

새로운 항암성 제리쿠드라닌 E 유도체의 합성 및 항암활성

박재호 · 박경란 · 호현순 · 김희두* · 표명윤#

숙명여자대학교 약학대학

(Received August 1, 1999)

Synthesis and Antitumor Activity of Novel Gericudranin E Derivatives

Jae-Ho Park, Kyoung-Lan Park, Hyunsoon Ho, Hee-Doo Kim* and Myoung-Yun Pyo#

College of Pharmacy Sookmyung Women's University, Seoul, Korea

Abstract — The two gericudranin E derivatives, GER-I & II, were synthesized and evaluated their anti-tumour activities for the elucidation of structure-activity relationship. 2,4,6-Trihydroxyacetophenone was converted to target molecules GER-I and GER-B in 5 steps *via* sequential protection, aldol condensation, Michael type-cyclization, regioselective C-benylation. The cellular growth inhibition of compounds GER-I and GER-II were investigated against P388, L1210, K562, HCT-15, SK-HepG-1, MCF-7 as cancer cell lines and mouse splenocytes as a normal cell by MTT assay.

Keywords □ Gericudranin E, synthesis, antitumor, MTT assay.

최근 식생활 습관의 변화와 환경오염 등으로 암환자의 수가 전세계적으로 계속 증가하고 있는 추세이며, 이러한 질환의 치료제로서 다양한 항암제가 개발되어 있다. 그러나 현재 임상적으로 사용되고 있는 대부분의 항암제는 선택성이 매우 낮아 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 독성을 발현하여 많은 부작용¹⁾을 나타내며, 장기치료로 인하여 암세포에 대한 내성이 형성되는 문제점을 가지고 있다. 따라서 부작용이 적고 강력한 항암작용이 있는 신의약품을 개발하는 연구가 다각도로 활발히 진행되고 있는 실정이다.²⁾

뽕나무과(Moraceae)에 속하는 꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 옛부터 우리나라³⁾와 중국에서 간암치료 및 소화관 악성종양 치료⁴⁾에 민간요법으로 사용되어 왔으며, 각 부위별로 다소의 차이는 있으나 과산화지질의 함량을 억제⁵⁾하는 작용도 보고되어 있다. 최근 Lee 등⁶⁾이 이 식물에서 분리한 flavonoid류인 gericudranin E(Fig. 1)는 구조적으로 C-benylation 된 dihydroflavonol 핵을 가진 물질로서 독성이 적고 항암, 항산화 활성을 나타내는 물질로 밝혀졌으며, 항암제로의 개발에 선도물질로 주목을 받게 되었다. Kim 등은 gericudranin A의 효율적인 전합성 방법을 개발⁷⁾하고, gericudranin 유도체의 구조-활성관계를 규명하여 gericudranin E보다 높은 항암활성을 가진 항암제를 개발하고자 수종의 gericudranin E 유도체를 합성하여 연구를 진행하고 있다.⁸⁾

본 연구에서는 gericudranin E가 A보다 우수한 세포독성을 나타낸다는 점과, phenolic OH의 일부가 methyl ether 형태로 보호된 O-methylated gericudranin A가 gericudranin A보다 강한 세포독성을 나타낸다는 선행연구결과를 바탕으로 하여 GER-I 및 GER-II를 설계, 합성하여 *in vitro*에서 마우스 암세포주 2종(L1210, P388)과 사람 암세포주 4종(K562, HCT-15, SK-HepG-1, MCF-7)에 대하여 암세포 증식 저해정도를 MTT assay로 측정하여⁹⁻¹¹⁾ 이들의 항암활성을 검토하고자 하였다.

