

당귀로부터 정제한 Decursin의 인체암세포주에 대한 세포독성

박경욱¹ · 최사라¹ · 손미예² · 정일윤³ · 강갑석⁴ · 이성태⁵ · 심기환⁶ · 서권일^{1*}

¹순천대학교 식품영양학과, ²경상대학교 식품영양학과
³한국원자력연구소 방사선식품생명공학연구팀, ⁴부산정보대학 호텔조리과
⁵순천대학교 생물학과, ⁶경상대학교 대학원 응용생명과학부

Cytotoxic Effects of Decursin from *Angelica gigas* Nakai in Human Cancer Cells

Kyung-Wuk Park¹, Sa Ra Choi¹, Mi-Yae Shon², Il Yun Jeong³, Kap Suk Kang⁴,
Sung Tae Lee⁵, Ki Hwan Shim⁶, and Kwon Il Seo^{1*}

¹Dept. of Food Nutrition, Suncheon National University, Chonnam 540-742, Korea

²Dept. of Food Nutrition, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

³Radiation Application Research Division, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeonbuk 580-185, Korea

⁴Dept. of Culinary Arts, Busan College of Information Technology, Busan 616-737, Korea

⁵Dept. of Biology, Suncheon National University, Chonnam 540-742, Korea

⁶Division of Applied Life Sciences, Graduate School, Gyeongsang National University, Gyeongnam 660-701, Korea

Abstract

Anticarcinogenic-active compound was isolated and purified from *Angelica gigas* Nakai. The compound was identified as decursin (C₁₉H₂₀O₅; molecular weight 328) by mass, IR spectrophotometry, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The proliferation decreased in a dose dependant fashion in the MCF-7 cells treated with decursin for 24 hours over the concentration of 20 µg/mL. The IC₅₀ value of the decursin treatment for 24 hours were 31.04, 33.60, 27.24, 20.45 µg/mL in the SW480, 293, HepG2 and MCF-7 cells, respectively. The growth inhibitory effect was stronger in the MCF-7 cells compared to other cells including 293 of human normal cells. The chromatin condensation, apoptotic body formation and DNA fragmentation were examined in the cells treated with decursin. These results suggest that decursin from *Angelica gigas* Nakai inhibited the growth through apoptosis in MCF-7 cells.

Key words: *Angelica gigas* Nakai, decursin, MCF-7, cytotoxic activity, apoptosis

서 론

당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 다년생 초본으로 1~2년 생근을 말하며, 한국에서는 이의 뿌리를 가을에 채취하여 건조한 것을 이용하고 있다(1). 당귀는 한국, 일본, 중국 등지에서 약용을 목적으로 재배하여 왔으며, 그 산지에 따라 한국에서 생산되는 참당귀(*Angelica gigas* Nakai, 토당귀)와 일본에서 생산되는 일본당귀(*Angelica acutiloba* Kitagaw, 일당귀)와 중국에서 생산되는 중국당귀(*Angelica sinensis* Diels)로 구분하며, 그 성분과 약리적 효과는 상이한 것으로 알려져 있다(2).

참당귀의 주요성분으로는 coumarin계의 decursin, decursinol angelate와 nodakentin, umbelliferon, β-sitosterol 등의 성분이 함유되어 알려져 있으며(3), 최근 decursin은 백혈병치료와 신장독성 경감, 당뇨병성 고혈압 치료 등에 효과

가 있으며 새로운 기작의 항암제로 확인되고 있다(4).

이러한 당귀에 대한 연구는 참당귀로부터 decursin의 분리(5) 및 성분연구(5-8), decursin의 생취에 대한 수면작용 변동 효과(9), 자발작용 억제효과(10) 및 protein kinase C의 활성화 증진 작용(11) 등이 보고되고 있으며, 당귀의 면역효과(12), 항산화효과(13), 항돌연변이효과(14), 인체 전립선암 세포주기 억제와 apoptosis 유발(15) 및 in vitro상에서의 적 백혈병 및 골수백혈병에 대한 연구가 보고되고 있다(16,17).

