

암세포에 대한 *Echinacea angustifolia* 순차 용매 추출물의 세포독성 효과

이준경 · 구성자*
경희대학교 식품영양학과

Cytotoxic Effects of Methanol Extract and Fractions from *Echinacea angustifolia* on Cancer Cells

Joon-Kyoung Lee and Sung-Ja Koo*
Department of Food & Nutrition, Kyunghee University

Echinacea is a North American native medicinal herb used traditionally for wounds, burns, snake or insect bites, colds, infections, and inflammation by indigenous Americans. We investigated the effects of the root and stem of fresh Korean-grown *Echinacea angustifolia* methanol extracts and fractionation extracts on the cytotoxicity against cancer cells (HL60, 3LL). The extracts were prepared by step-wise fractionation of methanol extracts of *Echinacea angustifolia* using hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, and water. From the tests, root and stem parts of *Echinacea* showed the cytotoxic effect on cancer cells. The cytotoxic rate of the ethyl acetate fraction of the root parts showed 79% against HL60 cells at low concentration (0.125 mg/mL), and hexane fraction of the root and stem parts gradually increased as the concentration of samples increased, and the root parts showed 82% at 1.0 mg/mL concentration against HL60 cells, chloroform fraction of the root part showed 78.4% against HL60 cells and 68.4% on 3LL cells at 1.0 mg/mL concentration, water and butanol fraction of the root and stem parts showed 60.1% to 77.1% against HL60 cells, after testing by MTT assay system. From these results, it is considered that ethyl acetate fraction of the *Echinacea angustifolia* root parts has stronger anti-cancer effects than any other fractions *in vitro*.

Key words: *Echinacea angustifolia*, cytotoxic effects, HL60 cells, 3LL cells

서 론

만성 질병의 징후를 예방하거나 치료를 돕고, 인식기능 향상과 수명을 증가시키기 위해 대체 의약에 대한 관심이 증가함에 따라 허브에 대한 소비자의 관심이 날로 증가하여, 북미에서는 허브제품의 판매가 매년 약 10~15% 정도 증가하고 있으며 그 중 에키네시아(*Echinacea*) 제품이 가장 인기가 있다고 알려져 있다⁽¹⁾. 에키네시아는 북아메리카 원산의 약용식물로 원주민들에 의해서 상처, 화상, 뱀이나 곤충 물린데, 감기, 감염, 염증에 수세기 동안 민간적으로 이용되어져 왔으며⁽²⁾, 국화과의 다년생 식물로서 여러 종류가 있는데⁽³⁾, 가장 많이 이용되는 3가지 에키네시아 종(*Echinacea angustifolia*, *Echinacea pallida*, *Echinacea purpurea*) 중에서 미국에

서는 *Echinacea angustifolia*(purple coneflower)는 북아메리카의 초기 이주민들과 원주민들에게 중요한 약용 식물이었으며, 최근까지 북아메리카와 독일의 제한된 지역에서 이용되고 있다⁽⁴⁾. 최근 에키네시아는 추출물, 차, 텅크제, 강장제, 정제, 연고의 형태로 아메리카 원주민에 의해 1600년대 이래로 이용되어져 왔고⁽⁵⁾, 현재 면역 촉진제로 가장 잘 알려져 있어 호흡기 감염, 요로감염, 암, 피부질환과 다른 많은 염증과정에 비특이적 면역촉진제로서 이용되며⁽⁶⁻⁹⁾ macrophages^(10,11)를 증가시키는 효과가 있었으며, macrophage는 TNF, IL-1, IL-6, IL-10의 생산을 증가시켜 tumor cell(WEHI 164 cell)을 죽인다고 알려져 있다⁽¹²⁻¹⁴⁾.