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-710-9567 (팩스) 02-703-0736

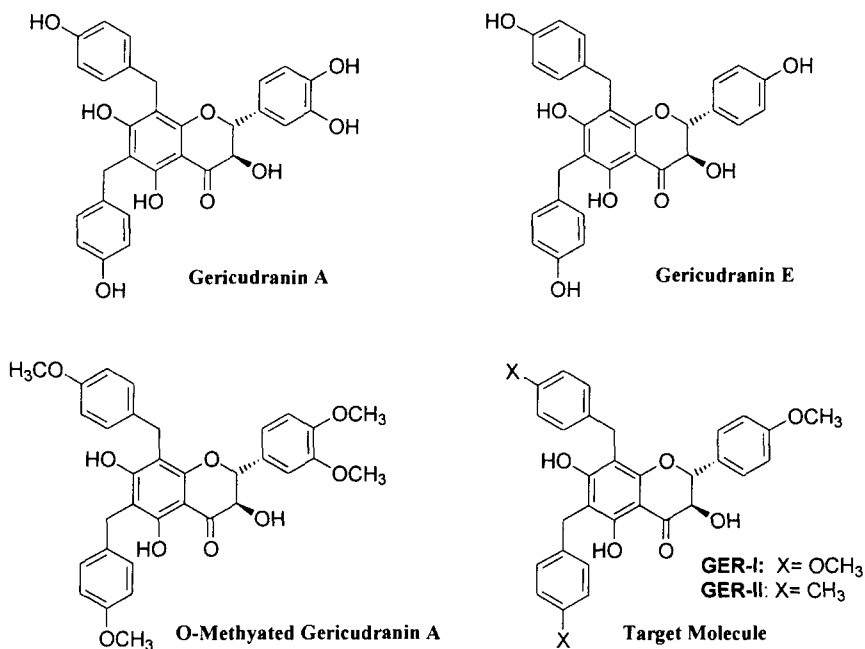


Fig. 1 – Structure of Gericudranin A, E, and their O-methylated Derivatives.

실험재료 및 방법

시약 및 기기

2,4,6-Trihydroxyacetophenone은 Aldrich사의 제품으로 98% 함량의 것을 사용하였다. THF(tetrahydrofuran)는 질소 기류하에서 benzophenone sodium ketyl로 부터 증류하여 사용하였고 1,4-dioxane, 1,2-dichloroethane 및 *p*-methoxy 및 *p*-methylbenzyl alcohol은 CaH₂에서 증류하여 사용하였다. 핵자기 공명(NMR) 스펙트라는 Bruker WP-80 SY, Varian Gemini 300BB를 이용하여 TMS(tetramethylsilane)를 내부 표준 물질로 하여 측정하였으며, 화학적 이동(chemical shift)은 δ 단위로, coupling constant는 Hz로 나타내었다. IR 스펙트라는 Shimadzu IR-435 분광광도계로 측정하였으며, cm⁻¹로 표시하였다. Mass 스펙트라는 VG Trio-2 GC-MS를 사용하여 70eV의 이온화 전압에서 EI로 측정하였다. 녹는점은 Büchi 535 녹는점 측정기와 SYBRON Thermolyne 로 측정하였다. 박층 크로마토그래프(TLC)는 silica gel(Kieselgel 60_{F254}, Merk)를 사용하였고, 컬럼 크로마토 그래피는 silica gel(Kieselgel 60, 230-400 mesh, Merk)를 사용하였다.

항암활성실험에는 adriamycin, cisplatin, MTT와 DMSO는 Sigma제품을, RPMI medium 1640 powder, HEPES, Fetal Bovine Serum(FBS), Antibiotic & Antimycotic agent, Trypsin-EDTA는 Gibco제품을 그 외의 시약은 특급을 사용하였다. 기기는 CO₂ incubator(New Brunswick Scientific Co.), Microtiter plate reader(Spectrophotometer, Dynatech MR5000)를 사용하였다.

합성

화합물 2 및 3은 저자 등이 보고한 문헌기지의 방법에⁷⁾ 의거 합성하였다.

3-(4-Methoxyphenyl)-1-(2,4,6-tris-methoxyphenyl)propenone(4)

2,4,6-tris(methoxymethoxy)acetophenone (3) (1.00 g, 3.15 mmol)을 무수 ethanol 30 ml에 녹이고 KOH (4.50 g, 0.12 mol)을 가하고, 이어서 *p*-anisaldehyde (0.43 g, 3.15 mmol)을 가하고 교반하면서 TLC로 기질이 없어질 때까지 교반한다. 용매를 감압농축하여 제거하고 benzene으로 희석하고 5% HCl로 중성화 한 다음 물, 포화 식염수 순으로 세척하고 무수 sodium

sulfate로 건조, 여과 후 얻은 여액을 감압농축하여 얻은 잔사를 column chromatography(hexane:ethyl acetate=3:1)를 정제하여 황색 고체 1.30 g(95%)을 얻었다.

