

HT-29 암세포 이종이식으로 유발된 종양에 대한 18 β -Glycyrrhetic Acid의 치료효과

한용문[#] · 김정현

동덕여자대학교 약학대학 면역 · 미생물학교실

(Received May 28, 2015; Revised June 15, 2015; Accepted June 18, 2015)

Therapeutic Effect of 18 β -Glycyrrhetic Acid on HT-29 Cancer Cell in a Murine Xenograft Model

Yongmoon Han[#] and Jeonghyeon Kim

Department of ImmunoMicrobiology, College of Pharmacy/Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Abstract — In the present study, we determined the effect of 18 β -glycyrrhetic acid (18 β -GA) in the mice model bearing xenografts of HT-29 human colon cancer cell line. Data from the cytotoxicity assay displayed that 18 β -GA induced cell death in HT-29. The cytotoxicity was enhanced as the 18 β -GA treatment was prolonged. In case of 72 hrs treatment, LD₅₀ of 18 β -GA was approximately 90 μ M, and the efficacy at 100 μ M of 18 β -GA appeared to be equivalent to that of doxorubicin at 1 μ M. Based on the *in vitro* data, we tested the anti-tumor effect of 18 β -GA in thymic mice (Balb/c strain). Xenograft tumors were generated by subcutaneous injection of HT-29 (3×10^6 cells/mouse) to mice and the mice were treated intraperitoneally with 18 β -GA (50 μ g/time/mouse) every other day for 4 times. The tumor volumes were measured for a period of 14 days. Data displayed that the 18 β -GA treatment reduced the tumor volumes ($P < 0.05$) as compared to control mice. However, this activity was demolished when athymic mice (Balb/c nu/nu) were used instead of thymic mice. This observation appeared that T lymphocyte played an important role in the anti-tumor activity. In conclusion, our results indicate that 18 β -GA has anti-tumor activity in HT-29 tumor-bearing mice, which may be associated with T cells.

Keywords □ 18 β -glycyrrhetic acid, HT-29, anti-tumor, xenograft, thymic, athymic

최근 서지학적으로 효능이 알려진 약용식물을 암, 당뇨병, 또는 관절염과 같은 난치병 치료에 적용하기 위해 전 세계적으로 많은 연구가 진행되고 있는 추세이다. 이에, 본 연구실에서는 한 방에서 가장 많이 사용되고 있는 약재 중의 하나인 감초 (Glycyrrhizae Radix, A Family of Leguminosae) 성분들의 효능에 대해 연구를 수행하고 있다. 문헌 고찰에 따르면, 감초 성분들 중에서도 pentacyclic triterpene 배당체인 glycyrrhizin의 비당부인 18 β -glycyrrhetic acid(18 β -GA)에 대한 연구가 가장 많

이 보고가 되고 있다. 즉, 18 β -GA의 주요 약물학적 효능은 항균, 항간독성 등의 항염증효과와 면역조절효과 등의 생리활성에 관해 주로 많이 보고되고 있다.¹⁻³⁾ 본 연구실에서는 주로 면역조절을 통한 감염성 질환과 관절염에 대해 연구를 하였는데, 18 β -GA 성분은 면역조절효과가 있고,^{4,5)} 병원성 진균인 *Candida albicans* 기인성 관절염(septic arthritis)에 대해 항 관절염효과가 있음이 규명되었다.⁶⁾ 또한, 18 β -GA의 Th1 대 Th2 면역조절력을 이용한 항 진균효과가 있음⁵⁾을 보고한 바가 있다. 뿐만 아니라 이 항진균효과는 다른 종류의 terpene 성분에 의해서도 발현됨을 확인하였다.⁷⁾ 본 면역조절효과에 대한 연구결과와 타 연구자들의 연구 요점을 분석해보면, Th1/Th2의 면역반응 조절이 중요함을 알 수가 있다. 즉, 암의 발생억제에는 세포매개성 면역반응을 유도하는 Th1 면역성이 중요하게 간주되는데, 만약 18 β -GA의 Th1/Th2의 면역반응조절에 대해 세부적인 기전이 규명된

#Corresponding Author

Yongmoon Han

Department of ImmunoMicrobiology, College of Pharmacy/Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Tel.: 02-940-4521 Fax.: 02-940-4195