에키네시아의 면역촉진기능은 alkamides, caffeic acid 유도체들(chicoric acid), 당단백, 다당류를 포함하는 추출물의 lipophilic과 polar fractions 둘 다 기여한다^(2,15)는 연구가 있었고, alkamide같은 lipophilic fraction이 에키네시아 알코올 추출물의 면역촉진 작용에 주로 기여하며⁽²⁾, alkamide fraction이 *in vivo*와 *in vitro*에서 phagocyte 작용을 촉진시킨다는 보고가 있었다^(16,17). 에키네시아의 alkamide는 주로 olefinic 및 또는 acetylenic bonds를 가진 고불포화(highly unsaturated)

*Corresponding author : Sung-Ja Koo, Dept. of Food and Nutrition, Kyunghee University, 1, Hoiki-dong, Dongdaemoon-gu, Seoul 130-701, Korea
Tel: 82-2-961-0709
Fax: 82-2-961-0260
E-mail: koo-sj@hanmail.net

carboxylic acids의 isobutylamides⁽¹⁸⁾로 항염증제로서 cyclooxygenase와 5-lipoxygenase를 억제시킨다는 보고가 있으며^(19,20), 뿌리에서 얻은 배당체인 echinacoside와 다당류인 echinacin은 항균 활성과 항곰팡이 활성을 가지며, 많은 연구에서 면역체계의 조절 기능을 보여주었음에도 불구하고^(13,21-23) 에키네시아의 항암 활성에 관한 연구는 많지 않다.

세계적인 추세에 따라 우리나라에서도 허브 제품들의 인기가 있지만, 에키네시아는 관상용으로 강원도 농장에서만 일부 재배하고 있는 실정이다. 본 연구는 에키네시아의 생리활성물질을 분리하기 위하여 *Echinacea angustifolia*의 줄기와 뿌리 methanol 추출물과 분획물의 암세포(HL60, 3LL)에 대한 세포독성효과를 검색하여 허브를 이용한 기능성 식품 개발을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 에키네시아는 강원도 평창군 허브나라 농원에서 계약 재배하여 1999년 10월에 채취한 2년생 *Echinacea angustifolia*(Compositae family)로 줄기와 뿌리의 methanol 추출물과 분획물을 암세포주에 의한 세포독성효과(cytotoxicity)에 사용하였다. 암세포주인 HL-60(human promyelocytic leukemia)은 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아 사용하였고, 3LL(lung carcinoma) 세포주는 경희대학교 약학대학으로부터 분양 받아 사용하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)와 dimethylsulfoxide(DMSO)는 Sigma사로부터 구입하였으며, 기타 시약들은 특급 또는 일급 시약을 사용하였다.

시료의 추출 및 분획

에키네시아(생시료)의 줄기(1146 g)와 뿌리(416 g)는 흙을 물로 씻어 거여로 물기를 제거한 후 세절하여 중량의 10배 methanol로 실온에서 3일 간 추출한 후 2,000×g에서 40분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻은 상층액을 rotary evaporator(Heidolph, VV2000, Germany)를 이용하여 감압농축 한 것을 methanol 추출물로 하였으며, methanol 추출물을 용매의 극성에 따라 hexane, chloroform, ethylacetate 및 buthanol로 순차 분획하였고, 마지막 남은 잔여물을 aqueous 분획으로 하였다. 각 분획물은 농축하고 건조시킨 뒤 -20°C 냉동고에 보관하면서 사용하였으며, 실험시 DMSO에 용해시켜(≤0.25% DMSO) 사용하였다.

암세포 배양⁽²⁴⁾

HL-60과 3LL 암세포는 RPMI-1640 배지(Nissui, Tokyo, Japan)에 10% FBS(fetal bovine serum, Sigma)와 1% antibiotics (penicillineG/streptomycin)를 첨가하여 배양하였으며, 이들 세포주는 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 3LL 암세포는 일주일에 2~3회 새로운 배지로 교환하고 PBS(phosphated buffered saline, pH 7.0)으로 세척한 후, trypsin/EDTA (0.1% and 1 mM) solution를 사용하여 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후, 집적된 암세포에 배지를 넣고 암세포가 골고루 분산되도록 피펫으로 잘 혼합하여 T-75 cell culture

flask에 10 mL씩 일정량 분할하여 주입하고, 3 일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. HL-60 암세포는 2~3 일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 배양액은 L-Glutamine 이 포함된 RPMI 1640 10.4 g, NaHCO₃ 2 g 및 1% antibiotics(penicilline G/streptomycin)을 넣어 용해시키고 pH를 7.2 로 조절하여 전체량을 1로 하였다. 그리고 세균 여과기로 여과한 후 최종농도가 10% 되도록 배지에 10% FBS를 첨가하여 사용하였다.