R_f 0.53(hexane/ethyl acetate=1/1, SiO₂); mp 78~80°C; IR(CHCl₃, NaCl) cm⁻¹ 3000, 2950, 2800, 2400, 1640, 1600; ¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 3.39(s, 6H), 3.51(s, 3H), 3.84(s, 3H), 5.12(s, 4H), 5.19(s, 2H), 6.57(br s, 2H), 6.89(d, 1H, $J=16$ Hz), 6.90(d, $J=9$ Hz, 2H), 7.32(d, 1H, $J=16$ Hz), 7.48(d, $J=9$ Hz, 2H); MS(EI), m/z (relative intensity) 418(M⁺), 373(34), 254(70), 165(100).

[3-(4-Methoxyphenyl)oxiranyl]-(2,4,6-tris-methoxymethoxyphenyl)methanone(5)

화합물 4(1.30 g, 2.98 mmol)를 methanol 40 ml에 녹이고, 별도의 용기에 35% hydrogen peroxide(1.6 mL, 16.04 mmol)를 넣고, 2N-NaOH(1.6 mL)를 가해 만든 용액을 반응액에 천천히 가하면서 교반한다. 2시간 후 반응액에 Na₂SO₃를 가하여 반응을 끝내고, MeOH을 감압농축 제거한 후 benzene으로 희석하고, 유기층을 물, 포화식염수로 세척하고 무수망초로 건조, 여과하여 얻은 여액을 감압농축하여 미색고체 1.35 g(98%)을 얻었다.

R_f 0.6(hexane/ethyl acetate=1/1, SiO₂); mp 64~70°C; IR(CHCl₃, NaCl) cm⁻¹ 3000, 2950, 2850, 1700, 1600; ¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 3.39(s, 6H), 3.47(s, 3H), 3.81(s, 3H), 3.92(d, $J=1.8$ Hz, 1H), 3.96(d, $J=1.8$ Hz, 1H), 5.10(s, 4H), 5.15(s, 2H), 6.52(s, 2H), 6.88(d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.23(d, $J=8.7$ Hz, 2H); MS(EI), m/z (relative intensity) 434(M⁺), 389(34), 285(100).

(2,3)-trans-3,5,7-Trihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)chroman-4-one(6)

Epoxide 5(4.20 g, 9.24 mmol)를 MeOH 50 mL에 녹이고, methanolic HCl 50 mL를 가하고 24시간 이상 교반한다. 기질이 없어진 것을 확인한 후 용매를 감압증류 제거한 뒤 ethyl acetate로 희석하고 aq. NaHCO₃, 물, 포화식염수 순으로 세척하고 무수 sodium sulfate로 건조한 후에 여액을 여과하고 감압농축하여 얻은 잔사를 column chromatography(hexa-

ne:ethyl acetate=2:1)로 정제하여 미색 고체 1.40 g (48%)을 얻었다.

R_f 0.55(hexane/ethyl acetate=1, SiO₂); mp 179-181°C; IR (KBr) cm⁻¹ 3500, 3000, 1620; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆/CDCl₃) δ 3.4(br s, 1H), 3.80(s, 3H), 4.48(dd, $J=11.4, 5.7$ Hz, 1H), 5.05(d, $J=11.4$ Hz, 1H), 5.68(d, $J=5.7$ Hz, 1H), 5.88(d, $J=1.8$ Hz, 1H), 5.92(d, $J=1.8$ Hz, 1H), 6.94(d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.43(d, $J=8.7$ Hz, 2H), 11.8(s, 1H); MS(EI) m/z (relative intensity) 302(M⁺), 165(28), 153(100).

