

산겨릅나무 추출물의 간암세포의 증식억제 효과

권하나 · 방우석 · 김주영¹ · 박정룡 · 전정례*

영남대학교 식품영양학과, ¹영남대학교 의과대학 해부학교실

Effect of *Acer tegmentosum* M. Extracts on Hepatocarcinoma Cell

Ha Na Kwon, Woo-Suk Bang, Joo-Young Kim¹, Jyung Rewng Park, and Jeong Ryaee Jeon*

Department of Food and Nutrition, Yeungnam University

¹Department of Anatomy, College of Medicine, Yeungnam University

Abstract The objective of this study was to investigate the anticancer effects of *Acer tegmentosum* M. extracts. HepG2 hepatocarcinoma cells were treated with ethanol, chloroform, ethylacetate, butanol, aqueous fraction and hot water extract. The antiproliferative effect was evaluated by trypan blue exclusion, MTT-based viability assay and morphology. The trypan blue test showed that anticancer effect of the *A. tegmentosum* M. extracts on HepG2 cells increased gradually in proportion to the increasing concentration of the fractions. The butanol fraction showed the highest anticancer activity against HepG2 cells ($p < 0.05$). The MTT assay indicated that the growth inhibition by the butanol fraction was dose-dependent. These results suggest that *A. tegmentosum* M. has the potential to inhibit the growth of hepatocarcinoma cells.

Keywords: *Acer tegmentosum* M., HepG2 hepatocarcinoma cell, MTT assay, anticancer

서 론

현대인의 대표적인 만성질환인 암은 생체 조직 안에서 세포가 무제한으로 증식하여 악성 종양을 일으키는 질병으로서 급격한 산업발달과 식생활의 변화 등으로 암 발생률과 사망률이 해마다 증가하고 있다(1). 통계청의 사망원인 통계에 따르면 2009년 우리나라 국민의 사망원인 1위는 암으로 사망자 10만 명 중 140.5명이 암으로 사망하였다. 그 중 간암의 유병률은 인구 10만 명당 31.7명, 사망률은 22.6명으로 폐암 다음으로 두 번째로 높은 사망률을 보이고 있어 유병률은 낮은 편이지만 한번 발생하게 되면 치사율이 높은 질병으로 알려져 있다(2).

암 치료를 위해 화학요법, 방사선요법 및 외과적인 수술요법 등이 사용되고 있지만 이러한 방법은 암세포는 물론 정상세포에도 영향을 미쳐 탈모나 구토 등의 심각한 부작용을 초래할 뿐만 아니라(3) 지속된 항암제 사용은 약제내성을 발생시켜 암세포 증식에 영향을 미치게 된다(4). 최근 녹색식물이나 과일, 한약 추출물 등의 천연물에 독성이 적으면서 강력한 항암효과를 나타내는 성분들이 함유되어 있다는 사실이 밝혀지면서(5) 국내외에서 천연물로부터 항암제의 분리 및 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(6,7).

산겨릅나무(*Acer tegmentosum* M.)는 단풍나무과(Aceraceae)의

낙엽활엽 소교목으로서 국내 중부이북의 고산지대와 만주, 아무르와 우수리강 유역의 일부 산지에만 분포하고 있으며 참겨릅나무, 산저릅나무, 봉목이라고도 하며 민간에서는 벌나무, 산청목으로 알려져 있다(8). 산겨릅나무 수피의 성분 및 생리활성에 대한 연구로서 Kwon과 Bae(9)는 수피 추출물의 ethyl acetate 분획에서 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin-3-O-gallate, gallic acid, 6"-O-galloylsalidroside 등의 페놀성 화합물을 분리하였으며, Hong 등(10)은 산겨릅나무의 분획별 추출물 중 ethyl acetate와 butanol 분획에서 강한 항산화성과 높은 항지질과산화 활성을 나타냄을 밝혔으며 ethyl acetate 분획에서 catechin, p-hydroxyphenethyl alcohol 1-O-β-D-(6"-O-galloyl)-glucopyranoside의 페놀계 배당체를 동정하였다. Shin 등(11)은 위암, 간암, 폐암 및 유방암 세포 등에서 암세포 생육억제효과를 보고하였다.