세포 독성(cytotoxicity)의 측정

암세포주(HL-60, 3LL)에 대한 시료의 독성효과는 MTT colorimetric assay 방법⁽²⁵⁾으로 실험하였다. 먼저 배양된 cell에서 배지를 제거한 후 PBS를 첨가하여 가볍게 섞은 후, PBS를 다시 제거하고 trypsin/EDTA(0.1% and 1 mM) solution을 첨가하여 37°C에서 5분간 배양하여 cell이 culture dish의 바닥으로부터 완전히 분리되었는지 현미경하에서 관찰한 후, culture 배지를 첨가하여 잘 혼합하여 cell 수를 1×10⁵ cell/mL로 조정하여 실험에 사용하였다. 그리고 시료는 PBS에 용해시킨 후 0.22 μm membrane filter로 여과한 후 사용하였다. 준비된 cell을 96-well microtiter plate에 10⁵ cell/well 농도로 접종하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 preincubation(3LL은 24시간)시킨 후 시료를 0.0625~1.0 mg/mL 농도로 조정하여 각 well에 시료를 농도별로 투여하였다. 세포주와 시험물질이 처리된 plate를 CO₂ incubator에서 48시간 배양시킨 후 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide soln.(5 mg/mL) 시약을 각 well에 50 μL씩 첨가하여 MTT가 생존 암세포의 효소작용에 의해 환원되도록 4시간 더 배양하였다. 각각의 실험군은 3개 well을 동일 조건으로 사용하였다. 배양 종료시 원심분리(450×g, 10 min.)하여 상층액을 제거하고 하층부에 DMSO 100 μL를 첨가해 생성된 formazan 결정을 용해시켜 540 nm에서 microplate reader(Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하였다. 대조군으로서는 cell suspension 100 μL에 sample 대신 배지 100 μL를 첨가한 것을, blank로서는 각 농도별 sample 100 μL에 배지 100 μL를 넣은 O.D.값을 측정하며 다음과 같은 식으로 cytotoxicity index(%)로 나타낸다. 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan(blue)으로 분해된 양을 나타내고 따라서 각 well의 viable cell 수와 비례하여 cytotoxicity index(%)로 나타내었다⁽²⁶⁾.

$$\text{Cytotoxicity index(\%)} = \frac{(1 - \text{sample O.D.} - \text{blank O.D.})}{\text{control O.D.}} \times 100$$

통계분석

모든 실험결과와 통계처리는 SAS 통계 프로그램을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

에키네시아 methanol 추출물 및 분획물의 양

에키네시아의 줄기 1146 g, 뿌리 416 g을 메탄올로 추출하여 추출물 각각 65.18 g, 28.96 g을 얻었다. Methanol 추출물

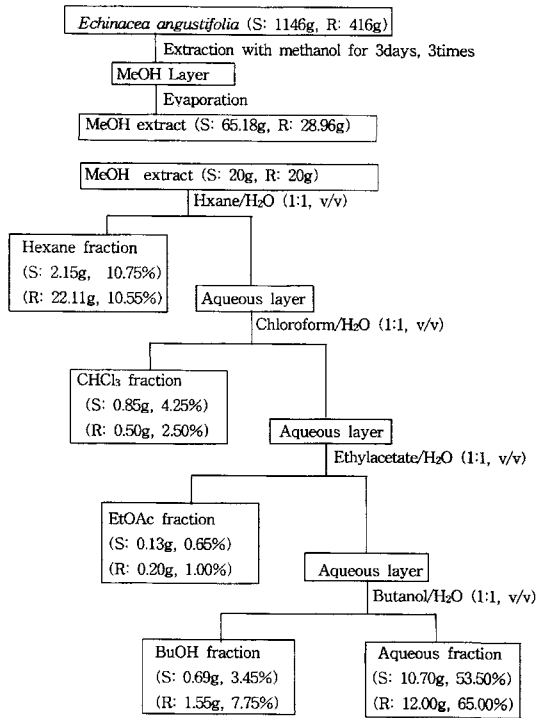


Fig. 1. The procedure for the solvent fraction of methanol extract from the *Echinacea angustifolia*. stem and root (S. and R. represent stem and root of *Echinacea angustifolia*)

20 g을 hexane, chloroform, ethylacetate 및 butanol의 각 용매별 계통분획에 의하여 분배하여 줄기의 경우 hexane 2.15 g, chloroform 0.85 g, ethylacetate 0.13 g, butanol 0.69 g, aqueous 10.70 g의 분획물을 얻었고, 뿌리의 경우는 hexane 2.11 g, chloroform 0.50 g, ethylacetate 0.20 g, butanol 1.55 g, aqueous 13.00 g의 분획물을 얻었다(Fig. 1).

