

단삼 분획추출물의 암예방 효과

손윤희 · 조현정 · 장현욱¹ · 손건호² · 남경수*

동국대학교 의과대학 약리학교실, ¹영남대학교 약학대학, ²안동대학교 생활과학대학 및 난치병한양방치료연구소

Received January 12, 2006 / Accepted February 27, 2006

Chemopreventive Potential of *Salvia miltiorrhiza* Fraction Extracts. Yun-Hee Shon, Hyun-Jung Cho, ¹Hyeun-Wook Chang, ²Kun-Ho Son and Kyung-Soo Nam. College of Medicine and Intractable Disease Research Center, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea, ¹College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea, ²College of Human Ecology and Kinesiology, Andong National University, Andong 760-749, Korea – Six fractions of *Salvia miltiorrhiza* were tested for their chemopreventive potentials using biochemical markers of carcinogenesis such as quinone reductase (QR), glutathione S-transferase (GST) and glutathione (GSH). Seventy percentage of EtOH extract was potent inducer of QR activity in Hepa1c1c7 murine hepatoma cells. GST activity was increased about 1.4-fold with EtOAc extract at concentration of 50 µg/ml. GSH levels were significantly increased with H₂O extract, 70% EtOH extract and water extract at concentration of 50 µg/ml ($p < 0.005$). From these results, 70% EtOH extract (250 mg/kg) was intragastrically administered to ICR mice for 14 days. QR, GST and GSH levels were significantly increased with the 70% EtOH treatment. These studies suggest that the 70% EtOH extract of *S. miltiorrhiza* could be considered as a potential agent for cancer chemoprevention.

Key words – *Salvia miltiorrhiza*, quinone reductase, glutathione S-transferase, glutathione

암(cancer)은 아직도 그 발생기전이 불명확하여 난치성질환으로 남아 있으며, 이를 치료하기 위하여 화학요법, 방사선, 유전자, 면역요법 등 다양한 치료법들이 도입되고 있으나 독성 및 부작용 등의 문제로 치료에 한계를 가지고 있는 실정이다. 이를 극복하기 위해 발병된 암을 치료할 수 있는 항암제 개발과 더불어 암이 발병하기 전에 막을 수 있는 암예방 제제 개발에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[13,19]. 암예방물질(chemopreventive agent)은 최종 발암대사물질 활성을 줄이거나 형성을 차단하고 또한 표적조직에서 발암물질의 활성을 감소시킴으로써 암발생을 억제할 수 있다[8].

단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 약용식물로 적삼, 자단삼, 대홍포, 활혈근이라고도 불리며 뿌리가 붉기때문에 단삼이라고 한다[6]. 원산지는 중국으로 봄이나 가을에 채취한 뿌리를 건조시킨 후 약재로 사용하고 있으며[11], 그 뿌리는 특이한 냄새가 나고 약간 쓴맛이 난다[4]. 한방치료에서는 거담, 어혈, 월경불순, 고혈압, 관상동맥, 경화성 심장병 및 식도암에 쓰인다고 알려져 있다[9]. 단삼은 tanshinone, multinone, tansinol과 비타민 E 등의 성분을 함유하고 있으며[9], 그 성분 중 przewaquinone C가 항암활성이 있다고 보고된 바 있다[23]. 한편 단삼의 항암효과에 대한 연구는 김 등[7]이 단삼과 여러 천연물을 분획별로 추출하여 항암효과를 측정한 결과 단삼이 항암작용이 높다고 보고하였고, 정 등[3]은 단삼추출물의 암세포 증식억제 효과

에 관한 연구에서 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해 에탄올 추출물 중에 항암활성을 갖는 성분이 존재한다고 발표한 바 있다.

