



Original Article / 원저

단삼 추출물이 암세포주에 미치는 세포증식 억제 효과

양의호 · 정태산 · 최창원*

동신대학교 한의과대학 내과학교실

Antiproliferative Effect of the *Salviae miltiorrhizae Radix* Extracts on the Cancer Cell Lines

Weo-ho Yang · Tae-san Jung · Chang-won Choi*

Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine,
Dong-shin University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to identify antiproliferative effects of *Salviae miltiorrhizae Radix*(SM) extracts against cancer cell lines.

Methods : We used 2 kinds of cancer cell lines such as colon cancer cells(HT-29), human oral epitheloid carcinoma cells(KB). MTT assay was performed to examine the efficacy of SM extracts on the cytostaticity of cancer cells in proportion to time and doses. Apoptosis was evaluated by DNA laddering and DAPI nuclei staining.

Results : The MTT absorbances against HT-29 and KB of SM extracts were significantly decreased. DNA ladders could be identified in KB of SM extracts. The morphological change were observed and number of cells were decreased by SM extracts.

Conclusions : SM extracts is considered to be effective to induce apoptosis and inhibit cancer cell proliferation.

Keyword : *Salviae miltiorrhizae Radix*, Antiproliferative effect, Cancer cell lines

I. 서 론

암은 환경오염과 식생활 습관, 흡연, 음주 등으로 인하여 발병하며, 개체를 구성하는 정상 세포가 어떠한 자극에 의해 유전자의 형질전환이 발생하고 그 결과 세포의 형태학, 생물학, 물리학, 면역학적 행동이 변한 변형세포가 유전적으로 대를 이어 무절제한 증식을 하여 발생한다¹⁾.

암에 대한 치료법은 수술요법, 방사선요법, 면역요법, 약물요법 등으로 알려져 있는데, 현재 사용하고 있는 항암제는 세포독성을 이용하여 암세포의 사멸과 증식억제를 이용하는 방법으로 암세포의 성장을 효과적으로 억제하기도 하지만 정상 세포와 면역계 세포에도 독성을 발현하는 문제점을 나타내고 있다²⁾. 따라서 부작용을 감소시키면서 암세포에 대한 특이적 독성을 나타내는 항암제를 합성물질이 아닌 천연물질에서 개발하려는 노력이 시도되고 있고, 한의학계에서도 기존의 항암 치료의 한계를 극복하기 위한 노력으로 한약제의 항암효과와 면역증진 및 항암제의 부작용 억제와 항암제와의 병용요법 등에 관한 연구들을 진행해 오고 있다³⁾.

암에 대한 한의학의 인식은 《黃帝內經》에서 “石瘕, 腸覃” 등으로 언급한 이래, “癌, 腫瘍, 乳巖, 石疽, 石瘕” 등으로 인식하였고^{4,5)}, 治法에 대해서는 歷代로부터 “堅者削之, 結者散之, 留者攻之, 損者益之”의 4대 방법이 설정되어 왔고, 近來에는 理氣化血, 通經活絡, 化痰利濕, 軟堅散結, 解毒止痛, 益氣養血, 健脾和胃, 滋補肝腎 등의 治法이 활용되고 있다⁶⁾.

단삼 (*Salviae miltiorrhizae Radix*)은 꿀풀과에 속한 다년생 초본으로 活血祛瘀, 調經止痛, 養血安神, 涼血消癰의 효능이 있어 癥瘕積聚, 癰瘡腫毒, 月經不調, 心腹疼痛, 煩燥不安 등의 병증을 치료한다⁷⁾.

