 위상차 현미경으로 세포주의 형태학적 변화를 관찰한 결과에서도 methanol 추출물에서의 활성이 가장 강력하게 나타남을 알 수 있었다. 조각인의 항암활성물질들의 용매특성을 알아보기 위하여 methanol 추출물을 극성도에 따라 용매분획 하여 분리한 각 분획물의 세포독성을 확인한 결과, water층 분획물에서 농도 의존적으로 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 또한 조각인의 water층 분획물은 또 다른 대장암 세포주인 SW620에 대해서도 대조군에 비해 25 µg/ml의 농도에서 2배 정도 높은 항암활성을 나타내고 있음을 MTT reduction assay와 LDH release assay를 통하여 확인 할 수 있었다.

**Key words:** Cytotoxicity, *Gleditsiae Semen*, MTT reduction assay, HT-29 cells, SW620 cells

### 감사의 글

본 연구는 2006학년도 경남대학교 학술논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Lin, H. I., Lee, Y. J., Chen, B. F., Tsai, M. C., Lu, J. L., Chou, C. J. and Jow, G. M. (2005) Involvement of Bcl-2 family, cytochrome c and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett.* **230**, 248-259.

2. Kim, O. H., Chung, S. Y., Park, M. K., Rheu, H. M. and Yang, J. S. (1999) Anticancer activity of natural products including *Salvia miltiorrhiza*. *J. Appl. Pharmacol.* **7**, 29-34.

3. Han, E. J., Roh, S. B. and Bae, S. J. (2000) Cytotoxicity of *Daucus carota* L. on various cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 153-160.

4. Eun, J. S. (1992) Effect of several combined preparation of crude drugs on the adverse effects of anticancer agent-mitomycin C. *Kor. J. Pharmacogn.* **23**, 248-258.

5. Kwon, H. J., Hong, Y. K., Kim, K. H., Han, C. H., Cho, S. H., Choi, J. S. and Kim, B. W. (2006) Methanolic extract of *Pterocarpus santalinus* induces apoptosis in HeLa cells. *J. Ethnopharmacol.* **105**, 229-234.

6. Rhoo, I. J., Park, H. R., Choo, S. J., Hwang, J. H., Park, Y. M., Bae, K. H., Shin-ya, K. and Yoo, I. D. (2006) Selective cytotoxic activity of valinomycin against HT-29 human colon carcinoma cells via down-regulation of GRP78. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 817-820.

7. Byun, K. S., Lee, Y. W., Jin, H. J., Lee, M. K., Lee, H. Y., Lee, K. J., Heo, M. Y., Yu, C. Y. and Lee, J. H. (2005) Genotoxicity and cytotoxicity in human cancer and normal cell lines of the extracts of *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **13**, 199-205.

8. Sim, S. J. and Park, S. W. (2005) Development trends of next generation anticancer drug, Epothilones. *Prospectives of industrial Chemistry* **8**, 1-11.

9. Yu, Z. and Li, W. (2006) Induction of apoptosis by puerarin in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett.* **238**, 53-60.

10. Kim, K., H., Park, H. Y., Nam, J. H., Park, J. E., Kim, J. Y., Park, M. I., Chung, K. O., Park, K. Y. and Koo, J. Y. (2005) The inhibitory effect of curcumin on the growth of human colon cancer cells (HT-29, WiDr) *in vitro*. *Korea J. Gastroenterol.* **45**, 277-284.

11. Lee, K. H., Yu, C. S., Kim, H. C., Kim, J. R., Kim, Y. M., Kim, J. S. and Kim, J. C. (2004) Outcome of curative resection in patients with completely obstructing colorectal cancer. *J. Korean Surg. Soc.* **66**, 199-204.

12. Park, H. R., Tomida, A., Sato, S., Tsukumo, Y., Yun, J., Yamori, T., Hayakawa, Y., Tsuruo, T. and Shin-ya, K. (2004) Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 1300-1310.

13. Xu, R., Zhou, B., Fung, P. C. W. and Li, X. (2006) Recent advances in the treatment of colon cancer. *Histol. Histopathol.* **21**, 867-872.

14. Yun, J. M., Kwon, H., Mukhtar, H. and Hwang, J. K. (2005) Induction of apoptosis by Panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in human colon cancer HT-29 cells. *Planta. Med.* **71**, 501-507.

15. Shin, S. J., Kim, S. W., Cho, S. H., Bae, D. H., Kang, G. J. and Kim, D. S. (1988) A clinical evaluation of toxic effects of Cis-Platinum in cervical epithelial carcinoma. *Korean J. Obstet. Gynecol.* **25**, 181-185.

16. Yang, J. H. (2005) The effects of foot reflexology on nausea, vomiting and fatigue of breast cancer patients undergoing chemotherapy. *J. Korean Acad. Nurs.* **35**, 177-185.

17. Cho, S. I., Moon, G. I., Kim, H. W. and Jeong, H. W. (2006) Inhibitive effects of cotton plant sectional extracts in cancer cell

- lines. *Kor. J. Herbology* **21**, 57-62.
18. Hemalswarya, S. and Doble, M. (2006) Potential synergism of natural products in the treatment of cancer. *Phytother. Res.* **20**, 239-249.
19. An, B. J., Lee, C. E., Son, J. H. Lee, J. Y., Choi, G. H. and Park, T. S. (2005) Antioxidant, anticancer and Tyrosinase inhibition activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* T. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 280-284.
20. Chow, L. M., Chui, C. H., Tang, J. C., Teo, I. T., Lau, F. Y., Cheng, G. Y., Wong, R. S., Leung, T. W., Lai, K. B., Yau, M. Y., Gou, D. and Chan, A. S. (2003) *Gleditsia sinensis* fruit extract is a potential chemotherapeutic agent in chronic and acute myelogenous leukemia. *Oncol. Rep.* **10**, 1601-1607.
21. Chow, L. M., Chui, C. H., Tang, J. C., Lau, F. Y., Yau, M. Y., Cheng, G. Y., Wong, R. S., Lai, P. B., Leung, T. W., Teo, I. T., Cheung, F., Guo, D. and Chan, A. S. (2003) Anti-angiogenic potential of *Gleditsia sinensis* fruit extract. *Int. J. Mol. Med.* **12**, 269-273.
22. Chui, C. H., Tang, J. C., Lau, F. Y., Teo, I. T., Yau, M. Y., Wong, R. S., Cheng, G. Y., Ho, S. K., Leung, T. W., Hui, K. S., Wong, M. M., Fatima, S., Cheng, C. H., Cheung, F., Tan, W. Q., Chow, L. M., Guo, D. and Chan, A.S. (2004) *Gleditsia sinensis* fruit extract induced growth inhibition involves basic fibroblast growth factor and nitric oxide. *Int. J. Mol. Med.* **13**, 169-173.
23. Hwang, Y. J., Lee, S. H., Ryu, S. Y., Ahn, J., W., Kim, E. J., Ro, J. S. and Lee, K. S. (1994) Chemical study on the phenolic compounds from *Gleditsia japonica*. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**, 11-19.
24. Lee, E. O. and Hwang, D. M. (1976) Amino acids in seeds of *Gleditsia*. *Kor. J. Pharmacog.* **7**, 63-67.