

원저

Proteomic Analysis기법을 이용한 紅花子藥鍼液이 肝癌細胞柱의 遺傳子 發顯에 미치는 影響

이경민 · 임성철 · 정태영 · 서정철 · 한상원

대구한의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

Effect of Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture Solution(CTF-HAS) on Gene Expression in HepG2 carcinomar cells by Proteomic Analysis

Lee Kyung-min, Lim Seong-chul, Jung Tae-young, Seo Jung-chul, Han Sang-won

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Abstract

Objective : It has long been known about the osteogenic effect of CTF-HAS on bone tissues. However, it has not been determined the effect of CTF-HAS on cancer cells. The purpose of this study is to screen the CTF-HAS mediated differentially expressed genes in cancer cells such as HepG2 hepatoma cells lines.

Methods : CTF-HAS was prepared by boiling and stored at -70°C until use. For proteomic analysis, total protein was analyzed by 2D gel electrophoresis and Q-TOF mass spectrometer.

Results : In proteomic analysis, three spots were identified by 2D-gel electrophoresis and Q-TOF analysis. One down-regulated protein was heat shock 70kDa protein 5 and up-regulated proteins were chaperonin and 2-phospho -pyruvate-hydratase α -enolase by 1.5mg/ml of CTF-HAS.

Discussion : Proteomic ananlysis approach were performed to screen the differential expression genes. The screened genes will be used for the better understanding in therapeutic effect of CTF-HAS on cancer field.

Key words : proteomic analysis, CTF-HAS, gene expression, HepG2

1. 緒 論

현대인에게 '죽음에 이르는 병'으로 인식되고 있는 癌은 현재 한국인의 疾病死因 중 1위를 차지하고 있

며, 최근 20년 간 지속적인 增加를 보이고 있다²⁾.

癌에 대해 西洋醫學에서 연구가 많은 발전을 거듭하고 治療法에서도 手術療法, 放射線療法, 化學療法, 免疫療法 등의 方法이 알려져 있으나 어느 療法도 癌의 完전한 治療法이 되지는 못하고 있는 실정이다^{2,3)}.

최근 의학계에서 인간게놈계획이 研究, 進行됨에 따라 癌細胞의 發生으로부터 增殖, 進展, 轉移에 이르는 과정에서 發癌機轉의 각 단계마다 關聯된 다양한 遺傳

* 교신저자 : 한상원, 대구시 수성구 상동 165
대구한의대 부속대구한방병원 침구과
(Tel : 053-770-2236, E-mail: hansw@dhu.ac.kr)

子들 및 그 變化를 찾아낼 수 있는 기회가 많아졌으며⁹⁾ 遺傳子 자체의 情報 뿐 아니라 각종 治療法 이행 후의 變化를 폭넓게 파악할 수 있게 되어 研究 發展에 획기적인 전기를 마련할 수 있게 되었다⁹⁾.

현재 한의학계에서는 單味 藥材와 韓方 處方으로부터 抗癌劑를 개발하려는 많은 연구가 시행되고 있으며, 다양한 실험을 통하여 우수한 治療 效果가 報告되고 있다⁶⁾. 특히 藥鍼療法을 이용한 抗癌효과에 대한 연구가 활발히 진행되어 임 등⁸⁾, 김 등⁹⁾은 각각 人蔘藥鍼, 金銀花藥鍼, 鱉螯藥鍼 등의 抗癌 效果를 報告하였으며 최근 이 등¹⁰⁾이 紅花子 藥鍼液의 DNA chip을 이용한 肝癌細胞柱에 대한 遺傳子 發顯에 미치는 영향을 보고한 바 있다.

이에 著者는 活血行瘀, 消腫散結, 解痘毒, 解毒하는 效能¹¹⁾이 있는 紅花子 (Carthami Tinctorii Fructus ; CTF) 藥鍼液 처리에 發顯 增減을 나타내는 遺傳子들을 찾기 위하여 肝癌 細胞柱에 혼합물에 존재하는 특정 물질의 선택 기능이 우수한 proteomic analysis 기법을 이용하여 遺傳子 發顯을 分析한 結果 有意性이 있어 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

本 實驗에서 사용된 紅花子 (Carthami Tinctorii Fructus ; CTF) (경북, 의성)는 대구한의대학교 부속 대구한방병원 藥劑科에서 300g을 購入한 후 精選하여 使用하였다.