세계적으로 암은 심장질환 다음으로 최근 우리나라의 경우 사망자의 사인 순위도 그 구성비를 보면 암으로 인한 사망률이 높다(18). 대부분 인체에 발생하는 암의 발병은 많은 시간이 흘렀음에도 불구하고 아직까지 현대의학의 가장 큰 당면과제로 대두되고 있으며(19), 이와 관련하여 최근 식이와 관련된 암의 원인 물질을 검색하는 연구가 활발히 진행되고 있을 뿐 아니라 일상 식생활에서 섭취하는 식품 중 항암

*Corresponding author. E-mail: seoki@sunchon.ac.kr
Phone: 82-61-750-3655, Fax: 82-61-750-3650

제로 이용하기 위한 물질이 계속 탐색되고 있다(20). 특히, 우리나라에서는 200여종의 한방 생약제가 암환자에게 처방되고 있고(21,22), 그 중 당귀는 몇몇 연구자들에 의해 전립선암세포에 대한 항암효과는 보고되고 있으나, 다른 암세포에 대한 연구는 전무한 실정이다(15).

따라서 본 연구에서는 당귀의 항암효과를 규명하기 위한 일환으로 참당귀로부터 주요성분인 decursin을 분리 정제하고, 이를 이용한 각 인체 암세포주에 대한 성장억제 효과를 규명하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에 사용된 SRB(sulforhodamine B), TCA(trichloroacetic acid) 및 bis-benzimide(Hoechst 33258)은 Sigma(USA)사 제품을, Tris-HCl buffer는 Aldrich사 제품을 구입하여 실험에 사용하였다.

당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 2005년 6월 경상북도 영천에서 수확한 것을 순천 소재 한약 도매상을 통해 구입하여 분쇄 후 실험에 사용하였다.

당귀로부터 decursin의 분리 및 정제

Decursin은 SiO₂ column chromatography하여 분리하였다. 즉, 당귀의 건조중량 100 g을 20배(w/v)량 정도의 99.5% methanol 2 L와 혼합하여 80°C 환류냉각 추출을 3시간 동안 3회 반복한 후 그 여액을 감압 농축하여 methanol 추출물 7.00 g을 취하였다. 그 다음 H₂O와 methylene chloride(1:3)를 각각 300대 1,200 mL씩 분획여두에 넣고 실온에서 3시간, 3회 반복하여 분획한 후 methylene chloride 층을 취하고 농축하여 methanol 추출물로부터 methylene chloride 분획물 4.4 g 얻었다. 이를 SiO₂ column chromatography하여 hexane : ethyl acetate(30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1)로 순차적으로 fraction 5번을 취한 후, 다시 SiO₂ column chromatography하여 fraction 30번에서 decursin 336 mg을 순수 분리하였다(Fig. 1).

암세포 성장억제 효과

SRB assay: 실험에 사용한 암세포주인 SW480(colon cancer cells), MCF-7(breast cancer cell), HepG2(liver cancer cells) 및 293(kidney cells)으로 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 이때 사용되는 배지는 RPMI 1640 배양액으로 각각 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 것으로 사용하였으며, 이들 세포는 37°C, 5.5% CO₂ incubator에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다. Monolayer로 자란 암세포주를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 인체 유방암 세포의 최종 농도가 1×10⁵ cell/mL 되도록 24 well plate에 분주하고 37°C, 5.5% CO₂ incubator에서 24시간 배양 후 plate에

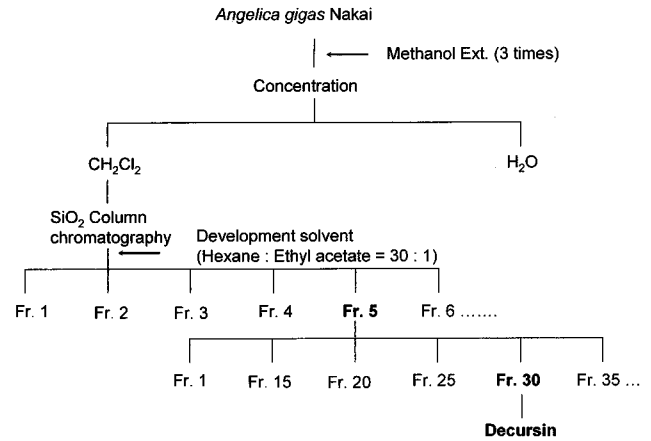


Fig. 1. Isolation of decursin from the root of *Angelica gigas* Nakai.

세포의 부착을 확인하고 당귀의 methanol 추출물은 RPMI 1640배지를 이용하여 희석하였으며, fraction 5과 decursin은 DMSO 40 mg/mL로 녹인 후 각각의 농도별로 RPMI 1640배지로 희석한 시료를 첨가하여 24시간 반응시킨 후 microplate reader(Titertek Multiscan Plus, Finland)로 540 nm에서 O.D값을 측정하였다.