본 연구에서는 천연물 자원으로부터 항암활성을 가지는 물질을 탐색하기 위한 목적으로 산겨릅나무 분획별 추출물을 인간 유래의 간암세포에 처리하여 항암효과를 확인함으로써 간암세포 성장 저해제로서의 산겨릅나무의 활용가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분획

연구에 사용된 산겨릅나무는 충북 제천산으로 (주)윌니허브에서 구매하여 사용하였다. 분획별 추출물의 조제를 위해서 가지를 세절하여 시료의 10배 량에 해당하는 70% ethanol(EtOH)을 가하여 진탕배양기에서 2회 반복추출하고 Whatman No. 4 여과지로 여과하여 40°C에서 감압농축한 후 동결건조하여 시료로 사용하였다. 일부의 EtOH 추출물은 다시 hexane, chloroform(CHCl₃), ethyl acetate(EtOAc), butanol(BuOH) 등의 순차적 분획물을 얻었고 열수추출물도 동일한 방법으로 추출하여 사용하였다.

*Corresponding author: Jeong Ryaee Jeon, Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-749, Korea

Tel: 82-53-810-2870

Fax: 82-53-810-4768

E-mail: jeonjr@ynu.ac.kr

Received June 30, 2011; revised September 29, 2011;

accepted October 1, 2011

암세포 배양

암세포주는 인체기원 세포주인 간암 세포 HepG2(hepatocarcinoma, human)를 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 사용하였다. 배양액은 10% fetal bovine serum(FBS, Welgene, Daegu, Korea)와 1% antibiotic(Welgene)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Welgene)배지를 사용하였다. 세포는 5% CO₂ incubator, 37°C 조건에서 배양하여 2-3일 마다 배양액을 교체하였고 5-7일 만에 한번씩 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

Trypan blue exclusion test

배양된 HepG2 세포를 12 well plate에 각 well당 5×10^5 개로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 산겨릅나무 분획물인 EtOH, CHCl₃, EtOAc, BuOH, aqueous 분획물과 열수추출물을 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 녹여 최종농도가 DMSO는 0.1%, 약물의 농도는 125, 250, 500, 1,000 µg/mL가 되도록 하여 24시간, 48시간 동안 처리하였다. 처리 후 상등의 배양액을 제거하고 PBS로 2회 세포를 세척한 후 trypsin EDTA로 부착된 세포를 분리하여 1500 rpm으로 3분간 원심분리 한 후 상등액을 제거하고 1.5 mL DMEM 배지를 넣었다. 피펫으로 세포를 골고루 분산시킨 현탁액 50 µL에 0.4% trypan blue(Gibco, Grand Island, NY, USA) 50 µL 용액을 혼합하여 세포를 염색시킨 후 TMS 현미경(Nikon, Japan)으로 hemocytometer를 사용하여 염색되지 않은 생 세포수를 계수하였다. Trypan blue에 염색된 세포는 죽은 세포로 간주하며 trypan blue에 저항성을 나타내는 세포를 살아있는 세포로 간주하였고 실험결과는 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다(12).

MTT assay

BuOH 분획물의 간암세포에 대한 성장억제 효과를 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다(13). 배양된 암세포를 96 well plate에 well당 1×10^4 개로 분주한 다음 24시간 동안 안정화시킨 후 DMSO에 녹인 산겨릅나무 BuOH 분획물을 125, 250, 500, 1,000 µg/mL 농도로 처리하였다. 24시간 후 상등액을 제거하고 90 µL media를 첨가한 후 5 mg/mL로 제조한 MTT(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma Chemical Co.) 용액 10 µL를 각 well에 첨가한 뒤 호일로 빛을 차단하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응시켰다. 상등액을 제거하고 DMSO 200 µL를 첨가한 후 ELISA microplate reader(Emax Laboratories Inc., Torrance, CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

암세포의 형태학적 관찰

산겨릅나무의 BuOH 분획물 처리에 따른 HepG2 세포주의 형태학적인 변화관찰을 위해 6 well에 1×10^6 cells/mL 로 2 mL씩 첨가하여 37°C의 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후, 최종농도가 125, 250, 500, 1,000 µg/mL가 되도록 BuOH 분획물을 처리하였다. 추출물 처리 24시간 후 inverted microscopy(Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 HepG2의 세포 수와 형태변화를 관찰하였다.