단삼에 대한 연구로 항암작용^{8,10)} 및 항균, 항염증작용^{9,11)}, 심혈관질환에 대한 응용^{12,13)} 등 다양한 연구가 이루어졌고, 사람 암세포주에 대한 항암작용 및 세포독성에 대한 연구^{8,9,20)} 도 이루어졌으나 암세포주의 apoptosis에 의한 세포 증식 억제효과를 보여주는 실험은 미비하였다. 이에 저자는 암세포 증식 억제 효과를 규명하고자 대장암 세포주(HT-29) 및 구강상피세포암 세포주(KB) 세포를 대상으로 MTT assay, DNA laddering 등을 수행하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약물 추출

단삼(*Salviae miltiorrhizae Radix*) 100 g에 증류수 600 mL를 가한 후 대용 약탕기(DWP-1800 T, 한국)로 3시간 동안 전탕한 다음 여과하고 상층액 100 mL을 얻었다. 저온순환수조(COOL ACE CA-1500)에서 1차 동결한 다음 동결건조기(Samwon, SFDSMO06, 한국)로 동결 건조하여 8 g의 분말을 얻었다.

2. 방법

1) 세포배양

사람 대장암 세포주(HT-29) 및 구강상피세포암 세포주(KB) 세포를 RPMI medium 1640(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum(FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배지를 이용하여 5% CO₂, 37 °C 조건에서 계대배양을 하여 실험에 이용하였다.

* Corresponding author : Chang-won Choi, PhD, Professor, Department of Internal Medicine of Korean Medicine, Dong-shin University, 1722-9, Jorye-dong, Suncheon-si, Jeollanam-do, 540-978, South Korea.

· Tel : 82-61-729-7177

· E-mail : medijun@paran.com

• Received : November 04, 2014 / Revised : November 23, 2014 / Accepted : December 08, 2014

2) MTT assay

96-well plate에 1×10^4 개 세포를 분주 후 24hr 동안 배양한 후 단삼 추출액을 농도별(0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 mg/ml)로 처리하고 1일, 3일, 5일 배양하였다. 이어 배지를 제거하고 동일 배지에 희석된 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 4시간 처리 후 DMSO (Dimethyl sulfoxide, SERVA GmbH, Germany)에 처리한 다음 ELISA(LI-COR, BIO-TEK instruments, INC, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 값을 측정하였다.

3. DNA laddering

MTT assay에서 가장 뛰어난 효과를 보인 KB 세포주 1×10^6 개를 직경 6cm dish에 분주하여 24시간 배양한 후, 단삼을 72시간 처리하고 DNA laddering Kit (ApopLadder ExTM, TAKARA, Japan)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, Oregon, USA)을 이용하여 염색을 시행하였다.

4. Apoptosis

1×10^4 개의 HT-29, KB세포주를 Multicell 8 plusTM(CTRLbio, Korea)에 각각 분주하여 24시간 배양한 후, 단삼 1.5 mg/ml를 72시간 처리하였다. 이어 4% paraformaldehyde에 10분간 고정하고 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)에 10분간 염색하고 봉입한 후 LSM 고축점현미경 (Carl Zeiss, Standort Gottingen-Vertrieb, Germany)하에 관찰하였다.

5. 통계분석

MTT assay에서 얻은 흡광도를 one-way ANOVA로 시행하였으며 각군간의 통계분석법은 95% 신뢰수준으로 student-Newman-Keuls 방법을 사용하였다.

III. 결 과

1. MTT assay

1) 1일

HT-29 세포주와 KB 세포주를 24시간 배양한 후 MTT assay를 통해서 얻은 세포의 밀도는 Fig. 1과 같다. HT-29 세포주에서는 단삼추출액의 농도가 1.0 mg/ml까지는 세포의 밀도 변화가 없었으나, 단삼 1.5 mg/ml 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$)있게 감소하였다(Fig. 1). KB 세포주에서는 단삼추출액의 농도가 1.0 mg/ml부터 세포의 밀도가 감소하였으며, 단삼 1.5 mg/ml 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$)있게 감소하였다(Fig. 1).