IC₅₀(50% inhibitory concentration) 값의 산출: 인체 암세포주에 대한 시료의 IC₅₀ 값은 암세포주의 증식 억제 정도가 50%일 때의 수치로 계산하였다.

암세포의 형태학적 관찰: 인체유방암(MCF-7) 세포를 각 well당 1×10⁵개씩 넣고 24시간 경과 후 20 µg/mL 농도로 첨가하여 24시간 동안 배양 후 위상차 현미경(Diaphot 300, Nikon, Japan)을 이용하여 대조군과 시료처리군의 형태학적 변화를 비교 관찰하였다.

Hoechst 염색을 통한 핵의 관찰: 당귀로부터 분리한 물질이 인체 암세포주의 사멸에 있어 apoptosis와 관련하는지를 확인하기 위해 bis-benzimide(Hoechst 33258) 염색 후 핵의 형태변화를 관찰하였다. MCF-7 세포를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 최종 세포 농도가 5×10⁵ cell/mL 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 다음 37°C, 5.5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 부착된 세포에 당귀의 methanol 추출물, fraction 5 및 decursin을 농도별로 처리하고 24시간동안 반응시킨 후 염색물질인 hoechst 용액(5 µg/mL)으로 염색하고 형광현미경(BH2-BH2-RPL-T3, Olympus optical Co. Ltd., Japan)을 이용하여 핵의 형태변화를 정상군과 비교하였다.

Detection of DNA fragmentation: Cell Detection ELISA kit를 사용하여 DNA 절편을 정량적으로 분석하였다. 24 well에 1×10⁵ cell/mL을 분주하여 24시간 동안 배양한 후 당귀로부터 분리한 decursin을 농도별로 처리하였다. 24시간 배양 후 원심분리(1500×g, 5 min)하여 세포를 회수하였고, 500 µL의 incubation buffer를 첨가하여 incubation(30 min, 15~25°C)한 후, 원심분리(20000×g)하여 상층액만

을 취하였다. 96 well plate 100 μ L의 coating solution을 incubation(overnight at 2~8°C)한 후 제거하고, 각 well에 200 μ L의 incubation buffer를 첨가하여 incubation(30 min, 15~25°C)후 제거하였다. 각 well을 250 μ L washing solution을 이용하여 3회 세척한 후, 100 μ L washing solution의 앞서 취한 시료를 각 well당 100 μ L씩 첨가하여 incubation(90 min, 15~25°C)한 후 solution을 제거하였다. Washing solution으로 3회 세척하고 100 μ L의 conjugate solution을 첨가하여 incubation(90 min, 15~25°C)한 후 solution을 제거하였다. 다시 washing solution으로 3회 세척하고 100 μ L의 substrate solution을 첨가하여 250 rpm에서 15~20분간 plate를 shaking한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Enrichment} = \frac{\text{mU of the sample (dying/dead cell)}}{\text{factor} \times \text{mU of the corresponding control (viable cell)}}$$

통계처리: 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

당귀로부터 decursin의 분리 및 정제

농축한 당귀 methanol 추출물로부터 분획한 methylene chloride 분획물을 SiO₂ column chromatography(ϕ : 2.5×40 cm)을 통해 분리하였다. 이때 n-hexane-ethyl acetate(30:1→5:1) 혼합용매를 이용하여 용매의 극성을 변화시키면서 용출시키고, TLC pattern(Fig. 2)에 따라서 fraction하였다. 그에 대한 활성 측정결과 용출액 중 fraction 5에서 암세포에 대한 성장억제 효과를 보였다. 용출액 중 fraction 5를 n-hexane-ethyl acetate 혼합용매에서 용매의 극성을 변화시켜가며 2차 SiO₂ column chromatography(ϕ : 1.0×25 cm)하여 분리한 결과 TLC pattern에서 용출액 중 fraction 30에서 main point인 1개의 화합물을 분리하였고, UV spectrum 254 nm에서 TLC상 확인 결과 단일 point임을 알 수 있었다.