따라서 본 실험에서는 6종류의 단삼 분획추출물(이하 추출물, H₂O, 70% EtOH, CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH 및 water layer)의 암예방 효과를 살펴보기 위하여 *in vitro*와 *in vivo* 상에서 quinone reductase (QR)과 glutathione S-transferase (GST) 활성 및 glutathione (GSH) 생성에 미치는 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

시약

Minimum essential medium eagle's (MEM), antibiotics, flavin adenine dinucleotide (FAD), 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β-NADP), glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, menadione, sodium dodecyl sulfate, dicumarol, crystal violet, NADP⁺, chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), glutathione reductase, β-naphthoflavone, triton X-100, Na-EDTA, bovine serum albumin (BSA), tween-20, 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), Tris-HCl, bicinchoninic acid protein kit는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 JBI사 (Daegu, Korea)제품을 사용하였다. 기타 세포 배양용 시약 및 추출용 유기용매는 특급시약을 사용하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-54-770-2412, Fax : +82-054-770-2477

E-mail : namks@dongguk.ac.kr

실험동물 및 실험군의 분류

본 실험에 사용한 동물은 5주령의 암컷 ICR 마우스 (체중 25-30 g)를 대한실험동물센터(충북, 음성)에서 구입하여 본 대학 동물사육실에서 일정한 조건 (온도 20±2℃, 습도 40-60%)하에서 7일간 안정시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험기간 중 사료와 물은 자유로이 먹게 하였다. 실험군은 마우스 5마리를 한 군으로 하여, 시료를 투여하지 않은 대조군 (control), 70% EtOH 추출물을 마우스 체중 kg당 10, 50, 250 mg으로 각각 투여한 군으로 나누었다. 시료투여는 마우스당 0.2 ml씩을 하루 1회로 하여 14일간 관류법(gastrointubation)으로 투여하였다.

세포배양

계대 보존 중인 생쥐의 간암세포 Hepa1c1c7 세포를 10% FBS가 포함된 MEM을 배양액으로 하여 CO₂ 배양기 (5% CO₂, 37℃)에서 배양하였고, 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 세포는 액체질소에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 사용하였으며, 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

단삼추출물 시료의 제조

실험에 사용한 국내산 단삼은 경주시 소재 건재상에서 구입하였으며 단삼 1.7 kg중 500 g은 60℃에서 H₂O (1.5 l)로 6시간씩 3회 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator (BUCHI RE121, Switzerland)로 농축하여 H₂O 추출물 약 166.9 g을 얻었고, 단삼 1.2 kg은 상온에서 70% EtOH (2 l)로 3일간 3회 추출하여 그 추출액을 여과 농축하여 70% ethanol (EtOH) 추출물 222.1 g을 얻었다. 여기에 물 1 l를 가해 녹인 다음 다시 n-hexane (1 l)를 가하여 분획깔대기로 n-hexane과 수층으로 분획한 다음 수층은 CH₂Cl₂ (1 l)를 가하여 분획깔대기로 CH₂Cl₂와 수층으로 분리한 다음 CH₂Cl₂ 층을 감압농축하여 CH₂Cl₂ 추출물(0.96 g)을 얻었고, 수층은 상기와 같은 방법으로 ethyl acetate (1 l), n-BuOH (1 l)순으로 추출하여 EtOAc 추출물 7.19 g, n-BuOH 추출물 8.34 g 과 water layer 추출물 163.5 g을 얻었다.

마우스 간으로부터 사이토졸과 마이크로솜의 분리

70% EtOH 추출물의 투여가 완료되고 24 시간이 지난 후 마우스를 질식사킨 다음 복피를 절개하여 간조직을 취하였다. 간은 무균상태에서 0.15 M KCl buffer (pH 7.0)로 perfusion시킨 후 적출하고, 다시 여러번 세척한 다음 흡습지로 수분을 제거하였다. Cytosol 부유액과 microsome의 분리는 Phol과 Fouts의 방법[14]을 응용하여 간 조직은 0.25 M sucrose 용액(조직 g 당 5.0 ml)으로 빙냉상태에서 조직균질기를 사용하여 마쇄하였다. 이 마쇄액을 원심분리(15,000 rpm, 20분)시킨 후 침전물은 제거하였으며, 상층액은 1 ml 당 0.25

M sucrose 용액에 녹인 0.1 M CaCl₂를 0.2 ml의 부피로 첨가하여 빙냉상태에서 30분간 방치하였다. 다시 2차 원심분리 (36,000 rpm, 1시간) 시켜 상층액은 cytosol 부유액으로 사용하고 형성된 침전물은 0.25 M sucrose에 재현탁하여 microsome 분획으로 실험에 사용하였다. 이상의 모든 과정은 4℃에서 실시하였다. 정량된 분획은 일정량씩 나누어 실험에 사용할 때까지 -70℃에서 냉동보관하였다.