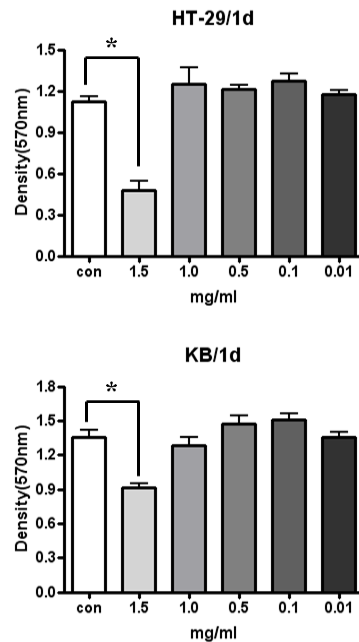


Fig. 1. Effect of *Salviae miltiorrhizae Radix* on the growth inhibition of HT-29 and KB cancer cell lines.

The cells were treated with various concentrations of *Salviae miltiorrhizae Radix* extracts during 1 day. After MTT assay, the MTT reduction rate were calculated by setting of control survivals in the absence of *Salviae miltiorrhizae Radix* extracts. All values are mean \pm S.E. Significant differences were compared with control at * $p < 0.05$.

2) 3일

HT-29 세포주와 KB 세포주를 3일간 배양한 후 MTT assay를 통해 얻은 세포의 밀도는 Fig. 2와 같다. HT-29 세포주에서는 단삼추출액의 농도가 0.5 mg/ml 부터 세포의 밀도가 감소하기 시작하였으며, 단삼 1.5 mg/ml 투여군에서는 대조군에 비하여 약 55% 감소하였고 통계적으로 유의성($p < 0.05$)을 보였다(Fig. 2). KB 세포주에서는 0.1 mg/ml의 단삼추출액을 투여한 군에서부터 미약한 감소가 있었으며, 1.0 mg/ml의 단삼 추출액 투여군에서는 약 10% 세포밀도가 감소하였고, 1.5 mg/ml 투여군에서는 대조군에 비하여 약 50% 감소하였으며 통계적으로 유의성($p < 0.05$)을 보였다(Fig. 2).

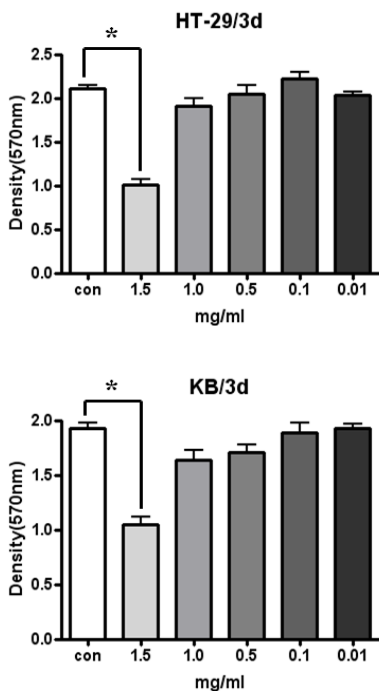


Fig. 2. Effect of *Salviae miltiorrhizae Radix* on the growth inhibition of HT-29 and KB cancer cell lines.

The cells were treated with various concentrations of *Salviae miltiorrhizae Radix* extracts during 3 days. After MTT assay, the MTT reduction rate were calculated by setting of control survivals in the absence of *Salviae miltiorrhizae Radix* extracts. All values are mean \pm S.E. Significant differences were compared with control at * $p < 0.05$.

3) 5일

HT-29 세포주와 KB 세포주를 5일간 배양한 후 MTT assay를 통해 얻은 세포의 밀도는 Fig. 3과 같다. HT-29 세포주에서는 단삼추출액의 농도가 1.0 mg/ml 부터 세포의 밀도가 감소하기 시작하였으며, 단삼 1.5 mg/ml 투여군에서는 대조군에 비하여 약 43% 감소하였으며 통계적으로 유의성($p < 0.05$)을 보였다(Fig. 3). KB 세포주에서는 1.0 mg/ml의 단삼추출액을 투여한 군에서부터 미약한 감소가 있었고, 1.5 mg/ml 투여군에서는 대조군에 비하여 약 25% 감소하였으며 통계적으로 유의성($p < 0.05$)을 보였다(Fig. 3).

