

산수유 클로로포름 추출물에 의한 B16/F10 melanoma세포의 증식억제효과

최원형^{1*} · 천현자² · 백승화¹ · 우원홍¹

¹원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과 ²원광대학교 자연과학기술학부

Effect of Proliferation Inhibition on B16/F10 Melanoma Cell by Chloroform Extract from Cornis fructus

Won Hyung CHOI^{1*}, Hyun Ja CHUN², Seung Hwa BAEK¹ and Won Hong WOO¹

¹Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, and

²Division of Natural Science, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

(Received May 19, 2003; Accepted June 26, 2003)

Abstract—Cornis fructus have various biological effects and major chemical components have been tannins, saponins, ursolic acids, gallic acids, linoleic acids, morronisides, cornins and loganins. The main aim of the present study is measurement the effect of chloroform extract from Cornis fructus on proliferation inhibition and Cell death. Cells were cultured in the presence of chloroform extracts from Cornis fructus for 48 h. after 48h treatment of B16/F10 melanoma cells with chloroform extracts, the cells were observed a dose-dependent inhibitions of cell viability with cell death in their proliferation. the cells were estimated cell viability, cell number, total DNA fragmentation and chromatin condensation in a dose-dependent manner. It also caused cell death as measured by cell morphology, DNA fragmentation and nucleus chromatin condensation. therefore, these results suggest that chloroform extracts from C. fructus is inhibitory proliferation and is related to cell death in this cells.

Keywords □ Cornis Fructus, B16/F10 melanoma cell, Cell death, Proliferation

산수유(*Cornus officinalis* SIEB. et Zucc)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 낙엽활목으로 오래 전부터 한방에서 성숙한 건조 과육을 약재로 사용하고 있다. 생약 산수유는 가을에 익은 산수유의 열매(Cornis Fructus)를 따서 씨를 뽑아내고 햇볕에 말린 것을 말하며 나무 높이는 약 4-7 m 내외이고 수피는 담갈색이며, 가지는 회갈색이다. 핵과는 긴 타원형이고 길이는 1.2-1.5 cm이며 성숙하면 적홍색을 띤다(김재길, 1995; 김창민 등, 1997; 신민교 등, 1998; 전통의학 연구소, 1994). 개화기는 5-6월, 결실기는 8-10월이며 10-11월 사이에 열매가 빨갱게 성숙하였을 때 채취하여 가지를 제거하고 약한 불에 말린 후 과육을 그늘에 보관 사용하여야 한다(김창민 등, 1997; 신민교 등, 1998; 전통의학 연구소, 1994). 과실에는 malic acid, vitamin A, tartaric acid 등이 함유되어 있으며, 종자의 지방유는 palmitic acid, oleic acid 등이 함유되어(김창민 등, 1997; 신민교 등, 1998) 있다. 이외에 swerside, 7-O-methylmorroniside(Endo, 1973) 와 cornusiin

A-F 등을(Hatano, 1989a; 1989; 1990; Okuda, 1984) 함유하고 있다. 산수유는 혈액내 혈당 감소(항당뇨)작용(Joo, 1989; Endo, 1973; Yamahara, 1981), 혈액내 cholesterol 감소 작용(Joo, 1989), 요통, 폐결핵 억제 작용의(김충섭 등, 1979) 효능이 있으며, 더불어 항균(김창민 등, 1997; Seo, 1999), 항암(김창민, 1997), 항산화작용의(Kim, 1996; Seo, 1999; Qiaoling Peng, 1998) 약리작용이 있는 것으로 보고되었다. 특히 산수유의 물 추출물이 항히스타민, 항아세틸콜린 및 항바륨작용을 나타내며(Lee, 1985), 황색 포도상구균을 억제하는 것으로(Gaw, 1949) 보고되었고 메탄올 추출물과 그의 에틸분획물이 소염, 항알러지성 작용에 효과가 있음이(Lee, 1985) 보고되었다. 산수유에 대한 연구로는 주로 tannin 화합물(Hatano, 1989a; 1989; 1990; Lee, 1989; Okuda, 1984), iridoid화합물(Endo, 1973), 및 정유성분(Miyazawa, 1989) 등의 연구가 보고되었다. 이처럼 천연물로부터의 약리 효능의 연구는 질병 치료의 효과적인 완치를 위해 없어서는 안될 의학 분야의 중심적 연구 분야로 발전되고 있는 실정이다. 이에 본 연구는 예전부터 한방에서 탁월한 효능이 있는 한약

*To whom correspondence should be addressed.