QR 활성 측정

시료를 48시간 처리한 Hepa1c1c7 세포와 마우스 간 조직의 cytosol 용액에서의 QR 활성 유도 효과는 Prochaska와 Santamaria의 방법[15]을 수정하여 사용하였다. QR 활성은 분당 환원된 MTT의 흡광도와 crystal violet의 흡광도에 의해 산출하였고, QR의 활성 유도는 대조군의 QR 활성에 대한 시료에 의한 활성의 비로 계산하였으며, 이때 도입된 3,247 nmol/mg은 crystal violet과 MTT의 흡광계수를 결정하는 비례상수이다.

Specific activity =

$$\frac{\text{Absorbance change of MTT/min}}{\text{Absorbance of crystal violet}} \times 3,247 \text{ nmol/mg}$$

GST 활성 측정

시료를 48시간 처리한 Hepa1c1c7 세포와 마우스 간 조직의 cytosol 용액에서의 GST 활성 측정은 윤 등[24]의 방법으로 실시하여 3분간 흡광도의 증가를 380 nm에서 측정하였다. GST 활성은 slop/min/mg protein으로 계산하여 시료를 처리하지 않은 대조군의 GST 활성에 대한 시료를 처리한 GST 활성의 비로 나타내었다.

GSH 함량 측정

시료를 48시간 처리한 Hepa1c1c7 세포와 마우스 간 조직의 microsome 분획의 총 glutathione 함량은 윤 등[24]의 방법으로 측정하였다. GSH 함량은 GSH 표준곡선으로 계산하였고, nmol/mg protein으로 표시하였으며, GSH 함량의 비는 대조군에 의한 GSH 양과 시료에 의해 생성된 GSH 양의 비율로 측정하였다.

단백질 검량

세포내 총 단백질 및 cytosol 부유액과 microsome분획 단백질은 bicinchoninic acid (BCA) protein kit를 사용하여 BSA를 표준 단백질 용액으로 이용한 표준검량선을 구하여 그 양을 산출하였다.

통계학적 처리

실험결과는 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나

타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정을 위해 student's t-test 를 수행하여 결과치는 p 값이 0.05 미만을 통계학적으로 의미 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

암예방(chemoprevention)은 암화과정(carcinogenesis)을 억제시키거나 암화된 것을 전환(reversion) 시키는 작용이다. 현재 암예방 물질에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며, 효과적인 암예방물질(chemopreventive agent)의 연구를 위해 생화학적 표식자(biochemical markers)를 사용하고 있다[18]. 이 표식자들은 암화과정시 발암물질의 대사물질과 그의 부산물과도 반응하며 다양하고 많은 발암기전을 저해할수록 효과적인 암예방 물질로 간주된다. 이러한 표식자들 중에는 QR, GST 및 GSH 등이 대표적으로 사용되고 있다[5].

세포내 QR 활성

QR은 phase II 효소(GST, UDP-glucuronosyl transferase 등)의 한 종류로 간세포에서 주로 생성되어 세포질에 주로 분포하는 효소로 외부의 독성이 있는 물질과 돌연변이물질(mutagen), 발암물질(carcinogen)로부터 세포를 보호한다. 또한 생체내에 유입되는 다양한 quinone과 그 대사산물인 quinoneimine을 환원시켜 신진대사 단계의 세포독성(cytotoxicity)으로부터 세포를 보호하는 역할을 담당하고 있다. 그러므로 phase II 효소 생성의 유도는 곧 항암활성(anticarcinogenic activity)으로 여겨진다[17,20,21].

단삼분획의 QR 활성유도 효과를 측정한 결과, Hepalcl7 세포에 대한 *in vitro* 상에서의 실험에서 각각의 추출물을 12.5, 50 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 70% EtOH 추출물 처리군에서 대조군에 비하여 1.7배-2.5배로 높은 생성유도율을 보였다. 그 다음으로는 CH₂Cl₂ 추출물 50 µg/ml 처리군에서 1.4배의 QR 생성을 유도하는 것으로 나타났다(Table 1). 따라서 본 연구의 결과 단삼분획의 QR 활성 유도는 70% EtOH 추출물을 처리하였을 경우 발암물질의 중앙유발을 억제하는 효소인 QR의 활성을 유도하여 세포에 미치는 암유발을 효과적으로 억제할 것으로 기대할 수 있다.