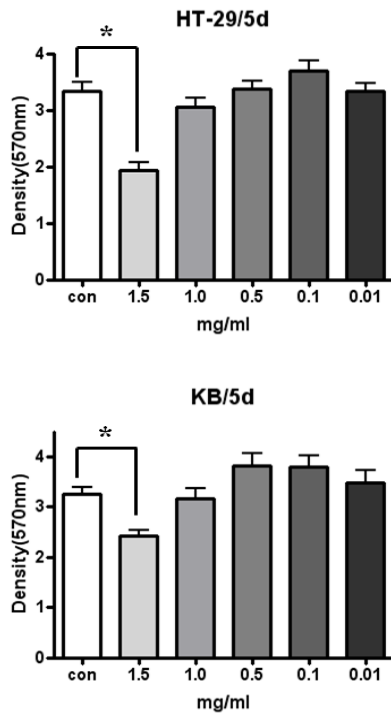


Fig. 3. Effect of *Salviae miltiorrhizae Radix* on the growth inhibition of HT-29 and KB cancer cell lines.

The cells were treated with various concentrations of *Salviae miltiorrhizae Radix* extracts during 5 days. After MTT assay, the MTT reduction rate were calculated by setting of control survivals in the absence of *Salviae miltiorrhizae Radix* extracts. All values are mean \pm S.E. Significant differences were compared with control at * $p < 0.05$.

2. DNA laddering

암세포의 성장 억제에 가장 뚜렷한 억제 효과를 보였던 KB 세포주 3일군에 DNA laddering을 실시하였다. 대조군에서는 하나의 band가 관찰되었으나 단삼 1.5 mg/ml를 투여한 결과 여러 개의 band가 관찰되었다(Fig. 4).

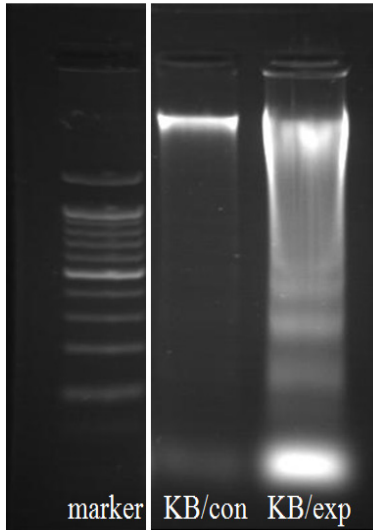


Fig. 4. DNA laddering by *Salviae miltiorrhizae Radix* extract.

KB-cell line were treated with *Salviae miltiorrhizae Radix* (1.5 mg/ml) for 72hr. DNA laddering was analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis in the presence of SYBR. DNA laddering was observed in the treated group.

3. Apoptosis

1) HT-29 세포주

대조군의 HT-29 세포주에서는 대부분의 암세포들이 DAPI-염색 결과 핵 모양이 둥글게 관찰되었으나(Fig. 5a), 3일간 단삼 1.5 mg/ml를 처리한 결과 많은 세포의 핵들에서 세포고사 변화(apoptotic change)를 보여주었다(Fig. 5b).

2) KB 세포주

정상 대조군의 KB 세포주의 핵들은 둥근 모양으로 관찰되었으나(Fig. 6a), 단삼 1.5 mg/ml를 3일간 처리한 실험군에서 다수의 세포들에서 핵분절(nuclei fragmentation)이 관찰되었다(Fig. 6b).

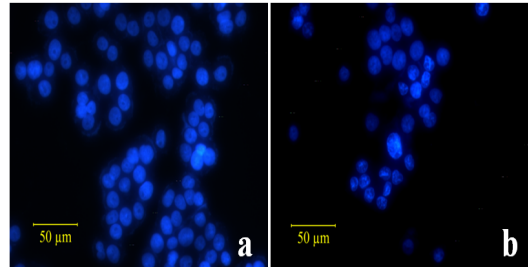


Fig. 5. Detection of apoptosis by DAPI-staining in the HT-29 cell lines.

A number of shrinking nuclei are observed in the experimental group(b) compared with control(a).