2. 方法

1) 藥鍼液의 調製

紅花子를 破碎하여 25g의 분말을 500ml의 蒸溜水에 넣어 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 紅花子와 혼합된 蒸溜水를 13,000rpm으로 1시간 동안 원심 분리하여 上清液만을 회수하였다. 上清液을 멸균된 필터기를 사용하여 얻은 다음 -70°C에서 48시간 동안 냉동 건조시켜 10g의 건조된 분말을 얻었다.

2) 細胞 培養

本 실험에 사용된 細胞柱는 肝癌 細胞에서 유래한 HepG2 (hepatic cancer cell)는 ATCC (U.S.A.)에서 구입 확보하였다. 細胞 培養에 사용된 미디어는 DMEM/F12k (50:50) (GibcoBRL, U.S.A.)에 FBS (fetal bovine serum) (GibcoBRL, U.S.A.) 10%를 첨가하여 사용하였다. 배양기의 약 70% 정도 細胞가 자라면(2.5×10⁶) 계대 培養한 후 사용하였다. 시료를 처리하기 12시간 전에 培養液을 serum이 없는 상태로 만들어서 serum 내의 cytokine 및 단백질의 영향을 배제하였다. 紅花子藥鍼液의 농도를 0.1, 0.5, 1.5, 10 및 20mg/ml 되게 HepG2에 24시간 처리하였다. 細胞를 trypsin-EDTA 1ml을 첨가하여 PBS로 세척 후 원심 분리하여 회수하였다.

3) Proteomic analysis

(1) Analytical two dimensional (2D) gel electrophoresis

腫瘍 細胞柱에 紅花子藥鍼液을 1.5mg/ml로 처리한 후 24시간 동안 반응시켜 얻어진 細胞에 8M urea, 2% Nonidet P-40 (NP-40), 2% ampholytes (Ampholine pH 3.5 and pH 5.8; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden, 5% polyvinylpyrrolidone)가 포함된 시약을 사용하여 일차적으로 細胞를 破碎시킨 다음 15,000rpm (Kubota, Tokyo, Japan)에서 5분 동안 원심 분리를 2회 실시한 후 上清液을 2D PAGE에 사용하였다. 遺傳子은 IEF (Isoelectric focusing)에 의한 pH gradient (pH 6-10, Daici-Kagaku, Tokyo, Japan)에 따라서 첫 번째 분리를 시도하였다. 그런 다음 분자량에 따라서 분리를 실시하기 위하여, 8M urea, 3.5% acrylamide, 2% NP-40, 동량의 2% Ampholines를 준비하였다. 전기영동은 200V에서 30분간 실시한 후, 400V에서 1시간, 1,000V에서 16시간, 2,000V에서 1시간 동안 실시하였다. SDS-PAGE 전기영동은 12.5% polyacrylamide gel을 사용하였고, 5% stacking gel에서 35mA로 실시하였다.

(2) Gel scanning, image analysis, in-gel proteolytic digestion

2D 전기영동 결과 얻어진 spot에 대한 상호 비교 데이터를 소프트웨어 (Bio-Rad, U.S.A.)를 사용하여 정량적인 데이터를 얻었다. 紅花子藥鍼液에 대하여 遺傳子 發顯의 양적 차이를 보이는 spot을 다음과 같이 동정하

였다. 먼저 spot을 3조각으로 자른 후 30mM potassium fericyanide와 100mM sodium thiosulfate를 1:1로 섞어 염색약이 빠질 때까지 혼합하고 蒸溜水로 3번 이상 세척하였다. 염색약이 제거된 gel에 200mM ammonium bicarbonate 50 μ l를 20분 동안 혼합한 후 蒸溜水를 5분 동안 혼합한 다음, 100% Acetonitrile 50 μ l를 혼합하여 탈수한 후 trypsin과 50mM NH₄Cl를 혼합한 다음 37°C에서 18시간 반응시켰다.

(3) Q-TOF 分析

이온화 방법 (MALDI)으로 생성된 이온을 Mass Analyzer인 Q-TOF에서 질량/하전량과의 비에 따라 분리 검출된 질량스펙트럼을 분석, 해석하여 분석물질의 질량을 확인하였다. Q-TOF 分析으로 얻어진 遺傳子 조각들의 분자량은 ProID Database 프로그램 (MDS Sciex, U.S.A.)을 이용하여 검색한 후 각 遺傳子를 동정하였다.