분리한 단일 화합물의 구조동정

분리된 단일 화합물의 구조분석은 NMR spectrometer

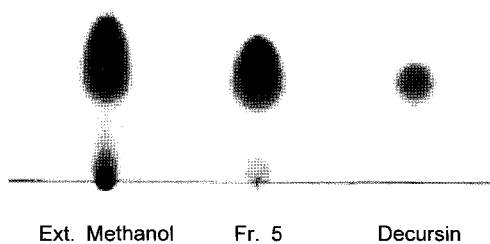


Fig. 2. TLC fluorescence chromatograms of decursin from the *Angelica gigas* Nakai by excitation using 254 nm.

(Bruker, AW500)를 사용하여 ¹H, ¹³C-NMR 스펙트럼과 Mass spectrometer(JMS, DX300)를 이용하여 EI-MS를 측정하였고, 기존 문헌(23)의 측정값과 비교하여 구조를 분석하였다.

당귀시료 100 g로부터 methanol 추출하여 methylene chloride로 분획한 후 SiO₂ column chromatography를 통하여 2.89 g의 compound 물질을 순수 분리하였다. 이 물질의 구조 결정을 위하여 질량분석 및 핵자기공명분석을 실시하였다. compound 물질의 electron impact(EI) mode로 질량분석을 한 결과 분자이온(M⁺)이 m/z 328에서 나타났고, 이 질량 스펙트럼은 decursin과 일치하는 것으로 나타났다.

또한 이 물질의 정확한 구조동정을 위하여 ¹H-과 ¹³C-NMR 스펙트럼을 얻었으며(Fig. 3, 4), 이는 Ahn 등(24)이 당귀에서 보고한 decursin과 일치하였다.

Decursin: white crystals from MeOH. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ _H(ppm): 7.57(1H, d, J=9.5 Hz), 7.15(1H, s), 6.78(1H, s), 6.22(1H, d, J=9.5 Hz), 5.66(1H, s), 5.08(1H, t, J=4.9 Hz), 3.17(1H, dd, J=16.8, 5.0 Hz), 2.86(1H, dd, J=16.8, 5.0 Hz), 2.14(3H, s), 1.87(3H, s), 1.38(3H, s), 1.36(3H, s);

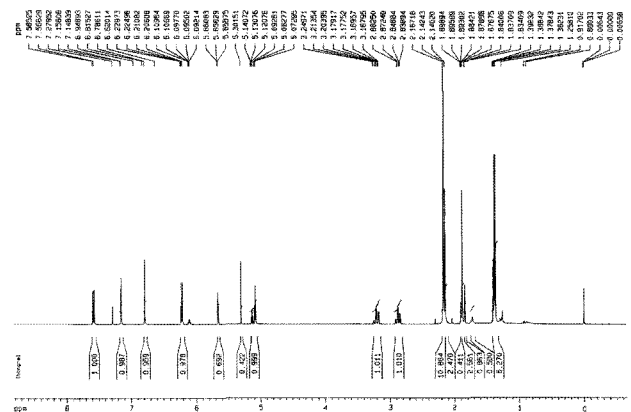


Fig. 3. ¹H-NMR spectral data of decursin from the *Angelica gigas* Nakai (in CDCl₃).

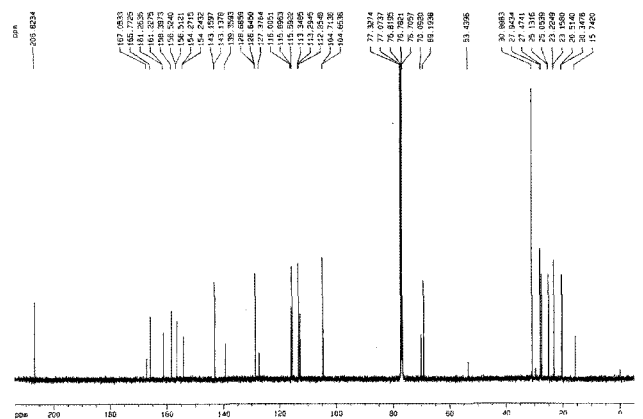


Fig. 4. ¹³C-NMR spectral data of decursin from the *Angelica gigas* Nakai (in CDCl₃).

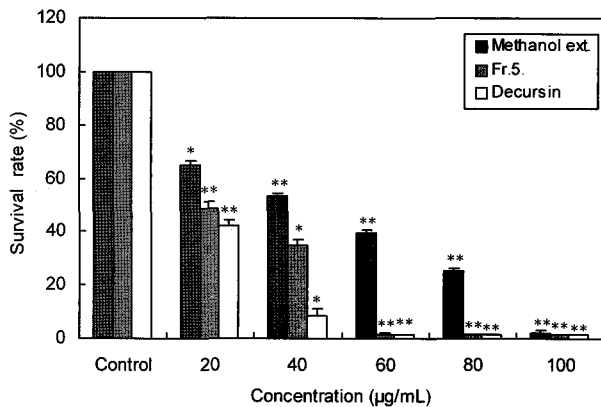


Fig. 5. Cell growth inhibition effects in MCF-7 cells treated with decursin from *Angelica gigas* Nakai for 24 hours by SRB assay.