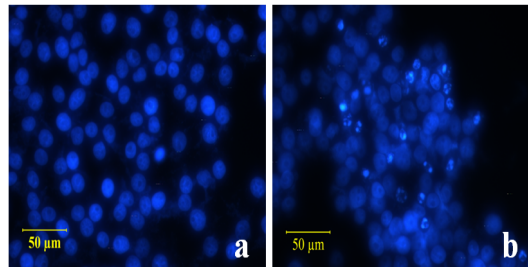


Fig. 6. Detection of apoptosis by DAPI-staining in the KB cell lines.

A number of segmented nuclei are observed in the experimental group(b) compared with control(a).

IV. 고찰

암은 일종의 전신성 질환으로 국부에서 침윤성 성장을 하거나 다른 부위로 확산과 전이를 일으켜 정상적인 조직기관을 파괴할 뿐만 아니라, 숙주에게 일련의 대사장애와 영양장애 등을 일으켜 항병력을 약화시켜 대부분 사망에 이르게 하는 질병이다⁴⁾. 최근 암 발생률은 산업의 급격한 발달, 지구 생태계 및 식생활의 변화 등으로 과거에 비해 급격히 증가하고 있으나, 아직도 암의 발생 기전이 불명확하여 난치성 질환으로 알려져 있다²⁾.

암에 대한 치료법은 수술요법, 항암화학요법, 방사선요법, 면역요법 및 유전자요법 등이 알려져 있는데 그 중 사용빈도가 높은 화학요법과 방사선요법은 정상세포까지 독성을 나타내어 소화 장애, 혈액학적 변화, 면역 기능 저하, 조혈장애, 유

전자 손상 등의 부작용을 초래하고 있다^{1,2)}. 최근에는 서양 의학적인 암치료법의 한계를 극복하기 위하여 기존의 치료에 한약을 병행하는 치료를 함으로써 암치료의 효율을 높이고 생존율을 증가시키는 연구가 이루어지고 있으며, 화학요법이나 방사선요법의 부작용을 줄이기 위한 노력들이 이루어지고 있다^{15,16)}.

암에 대한 한의학의 인식은 《黃帝內經》에서 “石瘕, 腸覃”등으로 언급한 이래, “癥, 腫瘍, 乳巖, 石疽, 石瘕” 등으로 인식하였고^{4,5)}, 癰疽와 瘰癧의 관계는 浮腫, 發熱, 疼痛하면서 肌肉間에 발생하는 것을 癰이라 하고, 腫根이 堅固하면서 熱이 없고 暗紫色을 띠는 것을 疽라하며, 紫黑色을 띠고 堅硬하며 潰瘍이 됨으로써 巖穴과 같은 상태가 되는 것을 瘰癧이라 하여 瘰癧形態의 하나라고 분류하였다. 治法에 대해서는 歷代로부터 “堅者削之, 結者散之, 留者攻之, 損者益之”의 4대 방법이 설정되어 왔고, 近來에는 理氣化血, 通經活絡, 化痰利濕, 軟堅散結, 解毒止痛, 益氣養血, 健脾和胃, 滋補肝腎 등의 治法이 활용되고 있다⁶⁾.

본 실험에 사용된 단삼 (*Salviae miltiorrhizae Radix*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속한 다년생 초본으로 活血祛瘀, 調經止痛, 養血安神, 涼血消癰의 효능이 있어 癥瘕積聚, 癰瘡腫毒, 月經不調, 心腹疼痛, 煩燥不安 등의 병증을 치료한다⁷⁾. 약리작용으로는 관상 동맥 확장 작용이 있어서 혈류량을 현저히 증가시키고, 지질 대사를 활성화시켜 콜레스테롤을 강하시킨다. 또한 혈압강하, 간 기능 활성화, 진정 작용, 항염증 작용, 항암 작용, 항균 작용이 있을 것으로 보고되고 있다¹⁷⁾. 단삼의 주요 화학성분으로는 tanshinone I, II A, II B등을 포함하는 diterpene 화합물과, danshensu(salvianic acid A), protocatechuic aldehyde, salvianolic acid B 등을 포함하는 phenolic 화합물 등, 그 외에 baicaline, b-sitosterol, ursolic acid, vitamin E와 tannin 등이 알려져 있다¹⁸⁾.