세포내 GST 활성유도

GST는 외부 이물질의 대사과정 중 생성된 친전자성 대사산물(electrophilic metabolite)을 GSH와 결합하여 용해되기 쉬운 수용성 물질로 만들어 배설시키는 효소로서[2] phase II 효소의 한 종류이며 이 효소의 유도는 암 예방활성과 상관성이 높다[16]. GST는 세포질내에 다량으로 존재하며 여러 종류의 isozyme이 밝혀져 있고[22], 생체내에 GSH를 기질로 이용하여 발암의 직접적인 원인이 되는 활성 중간대사산물을 제거함은 물론 항산화 활성도 가지고 있다[8].

Table 1. Effect of *Salvia miltiorrhiza* fraction on quinone reductase (QR) activity

Samples	Concentration (µg/ml)	Ratio (treated/control)
H ₂ O extract	12.5	1.0±0.1
	50	1.1±0.1
70% EtOH extract	12.5	1.7±0.1**
	50	2.5±0.2***
CH ₂ Cl ₂ extract	12.5	1.3±0.1*
	50	1.5±0.1**
EtOAc extract	12.5	1.0±0.1
	50	1.4±0.1**
n-BuOH extract	12.5	1.0±0.1
	50	1.1±0.1
Water layer	12.5	1.1±0.1
	50	1.2±0.2
β-naphthoflavone	12.5 µM	1.5±0.1**

The quinone reductase (QR) activity in the sample-treated cells was analyzed and compared with a solvent-control to calculate the ratio of QR induction. The induction of QR in the solvent control was 119.8±14.1 nmol/min/mg protein. Values are mean±SD(standard deviation) of three experiments. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 as compared to the solvent control.

단삼분획의 암예방 효과를 측정하기 위하여 Hepa1c1c7 세포에서의 GST 활성을 측정한 결과, 50 µg/ml의 농도에서 H₂O 추출물, 70% EtOH 추출물 그리고 CH₂Cl₂ 추출물은 대조군에 비해 1.3배의 GST 활성 유도율을 보였고, EtOAc 추출물은 1.4배의 유도율을 나타내었다(Table 2).

세포내 GSH 함량

GSH는 외부의 독성물질이 세포내 침입했을때 직접 반응하거나 GST 및 glutathione peroxidase의 기질로 작용하여 독성물질과 결합하여 무독하게 하는 기능을 가지고 있다[10]. 대부분의 외부의 화학물질은 cytochrome P450-dependent monooxygenase system에서 대사되어져 전자친화적 물질(electrophilic product), epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질로 변화된다. 이 물질들은 GSH와 직접적으로 결합하거나 GST에 의해 촉매되는 포합과정을 거쳐 배설되기도 한다[12]. 체내 GSH 함량저하는 간세포의 단백질 분비의 손상과 지방간, 간괴사, 섬유아 증식과 같은 간질환을 일으킨다. 또한 세포내 GSH가 고갈되면 독성이 강한 대사산물이 생성되며 세포내 손상과 암의 발생이 일어난다[10]. 황(sulfur)을 포함한 화합물들은 체내 GSH 함량을 증가시켜 GST나 QR과 같은 독성억제 효소의 활성을 증가시키고 발암물질의 생성을 억제시키는 것으로 Benson 등[1]에 의해 보고되었다.

Table 2. Effect of *Salvia miltiorrhiza* fraction on glutathione S-transferase (GST) activity

Samples	Concentration (µg/ml)	Ratio (treated/control)
H ₂ O extract	12.5	1.1±0.1
	50	1.3±0.1*
70% EtOH extract	12.5	1.0±0.1
	50	1.3±0.2*
CH ₂ Cl ₂ extract	12.5	1.1±0.1
	50	1.3±0.1*
EtOAc extract	12.5	1.1±0.1
	50	1.4±0.1**
n-BuOH extract	12.5	1.0±0.1
	50	1.1±0.1
Water layer	12.5	1.1±0.1
	50	1.2±0.2
β-naphthoflavone	12.5 µM	1.4±0.1**

The glutathione S-transferase (GST) activity in the sample-treated cells was analyzed and compared with a solvent-control to calculate the ratio of GST induction. The induction of GST in the solvent control was 14.3±1.9 slope/min/mg protein. Values are mean±SD (standard deviation) of three experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 as compared to the solvent control.