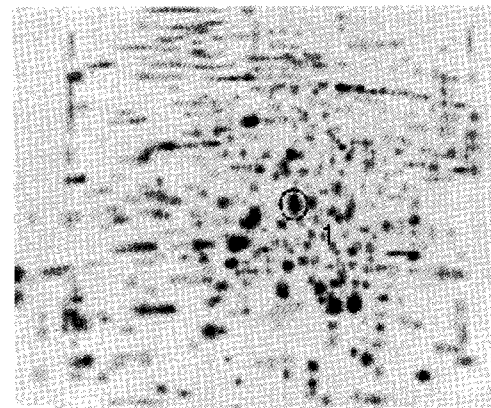
III. 成績

紅花子藥鍼液 처리에 發顯 增減을 나타내는 遺傳子들을 찾기 위하여 2D-gel 전기영동과 Q-TOF 分析을 시행하였다. HepG2 細胞에 紅花子藥鍼液을 처리한 후 發顯 遺傳子들의 양적 차이를 비교하였다. 비교 후 增加나 減少를 나타내는 遺傳子들 중 발현차이가 뚜렷한 것들을 선정하여 동정하였다. 2D-gel 전기영동 후 나타나는 遺傳子들의 사진으로 치료 처치했을 때 減少되는 遺傳子를 spot 1이라 명명하였다. Spot 1 遺傳子를 Q-TOF 分析으로 동정한 결과 heat shock 70kDa protein 5 (GB No. gil16507237)였다(Fig. 1-a).

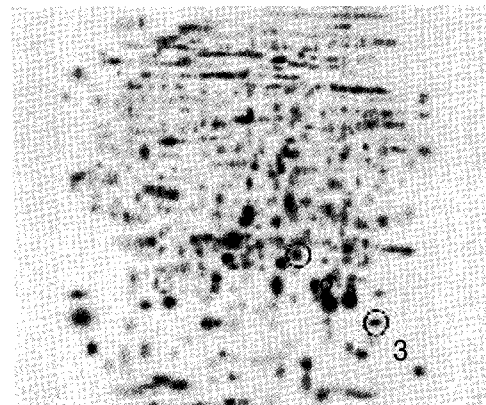
紅花子藥鍼液 처리 후 增加되는 遺傳子 중 일부를 spot 2와 spot 3라 명명하고 같은 방법으로 동정하였다. Spot 2는 chaperonin (GB No. gil31542947)으로 發顯이 增加되었고, spot 3은 2-phospho · pyruvate-hydratase α -enolase (GB No. gil693933)로 밝혀졌고 發顯이 增加되었다(Fig. 1-b).

IV. 考 察

癌은 우리 몸을 구성하는 기본 단위인 細胞가 그 정상적인 調節機能의 範疇와 주위 臟器의 정상적인 영향



Control



CTF-HAS

Fig. 1 Proteomic analysis of HepG2 cells after CTF-HAS treatment. Confluent HepG2 cells were treated with 1.5mg/ml of CTF-HAS for 24hrs and total proteins were obtained and analyzed as described in materials and methods. Control was no treatment with CTF-HAS. Spot 1 is a single circle in control. Spot 2 and spot 3 are upper and lower circle in CTF-HAS (1.5mg/ml), respectively. CTF-HAS ; Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture Solution

력을 벗어나 自律成을 지니고 非可逆的으로 過剩 增殖을 하는 것으로, 臨床 및 病理 形態의인 소견에 의하여 良性 腫瘍과 惡性 腫瘍으로 구분된다¹²⁾.

이 중 일반적으로 癌이라고 하는 모든 惡性 腫瘍은 빠른 成長, 浸潤, 체내 각 부위로의 擴散 및 轉移 등과 같은 특성이 있어 생명에 위험을 초래한다. 우리나라에서도 癌에 의한 死亡率이 최근 20년 간 꾸준한 상승을 보여 전체 死亡原因 1위를 차지하면서 국민보건을 위협하는 가장 큰 요인이 되고 있다^{3, 12)}.