단삼에 대한 실험적인 연구로는 남^{19,20)} 등이 세포독성을 억제한다고 하였으며, 성²¹⁾ 등은 항암 효과와 활성물질 분리에 대한 연구를 하였고, 정⁸⁾ 등은 단삼의 추출물 중에 암세포 증식에 대한 억제

효과를 가진 성분이 존재한다고 보고하였다. 이외에 항균, 항염증작용^{9,11)}, 심혈관질환에 대한 응용^{12,13)}, 항산화²²⁾, 항돌연변이²³⁾ 등 다양한 연구가 이루어졌고, 사람의 암세포주에 대한 항암작용 및 세포독성에 대한 연구^{8,9,20)}도 이루어졌으나 암세포주의 apoptosis에 의한 세포 증식 억제효과를 보여주는 실험은 미비하였다. 이에 저자는 암세포 증식 억제효과를 규명하고자 대장암 세포주(HT-29) 및 구강상피세포암 세포주(KB) 세포를 대상으로 MTT assay, DNA laddering 등을 수행하였다.

암세포 증식 억제 효과를 분석하기 위해서 암세포를 배양기에서 배양하면서 다양한 농도의 단삼 추출액을 투여하여 세포의 증식 정도를 알 수 있는 MTT assay를 통하여 객관적으로 분석하였다. Tetrazolium-based colorimetric(MTT) assay는 Mosmann²⁴⁾이 개발하고 Kotnik²⁵⁾등이 변형시킨 방법으로 많은 시료를 간단하고 빠르게 판독할 수 있어 배양된 세포의 세포독성에 관한 연구에 주로 사용되었다.

이 방법은 대사과정이 온전한 세포의 미토콘드리아 탈수소효소가 노란색 수용성 tetrazolium salt 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide를 자주색을 띠는 비수용성의 formazan 결정으로 환원시키는 원리를 이용하여 570nm의 파장에서 흡광도를 측정함으로써 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영한 것이다.

실험의 결과는 HT-29, KB 세포주에서 단삼 추출액을 농도별로 처리한 후 1일, 3일, 5일 배양하여 MTT assay를 통해 세포의 밀도를 측정할 결과 단삼 추출액의 농도에 따라 세포 밀도의 감소 정도가 차이가 있었으나 단삼 추출액 농도의 증가에 따라 세포의 밀도가 감소하는 경향을 보였고, 단삼 1.5 mg/ml 투여군에서는 가장 현저한 감소를 보였으며 통계적으로 유의성(p<0.05) 있는 결과를 나타내었다. 이는 단삼 추출액이 HT-29, KB 세포주의 암세포 증식을 억제하는 효과가 있다고 사료되었다. 그러나 정확한 직접 투여량과 투여기간에 대한 유의성은 아직 불명확하여 이에 대한 추가적인 검증이 필요할 것으로 사료된다.

기존에 사용되고 있는 항암제의 대부분은 암세

포의 apoptosis를 유도하여 암세포의 증식을 막는 것으로 알려져 있다. apoptosis 여부를 판단하기 위해 많은 방법들이 사용되는데, 형태적인 방법에는 HematoxylinEosin staining, Hoechst3342 형광 염색법, TUNEL 정량법, AnexinV-FITC and PI staining 등이 있고 생화학적인 방법으로 DNA laddering이 있으며 cell cycle 분석에 의한 Flow cytometry 이용법 등이 주로 이용되고 있다^{26,27}.

본 실험에서는 단삼이 암세포의 성장억제효과를 나타내는지 확인하기 위해서 세포자연사의 가장 특이적인 현상으로 알려진 DNA laddering 방법을 사용하였다. DNA laddering이 일어나는 것은 apoptosis가 일어나면서 분비가 증가되는 endonuclease에 의해 nucleosome이라는 반복적인 구조를 가지는 DNA에 nucleosome 단위로 fragmentation이 일어나게 됨으로써 관찰되어진다. 따라서 전기영동 후 gel상에서 DNA ladder를 관찰할 수 있으며 이는 apoptosis를 관찰할 가장 흔히 사용되는 방법이다²⁸.