Data values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by Student t-test.

^{13}C -NMR(500 MHz, CDCl_3) δ_c (ppm): 165.7, 161.2, 158.4, 156.5, 154.2, 143.2, 128.6, 115.9, 115.6, 113.3, 112.7, 104.6, 76.7, 69.2, 27.9, 27.4, 25.0, 23.2, 20.5; EI-MS: m/z [M] $^+$ 328.

Decursin은 dihydro-pyrano coumarin 중의 한 물질로 *A. decursiva*(Miq.) Fr. et Sav.에서 처음으로 보고되었으며, 그 이후 Ahn 등(24)와 Chen 등(25)에서도 보고되었다.

정제된 decursin의 암세포 성장 억제 효과

MCF-7에 대한 당귀 methanol 추출물, decursin 함유 fraction 5 및 정제된 decursin의 억제효과를 조사하기 위해 (20, 40, 60, 80 $\mu\text{g/mL}$) 농도로 처리하고 24시간 배양한 후 암세포 성장억제 효과를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 당귀의 methanol 추출물, fraction 5 및 decursin은 처리농도에 의존적으로 암세포의 성장을 억제하였으며, 특히 decursin은 추출물 및 fraction 5에 비하여 월등히 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타내었으며 60 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리 시 90% 이상의 암세포 성장억제 효과를 나타내었다.

Yim 등(15)은 당귀로부터 분리한 decursin을 인체 전립선 암세포주인 DU145, PC-3 및 LNCaP에(25, 50, 100 μM) 농도별로 24시간 처리 결과 암세포주 억제율이 22~51%, 7~54% 및 9~72%의 억제율을 보고한바 있어 decursin이 암세포의 성장에 대한 상당한 효과가 있는 것으로 사료된다.

인체 암세포에 대한 decursin의 IC_{50} 값

인체 암세포주에 대한 당귀의 methanol 추출물, fraction 5 및 decursin의 IC_{50} 값 측정결과는 Table 1과 같다. 당귀의 methanol 추출물, fraction 5 및 decursin은 SW480에 대하여 각각 42.96, 32.84 및 31.04 $\mu\text{g/mL}$ 의 IC_{50} 값을 나타내었고, HepG2 세포에 대하여는 각각 35.46, 32.23, 27.24 $\mu\text{g/mL}$ 의 값을 나타내었으며, MCF-7에 대하여는 각각 32.00, 20.66 및 20.45 $\mu\text{g/mL}$ 의 값을 나타내어, decursin은 실험에 사용한

Table 1. IC_{50} values of methanol extract, fraction 5 and decursin from *Angelica gigas* Nakai in various human cancer cells

Sample	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	SW480	MCF-7	HepG2	293
Methanol ext.	42.96 \pm 0.44	32.00 \pm 1.30	35.46 \pm 1.75	41.14 \pm 0.51
Fraction 5	32.84 \pm 0.48	20.66 \pm 1.59	32.23 \pm 1.80	36.40 \pm 1.14
Decursin	31.04 \pm 1.23	20.45 \pm 1.20	27.24 \pm 1.67	33.60 \pm 1.39

SW480: colon cancer cells, MCF-7: breast cancer cells, HepG2: liver cancer cells, 293: kidney cells.

다른 암세포주보다 MCF-7에 대하여 더 높은 억제활성을 나타내었다. 또한 인체 정상세포인 293 세포주에 대하여는 각각 41.14, 36.40 및 33.60 $\mu\text{g/mL}$ 의 IC_{50} 값을 나타내어, MCF-7세포에 비하여 세포의 성장이 적게 나타남을 알 수 있었다.