Hepa1c1c7 세포로부터 단삼분획에 의한 GSH 함량변화를 살펴본 결과, 단삼 H₂O 추출물에서는 대조군에 비해 12.5 µg/ml 농도에서 1.5배, 50 µg/ml 농도에서 1.7배의 높은 생성율을 보였으며, 70% EtOH 추출물, CH₂Cl₂ 추출물 및 water layer 추출물을 농도별로 처리하였을 경우에도 1.3-1.6배의 함량증가를 보였다. 이상의 결과로 보아 단삼분획의 GSH 생성율은 H₂O 추출물, 70% EtOH 추출물 그리고 water layer 추출물을 50 µg/ml 농도로 처리하였을 때 대조군에 비해 GSH 함량증가가 높은 것으로 보아 세포내 독성물질 및 발암물질을 무독화할 것으로 추측된다(Table 3).

단삼 70% 에탄올 추출물에 대한 *in vivo*상에서의 암억제 효과

단삼분획별로 암예방효과를 측정하기 위해 *in vitro*상에서 QR, GST, GSH 활성을 측정한 결과, 70% EtOH 추출물이 세포상에서 QR과 GST활성 증가와 GSH함량 증가에 가장 높은 효과를 나타내었기에 70% EtOH 추출물을 관류법으로 마우스에 투여하여 간세포에서의 QR과 GST활성 및 GSH 함량을 측정하였다. 그 결과 간에서의 QR 활성은 대조군과 비교하였을 때 10 mg 농도에서는 변화를 보이지 않았으나 50 mg에서 1.5배, 250 mg에서는 1.7배의 활성유도로 유의성 있는 증가가 관찰되었으며 투여한 농도가 증가할수록 활성이 증가하는 것으로 나타났다. GST 유도효과를 관찰한 결과 마우

Table 3. Effect of *Salvia miltiorrhiza* fraction on glutathione (GSH) levels in Hepa1c1c7 hepatoma cells

Samples	Concentration (µg/ml)	Ratio (treated/control)
H ₂ O extract	12.5	1.5±0.1**
	50	1.7±0.2***
70% EtOH extract	12.5	1.3±0.1*
	50	1.6±0.2***
CH ₂ Cl ₂ extract	12.5	1.3±0.1*
	50	1.5±0.1**
EtOAc extract	12.5	1.0±0.1
	50	1.3±0.1*
n-BuOH extract	12.5	1.0±0.1
	50	1.1±0.1
Water layer	12.5	1.3±0.1*
	50	1.6±0.2***
β-naphthoflavone	12.5 µM	1.4±0.1*

The glutathione (GSH) levels in the sample-treated cells was analyzed and compared with a solvent-control to calculate the increase of GSH levels. GSH levels in the solvent control was 49.8±5.1 nmol/mg protein. Values are mean±SD (standard deviation) of three experiments. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 as compared to the solvent control.

스 kg 당 50과 250 mg으로 처리하였을 때 대조군에 비해 1.1-1.5배의 유도율을 나타내었다. 또한 간에서의 GSH 생성량을 측정한 결과 마우스 kg당 250 mg의 농도를 투여한 경우에만 1.4배로 유의성 있는 증가가 나타났다. 따라서 단삼 70% EtOH 추출물을 투여한 마우스의 간에서는 250 mg을 투여했을 경우 간에서의 암예방효소의 활성이 증가된 것으로 보아 외부물질이나 대사산물에서 일어날 수 있는 암발생을 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다(Fig. 1).