단삼에 투여 후 암세포의 성장 억제에 가장 뚜렷한 억제 효과를 보였던 구강상피세포암주(KB cell line)의 3일 군에서 DNA laddering을 실시하였다. 그 결과 대조군에서는 하나의 band가 관찰되었으나 단삼 1.5mg/ml를 투여한 결과 여러 개의 band가 관찰되었다. 이와 같은 결과는 단삼의 추출물이 암세포의 핵에 영향을 미치어 apoptosis에 의한 cell death를 유발할 것으로 사료되었다.

Apoptosis를 관찰하기 위해 HT-29와 KB 세포주에 3일간 단삼 1.5mg/ml를 처리하고 DAPI 염색한 후 관찰한 결과 HT-29 세포주의 많은 세포핵에서 세포고사 변화를 관찰할 수 있었고(Fig. 5b), KB 세포주에서는 다수의 핵분절(nuclei fragmentation)이 관찰되었다(Fig. 6b). 이는 단삼 추출물이 암세포 apoptosis에 의한 cancer cell death를 유발하였다고 판단되지만, apoptosis가 cell death receptor를 통하는지 mitochondrial pathway를 통하는지는 추후 연구가 더 필요하다고 사료된다.

이상의 실험결과를 요약하여 보면 대장암 세포주(HT-29) 및 구강상피세포암 세포주(KB)를 대상으로 MTT assay, DNA laddering 등을 수행한 결과 암조직에서 유래한 세포의 apoptosis를 유도

하여 암세포증식을 억제하는 효과가 있다고 유추해 볼 수 있다. 그러나 단삼추출물의 암세포증식 억제를 유도하는 최적의 농도와 생체내의 유효성 및 처리시간에 따른 효과의 증감 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

단삼 추출물의 항암활성과 apoptosis 효과를 확인하기 위해 대장암 세포주(HT-29) 및 구강상피세포암 세포주(KB) 세포를 대상으로 MTT assay, DNA laddering 등의 실험을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT assay 결과, HT-29 및 KB세포에서 단삼 추출액 농도의 증가에 따라 세포의 밀도가 감소하는 경향을 보였고, 1.5 mg/ml 투여군에서 가장 현저한 감소를 보였으며 유의성 있는 결과를 나타내었다.

2. KB 세포 3일 군에서 DNA laddering을 실시한 결과 대조군에서는 하나의 band가 관찰되었으나 1.5mg/ml 투여군에서 여러 개의 band가 관찰되었다.

3. Apoptosis를 관찰한 결과, HT-29 세포주의 많은 세포핵에서 Apoptosis변화를 관찰할 수 있었고 KB 세포주에서는 다수의 핵분절(nuclei fragmentation)이 관찰되었다.

이러한 결과들을 통하여 단삼 추출물은 apoptosis를 유도하여 암세포 증식을 억제하는 효과가 있다고 판단되며 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Korean society of pathologists. Pathology. Seoul: Komunsa. 2003:143.
2. Seoul National University Medical College. Oncology. Seoul:Seoul National University Press.