Decursin의 처리에 따른 암세포의 형태변화

부착성의 세포들은 세포독성 유발물질, 성장인자의 결핍, 바이러스의 감염 등을 포함하는 다양한 종류의 외부 자극에 의해 세포사멸이 유도되어지면 세포의 크기가 축소되어지고 배양배지 속에 사멸소체들이 발견된다. 그러므로 당귀의 methanol 추출물, fraction 5 및 decursin의 처리에 따른 MCF-7 세포의 형태변화를 관찰하기 위하여 MCF-7에 각 시료를 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 같은 농도로 처리하고 24시간 배양 후 세포의 형태학적 변화를 위상차현미경으로 관찰하였다(Fig. 6). 시료를 처리하지 않은 대조구 세포는 세포막을 유지하며 plate의 기력에 부착되어 세포 모양을 유지하고 있으나 처리구는 사멸한 세포가 배양용기에서 떨어져 배지에 부유하는

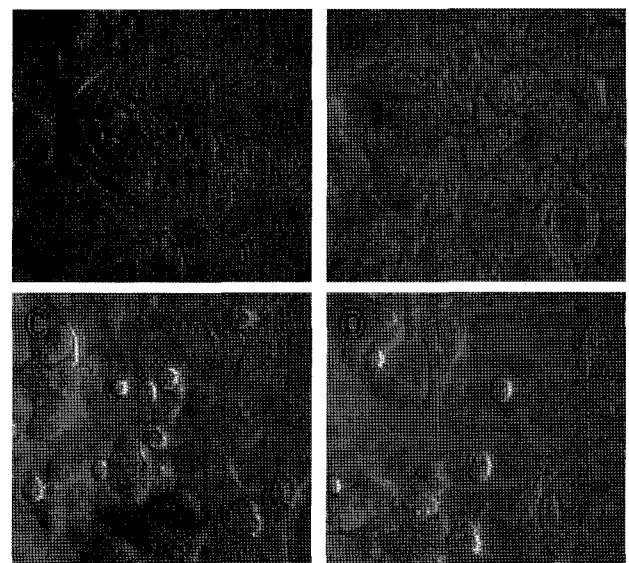


Fig. 6. Photomicrographs ($\times 400$) of MCF-7 cells treated with methanol extract, fraction 5 and decursin from *Angelica gigas* Nakai for 24 hours.

(a) Control, (b) Treated with methanol extract (20 $\mu\text{g/mL}$), (c) Treated with fraction 5 (20 $\mu\text{g/mL}$), (d) Treated with decursin (20 $\mu\text{g/mL}$).

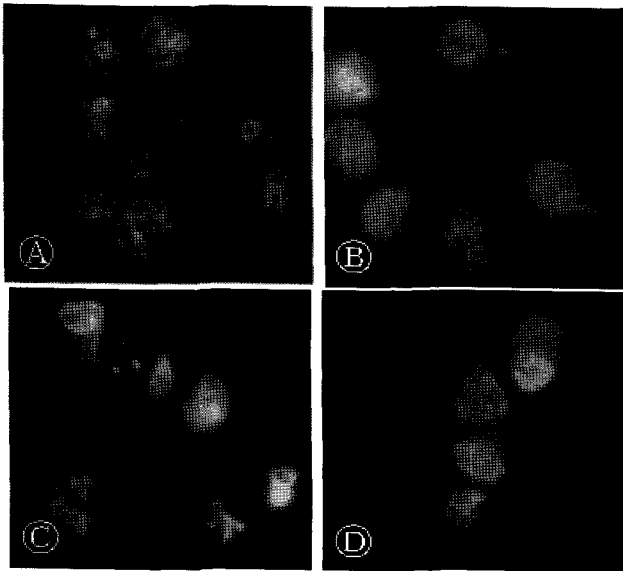


Fig. 7. Nuclear fragmentation were induced by methanol extract, fraction 5 and decursin from the *Angelica gigas* Nakai for 24 hours in MCF-7 human breast cancer cells. ① Control, ② Treated with methanol extract (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ③ Treated with fraction 5 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ④ Treated with decursin (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

것을 관찰할 수 있었고, 또한 대조구에 비하여 세포의 밀도 감소현상과 형태학적 변화를 관찰할 수 있었다.

Roh 등(26)은 HepG2에 당귀의 각 추출물을 첨가 시 세포의 밀도가 매우 낮아지며 세포 손실이 많았음을 보고한 바 있다. 이와 같은 결과로 보아 정제된 화합물 decursin이 MCF-7 세포의 성장을 억제함으로써 세포의 증식을 억제시키고, 세포사멸을 유도하는 것으로 보여 HepG2에 대한 다른 연구자의 보고와도 유사함을 알 수 있었다.