韓醫學에서는 癌에 대하여 殷墟의 甲骨文에서 ‘瘤’라 한 것에서 처음으로 나타나며, 이후 『內經』¹³⁾에서 積聚, 腸覃, 石瘕, 癰, 五臟之積 등에 대하여 구체적으로 언급한 이래로 癌은 腫瘍, 腸覃, 羸瘤, 羸贅, 贅疣, 癥瘕, 積聚, 噎膈, 反胃, 惡瘡, 岩 등의 範疇에서 취급하고 있다¹⁴⁾. 癌의 발생 원인은 外感邪氣, 七情의 변화, 飲食失調 및 正氣虛弱 등으로 인하여 氣滯血瘀가 되거나 臟腑의 機能이 失調되어 발생하는 것으로 볼 수 있다¹⁵⁾.

최근 韓醫學에서 癌에 대해 여러 가지 연구¹⁶⁻⁷⁾ 진행되고 있는데, 이 중에서 經絡學說의 原理에 의거하여 韓藥材를 선택하여 有關한 穴位, 壓痛點 및 陽性反應點에 注入하여 刺鍼과 藥物作用을 통하여 生體의 機能을 조정하고 病理狀態를 개선시켜 질병을 치료하는 新鍼療法인 藥鍼療法¹⁸⁾으로 다양한 약침을 이용한 抗癌 연구가 활발히 진행되고 있다. 임 등¹⁹⁾이 皮膚癌이 誘發된 ICR계 생쥐의 足三里에 人蔘藥鍼을 주입한 후 腫瘍의 體積, B細胞와 T細胞의 含量, 림프구 增殖反應, 大食細胞의 食食能, IL-2와 interferon의 生産能을 측정 한 결과 比較群에 비해 有意한 效果가 있음을, 김 등²⁰⁾은 全蝎藥鍼을 中脘에 주입했을 때 발암물질이 誘發하는 突然變異原性과 遺傳 毒性을 抑制한다는 결과를 報告하였다. 이 등²¹⁾은 膽癌 생쥐에게 蟾蜍藥鍼을 中脘과 足三里에 주입한 결과 腫瘍抑制能, 細胞毒性能, 生存率 延長 效果에 有意한 效果가 있음을 報告하였다. 그리고 이 등²²⁾, 배 등²³⁾은 각각 菟絲子藥鍼과 魚腥草藥鍼을 腫瘍을 誘發한 생쥐에 주입하여 抗癌과 免疫機能 增進에 有意한 效果가 있음을, 박 등²⁴⁾은 B16-F10과 HT-1080 및 S-180 癌細胞柱로 腫瘍을 誘發시킨 생쥐의 中脘에 益智仁藥鍼을 주입한 결과 抗腫瘍 및 免疫效果가 있음을 報告하였다.

紅花子 (Carthami Tinctorii Fructus ; CTF)는 국화과에 속하는 잇꽃의 종자²⁵⁾로, 성분²⁶⁾은 linoleic acid와 oleic acid의 glyceride가 주성분인 20-30%의 脂肪油와 serotonin, serotonin conjugate, serotobenin 등으로 밝혀져 있다. 性은 溫하고 味는 苦하며 心脾 二經에 歸經하여 活血祛瘀, 解毒, 通絡止痛의 效能이 있어 瘀血腹痛, 動脈硬化症, 産後瘀血腹痛, 腦血栓 등에 활용하며²⁷⁾, 최근에는 민간에서 紅花子가 뼈질환에 좋다하여 일반인들이 많이 복용하고 있는 실정이다.

그 일환으로 學界에서는 紅花子를 이용한 연구가 많이 報告되고 있는데 육 등²⁸⁾은 난소적출로 誘發된 estrgen 결핍성 骨多孔症에 紅花子·鹿茸·紫河車藥鍼

을 주입한 결과 일정한 效果가 나타났으며, 김 등²⁹⁾은 흰쥐의 關元 相應部에 桃仁 및 紅花藥鍼을 주입하여 醋酸法과 熱板法에 대한 鎮痛作用과 endotoxin으로 誘發된 혈관내 혈전증후군에 대해 有意한 效果를 연구하였으며, 김 등³⁰⁾은 MSU (microcrystalline sodium urate)로 急性 痛風을 誘發시킨 흰쥐에게 紅花油藥鍼을 처리한 결과를 報告하였다. 특히 안 등³¹⁾과 윤³²⁾은 Sarcoma-180 細胞를 주입한 생쥐에게 각각 紅花子藥鍼과 紅花子·巴豆混合藥鍼을 주입한 결과, 抗腫瘍 效果 및 免疫增強 效果가 있음을 발표하는 등 骨多孔症, 關節炎, 抗癌 등에 대한 많은 연구가 報告되었고 최근 이 등이 紅花子藥鍼液의 DNA chip을 이용한 肝癌細胞柱에 대한 遺傳子 發顯에 미치는 영향을 보고한 바 있다.