요 약

본 연구는 단삼 분획추출물로부터 *in vitro*와 *in vivo*상에서 QR과 GST의 활성 유도와 GSH의 함량변화를 지표로 암예방효과를 측정하였다. Hepa1c1c7 세포에 대한 *in vitro*상에서의 실험결과 QR 활성 유도율은 70% EtOH 추출물 50 µg/ml 처리군에서 2.5배로 가장 높은 유도율을 나타내었고, GST 활성 측정은 EtOAc 추출물 50 µg/ml 농도에서 1.4배의 유도율을 나타내었다. GSH 생성변화를 살펴본 결과에서는 H₂O 추출물, 70% EtOH 추출물 그리고 water layer 추출물 50 µg/ml 농도에서 높은 생성율을 나타내었다. 이상의 결과에서 QR활성과 GSH 함량변화에서 높은 증가효과를 나타낸 70% EtOH 추출물을 관류법으로 마우스에 투여하여 *in vivo* 상에서의 QR과 GST의 활성 변화와 GSH 함량을 측정한 결과 QR, GST 활성과 GSH함량이 250 mg 투여시 각각 1.7배 및 1.5배

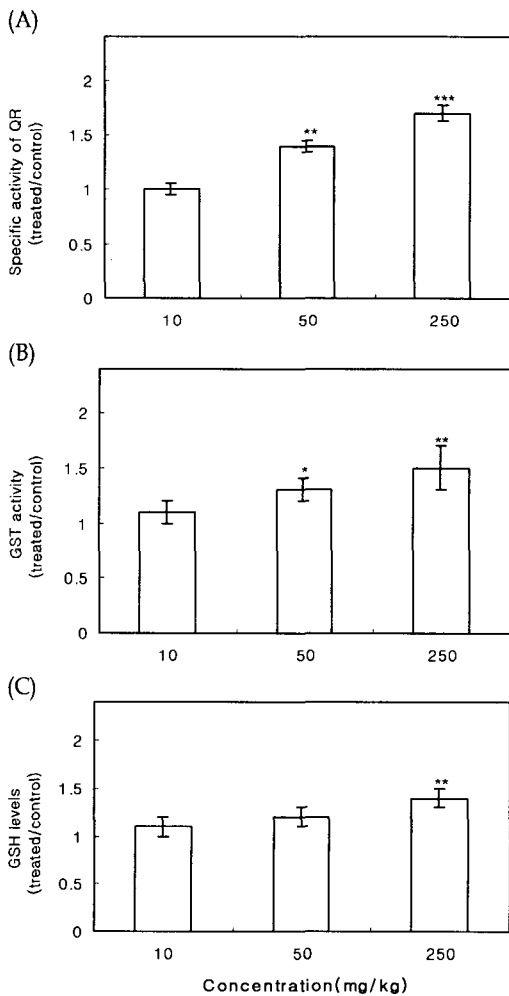


Fig. 1. Induction of QR (A) and GST (B) activities and GSH levels (C) by intragastric application of 70% EtOH extract of *S. miltiorrhiza* in ICR mice. The values are mean±SD (standard deviation). The values of each group are statistically significant as compared with the control group (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005).

의 활성 증가와 1.4배 함량증가를 측정할 수 있었으므로 70% EtOH추출물은 암예방효과가 가장 높은 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지역혁신특성화시범 사업의 지원을 받아 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Benson, A. M. and P. B. Barretto. 1985. Effects of disulfiram, diethyldithiocarbamate, bisethylxanthogen, and benzyl isothiocyanate on glutathine activites in mouse organs.