2,6,8-Trihydroxy-5,7-bis-(4-methoxybenzyl)-3-(4-methoxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-naphthalene-1-one (GER-I)

Flavanon 6(300 mg, 1.0 mmol)을 무수 1,4-dioxane 20 ml에 녹이고 *p*-methoxybenzyl alcohol(0.5 ml, 4.0 mmol)을 가한 후, 70~80°C로 유지하면서 교반후 BF₃ etherate(0.85 ml, 6.95 mmol)를 가하고 밤새 교반한다. TLC로 기질이 없어진 것을 확인한 후, 반응액에 물을 가하여 종결한다. 용매를 감압제거후 에틸 아세테이트로 희석하고 이 유기층을 물, 포화 식염수 순으로 세척한 다음 무수 sodium sulfate 로 건조한 뒤 여액을 감압 농축 하여 얻은 잔사를 column chromatography(hexane:ethyl acetate=10:1)로 정제하여 백색 고체 60 mg(11%)을 얻었다.

R_f 0.4(hexane/ethyl acetate=3/1, SiO₂); mp 148-152°C; IR (KBr) cm⁻¹ 3500, 2950, 1620, 1602, 1505; ¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆/CDCl₃) δ 3.51(d, $J=1.5$ Hz, 1H), 3.77(s, 3H), 3.78(s, 3H), 3.82(s, 2H), 3.84(s, 3H), 3.85(s, 3H), 3.92(s, 1H), 3.93(s, 1H), 4.54(dd, $J=1.5, 11.7$ Hz, 1H), 5.04(d, $J=11.7$ Hz, 1H), 5.65(br s, 1H), 6.79(d, $J=8.7$ Hz, 2H), 6.83(d, $J=8.7$ Hz, 2H), 6.98(d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.10(d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.20(d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.46(d, $J=8.7$ Hz, 2H), 11.5(s, 1H).

2,6,8-Trihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-5,7-bis-(4-methylbenzyl)3,4-dihydro-2H-naphthalen-1-one(GER-II)

Flavanon 6(400 mg, 1.24 mmol)을 무수 1,4-dioxane 20 ml에 녹이고 4-methylbenzyl alcohol(0.6 mg,

4.96 mmol)을 가한 후, 60°C로 유지하면서 교반 후, BF₃ etherate(1.2 ml, 6.95 mmol)를 가하고 밤새 교반한다. TLC로 기질이 없어진 것을 확인한 후, 반응액에 물을 가하여 종결한다. 용매를 감압 제거 후 에틸 아세테이트로 희석하고 이 유기층을 물, 포화 식염수 순으로 세척한 다음 무수 sodium sulfate 로 건조한 뒤 여액을 감압 농축 하여 얻은 잔사를 순상 column chromatography(hexane : ethyl acetate=10:1, SiO₂) 및 역상 column chromatography(MeO/H₂O=2/1, C₁₈)로 정제하여 백색 고체 80 mg(12%)을 얻었다.

R_f 0.45(hexane/ethyl acetate=3/1, SiO₂); mp 202~204°C(recrystallized from EtOH-H₂O; IR(KBr) cm⁻¹ 3500, 3000, 2950, 1620, 1510; ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 2.22(s, 3H), 2.23(s, 3H), 3.42(br s, 1H), 3.76(s, 3H), 4.45(d, J=12Hz, 1H), 4.96(d, J=12Hz, 1), 5.54(br s, 1H), 6.89(d, J=7.4Hz, 2H), 7.1-6.9(m, 6H), 7.18(d, J=1.3Hz, 2H), 7.37(d, J=7.4Hz, 2H), 11.49(br s, 1H); MS(ED) m/z(relative intensity) 510(M⁺,10), 361(20), 334(25), 148(92), 121(100)

생체의 항암활성 측정

시료조제 및 적용 - 새로 합성한 GER-I과 GER-II 및 대조물질인 cisplatin과 adriamycin을 각각 DMSO 원액에 용해하여 보관한 후 실험직전에 예비실험을 통하여 0.5% DMSO에서 해당되는 농도가 되도록 희석하였다.

암세포주 및 배양 - 연세대 의대로부터 분양받은 L1210세포주와 한국세포주은행으로부터 분양받은 P388세포주는 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 tissue culture flask를 사용하여 RPMI 1640 배양액(RPMI 1640 powder, Hepes, L-glutamin, antibiotic-antimycotic agent, 10% FBS)으로 2~3일 간격으로 계대배양하여 logarithmic phase에 도달한 세포를 실험에 사용하였다. 한국세포주은행으로부터 분양받은 HCT-15세포주와 SK-HepG-1세포주는 3-4일 간격으로 계대배양하였으며, tissue culture flask기벽에 부착한 세포를 분리할 때는 0.25% trypsin-EDTA용액으로 처리하였다.