E-mail: ymhan@dongduk.ac.kr

다면, Th1 면역성을 증가시킴으로써 암 치료에 더 효과적으로 대처가 가능할 것으로 추정된다.^{8,9)}

문헌고찰에 의하면 18β-GA는 B16 melanoma 세포에 독성효과가 있고,¹⁰⁾ tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA)로 유발된 암세포에 대한 증식억제효과,^{11,12)} 그리고 백혈암 세포주인 HL60에 대한 세포사멸(apoptosis)을 통한 항암효과 등이 보고되었다.¹³⁾ 이들 연구는 생쥐에 암을 유발시킨 후에 18β-GA의 효과를 측정할 공통점이 있다. 최근에는 이종이식동물모델(Xenograft animal model)을 적용하여 사람 암세포주 기인성 종양발생 상태에서 항암효과를 규명하려는 시도가 있지만,¹⁴⁻¹⁶⁾ 사람암세포를 생체 내에 이식을 해서 발생한 암종양에 대한 18β-GA의 치료효과를 규명하는 연구는 본 연구실에서 수행한 A549 human lung adenocarcinoma에 대한 연구조사¹⁷⁾ 이외에는 없다.

이런 관점에서, 본 연구에서는 대장암이 현재 우리나라¹⁸⁾와 또 다른 예로 미국¹⁹⁾ 등에서 발병율이 가장 높은 암 중의 하나로 간주되고 있다는 점에서, HT-29 사람 대장암세포를 선정하여 이종이식동물모델에서 18β-GA의 항종양효과를 조사하였다. 아울러, 이 항종양효과에서 T 임파구의 관련여부를 확인하기 위해, T 임파구가 정상적으로 작용하는 Thymic mice(Balb/c strain of mouse)와 T 임파구가 없는 Athymic mice(Balb/c nu/nu, nude mice)^{20,21)}를 사용하여 T 임파구의 관여에 따른 항암효과를 비교 평가하였다.

재료 및 실험방법

실험동물

본 연구에 사용된 생쥐는 6주령의 Balb/c 생쥐(=Thymic mouse) 및 Balb/c nu/nu(=Athymic nude mouse)를 Orient Inc.-Charles River Lab에서 구입하여 사용하였다. 이들 생쥐는 멸균된 filter-top cage에서 멸균된 물과 사료(Orient Inc.)를 자유롭게 먹게 하고, 20±2°C 온도와 50±10% 습도로 조절된 사육실 환경에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사용된 동물은 동덕여자대학교 동물규정에 따라 승인(# 201302-01)을 받고 규정에 따라 사용하였다.

18β-glycyrrhetic acid(18β-GA)

18β-GA는 Sigma(St. Louis)에서 구입하였으며, 본 실험실의 기연구에서 사용한 방법¹⁷⁾에 따라 실험에 사용하기 직전에 DPBS (Dulbecco's phosphate saline solution; Sigma)에 용해한 후 여과멸균(pore size=0.2 μm; Satorius Stedim Biotech., Germany)하여 실험에 사용하였다. 이 성분에 내독소의 오염 가능성을 확인하기 위해 LAL(Limulus Amebocyte Lysate) 실험 Kit(Sigma)을 이용하여 검색하였다. 검색결과, 내독소의 오염은 없는 것으로 확인되었다.

HT-29 암세포주 및 배양

HT-29(사람 대장 암세포) 세포주는 한국 세포주은행에서 분양받아 본 실험에 사용하였다. 암세포 배양은, RPMI1640 기본배지에 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS; welGENE Inc., Seoul)과 1% penicillin/streptomycin을 첨가한 배지를 사용하였다[이하 이 배지를 완전배지라고 명함.]. 암세포 수효는 Trypan blue 용액과 혼합하고 hemocytometer를 이용하여 계측하였으며, 세포의 생존율이 95% 이상일 경우에만 사용하였다.

18β-GA의 세포독성 검색

먼저, 18β-GA과 암세포간의 상호접촉에 의한 지속성(sustainability)인 효능을 규명하기 위해서 동일 용량의 18β-GA를 암세포에 투여한 후에 처리기간의 차이에 따른 이 성분의 세포독성효과 유효성의 차이점을 조사하였다. 이를 위해, HT-29에 대한 18β-GA의 항암효과는 본 연구실의 기연구에서 사용한 세포독성을 측정하는 방법^{17,22,23)}을 사용하였다. 이 방법의 원리는 CCK-8(Cell Counting Kit-8; Dojindo Lab, Japan)을 사용하여 세포독성 정도를 측정하는 것으로, 살아있는 세포의 탈수소효소의 활성 여부에 따른 채색유무(fromazone 오렌지 색상의 형성)를 450 nm 흡광도에서 측정하였다. 실험과정은, 완전배지에서 배양한 HT-29 세포를 원심분리에 의해 serum free RPMI 배양액으로 세척하고 적정한 수효로 희석한 후, 96-well flat bottom plate(Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)에 1×10⁴ cells/well이 되도록 분주하였다. 지정된 well에 각기 다른 농도의 18β-GA를 첨가하고 37°C-5%CO₂ 배양기에서 24시간, 48시간 또는 72시간 배양을 하였다. 사용한 18β-GA의 농도는 5, 10, 20, 40, 80, 120, 140, 160, 그리고 200 μM로 사용하였다. 이들 암세포들을 21, 45, 또는 69시간 배양한 후, CCK-8 용액을 각 well에 10 μl씩 투여하고 동일한 배양조건에서 3시간 동안 추가 배양한 다음에 ELISA microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 실험군의 각 흡광도는 음성대조군(18β-GA로 처리되지 않은 HT-29)의 흡광도를 100%로 기준하여 상대적 세포생존율(%)로 평가하였다. 그리고 HT-29 세포에 기존의 항암약물인 doxorubicin을 첨가한 경우를 양성대조군으로 사용하여 실험군의 항암효과와 비교 평가하였다.