재 중 산수유 함유 성분의 약리 효능을 규명하고자 *in vitro* 상에서 약리 효능 실험을 시행, 비교 검토한 결과, 산수유의 클로로포름 추출물이 멜라닌 세포의 증식 억제와 cell death에 미치는 영향을 조사하여 흥미있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험 방법

검액조제

본 실험에서 사용한 산수유 열매는 원광대학교 한의과 대학 한방병원에서 구입하였으며 사용 시료는 n-hexane 으로 상온에서 24시간 3회 추출한 다음, 이 추출액을 여과지로 여과한 후, 감압 농축하고 동결건조시켜 시료를 얻었다. 계속하여 Chloroform, EtAc, MeOH, H₂O로 추출하고, 추출액을 여과한 후 감압 농축하였다. 사용 시료는 DMSO에 녹인 후 세포에 투여하기 전 0.22 m pore 여과지로 여과 멸균하여 시료 농도를 조정한 다음 사용 배지로 dilution하여 사용하였다(schem 1).

세포배양

B16/F10 melanoma 세포는 CO₂ 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 10% fetal bovine serum (Gibco. Co.)이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 여기에 penicillin-streptomycin (Sigma Chemical Co., USA) 100 I.U.-100 µg/ml를 첨가하였으며, 약 24 시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하였다.

Cell Death induction

세포들을 24well plate에 2×10⁴ cells/ml정도의 세포수로 배양 배지에 분주한 후 산수유 클로로포름 추출물을 투여하였고 B16/F10 melanoma 세포에 여러 가지 농도 (0.1~120 µg/ml)로 48시간 동안 처리하였다. 산수유 클로로포름 추출물은 4°C에 저장하였고 사용 직전, 실험에 필요한 농도로 사용 배지에 희석하여 사용하였다.

MTT Assay

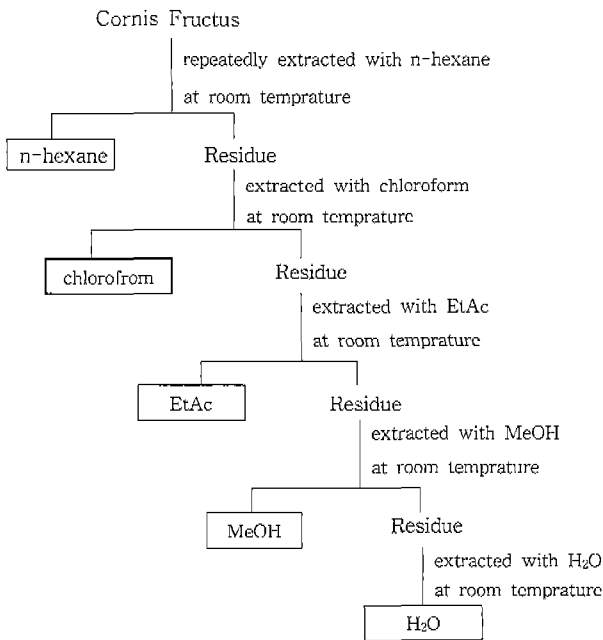
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) 정량은 Mosmann의 방법(Mosmann, 1983)으로 실시하였다. 세포를 48시간 배양한 후 상층액을 버리고, 당일 제조한 100 µg/ml MTT를 배양 용기당 1 ml 씩 넣어 은박지로 포장한 후 3시간 동안 배양하였다. 살아있는 세포는 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 10% DMSO를 200 µl씩 넣고 15분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

Trypan blue 검사

대조군과 실험군의 각 well에 0.05% trypsin - 0.02% EDTA용액을 가하여, 각 well에서 세포를 분리 수거하였다. 이 분리 수거한 세포를 PBS로 2회 세척한 후 0.02ml와 동량의 0.4%(w/v) trypan blue를 잘 섞은 다음 hemocytometer에 넣고 광학현미경을 이용하여 trypan blue에 염색된 살아 있는 세포수를 측정하였다.