- 2001:141-88.
- Kim SH. Study on trends of cancer study in TKM and its research strategy in future. *Journal of Korean Medicine*. 1998;19(1):470-99.
 - Yang WJ. *Medical Theory of cancer tumors, Careful selection*. YakkunMunhwa company, 1989:1-4.
 - Jang DS. *Chinese and Western Medicine Combined treatment of cancer*. Shanxi:Shanxi Publisher. 1984:11,34.
 - Hwang Y. *Chinese Medicine Encyclopedia, Chinese traditional surgery*. Shanghai:Shanghai Science and Technology Publisher.1985:34.
 - The co-textbook publishing committee of Korean oriental medicine school. *The herbalmedicine*. Seoul:Younglimsa. 2004:461.
 - Cheng GC, Lee JY, Kim DC, Suh SO, Hwang WI. Inhibitory Effect of *Salvia miltiorrhiza* Extract on Growth of Some Cancer Cells. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2000;29:726-31.
 - Kwag JS, Baek SH. Cytotoxicity and Antimicrobial Effects of Extracts from *Salvia miltiorrhiza*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 2003;34(4): 293-6.
 - Kim OH, Chung SY, Park MK, Rhee HM, Yang JS. Anticancer Activity of Natural Products including *Salvia miltiorrhiza*. *The Journal of Applied Pharmacology*. 1999;7:29-34.
 - Han WS. Isolation of Antimicrobial Compounds from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2004;12(3):179-82.
 - Lee JH, Lee BC, Park ST, Lee JH, Lee KC, Seo BI, Song HJ. Effect of *Salviae Miltiorrhizae* Radix on Cultured Mouse Myocardial Cells Damaged by Hydrogen Peroxide. *Korean Journal of Herbology*. 2003;18(3):21-5.
 - Kim SH, Jeong HK, Lee HS. Effects of Aqua-Acupuncture of *Radix Salviae Miltiorrhizae* Water Extract on Blood Pressure in Hypertensive Rats. *The Journal of Korea Acupuncture & Moxibustion Society*. 1999;16(2):349-54.
 - Lee JH, Shim BS, Ahn KS, Choi SH. Anti-metastatic Effects of *XuefezhuYutang*. *Journal of Korean Oriental Oncology*. 1999;5(1):61-76.
 - Hwang CY. Bibliographic Study on the Therapy of Lung Cancer by Integrated Oriental and Western Medicine. *Journal of Korean Medicine*. 1995;16(2):177.
 - Lee PM. Trend to treat tumors with a combination of the Midwest to the change of the paper with a tumor associated. 1993:72.
 - Ahn DK. *Korean Herbal illustrations*. Seoul: Kyohaksa. 1998:558.
 - Fugh-Berman A. Herb and dietary supplements in the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Prev. Cardiol*, 2000;3:24-32.
 - Nam WY, Jeon BH. Influence of the extract of *RADIX SALVIAE MITIORRHIZAE* on the cytotoxicity induced by the chemotherapeutic agents, mitomycin C. *Korean Journal of Pathology*. 1997;11(2):113-7.
 - Sun JK, Shin MK. Cytotoxic effect of *SALVIA MILTIORRHIZAE* ROOT against L1210 cell. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 1992;3(1): 84-90.
 - Seong RK, Kim SH, Lee KI. Study on Antitumor Effect of *Salviae Miltiorrhizae* Radix and Isolation of Active Compound. *Korean Journal of Pathology*. 1996;10(2):76-91.
 - Kim YH, Han YS, Paik JE, Song TH. Screening of Antioxidant Activity in Dansam (*Salvia miltiorrhiza*) and Additional Effect on the Shelf-Life and the Characteristics of Yakgwa. *Journal of Korean Society Food and Cookery Science*. 2003;26:24-7.
 - Choi DS, Ahn BY, Kim DG. Antimutagenic Effect of Tansen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999;27:197-202.



24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65: 55-63.
25. Kotnic V and Fleischmann, W.R.jr. *J. Immunol. methods*. 1990;129:23.
26. Ra MS, Kim JM. The Induction of Human Corneal Epithelial Apoptosis by Serum-free Medium. *Journal of Korean Ophthalmic Optics Society*. 1999;4(1):1-6.
27. Kim JM. The Induction of Human Corneal Epithelial Cell Apoptosis by Different Cytokines. *Journal of The Korean Ophthalmological Society*. 1999;1(1):47-55.
28. Kim JW, Ryu KE, Jang HS, Ahn WS, Chio JO, Chun HJ. Cytotoxic Effect of Urushiol-ethanol Micro-particles on Human Cervical Carcinoma Cells. *Journal of Korean Pharmaceutical Sciences and Technology*. 2004;34(1):23-7.