인간유래 백혈암(HL60) 세포주에 대한 세포독성 효과

세포독성은 비특이적 방어기전으로서 암세포에 직접적으로 손상을 줄 뿐 만 아니라 동물 생체내 림프구나 대식세포와 같이 표적세포에 대하여 세포독성효과를 나타내는 작동세포를 자극함으로써 그 세포독성효과를 항진시킨다는 보고가 있다⁽²⁷⁾. 백혈암세포주 HL60에 대한 에키네시아의 methanol 추출물과 각 용매 분획물의 MTT assay에 의한 세포독성효과는 뿌리의 경우 Fig. 2에 나타난 바와 같이 각 분획물들의 시료 농도를 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL 및 1.0 mg/mL씩 점차 증가시키면서 암세포주에 첨가한 결과 ethylacetate, aqueous, butanol 분획물은 0.125 mg/mL 농도에서 각각 77%, 74.3%, 72.2%의 높은 효과를 나타내었고, 농도가 증가할수록 세포독성효과가 약간 감소하거나 비슷한 수준을 유지하여 1.0 mg/mL 농도에서는 각각 55.4%, 70%, 60.1%의 세포독성효과를 보여 고농도보다 저농도에서부터 세포독성효과가 뛰어남을 알 수 있었다. 에키네시아 뿌리의 methanol 추출물의 HL60 cell에 대한 세포독성효과는 이전에 보고한 바⁽²⁸⁾와 마찬가지로 0.125 mg/mL의 저농도에서부터 독성효과가 74.4%로 컸으며 농도 증가함에 따라 독성효과가 약간 감소(1.0 mg/mL, 58.3%)하는 경향이 나타남을 알 수 있었다.

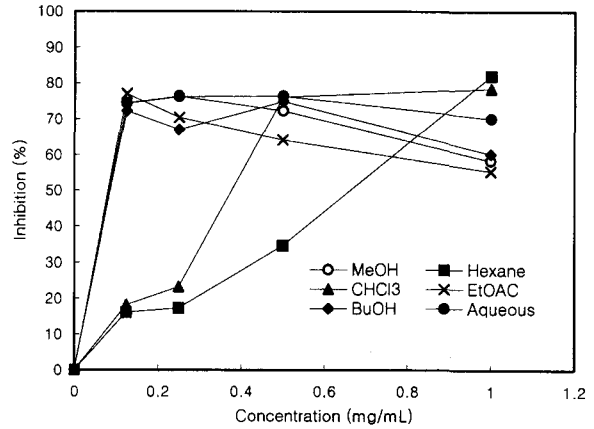


Fig. 2. Inhibitory effects of each fraction from the *Echinacea angustifolia* root on the growth of HL60 human leukemia cells in MTT assay

Hexane 분획물은 저농도(0.125 mg/mL)에서 16.1%이었으나 농도 의존적으로 점진적인 세포독성효과를 나타내었으며, 1.0 mg/mL 농도에서 82%의 높은 세포독성효과를 나타내었다. 같은 농도(1.0 mg/mL)에서 chloroform 분획물은 0.125 mg/mL 농도에서 18.1%의 효과를 보였으나 1.0 mg/mL 농도에서 78.4%의 효과를 보였다.