DNA Fragmentation

DNA 분절 현상을 관찰하기 위하여 Wizard Genomic DNA purification kit(Promega Co. Medison, USA)를 이용하여 total DNA를 추출하였다. 세포에 산수유 chloroform 추출물을 여러 농도별로 처리하고 세포를 PBS 용액으로 세척한 후 원심분리기를 이용하여 순수 세포만을 모았다. pellet에 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 첨가하고 37°C에서 15분간 방치한 후 RNA를 처리하였다. 단백질을 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 원심분리하여 상등액을 다른 tube에 옮기고 pellet은 버렸다. 여기에 isopropanol을 첨가한 후 침전에 의해 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 15분간 실온에서 air dry 시켰다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 첨가하여 DNA pellet을 용해한 후 분광광도계를 이용하여 260 nm와 280 nm의 optical density (OD) 값을 측정하여 DNA를 정량하였다. 10 µg의 각 DNA 포본들을 10 µg/ml 농도의 ethidium bromide를 포함한 1.2% (w/v) agarose gel에서 50 v, 2시간 정도 전기영동



Scheme 1. Extraction of Cornis Fructus.

시켰으며 ultraviolet light에서 DNA pattern을 관찰하였다.

Hoechst 염색

Apoptosis과정에서 일어나는 DNA 분절화와 염색질 농축을 관찰하기 위하여 Hoechst 염색 (Araki, 1987; Latt, 1976)을 시행하였다. 클로로포름 분획물들 중 3번 분획물로 처리된 세포들을 5% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 1X PBS로 씻어주고 Hoechst 33342(Sigma Chemocal Co., St. Louis, NY,USA) 염색시약을 1X PBS에 10 uM이 되게 희석하여 15분간 염색한 후 다시 Phosphate-buffered saline (PBS)로 세척하여 형광 현미경으로 관찰하였다.

통계방법

실험결과는 평균 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's T-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

산수유의 용매별 추출 수득율

산수유 1.5 kg에 용매를 넣어 상온에서 교반하고 연속 추출법으로 각 추출물을 얻었다. 각 추출물을 0.4 m필터로 여과한 후, 여과액을 농축기로 35°C에서 감압농축시킨 후 냉동 건조하여 수득량을 얻었으며(Choi, 2003) 추출물의 함량은 백분율로 나타내었다.

산수유 클로로포름 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향

산수유 클로로포름 추출물이 B16/F10 melanoma 세포

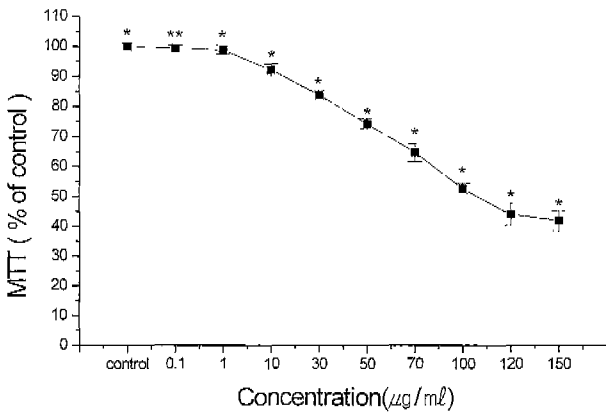


Fig. 1. Effect of chloroform extract from Cornis fructus on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of Cornis fructus for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results are expressed as % control and data are mean ± S.D. of three experiments performed on triplicate. *Significantly different from control group(*p < 0.05, **p < 0.01).