통계처리

본 실험 결과는 SPSS 통계프로그램(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 산출한 평균과 표준편차로 나타내었고 일원 배치 분산분석법에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 각 실험군의 평균치간 유의성은 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

결과 및 고찰

Trypan blue exclusion test

산겨릅나무 분획물 추출물이 간암세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 모든 분획을 0.1% DMSO 용액에 녹여 125, 250, 500, 1,000 µg/mL 농도로 만들어 24시간, 48시간 처리하였고 대조군은 0.1% DMSO 용액만을 처리하였다. 이후 0.4% trypan blue로 염색하여 살아있는 세포를 계수하였으며 결과는 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다(12).

HepG2에 분획물을 24시간 처리한 결과는 Table 1과 같다. 대부분의 분획물에서 대조군에 대하여 농도 의존적으로 유의하게 세포 생존율이 감소하는 경향을 나타내었다.

특히 BuOH 분획물이 36.1-0.83%로 가장 높은 세포 생존 억제율을 보였고 두 번째로 높은 그룹은 EtOAc 분획물 81.3-2.1%와 EtOH 추출물 38.0-4.3%이었으며 CHCl₃ 분획물은 101.9-23.8%, 열수추출물은 78.2-25.4%, aqueous 분획물은 83.7-30.2%로 상대적으로 낮은 억제율을 나타냈다. 또한 유기용매 분획물인 BuOH 분획물, EtOAc 분획물, EtOH 추출물이 상대적으로 aqueous 분획물, 열수추출물과 같은 수용성 용매 분획물보다 세포 생존 억제율이 높은 것으로 관찰되었다.

Kim 등(14)의 산삼 장뇌삼 인삼을 농도별로 HL-60세포(급성 백혈병 세포주)에 24시간 동안 처리하여 trypan blue exclusion test를 한 결과 대조군에 비해 산삼, 장뇌삼, 인삼 각각의 세포 생존 억제율이 21.8, 52.8, 86.9%와 같다는 보고가 있었으며, Cha 등(15)의 선복화를 극성에 따른 순차적 용매 분획을 만들어서 HT-

Table 1. Effects of various fractions of *Acer tegmentosum* on cell viability treated for 24 h

Fractions	Cell viability (%)				
	Concentration (µg/mL)				
	0	125	250	500	1000
EtOH extraction	100.0±6.24 ^{a,E}	38.0±0.83 ^{a,D}	24.4±1.79 ^{a,C}	15.1±2.93 ^{a,B}	4.3±1.07 ^{a,A}
CHCl ₃ fraction	100.0±6.24 ^{a,D}	101.9±10.10 ^{c,D}	67.8±8.71 ^{b,C}	45.7±12.52 ^{c,B}	23.8±2.93 ^{b,A}
EtOAc fraction	100.0±6.24 ^{a,D}	81.3±11.46 ^{b,C}	19.4±3.41 ^{a,B}	3.9±2.58 ^{a,A}	2.1±1.29 ^{a,A}
BuOH fraction	100.0±6.24 ^{a,E}	36.1±0.47 ^{a,D}	19.8±3.22 ^{a,C}	7.4±1.07 ^{a,B}	0.83±0.36 ^{a,A}
Aqueous fraction	100.0±6.24 ^{a,D}	83.7±9.29 ^{b,C}	69.0±12.90 ^{b,C}	51.2±7.75 ^{c,B}	30.2±1.56 ^{c,A}
Hot water extraction	100.0±6.24 ^{a,D}	78.2±13.76 ^{b,C}	58.5±7.23 ^{b,B}	33.9±2.80 ^{b,A}	25.4±4.07 ^{b,A}

¹⁾Mean±SD

²⁾a,b,c Values in the column with different lowercase superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

³⁾A,B,C,D,E Values in the row with different uppercase superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

Table 2. Effects of various fractions of *Acer tegmentosum* on cell viability treated for 48 h