이에 紅花子藥鍼液의 臨床的 作用機轉을 보다 깊이 이해하고 臨床的 應用의 폭을 넓히는 데에 도움이 되는 기초 자료를 마련하고자 肝癌細胞柱에 최신 proteomic analysis 기법을 통해 紅花子藥鍼液 처리에 發顯 增減을 나타내는 유전자들을 分析하게 되었다.

Q-TOF 分析은 이온화 방법으로 생성된 이온을 질량/하전량과의 비에 따라 분리 검출된 질량스펙트럼을 分析 解釋하여 分析물질의 질량 및 그 구조를 확인할 수 있다. Q-TOF는 혼합물에 존재하는 특정 물질의 선택 기능이 우수할 뿐만 아니라 CID를 이용한 fragment를 높은 감도로 측정할 수 있다. 따라서 紅花子藥鍼液 처리에 發顯 增減을 나타내는 유전자들을 찾기 위하여 2D-gel 전기영동과 Q-TOF 分析을 시행하였고, HepG2 細胞에 紅花子藥鍼液을 처리한 후 發顯 유전자들의 양적 차이를 비교 후 增加나 減少를 나타내는 유전자들 중 발현차이가 뚜렷한 것들을 선정하여 동정하였다.

肝癌 細胞柱에서 紅花子藥鍼液을 처리하고 증감된 유전자들 Q-TOF를 통하여 分析한 결과, heat shock 70kDa protein 5 (GB No. gil16507237)의 發顯이 減少되었고, chaperonin (GB No. gil 31542947)과 2-phosphopyruvate-hydratase α -enolase (GB No. gil 693933)의 發顯이 增加되었다.

Heat shock 70kDa protein 5는 라이소좀 막의 투과성을 억제하여 細胞 생존을 촉진한다³³⁾. 따라서 紅花子藥鍼液을 처리한 경우 heat shock 70kDa protein 5의 發顯이 減少되는 것은 紅花子藥鍼液이 肝癌 細胞柱의 細胞 增殖을 抑制할 것임을 의미한다.

Chaperonin은 細胞 內 chaperone 기전에 핵심적인 구성인자로 細胞 내 단백질의 구조를 변화시켜 특정 단

백질을 활성화하거나 또는 비활성화한다³⁰. 紅花子藥鍼液에 의한 chaperonin의 發顯增加는 肝癌 細胞柱 內의 특정 단백질의 활성화 혹은 비활성화와 연관이 있는 것으로 사료되나 이에 대하여는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

2-phosphopyruvate-hydratase α -enolase의 發顯 增加는 紅花子藥鍼液에는 지방이 다량 함유되어 있어³¹ 細胞 內 대사를 위하여 활성화된 것으로 사료된다.

本 實驗의 結果 肝癌 및 胃癌 細胞柱에 紅花子藥鍼液 處理 時 癌關聯 遺傳子가 다양하게 發顯된 점으로 미루어 보아 紅花子藥鍼液이 抗癌劑로서의 가능성을 어느 정도 시사하는 것으로 보이나 자세한 機轉을 糾明하기 위해서는 더 많은 研究가 進行되어야 할 것으로 思慮된다.

參考文獻

1. 통계청. 2003년 사망원인통계연보. 대전:통계청. 2004 : 22-4.
2. 박재갑. 인간생명과학. 서울:서울대학교출판부. 1993 : 662-73.
3. 서울대학교 의과대학. 증양학. 서울:서울대학교 출판부. 1992 : 1-3, 137-43, 225-34.
4. Correa P. Human gastric carcinogenesis:a multistep and multifactorial process. *Cancer Res.* 1992 ; 52(24) : 6735-40.
5. DeRisi JL, Penland L, Brovn PO. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression pasterns in human cancer. *Nature Genet.* 1996 ; 14(4) : 457-60.
6. 朴成濠. 白花蛇舌草藥鍼이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 影響. 大田大學校 碩士學位論文. 2003.
7. 李潤熙. 補中益氣合大七氣湯가 Doxorubicin의 併用이 抗癌效果에 미치는 影響. 大邱한의대학교 博士學位論文. 2004.
8. 임사비나, 한상원, 변부형. 人蔘藥鍼과 Lidocaine을 添加한 人蔘藥鍼이 腫瘍 및 免疫機能에 미치는 影響. *東西醫學.* 1995 ; 20(3) : 21-40.
9. 김소형, 김갑성. 全蝎 藥鍼液의 抗突然變異 및 抗癌 效果. *大韓鍼灸學會誌.* 2000 ; 17(3) : 151-67.
10. 이경민, 임성철, 정태영, 서정철, 한상원. Oligonucleotide chip을 이용한 紅花子藥鍼液이 胃癌細胞柱의 遺傳