의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 클로로포름 추출물을 0.1 µg/ml에서 150 µg/ml까지 다양한 농도로 처리하고 24시간, 48시간 배양한 후에 MTT 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다(Fig. 1). MTT 결과에서 보는 바와 같이, 클로로포름 추출물에 의한 세포 생존율은 0.1 µg/ml-최고 150 µg/ml 처리시 유의할만한 변화를 나타내었다. 이 결과를 다시 확인하기 위하여 trypan blue 방법으로 클로로포름 추출물을 처리하고 세포수를 조사해본 결과 MTT 방법의 결과와 마찬가지로 농도가 증가함에 따라 유의할만한 감소를 나타내었으며(Fig. 2), 세포의 형태학적 변화를 관찰해 본 결과 대조군과 실험군 사이에 유의성 있는 차이를 나타내었다(Fig. 3). 더불어 산수유의 구성 화합물 중 알려진 단일 물질과 클로로포름 추출물을 B16/F10 melanoma 세포에 대해 MTT방법으로 세포 생존율을 비교, 측정해본 결과 구성 화합물 중 Ursolic acid 에 의해 B16/F10 melanoma 세포가 억제되는 것을 관찰 할 수 있었다

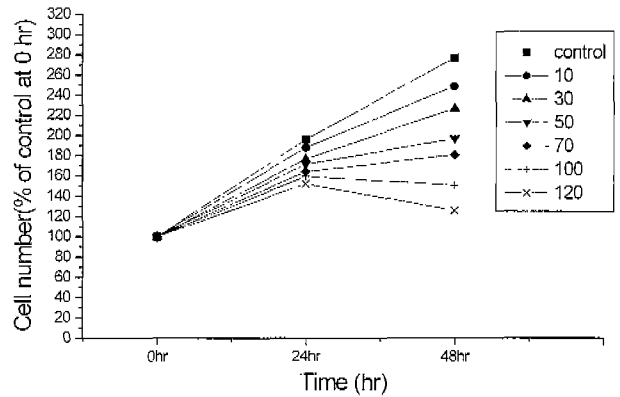


Fig. 2. Effect of chloroform extract from Cornis fructus on the proliferation of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations chloroform extract of Cornis fructus for 24 h and 48 h. The proliferation of the cells was measured by trypan blue test. Results are expressed as % control and data are mean ± S.D. of three experiments performed on triplicate. Standard deviation were less than 5%.

Table I. The Results of MTT Assay on the viability of present known compounds of Cornis fructus and chloroform extract from Cornis fructus

Known sample NO.	IC ₅₀ (µg/ml) on B16/F10 melanoma cells
Gallic acid	No activity
Palmitic acid	No activity
Tannin	No activity
Ursolic acid	26.8 µg/ml
Chloroform extract	104.7 µg/ml

The cells were cultured for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay.

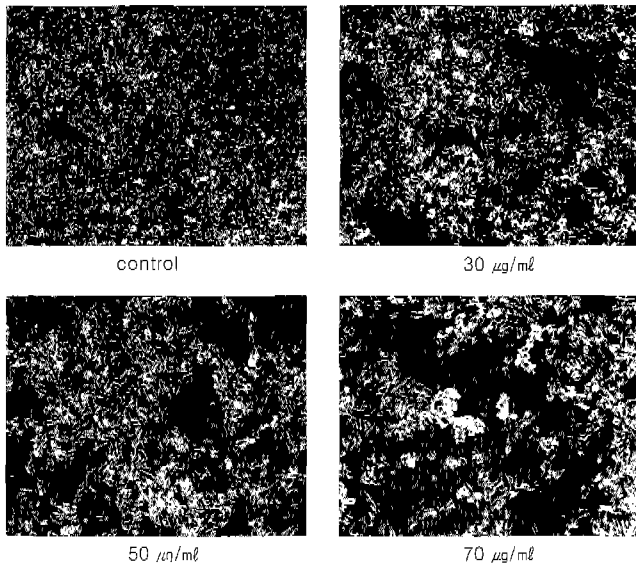


Fig. 3. Morphology of control and chloroform extract-treated B16/F10 melanoma cells.

(Table I). 이상의 결과를 종합해 볼 때 산수유 클로로포름 추출물의 농도가 증가함에 따라 B16/F10 melanoma 세포의 분열 증식을 억제하여 세포 사멸을 유도한 것으로 사료된다.