Fractions	Cell viability (%)				
	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)				
	0	125	250	500	1000
EtOH extraction	100.0 \pm 9.42 ^{a,D}	49.7 \pm 5.33 ^{b,C}	26.1 \pm 2.15 ^{b,B}	10.1 \pm 1.67 ^{b,A}	1.5 \pm 0.86 ^{a,A}
CHCl ₃ fraction	100.0 \pm 9.42 ^{a,C}	86.4 \pm 7.21 ^{d,B}	78.5 \pm 4.15 ^{e,B}	42.3 \pm 5.76 ^{e,A}	38.1 \pm 4.6 ^{d,A}
EtOAc fraction	100.0 \pm 9.42 ^{a,D}	72.7 \pm 8.57 ^{c,C}	19.6 \pm 2.50 ^{ab,B}	1.80 \pm 0.64 ^{a,A}	0.28 \pm 0.48 ^{a,A}
BuOH fraction	100.0 \pm 9.42 ^{a,D}	29.5 \pm 2.61 ^{a,C}	15.8 \pm 2.90 ^{a,B}	3.5 \pm 0.24 ^{a,A}	0.27 \pm 0.24 ^{a,A}
Aqueous fraction	100.0 \pm 9.42 ^{a,C}	70.4 \pm 13.10 ^{c,B}	66.4 \pm 5.82 ^{d,B}	33.1 \pm 4.89 ^{d,A}	28.7 \pm 5.33 ^{c,A}
Hot water extraction	100.0 \pm 9.42 ^{a,D}	71.1 \pm 3.88 ^{c,C}	56.6 \pm 6.86 ^{c,B}	26.0 \pm 1.87 ^{c,A}	20.3 \pm 2.49 ^{b,A}

¹⁾Mean \pm SD

²⁾^{a,b,c}Values in the column with different lowercase superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

³⁾^{A,B,C,D,E}Values in the row with different uppercase superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

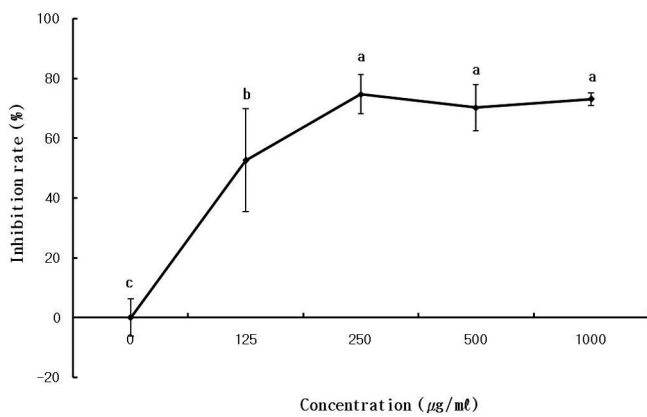


Fig. 1. Cell inhibition rate of BuOH fraction obtained from *Acer tegmentosum*. Values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$

29(인간 대장암 세포주)에 처리하여 독성을 확인한 결과 ethanol extract 등 유기용매 분획에서 높은 암세포 성장 저해능을 나타냈다는 연구와 유사한 결과를 보였다.

Shin 등(11)의 산겨릅나무 분획 추출물의 항산화성 실험결과 EtOAc 분획물에서 항산화 효과가 가장 높은 것으로 나타났는데 이는 본 연구와 추출용매의 농도, 추출방법과 추출시간 등의 차이로 인해 나타나는 결과로 보인다.

HepG2에 분획물을 48시간 동안 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 모든 분획물에서 대조군에 대하여 농도 의존적으로 유의($p < 0.05$)하게 세포 생존율이 감소하는 경향을 확인할 수 있었으며 처리시간을 24시간 조건으로 했을 때보다 CHCl₃ 분획물을 제외한 모든 분획물에서 세포 생존율이 더 감소하는 경향을 나타냈다($p < 0.05$).

특히 BuOH 분획물은 29.5-0.27%로 가장 높은 세포 생존 억제율을 보였고 EtOH 추출물은 49.7-1.5%, EtOAc 분획물은 72.7-0.28%로 높은 억제율이 관찰되었으며 CHCl₃ 분획물은 86.4-38.1%, 열수추출물은 71.1-20.3%, aqueous 분획물은 70.4-28.7%로 상대적으로 낮은 억제율을 나타내어 분획별 결과는 24시간 처리했을 때와 같은 경향을 나타냈다.

MTT assay

Trypan blue exclusion test를 통하여 분획물 중 암세포 생존 억제율이 가장 높았던 BuOH 분획물을 가지고 MTT assay를 실시하여 HepG2 생존 억제활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 실험결과 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 각 농도에서의 저해효과는 52.52, 74.69, 70.17, 73.03%로 농도가 높을수록 생존 억제 효과가 증가하였으며 특히 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 대조군과 비교하여 유의적으로 큰 차이가 나타났다($p < 0.05$).