줄기의 경우는 butanol, ethylacetate, aqueous 분획물은 0.25 mg/mL에서 각각 72.2%, 61%, 55.8%의 높은 효과를 나타내어 뿌리의 경우와 마찬가지로 저농도에서 높은 효과를 나타내었다(Fig. 3). Hexane 분획물도 0.125 mg/mL에서 6%이었으나 농도 의존적으로 점진적인 세포독성효과를 나타내었으며, 1.0 mg/mL 농도에서 74.3%의 높은 세포독성효과를 나타내어 뿌리의 경우와 같은 경향을 나타내었다. 줄기 methanol 추출물의 HL60 cell에 대한 경우는 저농도에서는 독성효과가 낮았으나 고농도로 갈수록 독성효과가 컸는데 이 또한 이전의 실험⁽²⁸⁾과 같은 경향이었다. 분획물이 methanol 추출물에 비교해 억제효과를 보이지 않은 경우들이 있었는데, 이는 단일성분의 작용만은 아니며 여러 성분들에 의해 복합작용에 의한 것으로 생각된다. chloroform 분획물 또한 뿌리의 경우와 같이 저농도(0.125 mg/mL)에서 0.7%의 효과를 보였으나, 1.0 mg/mL 농도에서는 76.5%의 높은 효과를 보였다.

HL60에 대한 에키네시아 추출물의 세포독성효과는 줄기보다 뿌리의 세포독성이 컸고, aqueous, butanol, ethylacetate 분획물이 효과가 더 컸다.

폐암 세포주(3LL cell)에 대한 세포독성 효과

3LL cell에 대한 MTT assay 실험결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 에키네시아 뿌리의 methanol 추출물과 각 용매 분획물의 저해효과를 나타낸 것이다. Butanol과 ethylacetate 분획물은 0.25 mg/mL 농도에서 43.5%, 26.3%의 세포독성효과를 나타냈으나 그이상의 농도에서는 오히려 약간 감소하여 1.0 mg/mL 농도에서 20% 내외의 독성효과를 나타내었고, chloroform, aqueous 및 hexane 분획물은 농도의존적으로 세포독성이 증가하여 1.0 mg/mL 농도에서는 각각 68.4%, 60.3%, 58.5%, 49.8%의 세포독성효과를 나타내었다. 뿌리의 ethylacetate 분획물은 3LL세포에 대한 독성효과는 낮았고, 이

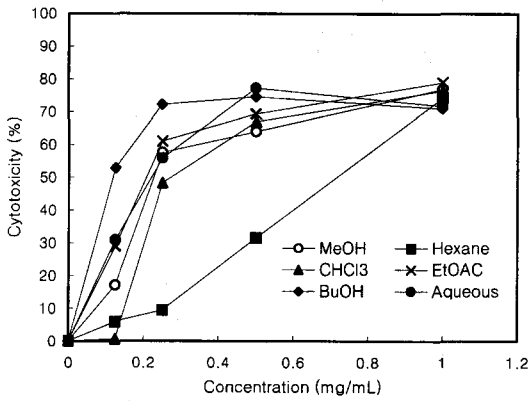


Fig. 3. Inhibitory effects of each fraction from the *Echinacea angustifolia* stem on the growth of HL60 human leukemia cells in MTT assay

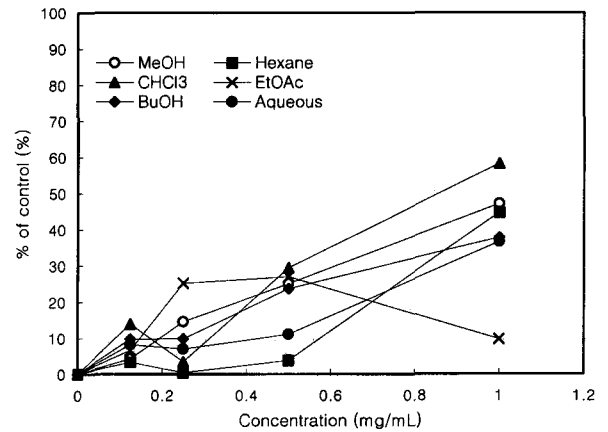


Fig. 5. Inhibitory effects of each fraction from the *Echinacea angustifolia* stem on the growth of 3LL lung carcinoma cells in MTT assay

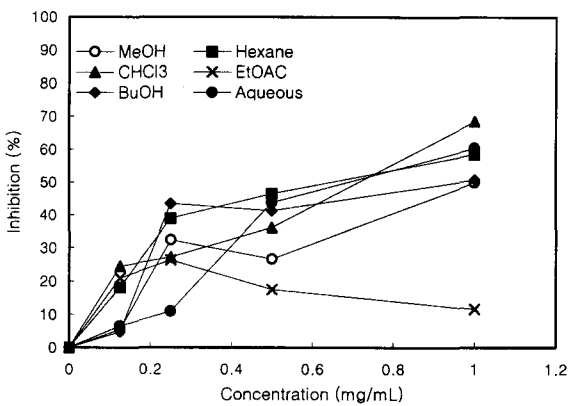


Fig. 4. Inhibitory effects of each fraction from the *Echinacea angustifolia* root on the growth of 3LL lung carcinoma cells in MTT assay

에 비해 Fig. 2에서와 같이 HL60 세포에 대해서는 저농도에서도 비교적 높은 억제활성을 나타내었다.