세포의 형태학적 특징

본 실험에서는 피부암 세포인 B16/F10 melanoma 세포의 세포 사멸에 대한 산수유 클로로포름 추출물의 효과를 알아보기 위하여 추출물의 농도를 1~150 µg/ml 농도로 증가시키면서 세포 배양 배지에 처리하여 48시간 동안 세포를 배양하였다. Fig. 1과 Fig. 2에서 보여지듯 시료의 농도가 증가함에 따라 세포의 분열 증식은 점차적으로 감소하였으며 세포 사멸은 증가하였다. 산수유 클로로포름 추출물에 노출된 세포들의 형태학적인 특징을 현미경 하에서 관찰한 결과 세포 사멸에 의한 세포막 외부 용기의 돌출과 응축 현상을 볼 수 있었다(Fig. 3). 이러한 세포의 사멸 현상은 시료 성분이 B16/F10 melanoma 세포의 성장과 분열 증식을 억제시키면서 세포 사멸을 유도하는 증거라고 보여진다.

DNA Fragmentation에 미치는 영향

산수유 클로로포름에 노출된 B16/F10 melanoma 세포의 세포 사멸이 수동적이고 물리적인 necrosis인지, cell signal에 의한 능동적이고 자발적 apoptosis인지를 확인하기 위하여 Fig. 1과 동일한 조건하에서 처리된 세포들을 이용하여 DNA fragmentation을 확인하였다. 대조군 세포와 세포 고사가 유도된 세포들로부터 total DNA를 취하여 agarose gel로 전기영동을 실시하였다. 그 결과 세포



Fig. 4. DNA Fragmentation pattern by the chloroform extract of Cornis fructus in B16/F10 melanoma cells. Genomic DNA was extracted from control and treated samples.

사멸이 유도된 세포에서 세포 고사가 진행되는 동안 oligonucleosomal 크기의 DNA 분절(180-200 bp)을 포함하는 apoptotic DNA ladder 현상은(Bicknell, 1994; Gavlieli, 1992; Nicoletti, 1991) agarose gel상에서 정연하게 확인되지는 않았지만 DNA tugging 형태가 관찰되었다(Fig. 4).

산수유 클로로포름에 의한 chromatin condensation 유도

산수유 클로로포름을 처리한 B16/F10 melanoma 세포의 죽음의 기전이 apoptosis에 의한 것인지 또는 necrosis에 의해 나타나는 현상인지를 확인하기 위해 apoptosis의

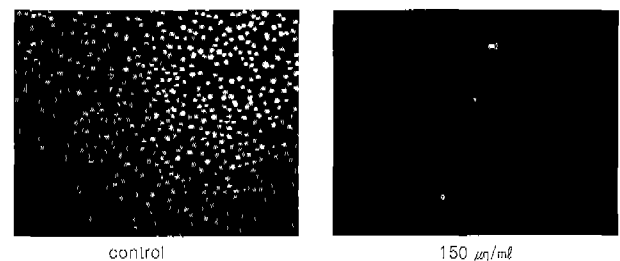


Fig. 5. Effects of the chloroform extract of Cornis fructus on chromatin condensation in B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of the chloroform extract of Cornis fructus for 48 h. Fluorescent staining of nuclei in B16/F10 melanoma cells by Hoechst 33342.

특정인 핵 염색질의 농축을 조사하였다. 산수유 클로로포름 추출물이 150 µg/ml의 농도가 되도록 B16/F10 melanoma 세포에 48시간 처리한 후, Hoechst 염색법으로 형광 현미경하에서 세포의 염색질 응축과 분절화 현상이 관찰되었다(Fig. 5).