마우스의 비장세포 부유액 조제 - 4~6주령의 ICR 계 암컷 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 배지

액이 담긴 용기에 넣고 teflon pestle를 이용하여 200 mesh stainless steel sieve를 통과시켜 단일세포액으로 만들고, RBC lysis buffer용액으로 적혈구를 용혈시켜 제거한 후 trypan blue exclusion method¹⁵⁾로 2×10⁶ cells/ml이 되도록 비장세포 부유액을 만들었다.

세포독성 측정 - 새로 합성한 GER-I과 GER-II에 대하여 *in vitro*에서 마우스와 사람의 암세포주에 나타나는 세포독성을 Mosmann법¹⁶⁾을 약간 변형한 MTT assay로 측정하였다. 즉, 실험하고자 하는 부유세포주(L1210, P388)와 마우스의 비장세포의 경우에는 배양기의 세포액을 원심분리하고, 부작세포주의 경우에는 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 배양기의 부작면으로부터 분리시킨 다음에 원심분리한 후, trypan blue exclusion method¹⁵⁾로 적정수의 세포 농도(2×10⁶ cells/ml 또는 1×10⁶ cells/ml)로 보정하였다. 암세포 현탁액을 96well microplate의 각 well에 100 μl씩 가한 후, 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 30분 동안 안정화시킨 후에 농도별로 시료용액을 각 well에 100 μl씩 넣어 실험군으로 하고, 배지액 100 μl씩 가한 것을 대조군으로 하였다. 48시간 배양후 MTT 용액을 well당 50 μl씩 넣어 4시간 동안 배양기에 방치한 후 원심분리하여 상등액을 제거하였다. DMSO 원액을 well당 50 μl씩을 가하여 30분간 진탕하면서 formazan을 완전히 용해시켜 ELISA plate reader를 이용하여 흡광도(570 nm)를 측정하였다. 이 때, 실험군과 대조군은 3 well에 동일하게 시행하였으며, 동일 실험을 3회 이상 실시하였다.

생성된 formazan의 양은 well중의 생존 세포수와 정비례하므로 실험군에서의 시료액의 농도별 평균 OD 값과 대조군의 평균 OD값을 구해 아래의 식에서와 같이 세포생존률(%)을 산출하였다.

$$\text{Cell growth(\%)} = \frac{\text{Mean of OD in Experimental group}}{\text{Mean of OD in Control group}} \times 100$$