Decursin에 의한 apoptosis 유도 관찰

당귀의 methanol 추출물, fraction 5 및 decursin의 처리가 MCF-7 세포의 사멸에 있어서 apoptosis 유도하는지를 알아보기 위하여 MCF-7 세포에 이들 시료를 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 후 hoechst 염색하여 형광현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 7과 같다. 대조군의 세포막과 핵은 뚜렷한 형태를 유지한 반면 이들 시료를 처리한 암세포의 경우는 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되어지는 염색질 응축(chromatin condensation)에 의한 apoptotic body의 출현의 형태학적 변화가 관찰되었으며, 특히 decursin의 처리군에서 더욱 뚜렷하게 관찰되었다.

당귀로부터 정제한 decursin이 apoptosis를 유도하는지를 더욱 확실히 하기 위하여 decursin을 MCF-7 세포에 24시간 처리한 후 Cell Detection ELISA kit를 사용하여 DNA 절편을 정량적으로 분석한 결과는 Fig. 8에 나타내었다. MCF-7 세포에 decursin을 농도별로 처리하였을 때 apoptosis의 지표 생성물인 DNA절편이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이는 nuclease에 의한 염색체 nucleosome의

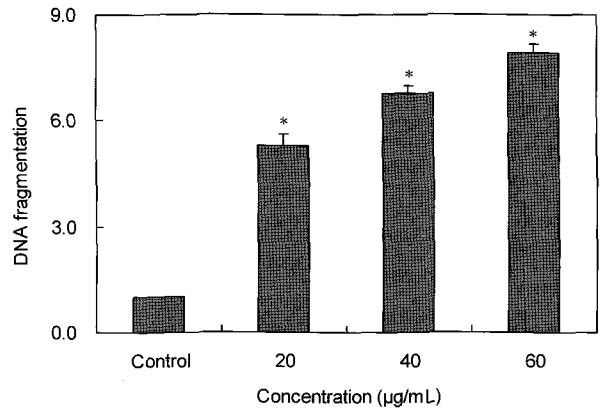


Fig. 8. DNA fragmentation in MCF-7 cells treated with decursin from *Angelica gigas* Nakai. Data values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by Student t-test.

linker DNA부분이 절단에 의한 DNA 단편화의 결과이므로 decursin이 MCF-7세포에 대하여 apoptosis 유도함을 알 수 있었다.

요 약

당귀로부터 항암활성을 화합물을 silicagel column chromatography를 이용하여 분리 및 정제한 후, ^1H 와 ^{13}C NMR, MS, HMQC 및 COSY spectrum(500 MHz CDCl_3) 분석을 통하여 분자량 328의 decursin임을 구조 동정하였다. 정제된 decursin을 MCF-7에 24시간 처리한 결과 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서 농도 의존적으로 암세포주의 성장을 억제하였으며, SW480, HepG2, MCF-7 및 293과 같은 인체 암세포주에 대한 decursin의 IC_{50} 값은 각각 31.04, 27.24, 20.45 및 33.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타나, decursin은 인체 정상세포주인 293세포를 포함한 다른 세포에 비하여 MCF-7에 대하여 가장 높은 성장 억제 활성을 보여주었다. MCF-7 세포에 decursin을 처리한 결과 대조군에서 균일한 핵의 형태가 관찰된 것에 반해 처리군의 경우는 핵의 응축과 apoptotic body를 보였고, DNA 절편이 관찰되었다. 이 결과는 당귀에서 분리한 decursin은 MCF-7 세포에서 apoptosis를 통하여 세포의 성장을 억제하는 것을 암시한다.

문 헌

1. Ko KS, Kim YS. 1991. *An illustrated book of the Korean flora*. Academy Publishing Co, Korea. p 433-434.
2. Lee SL. 1994. *Phytology*. Youngm Lim Publishing Co., Seoul. p 578-580.
3. Ahn KS. 1996. A study on the anticancer and immunostimulating agents from the root of *Angelica gigas* Nakai. *PhD Dissertation*. Korea University.
4. Kang YG, Lee JH, Chae HJ, Kim DH, Lee SH, Park SY.