줄기의 경우는 ethylacetate와 buthanol 분획물이 0.25 mg/mL 농도에서 25.2%~9.8%로 같은 농도에서 뿌리보다 낮은 세포독성효과를 나타냈으며, 그이상의 농도에서 ethylacetate 분획물은 오히려 감소(1.0 mg/mL 농도에서 9.7%)하였고, chloroform, hexane 및 aqueous 분획물은 뿌리의 경우에서와 같이 농도의존적으로 세포독성효과가 증가하여 1.0 mg/mL 농도에서 각각 58.2%, 44.7%, 36.6%의 세포독성효과를 나타내었다(Fig. 5). 줄기의 ethylacetate 분획물 역시 3LL 세포주보다 HL60 세포주에 대한 세포독성효과가 높았으며, 3LL 세포주에 대한 에키네시아의 세포독성효과는 줄기보다 뿌리의 분획물이 효과가 높았다. 항암활성의 유무 혹은 정량성을 추정할 경우, IC₅₀의 값을 주로 이용하는데 암세포에 대해 IC₅₀의 값이 0.23 mg/mL 이상으로 나타난 추출물에 대해서는 항암활성이 없거나 미약한 것으로 간주할 수 있다⁽³¹⁾. 에키네시아 뿌리의 aqueous, buthanol 그리고 ethylacetate 분획물이 HL60 세포주에 대해 IC₅₀의 값이 0.23 mg/mL 이하로 나타나(각각 0.143 mg/mL, 0.228 mg/mL 및 0.230 mg/mL) 항암활성이 있는 것으로 나타났다. IC₅₀의 값이 0.23 mg/mL 이하로 나타난 뿌리의 ethylacetate 분획물이 저농도(0.125 mg/mL)에서

높은 세포독성효과(77%)를 나타내는 것으로 보아 극성과 비극성 물질을 모두 추출해 내는 ethylacetate 분획에 에키네시아의 항암작용 유효성분이 있다고 생각되며 이는 인체 암세포에 대한 당근 추출 성분의 세포독성효과에 관한 연구에서 ethylacetate 층에서 아주 강한 세포독성효과를 보였다고 보고한 한 등⁽³²⁾의 결과와 유사하였다.

IC₅₀의 값이 0.143 mg/mL, 0.228 mg/mL로 나타난 뿌리의 aqueous, buthanol 분획물도 0.125 mg/mL 농도에서 74.3%, 72.2%의 효과를 나타내어 저농도에서도 세포독성효과가 높았으며, 모든 농도에서 60%~76.2%의 세포독성을 유지하였는데 이는 에키네시아에 있는 polysaccharide⁽⁴⁾ 성분의 작용으로 생각된다. 에키네시아는 alkamides, caffeic acid 유도체(chicoric acid), glycoproteins, polysaccharides를 포함하는 추출물의 lipophilic과 polar fractions 둘 다 면역촉진기능^(2,15)뿐만 아니라 항암작용에도 기여한다고 사려된다. Okuda 등⁽³³⁾은 polysaccharide가 생체내의 보체계(complement system)에 관여하여 macrophage의 활성화, target cell에 대한 cytolysis와 opsonization 기능을 항진시킴으로써 항종양 효과를 나타낸다고 하였으며, polysaccharide에 의한 보체계(complement system)의 활성화와 항종양 효과의 상관관계를 밝히기도 하였다.

이상에서 에키네시아의 세포독성효과는 세포주에 대하여 저농도(0.125 mg/mL)에서 줄기보다 뿌리의 분획물이 효과가 높았고, 뿌리의 ethylacetate 분획물이 높은 세포독성효과를 보여 이 성분들이 암예방 효과가 있을 것으로 사료되며, 나아가 이들 분획물로부터 HL60 증식억제에 효과적인 성분에 대한 규명이 요구된다.