이러한 결과는 Shin 등(11)의 산겨릅나무 80% 에탄올 추출물과 Byun 등(16)의 만병초 잎 추출물이 간암세포(HepG2), 위암세포(AGS), 폐암세포(A549), 유방암세포(MCF7)에서 농도 의존적으

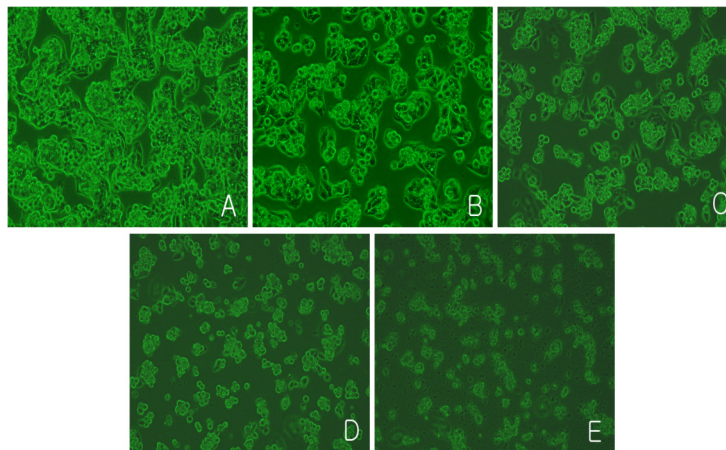


Fig. 2. Morphological change by BuOH fraction of *Acer tegmentosum* on HepG2 as examined by inverted microscope (magnification, $\times 10$). A: 0 $\mu\text{g/mL}$, B: 125 $\mu\text{g/mL}$, C: 250 $\mu\text{g/mL}$, D: 500 $\mu\text{g/mL}$, E: 1,000 $\mu\text{g/mL}$

로 생존 억제 효과를 나타냈다는 것과 유사했으며, 또한 Lee 등 (17)의 황칠나무 에탄올 추출물의 간암세포주(Hep3B)에 대한 생존 억제 활성이 1 mg/mL의 농도에서 68%로 뛰어났다는 결과와도 유사한 경향을 보였다.

암세포의 형태학적 관찰

암세포 생존 억제활성이 가장 높았던 BuOH 분획물의 HepG2의 형태학적 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 정상 세포는 모양이 둥글고 일정한 반면 apoptotic cell의 특징은 세포 내 골격 단백질의 변화로 인한 세포 수축, 염색사 응축, 핵 붕괴, DNA 분해 등과 같은 다양하고 특이한 형태적, 생화학적 변화를 일으킨다. 산겨릅나무 BuOH 분획물을 무처리하고 24시간 동안 배양한 대조군의 경우 배양용기의 바닥에 세포들이 거의 빈틈없이 가득 채워져 있었던 반면 125, 250, 500, 1,000 µg/mL 농도로 처리한 군에서는 농도 의존적으로 그 형태가 응축되고 무정형으로 세포사멸이 나타나 apoptotic cell의 전형적인 양상을 나타내었다. 특히 1,000 µg/mL 농도에서 세포의 응축정도나 세포 수 감소의 정도가 현저히 높게 나타나 다른 농도에 비해 세포생존 억제효과가 가장 뛰어남을 확인할 수 있었다.

Ming 등(18)의 간암세포(hepatocellular carcinoma SMMC7721 cells)에 인삼 사포닌 정제물을 처리하여 세포 형태학적 변화를 관찰한 결과 세포 수축과 핵 염색질의 응집, 단편화 등의 양상을 apoptosis에 의한 것이라고 하였다. 이와 비교해 볼 때 산겨릅나무 BuOH 분획물이 농도 의존적으로 HepG2 세포에 apoptosis를 유발하는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 간암세포 HepG2의 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도하는 천연소재 발굴을 목적으로, 산겨릅나무 분획 추출물을 이용하여 간암세포 HepG2의 증식에 미치는 영향을 확인하였다. 간암세포의 생존율에 분획별 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 분획물을 24시간, 48시간 동안 농도별로 처리하여 살아있는 세포를 계수한 결과 24시간 처리 시 모든 분획에서 농도 의존적으로 유의하게 생존율이 감소하였으며 유기용매 분획물들이 수용성 용매 추출물보다 높은 생육 억제 활성을 보였다. 48시간 처리 시에도 같은 경향이 나타났으며 24시간에 비하여 세포 생존율이 비슷하거나 조금 더 감소하였다.