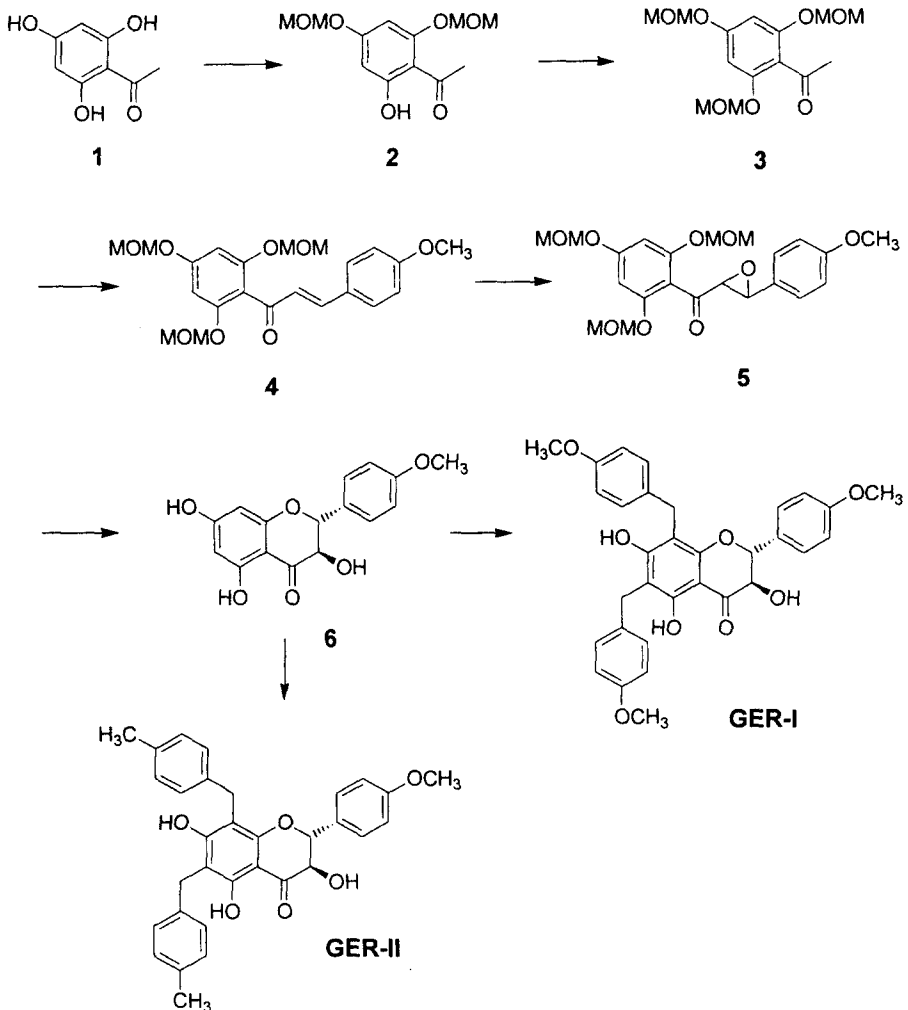
실험군의 각 농도에 대한 세포성장률(%)을 그래프로 작성한 뒤 선형 외삽법에 의해 ED₅₀(median effective dose)¹⁸⁾를 구하였다. 이 ED₅₀ 값은 대조군의 50% 수준으로 세포 성장을 억제하는 시료의 농도(50% inhibitory concentration of cell growth, IC₅₀)로 정의되며, IC₅₀ 값을 항암활성 지표로 하였다.

실험결과 및 고찰

합성 - Gericudranin E가 A보다 우수한 세포독성을 나타낸다는 사실과, Phenolic OH의 일부가 methyl ether 형태로 보호된 O-methylated gericudranin A가 gericudranin A보다 강한 세포독성을 나타낸다는 사실에 근거하여 GER-I 및 GER-II를 설계하였다. 이들 물질의 합성은 저자들에 의해 이미 개발된 (±)-gericudranin A의 합성과⁷⁾ 유사한 경로로 합성하였다 (Scheme 1).

출발물질인 2,4,6-trihydroxyacetophenone의 3개의 phenolic OH기 중 아세틸기와 수소결합을 하는 hydroxyl기를 제외한 두 개의 OH기를 완전한 조건

(MOMCl, diisopropyl ethylamine, CH₂Cl₂)에서 methoxymethyl ether 형태로 보호하고 남은 하나의 phenolic OH는 보다 강한 조건에서(MOMCl, NaH, THF) 보호시켰다. 이렇게 하여 얻어진 **3**을 p-anisaldehyde와 aldol 축합을 하여 chalcone 화합물 **4**를 합성하였다. 이 chalcone 화합물에 염기성 조건하에서 hydrogen peroxide로 처리하여 epoxide **5**를 합성하였다. Methanolic HCl로 처리하면 보호기인 MOM group이 제거됨과 동시에 환화반응이 일어나 flavanone ring을 구축할 수 있었다. 이렇게 하여 생긴 flavanone **6**에 Friedel-Crafts dibenzylation을 행하면 전자 밀도가 상대적으로 높은 A환에 위치선택적인 dibenzylation이 된 화합물 GER-I 및 GER-II를 얻을 수 있었다.



Scheme 1 - Synthetic Route to GER-I and GER-II.

Table I - IC₅₀ Values of experimental compounds against cancer cell lines and mouse splenocytes

Cell lines	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	Cisplatin	Adriamycin	GER-I	GER-II
P388	14.4	0.9	69.9	41.8
L1210	56.2	0.7	38.9	52.8
K562	30.6	2.3	44.4	32.1
SK-HepG-1	15.3	2.6	23.8	22.9
MCF-7	56.2	1.8	70.4	62.1
HCT-15	8.3	3.8	36.4	36.2
Splenocytes	22.5	-	47.1	51.3

Cells were incubated for 48hrs following drug treatment in humidified atmosphere of 5% CO₂ air at 37°C. Three to five replicate wells were used for each drug concentration.