요 약

*Echinacea angustifolia*의 줄기와 뿌리 methanol 추출물과 용매별 분획물의 인간유래 백혈암세포인 HL60과 폐암세포인 3LL 세포를 대상으로 항암 활성을 검색한 결과는 다음과 같다.

HL60 세포의 경우에 뿌리 추출물은 저농도(0.125 mg/mL)에서 ethylacetate, aqueous, buthanol 분획물의 순으로 77%~72%의 세포독성효과를 나타내었고, hexane 분획물이 저농도에서는 독성효과가 낮았으나 점진적으로 독성효과가 커짐(1.0

mg/mL, 82%)을 알 수 있었다. 3LL 세포주에 대해서는 뿌리의 경우 저농도(0.25 mg/mL)에서 buthanol, ethylacetate 분획물이 43.5%~26.3%의 낮은 세포독성효과를 나타내었고, 1.0 mg/mL 농도에서는 chloroform, hexane 분획물이 68.4%~58.5%의 세포독성을 나타내었다. 에키네시아의 줄기보다 뿌리의 세포독성이 컸고, HL60이 3LL보다 세포독성이 크게 나타났다.

문 헌

- Barrett, B., Kiefer, D. and Rabago, D. Assessing the risks and benefits of herbal medicine: An overview of scientific evidence. *Altern. Ther.* 5: 40-49 (1999)
- Bauer, R. and Wagner, H. *Echinacea* species as potential immunostimulatory drugs. In *economic and medicinal plant research*. Vol. 5, pp. 253-321 Wagner, H., Farnsworth, N.R. (eds.), Academic Press Inc. San Diego, CA, USA (1991)
- Li, T.S. and Wang, L.C.H. Physiological components and health effects of ginseng, *Echinacea*, and sea buckthorn. In: *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*; Maza, G. (eds), Technomic Publishing: Lancaster, PA, USA 329-356 (1998)
- Linert, D., Anklam, E. and Panne, U. Gas chromatography-mass spectral analysis of roots of *Echinacea*, species and classification by multivariate data analysis. *Phytochem. Anal.* 88-98 (1998)
- Hobbs C. *Echinacea: a literature review*. *HerbalGram* 30: 34-48 (1994)
- Dorch, W. *Clinical application of extracts of Echinacea purpurea or Echinacea pallida*. Critical evaluation of controlled clinical studies. *Z. Arztl. Fortbild.* 90: 117-122 (1996)
- Foster, S. *Echinacea: Nature's Immune Enhancer*. Healing Arts Press (1991)
- Hobbs, C. *Echinacea: The Immune Herb*. Botanica Press (1995)
- Lersch, C., Zeuner, M., Bauer, A., Siebenrock, K., Hart, R., Wagner, F., Fink, U., Dancygier, H. and Classen, M. Stimulation of the immune response in outpatients with hepatocellular carcinomas by low doses of cyclophosphamide (LDCY), *Echinacea purpurea* extracts (Echinacin) and thymostimulin. *Arch. Geschwulstforsch* 60: 379-383 (1990)
- Luetig, B., Steinmuller, C., Gifford, G.E., Wagner, H. and Lohmann-Matthes, M-L. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. *J. Natl. Cancer Inst.* 81: 669-675 (1989)
- Stümpel, M., Proksh, A., Wagner, H. and Lohmann-Matthes, M-L. Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*. *Infect. Immun.* 46: 845-849 (1984)
- Burger, R.A., Torres, A.R., Warren, R.P., Caldwell, V.D. and Hughes, B.G. *Echinacea*-induced cytokine production by human macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.* 19: 371-379 (1997)
- Rosler, J., Steinmuller, C., Kiderlen, A., Emmendorffer, A., Wagner, H. and Lohmann-Matthes M-L. Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to mice mediates protection against systemic infections with *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans*. *Int. J. Immunopharmacol.* 13: 27-37 (1991)
- Steinmuller, C., Rosler, J., Grottrup, E., Franke, G., Wagner, H. and Lohmann-Matthes M-L. Polysaccharides isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea* enhance the resistance of immunopressed mice against systemic infections with *Candida albicans* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Immunopharmacol.* 15: 605-614 (1993)
- Bauer, R. *Echinacea* containing drugs - Effects and active constituents. *Z. Arztl. Fortbild.* 90: 111-115 (1996)