결 론

산수유 추출물이 피부암 세포인 B16/F10 melanoma 세포의 분열 증식에 어떠한 영향을 나타내는지를 규명하기 위하여, B16/F10 melanoma 세포에 산수유의 클로로포름 추출물을 처리한 후 MTT 검색법에 의한 세포의 생존율, Trypan blue법에 의한 세포수, DNA fragmentation, chromatin condensation의 변화를 측정하였다. 산수유 클로로포름 추출물을 농도별로 처리 한 후 24시간, 48시간 배양한 B16/F10 melanoma 세포의 생존율은 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소하며 억제되었고 세포의 형태학적 관찰에서도 농도 의존적으로 세포 사멸(죽음)에 의한 세포막 외부 용기의 돌출과 세포 응축 현상이 관찰되었다. 세포의 죽음에는 외부의 자극에 의해 일어나는 세포의 타살적 죽음과 자발적 죽음으로 나뉘며, 자발적 사멸(programmed cell death)은 다양한 형태적, 생화학적 변화들을 동반한다. 우선 세포는 크기가 축소되고, 세포막 용기가 돌출되는 현상을 나타내며, 핵내에서는 endonuclease 활성화에 의한 핵 분절화와 염색사의 응축의 변화가 나타난다(Wyllie, 1980; 1992). 이와 더불어 세포막 지질로부터 ceramide의 유리, 미토콘드리아의 cytochrome C의 유리 현상과 caspase 단백질 분해효소의 활성화를 동반한다(Buja, 1993; Kerschmann, 1995; Nagata, 2000). 본 연구에서 DNA fragmentation 실험을 실시한 결과 cell signaling에 의한 자발적이고 능동적 사멸 현상의 하나인 DNA 분절화는 명확히 관찰되지 않았으며, DNA tugging 현상이 관찰되었다. DNA tugging현상도 미세하고 다양하게 분절화된 DNA fragment의 연속적 끌림의 한 현상이므로, 이를 확인하기 위하여 Hoechst 염색(Araki, 1987; Crissman, 1987; Latt, 1976)을 실시하여 염색질의 응축과 분절화를 형광 현미경으로 관찰한 결과, B16/F10 melanoma 세포에서 염색질 응축과 분절화 현상이 관찰되었다. 이상의 결과를 종합해보면 산수유의 클로로포름 추출물은 B16/F10 melanoma 세포의 분열 증식을 억제, 차단하여 세포의 죽음을 유도하는 것으로 사료되는 바이다.

감사의 말씀

본 연구는 BK 21사업의 연구비 지원으로 연구되었으

며, 이에 감사 드리는 바입니다.

참고문헌

- 김재길 (1995) 동양전통약물 원색도감, 도서출판 영림사, pp. 230.
- 김창민 (1997) 중약대사전, 도서출판 정담, pp. 2667-2672.
- 김충섭, 박종희, 도상학 (1979) 국내에 야생하는 특용식물자원의 이용을 위한 연구. 한국과 학기술연구소. (1), pp 1410-1416.
- 신민교, 정진섭 (1998) 도해 향약(생약)대사전, 도서출판 영림사, pp. 448-449.
- 전통의학 연구소편 (1994) 본초약재 도감, 정보사, pp. 203.
- Araki, T., Yamamoto, A. and Yamada, M. (1987) Accurate determination of DNA content in single cell nucleic stained with Hoechst 33258 fluorochrome at high salt concentration. *Histochemistry*. **87**, 331-338.
- Bicknell, G. R., Snowden, R. T. and Cohen, G. M. (1994) Formation of high molecular mass DNA fragments is marker of apoptosis in the human leukaemic cell line, U937. *J. Cell Sci.* **107**, 2483.
- Buja, L. M., Eigenbrodt, M. L. and Eigenbrodt, E. H. (1993) Apoptosis and necrosis Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med.* **117**, 1208-1214.
- Choi, W. H., Chun, H. J., Lee, J. H., and Beak, S. H. (2003) Effects of Methanol Extract from Cornis fructus on Mclanogenesis. *Kor. J. Pharmacogn.* **34**, 70-74.
- Endo, T. and Taguchi, H. (1973) Study on the constituents of Cornus Offinalis Sieb. et Zucc. *Yakugaku Zasshi.* **93**, 30-32.
- Gaw, H. Z. and Wang, H. P. (1949) Survey of chinese drugs for presence of antibacterial substances, *Science*, **110**, 11-1
- Gavlieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. J. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* **119**, 493.
- Hatano, T., Ogawa, N., Kira, R., Yasuhara, T. and Okuda, T. (1989a) Tannins of cornaceous plants. I. Cornusiins A, B and C, dimeric monomeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis*, and orientation of valoneoyl group in related tannins. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2083-2090.
- Hatano, T., Yasuhara, T. and Okuda, T. (1989) Tannins of cornaceous plants. I. Cornusiins D, E and F, new dimeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2665-2669.
- Hatano, T., Yasuhara, T., Abc, R. and Okuda, T. (1990) A Galloylated monoterpene glucoside and a dimeric hydrolysable tannin from *Cornus Offifinalis*. *Phytochemistry*. **29**, 2975-2978
- Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 a-25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**, 1474-1478.
- Hearing, V. J. (1987) Mammalian monophenol monooxygenase, *Methods in Enzymol.* **142**, 152-165.
- Hearing, V. J. (1999) Biochemical control of melanogenesis and