2003. HPLC analysis and extraction methods of decursin and decursinol angelate in *Angelica gigas* root. *Kor J Pharmacogn* 34: 201-205.
5. Ryu KS, Hong ND, Kim NJ, Kong YY. 1990. Studies on the coumarin constituents of the root of *Angelica gigas* Nakai. Isolation of decursinol angelate and assay of decursinol angelate and decursin. *Kor J Phymacogn* 21: 64-68.
 6. Chi HJ, Kim HS. 1988. Studies on essential oil of plants of angelica genus in Korea (I) essential oils of *Angelica gigantis* radix. *Kor J Pharmacogn* 19: 239-247.
 7. 이순우, 윤미혜, 최옥경, 윤덕희, 김범호. 1992. 당귀성분 중 Decursin의 HPLC 분석법 산지별 함량비교에 관한 연구. *경기도보건환경원보* 5: 35.
 8. Ryu KS, Hong ND, Kim NJ, Kong YY. 1990. Studies on the coumarin constituents of the root of *Angelica gigas* Nakai isolation of decursinol angelate and assay of decursinol angelate and decursin. *Korean J Phamacogn* 21: 64-68.
 9. Woo WS, Shin KH, Ryu KS. 1982. Annual report of natural products research institute. Seoul National University, Korea. p 59-64.
 10. Kim HS, Park HJ, Chi HJ. 1980. A study of effects of the root components of *Angelica gigas*. *Korean J Pharmacogn* 11: 11-14.
 11. Ahn KS, Sim WS, Kim IH. 1996. A cytotoxic agent and protein kinase C activator from the root of *Angelica gigas*. *Planta Med* 62: 7-9.
 12. Han SB, Kim YH, Lee CW, Park SM, Lee HY, Ahn KS, Kim IH, Kim HM. 1998. Charateristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Immunopharmacol* 40: 39-48.
 13. Wn H, Kong L, Wu M, Xi P. 1996. Effects of different processed products of radix *Angelica sinensis* on clearing out oxygen free radicals and anti-lipid peroxidation. *Chung Kuo ChungYoo Tsa Chin* 21: 599-601.
 14. Salikhova RA, Poroshenko GG. 1995. Antimutagenic properties of *Angelica archangelica* L. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 1: 58-61.
 15. Yim D, Singh RP, Agarwal C, Lee S, Chi H, Agarwal R. 2005. A novel anticancer agents, decursin, induces G1 arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 65: 1035-1044.
 16. Kim HH, Ahn KS, Han H, Choung SY, Choi SY, Kim IH. 2005. Decursin and PDBu; two PKC activators distinctively acting in the megakaryocytic differentiation of K562 human erythroleukemia cells. *Leukemia Res*: 1407-1413.
 17. Kim HH, Bang SS, Choi JS, Han HG, Kim IH. 2005. Involvement of PKC and ROS in the cytotoxic mechanism of anti-leukemic decursin and its derivatives and their structure-activity relationship in human K562 erythro-leukemia and U937 myeloleukemia cells. *Cancer Lett* 223: 191-201.
 18. 통계청. 1996. 사망원인 통계연보.
 19. Wynder EL, Gori GB. 1977. Contribution of enviroment to cancer medicine. *J Nati Cancer Inat* 58: 826-832.
 20. Miyazaki T, Nishijima M. 1981. Strutral examination of a water soluble antitumor polysaccharide of *Ganoderma incidum*. *Chem Pharm Bull* 29: 3611-3616.
 21. Hong MH. 1972. Statistical studies on the formularies of oriental medicine (I). prescription frequency and their origin distribution of herb drugs. *Kor J Pharmacogn* 3: 57-64.
 22. Cha SM. 1977. Potential anticancer medicinal plants. A statistical evaluation of their frequencies of appearance in oriental medicine formularies. *Kor J Pharmacogn* 8: 1-15.
 23. Lee SH, Lee YS, Jung SH, Shin KH, Kim BK, Kang SS. 2003. Antioxidant activities of decursinol angelate and decursin from *Angelica gigas* roots. *Nat Prod Sci* 9: 170-173.
 24. Ahn KS, Sim WS, Kim IH. 1995. Decursin: a cytotoxic agent and protein kinase C activator from the root of *Angelica gigas*. *Planta Med* 62: 7-9.
 25. Chen IS, Chang CT, Sheen WS, Tsai LL, Teng CM, Duh CY, Ko FN. 1996. Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from formosan *Pseuedanum japonicum*. *Phytochem* 41: 525-530.
 26. Rho SB, Han EJ, Bae SJ. 2000. Effects of quinone reductase induction and cytotoxicity of the *Angelica radix* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 147-152.

(2007년 8월 24일 접수; 2007년 9월 27일 채택)