2. Bora, P. S., C. A. Spilburg and L. G. Lange. 1989. Metabolism of ethanol and carcinogens by glutathione transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4470-4473.
3. Cheng, G. C., J. Y. Lee, D. C. Kim, S. O. Suh and W. I. Hwang. 2000. Inhibitory effect of *Salvia miltiorrhiza* Extract on Growth of Some Cancer Cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 726-731.
4. Kim, J. K. 1989. Illustrated natural drugs encyclopedia, pp. 160, Namsandang Pubilshers, Seoul, Korea.
5. Kim, J. W., H. K. Choi, Y. H. Shon, J. K. Lim, H. W. Lee and K. S. Nam. 1999. Chemopreventive potential of Lonicerae flos Aqua-Acupuncture solution. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**, 261-268.
6. Kim, O. H., J. S. Yang and E. J. Jung. 1993. *In vitro* anti-cancer screening and evaluation of natural products in human tumor cell lines. Report; *National Institute Safety Research* **6**, 201-207.
7. Kim, O. H., S. Y. Chung, M. K. Park, H. M. Rheu and J. S. Yang. 1999. Anticancer activity of natural products including *Salvia miltiorrhiza*. *J. Appl. Pharmacology* **7**, 29-34.
8. Kim S. Y., J. H. Son, H. C. Ha, H. W. Lee and J. S. Lee. 2002. Chemopreventive effects of the extracts from soybean fermented with basidiomycetes. *Kor. J. Mycol.* **30**, 124-130.
9. Lee, Y. J and S. Y. Lee. 1992. *Parmacognosy*, pp. 131-137, Dong Myeung Sa, Korea.
10. Mitchell, J. R., J. A. Hinson and S. D. Nelson. 1976. Glutathione and drug induced tissue lesion: metabolism and function, pp. 357-367, *In* I. M. Arias and W. B. Jakoby (eds.), *Glutathione*. Raven press, New York, NY.
11. Mok, J. S., Y. M. Kim, S. H. Kim and D. S. Chang. 1995. Antimicrobial property of the ethanol extract from *Salvia miltiorrhiza*. *J. Food Hyg. Safety* **10**, 23-28.
12. Molder, P. and B. Jernestrom. 1983. Interaction of glutathione with reactive intermediates. pp. 99-108, *In* A. Larson, S. Orrenius, A. Holgren and B. Mannervik (eds.), *Functions of glutathione: biochemical, physiological, toxicological, and clinical aspects*. Raven Press, New York, NY.
13. Mukhtar, H. and N. Ahmad. 1999. Contemporary issues in toxicology, cancer chemoprevention : future holds in multiple agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **158**, 207-210.
14. Pohl, R. J. and J. R. Fouts. 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal. Biochem.* **107**, 150-155.
15. Prochaska, H. J. and A. B. Santamarina. 1988. Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anti-carcinogenic enzyme inducer. *Anal. Biochem.* **169**, 328-336.
16. Prochaska, H. J., M. J. Delong, M. J. Delong and P. Talalay. 1985. On the mechanism of induction of cancer-protective enzymes: a unifying proposal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8232-8236.
17. Prochaska, H. J., P. Talalay and H. Sies. 1987. Direct protective effect of NAD(P)H: quinone reductase against me-

- radione-induced chemiluminescence of postmitochondrial fractions of mouse liver. *J. Biol. Chem.* **262**, 1931-1934.
18. Sharmss, S., J. K. Stutzman, G. J. Kelloff and V. E. Steele. 1994. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* **54**, 5848-5855.
 19. Shon, Y. H., K. T. Lee, S. H. Park, K. H. Cho, J. K. Lim and K. S. Nam. 2001. Induction of NAD(P)H: quinone reductase and glutathione S-transferase by *Xanthii fructus* and *Prunellae spica* extracts. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**, 269-273.
 20. Talalay, P. and H. J. Prochaska. 1987. Quinone reductase with special functions in cell metabolism and detoxification, pp 61-66, *In* L. Ernster, R. W. Estabrook, P. Hochstein and S. Orrenius (eds.), *DT-Di-aphorase*, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
 21. Wattenberg, L. W. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* **45**, 1-8.
 22. Wattenberg, L. W. and E. Bueding. 1986. Inhibitory effect of 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione(oltipraz) on carcinogenesis induced by benzo(a)pyrene, diethylnitrosamine, and uracil mustard. *Carcinogenesis* **7**, 1379-1381.
 23. Yang, B. J., X. L. Huang and Q. R. Zhou. 1984. The structures of four minor diterpenequinones przewaquinones C, D, E and F from the root of *Salvia przewalskii* Maxim var *mandarinorum* (Diels) Stib. *Acta Pharmaceutica. Sinica.* **19**, 294-298.
 24. Yoon, S. M., K. H. Cho, Y. H. Shon, K. S. Nam and J. K. Lim. 2001. Induction of phase II enzyme activity by *Artemisia asiatica* NaKai Aqua-acupuncture solution. *J. Kor. AM-Meridian & Pointology Soc.* **18**, 1-9.