- melanosomal organization. *Soc. Invest. Dermatol.* **4**, 24-28.
- Joo, H. K. and Jang, D. J. (1989) Effects of Shanshuyu(*Cornus Officinalis* Sieb) tea and Market teas feeding on Hematology and Liver Function of Rat. *Korean J. Dietary Culture.* **4**, 257-264.
- Jimbow, K., Queredo, J. W. C., Prota, G., Fitzpatrick, T. B. (1999) Biology of melanocytes. In: Freedberg, I. M., Eisen, A. Z., Wolff, K. W. et al, eds. *Dermatology in general medicine*, 5th ed. New York: McGraw-Hill Book, pp. 192-220.
- Kim, D. K., Kwak, J. H., Ryu, J. H., Kwon, H. C., Song, K. W., Kang, S. S., Lee, S. H., Lee, E. A., Kwon, N. S., Lee, K. R. and Zee, O. P. (1996) A Component from *Cornus officinalis* Enhances Hydrogen Peroxide Generation from Macrophages. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**, 101-104.
- Kerschmann, R. L., Woda, B. A. and Majno, G. (1995) The fusion of tumor cells with host cells; reflections on an ovarian tumor. *Perspect Biol Med.* **38**, 467-475.
- Latt, S. A. and Stetten, G. (1976) Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Histochem. Cytochem.* **24**, 24-33.
- Lee, E. B., Choi, B. C. and Cho, T. S. (1985) Pharmacological studies on ether fraction of *Corni Fructus*. *J. Pharm. Soc. Kor.* **29**, 1-10.
- Lee, S. H., Tanaka, T., Nonaka, G. I. and Nishioka, I. (1989) Sedoheptulose digallate from *Cornus officinalis*. *Phytochem.* **28**, 3469-3472.
- Lee, Y. C., Kim, Y. E., Lee, B. Y. and Kim, C. J. (1992) Chemical Compositions of *Corni Fructus* and Separating Properties of Its Flesh by drying. *Korean J. Food Sci. Technol.* **24**, 447-450.
- Matinez-Esparza, M. (1998) Mechanisms and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **225**, 139-146.
- Miyazawa, M. and Kameoka, H. (1989) Volatile flavor components of *corni fructus*. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 3337-3340.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* **139**, 271.
- Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res.* **256**, 12-18.
- Okuda, T., Hatano, T., Ogawa, N., Kira, R. and Matsuda, M. (1984) Cornusin A, A dimeric ellagitannin forming four tautomers, and accompanying new tannins in *Cornus officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 4662-4665.
- Qiaoling Peng, Z. W. and Benjamin, H. S. Lau. (1998) *Fructus corni* Enhances Endothelial Cell Antioxidant Defenses. *General Pharmacology.* **31**, 221-225.
- Seo, K. I., Lee, S. W. and Yang, K. H. (1999) Antimicrobial and Antioxidative activities of *Corni fructus* extracts. *Kor. J. Postharvest Sci. Tec.* **6**, 99-103.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. and Currie, A. R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251.
- Wyllie, A. H. (1992) Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Meta. Rev.* **11**, 95.
- Yang, H. O., Choi, W. H., Jeon, B. H., Beak, S. H., and Chun, H. J. (2002) Water Extract from *Cornis Fructus* Regulates Melanogenesis in B16/F10 Melanoma. *Kor. J. Oriental Physiology & Pathology.* **16**, 818-822.
- Yamahara, J., Mibu, H., Sawada, T., Fujimura, H., Takino, S., Yosikawa, M. and Kitagawa, I. (1981) Biologically active principles of crude drugs. Antidiabetic principles of *Corni Fructus* in experimental diabetes induced by streptozotocin. *Yakugaku Zasshi.* **101**, 86.
- Yang, T. H., Liu, S. H. and Sun, M. H. (1971) Constituents of the fruits of *Cornus Officinalis*. *Taiwan Yao Hsueh Tsa Chih.* **1**, 22-26.