IC₅₀ values : 50% growth inhibition concentration

Each value is the mean \pm SD(n>9).

생체의 항암활성 - Gericudranin E의 유도체로 합성된 GER-I와 GER-II의 생체의(*in vitro*) 항암활성을 검색하고자 마우스 암세포주 2종(P388, L1210)과 사람의 암세포주 4종(K562, SK-HepG-1, MCF-7, HCT-15)에 대하여 MTT assay를 이용하여 농도별로 성장률(%)을 측정하고, 50% 세포성장을 저해하는 농도(IC₅₀)를 산출하였으며, 대조물질인 cisplatin과 adriamycin도 동일하게 실험하여 항암효과를 비교하여 Table I에 나타내었다.

GER-I과 GER-II의 항암활성을 비교해 보면 P388, K562, MCF-7에 대해서는 GER-II가, L1210에 대해서는 GER-I이 강하고, SK-HepG-1과 HCT-15에 대해서는 비슷하였으며, 특히 다른 암세포주에 비해 SK-HepG-1에 강한 항암활성을 보였다. 또한 GER-I과 GER-II의 6종의 암세포주에 대한 항암활성(IC₅₀: 22.9~70.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 본 실험에서 대조물질로 사용한 cisplatin(IC₅₀: 8.3~56.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 adriamycin(IC₅₀: 0.7~3.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 비해서는 약하나, GER-I과 GER-II의 정상세포인 마우스 비장세포에 대한 IC₅₀값이 각각 47.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 51.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 cisplatin의 비장세포에 대한 세포독성(IC₅₀: 22.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)보다 현저히 낮았다.

결 론

Gericudranin E의 구조-활성 상관 관계를 규명할 목적의 일환으로 GER-I 및 II를 합성하고자 하였다. 2,4,6-trihydroxyacetophenone을 출발물질로 하여 5공정에 거쳐 목적화합물인 GER-I 및 II를 합성하였다. 수중

의 암세포주에 대해 항암효과를 검색한 결과, GER-I 및 II가 대조물질로 사용한 cisplatin과 adriamycin에 비해서는 항암효과는 약하였으나 정상세포에 대한 세포독성은 현저하게 낮았다. 또한 O-methylated Gericudranin A에 비해서도 GER-I 및 GER-II는 약 10배 정도의 약한 항암활성을 나타내었다. 이로부터 flavanone의 B환에 존재하는 3번 위치의 methoxy기가 항암활성에 중요한 역할을 하는 pharmacophore임을 알 수 있었다. 추후 B환의 3번 위치의 methoxy기에 대한 보다 정밀한 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 주관 특정연구개발사업인 '여자대학교연구기반확충사업'에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Ahn, B. Z., Lee, Y. H. and Kim, S. I. : Isolation of cytotoxicity potentiating substances from red ginseng. *J. Kor. Cancer Assoc.* **24**, 795 (1992).
- 2) Kim, J. H., Kim, B. S., Choi, J. J., Kim, K. M., Yoo, N. C., Choi, J. H., Lim, H. Y., Roh, J. K., Lee, K. S. and Kim, B. S. : Effects of verapamil, tamoxifen and cyclosporin A for the modulation of multidrug resistance in human lung cancer cell lines. *J. Kor. Cancer Assoc.* **25**, 225 (1993).
- 3) Park, J. C., Young, H. S. and Choi, J. S. : Constituents of *Cudrania tricuspidata*. *Yakhak* **36**, 40 (1992).
- 4) Shanghai Science and Technological Publisher : *The Dictionary of Chinese Drugs*, Shougakugan, Tokyo. **2**, 2383 (1985).
- 5) Park, J. C., Choi, J. S. and Choi, J. W. : Effect of the Fractions from the leaves, Fruits, Stems and Roots of *Cudrania tricuspidata* and flavonoid on Lipid Peroxidation. *Kor. J. Phatmacogn.* **26**(4), 377 (1995).
- 6) Lee, I. K., Kim, C. J., Song, K. S., Kim, H. M., Koshino, H., Uramoto, M. and Yoo, I. D. : Cytotoxic Benzyl Dihydroflavonols from *Cudrania*. *Phytochemistry* **41**, 213 (1996).
- 7) Choi, Y. J., Shim, P. J., Ko, K. S. and Kim, H. D. : Total Synthesis of (\pm)-Gericudranin A. *Heterocycles*.