- 子 發顯에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌.* 2005 ; 215-26.
11. 張貴君. 常用中藥鑑定大全. 北京:黑龍江科學技術出版社. 1993 : 383-4.
12. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울:杏林出版. 1995:13-5, 245-55.
13. 楊維傑 編. 黃帝內經素問靈樞錫解. 서울 : 成輔社. 1980 : 41, 45, 97, 168, 243, 295-6, 407, 447, 469, 473, 577.
14. 許俊. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1988 : 486-496, 720.
15. 賈堃. 癌瘤防治研究. 서울 : 成輔社. 1984 : 25-7.
16. Guimaraes MJ, Lee F, Zlotnik A, McClanahan T. Differential display by PCR: novel findings and applications. *Nucleic Acids Res.* 1995 ; 23(10) : 1832-3.
17. Kurian K, Watson CJ, Wyllie AH. DNA chip technology. *J Pathos.* 1999 ; 187(3) : 267-71.
18. 全國韓醫科大學 鍼灸·經穴學教室 編. 鍼灸學 <下>. 서울:集文堂. 1994 : 1457-67.
19. 李俊茂, 河智容. 蟻螞藥鍼의 抗癌作用에 관한 研究. *大韓東醫病理學會誌.* 2000 ; 14(2) : 132-43.
20. 이재복, 이병렬. 菟絲子藥鍼이 抗癌作用 및 免疫效果에 對한 實驗的 研究. *大韓鍼灸學會誌.* 2001 ; 18(3) : 94-104.
21. 배원영, 고흥균, 김창환. 魚腥草藥鍼이 B16黑色腫瘍모델에 대한 抗腫瘍效果 및 免疫反應에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌.* 2001 ; 18(1) : 186-201.
22. 박상용, 이병렬. 益智仁藥鍼이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 實驗的 研究. *大韓鍼灸學會誌.* 2001 ; 18(3) : 79-93.
23. 李時珍. 本草綱目(上册). 北京:人民衛生出版社. 1982 : 967-8.
24. 金昌致. 完譯 中藥大辭典. 서울:도서출판 정담. 1998 : 6364-5.
25. 육태한, 이창현, 이학인. 紅花子·鹿茸·紫河車 藥鍼이 骨多孔症에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌.* 2001 ; 18(1) : 61-75.
26. 金東煥, 李京燮, 宋炳基. 桃仁 및 紅花藥鍼의 鎮痛·抗血栓 効果에 관한 研究. *大韓韓方婦人科學會誌.* 2000 ; 13(2) : 60-73.
27. 金善赫, 李俊茂. 紅花油藥鍼이 Microcrystalline Sodium Urate로 誘發된 흰쥐의 痛風에 미치는 影

- 響. 大韓鍼灸學會誌. 1998 ; 15(1) : 483-91.
28. 안창석, 권기록, 이선구. 紅花子藥鍼의 急性·亞急性 毒性實驗 및 Sarcoma-180 抗癌效果에 관한 實驗的 研究. 大韓藥鍼學會誌. 2000 ; 5(1) : 7-26.
29. 尹弘老. 紅花子·巴豆 混合藥鍼液의 抗腫瘍效果에 대한 研究. 慶熙大學校 大學院 博士學位論文. 2003.
30. Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Hoyer-Hansen M et al. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization J Exp Med. 2004 ; 200(4) : 425-35.
31. Spiess C, Meyer AS, Reissmann S, Frydman J. Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. Trends Cell Biol. 2004 ; 14(11) : 598-604.
32. Khan AR. Studies in Indian oil seed. No. 3 Carthamus tinctorious L. The types of Safflower. Memories. Dept. Agri. India Bot Ser. 1929 : 18-21.