MTT assay를 통한 세포 생존 억제율의 측정 결과 BuOH 분획물은 간암세포에 대해 농도 의존적으로 생존 억제율을 증가시켰다. 형광현미경을 이용한 세포형태 관찰에서는 BuOH 분획물의 농도 의존적으로 세포의 형태가 응축되고 무정형으로 세포사멸이 나타나 apoptotic cell의 전형적인 양상을 확인할 수 있었다.

Hong 등(10)의 연구에서 산겨릅나무의 추출물 중 ethyl acetat와 butanol 분획에서 뛰어난 항산화성과 항지질과산화 활성이 있음을 밝힌 내용과 Shin 등(11)의 위암, 간암, 폐암 및 유방암 세포 등에서 암세포 생육억제효과와 보고와도 유사한 경향이 나타남을 알 수 있었다.

이상의 실험을 통해 산겨릅나무가 간암세포의 성장을 저해하는 효과가 있음을 확인할 수 있었으며 앞으로 식용 및 약용자원

으로서 활용가능성이 높은 것으로 판단된다.

문 헌

1. Seol KL, Choi SY, Lee JI. A study on the use, understanding satisfaction with alternative therapy for hospitalized cancer patients. J. Korean Public Health Assoc. 28: 198-211 (2002)
2. National statistical office. 2009 Statistics of mortality. Available from: <http://kostat.go.kr>. Accessed Nov. 23, 2011.
3. Ryu BH, Park BG, Song SK. Antitumor effects of the hexane extract of *Stachys sieboldii* MIQ. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 17: 520-524 (2002)
4. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 265-269 (1987)
5. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci. 65: 337-353 (1999)
6. Yang YM, Hyun JW, Lim KH, Sung MS, Kang SS, Park WH, Bae K, Cho WH, Kim HJ, Woo ER, Park HK, Park JG. Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants (III). Korean J. Pharmacogn. 27: 105-110 (1996)
7. Sunami E, Tsuno N, Osada T, Saito S, Kitayama J, Tomozawa S, Tsuruo T, Shibata Y, Muto T, Nagawa H. MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. Oncologist 5: 108-114 (2000)
8. Kim TW. The Woody Plants of Korea in Color. Kyohak Co., Seoul, Korea. p. 476 (1996)
9. Kwon DJ, Bae YS. Phenolic compounds from *Acer tegmentosum* bark. Wood Sci. Technol. 35: 145-151 (2007)
10. Hong BK, Eom SH, Lee CO, Lee WJ, Jeong JH, Kim JK, Cho DH, Yu CY, Kwon YS, Kim MJ. Biological activities and bioactive compounds in the extract of *Acer tegmentosum* Maxim. stem. Korean J. Medicinal Crop Sci. 15: 296-303 (2007)
11. Shin IC, Sa JH, Shim TH, Lee JH. The physical and chemical properties and cytotoxic effects of *Acer tegmentosum* Maxim. extracts. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 49: 322-327 (2006)
12. Freshney R. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Liss Inc., New York, NY, USA. p. 117 (1987)
13. Charmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Michell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 47: 936-941 (1987)
14. Kim SJ, Shin SS, Seo BI, Jee SY. Effect of mountain grown ginseng radix, mountain cultivated ginseng radix, and cultivated ginseng radix on apoptosis of HL-60 cells. Korean J. Herbol. 19: 41-50 (2004)
15. Cha MR, Kim JY, Hwang JH, Park HR. Cytotoxic activity of the *Inula japonica* extracts against several human cancer cell lines *in vitro*. Korean J. Pharmacogn. 37: 130-135 (2006)
16. Byun KS, Lee YW, Jin HJ, Lee MK, Lee HY, Lee KJ, Heo MY, Yu CY, Lee JH. Genotoxicity and cytotoxicity in human cancer and normal cell lines of the extracts of *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves. Korean J. Medicinal Crop Sci. 13: 199-205 (2005)
17. Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH, Lee HY. Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. Korean J. Medicinal Crop Sci. 10: 109-115 (2002)
18. Ming YL, Song G, Chen LH, Zheng ZZ, Chen ZY, Ouyang GL, Tong QX. Anti-proliferation and apoptosis induced by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin in human hepatocellular carcinoma cells. Cell Biol. Int. 31: 1265-1273 (2007)