- 43, 1223 (1996).
- 8) Choi, Y. J., Shim, P. J. and Kim H. D. : Design and Synthesis of (\pm)-3-Deoxygericudranin A as an Antitumour Agent. *Yakhak Hoeji*. **41**(1), 14(1997).
 - 9) Iselt, M., Holtei, W. and Hilgard, P. : The tetrazolium dye assay for rapid *in vitro* assessment of cytotoxicity. *Arzneim-Forsch. /Drug Res.* **39**, 747 (1989).
 - 10) Hida, T., Ueda, R., Takahashi, T., Watanabe, H., Kato, T., Suyama, M., Sugiura, T., Ariyoshi, Y. and Takahashi, T. : Chemosensitivity and radiosensitivity of small cell lung cancer cell lines studied by a newly developed 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide(MTT)hybrid assay. *Cancer Res.* **49**, 4785 (1989).
 - 11) Park, J. G., Kramer, B. S., Steinberg, S. M., J. Carmichael, Collins, J. M., Minna, J. D. and Gazdar, A. F. : Chemosensitivity testing of human colorectal cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res.* **47**, 5875 (1987).
 - 12) Tim Mosmann : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**, 55 (1983).
 - 13) Doyle, A., Griffiths, J. B. and Newell, D. G. : Cell & tissue culture : *Lab. Proc. UK.* 4B:5 (1993).
 - 14) Mischell, B. B and Shiigi, S. M : *Selected methods in cellular immunology.* W. H. Freeman and company, p. 16 (1980).
 - 15) Lee, K. H. and Kim C. H. : Comparison of *in vitro* bioassay for the screening of antitumor substances. *J. Kor. Cancer Assoc.* **27**, 5 (1995).
 - 16) Preparation of mouse cell suspension. *In vitro Immune Responses.* W. H. FREEMAN AND COMPANY U.S.A., p. 14 (1992) .
 - 17) Roh, J. K., Chung, H. C., Koh, E. H., Lee, W. Y., Hahn, J. S. and Kim, B. S. : *In vitro* cytotoxicity of various anticancer drugs to short-term cultured gastric adenocarcinoma cell line. *J. Kor. Cancer Assoc.* **23**, 3 (1991).
 - 18) Philip S. Thayer., Philip Himmelfarb. and Gary L. Watts. : Cytotoxicity assays with L1210 cells *in vitro* : Comparison with L1210 *in vivo* and KB cells *in vitro*. *Cancer Chemotherapy Reports*(part 2). **2**(1), April (1971).
 - 19) Rosenberg, B., Aancamp, L., Trosko, J. E. and Monsour, V. H. : Platinum compounds; a new class of potent antitumour agents. *Nature.* **222**, 385 (1969).
 - 20) Meischen, S. J., Gale, G. R. and Lake, L. M., et al : Antileukemic properties of organoplatinum complexes. *J. Natl. Cancer Inst.* **57**, 841 (1976).
 - 21) Lecointe, P., Macquet, J. P. and Butour, J. L. : Correlation between the toxicity of platinum drugs to L1210 leukemia cells and mutagenic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 209 (1976).
 - 22) Pera, M. F., Sessford, J. D. and Roberts, J. J. : Toxicity of cisplatin and hydroxymalonatodiammine platinum(II) towards mouse bone marrow and B16 melanoma in relation to DNA binding *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 2273 (1982).
 - 23) Rose, W. C., Schuring, J. E., Huftalen, J. B. and Brandner, W. T. : Antitumor activity and toxicity of cisplatin analogs. *Cancer Treat. Rep.* **66**, 135 (1982).
 - 24) 미생물학 분과회 : 신 종합 미생물학. 학창사 p. 458 (1995).