- Bauer, R., Juricic, K., Puhlmann, J. and Wagner, H. Immunological *in vivo* and *in vitro* examinations of *Echinacea* extracts. *Drug Res.* 38: 276-281 (1988)
- Bauer, R., Remiger, P., Juricic, K. and Wagner, H. Influence of *Echinacea* extracts on phagocytotic activity. *Z. Phytother.* 10: 43-48 (1989)
- Greger, H. Alkamides: Structural relationships, distribution and biological activity. *Planta Med.* 50: 366-375 (1984)
- Bauer, R., Brey, W., Willer, F., Wierer, M., Remiger, P. and Schwenker, G. *In vitro* inhibition of arachidonate metabolism by some alkamides and prenylated phenols. *Planta Med.* 55: 566-567 (1989)
- Muller-Jakic, B., Brey, W., Probstle, A., Greger, H., and Bauer, R. *In vitro* inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by alkamides from *Echinacea* and *Achillea* species. *Planta Med.* 60: 37-40 (1994)
- Melchart, D., Linde, K., Worku, F., Sarkady, L., Holzmann, M., Juricic, K. and Wagner, H. Results of five randomized studies on the immuno-nomodulatory activity of preparations of *Echinacea*. *J. Alternative Complementary Med.* 1: 145-160 (1995)
- Se, D., Broumand, N., Sahl, L. and Tilles, J.G. *In vitro* effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology* 35: 229-235 (1997)
- Tragni, E., Galli, C.L., Tubaro, A., Del, N.P. and Della, L.R. Antiinflammatory activity of *Echinacea angustifolia* fractions separated on the basis of molecular weight. *Pharmacol. Res. Commun.* 20(suppl 5): 87-90 (1988)
- Inokuchi, J., Jimbo, M., Kumamoto, Y., Shimeno, H. and Nagamatsu, A. Expression of ganglioside GM3 and H-2 antigens in clones with different metastatic and growth potentials isolated from Lewis lung carcinoma (3LL) cell line. *Clin. Exp. Metastasis* 11: 27-36 (1993)
- Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D. and Boyd, M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48: 4827 (1988)
- Barbara, G. Campling, J.P., Peter, R. Galbraith and Susan, P.C. Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells. *Leukemia Res.* 12: 823-831 (1988)
- Fischer, S.M., Leyton, L.J., Lee, M.L., Locniscar, M., Belury, M.A. and Maldve, R.E. Differential effects of dietary linoleic acid on mouse skin-tumor promotion and mammary carcinogenesis. *Cancer Res. (Suppl.)* 52: 2049-2056 (1992)
- Lee, J.K. and Koo, S.J. Effects of *Echinacea angustifolia* methanol extracts on the cytotoxicity against cancer cells and anti-oxidant activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* in press
- Hwang, B.H., Zhao, J.L., Choi, K.P., Jung, S.W., Kim, E.J. and Ham, S.S. The antimutagenic and anticancer effect of *Taxus cuspidata* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 1062-1068 (1996)
- Park, K.Y., Kim, S.H., Suh, M.J. and Chung, H.Y. In-hibitory effects of garlic on the mutagenicity in *Salmonella* assay system and on the growth of HT-29 human colon carcinoma cells (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 370 (1994)
- Hyun, J.W., Lim, K.H., Shin, J.E., Sung, M.S., Won, Y.J., Kim, Y.S., Kang, S.S., Chang, I.M., Woo, W.S., Paik, W.H., Kim, H.J., Woo, E.R., Park, H.K. and Park, J.G. Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants (in Korean). *Kor. J. Pharmacol* 25(2): 171-177 (1994)
- Han, E.J., Roh, S.B. and Bae, S.J. Cytotoxicity of *Daucus carota* L. on various cancer Cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29(1): 153-160 (2000)
- Okuda, T., Ikekawa, Y., Chihara, G. and Nishioka, K. Anti-complementary activity of anti-tumor polysaccharides. *Nature New Biol.* 238: 59-64 (1972)