18β-GA의 항종양효과 검색

HT-29 사람암세포를 nude mice의 복부에 이식하는 이종이식 동물모델^{15,16)}을 사용하여 18β-GA의 항종양효과를 조사하였다. 본 동물모델에서 먼저 T 임파구가 정상적으로 작용하는 Balb/c 생쥐(thymic mouse)와 T 임파구가 없는 생쥐(athymic mouse)에 대한 18β-GA의 항암효과를 각각 검색하였다. 이 실험방법을 간략히 기술하면 다음과 같다. 완전배지에 배양한 HT-29 암세포를 7주령의 생쥐의 복부 측면(lateral abdomen) 부위에 3×10⁶

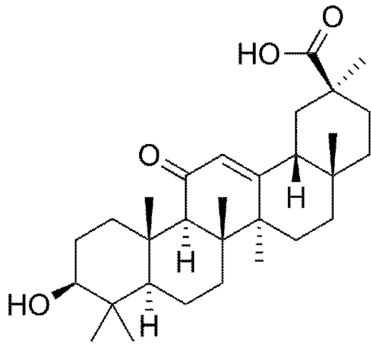


Fig. 1 – Chemical structure of 18β-glycyrrhetic acid (18β-GA).

cells/200 μ l/mouse 만큼 피하로 주사하였다(Day 0). 24시간 후에 18β-GA(용량=50 μ g/time/mouse)를 복강으로 주사하였다. 18β-GA 치료는 2일 간격으로 총 4회 투여하였다(Day 1, 3, 5, 7). 음성대조군 생쥐그룹에는 동일한 투여경로와 투여횟수에 따라 18β-GA 대신에 DPBS 완충용액을 주입하였다. 종양의 크기는 caliper(Mitutoyo, Japan)를 사용하여 길이(length, L)와 너비(width, W)를 3일에 한 번씩 측정하였고, 종양의 부피(mm^3)는 $L \times W^2/2$ 로 계산하여 각 그룹의 평균을 산출하였다. 각 실험군 당 다섯 마리의 생쥐를 사용하였다.

통계 처리

실험결과는 평균±표준오차(Mean±S.E.)로 계산하였으며, 각 군 간의 유의성 검증은 Student's *t*-test를 사용하였다. *P* 값이 5% 미만일 때에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

실험결과

18β-GA의 세포독성효과

18β-GA의 HT-29 암세포에 대한 독성효과를 검색하였다. 실험결과, 약물(18β-GA)과의 접촉시간이 길수록 세포독성이 증가하였다(Fig. 2). 일예로 160 μ M 농도에서 24, 48, 또는 72시간 배양한 경우에 처리한 경우, 대조군(약물을 투여 받지 않은 HT-29 세포)에서의 증식수효에 비해서 각각 약 61%, 83%, 그리고 90% 정도로 세포 수효가 감소하였다. 즉, 18β-GA와 HT-29 암세포간의 배양기간이 길수록 이에 비례하여 HT-29 세포의 증식이 감소되었다(Fig. 2). 하지만, 대략 80 μ M 이하의 저농도에서는 배양의 기간에 관계없이 세 경우 모두에서 18β-GA의 세포독성효과가 거의 없었다. 반면에 100 μ M 이상에서부터 18β-GA의 항암효과(세포독성)가 발현됨을 알 수가 있었다. 또한, LD₅₀도 배양 기간이 길수록 감소하여, 72시간 배양 시 LD₅₀은 약 90 μ M로 측정되었으며, 이 농도는 doxorubicin의 1 μ M 농도에서의 세포독성 효과에 버금하였다(Fig. 2). 3회 이상의 반복 실험에서도 상기 결과와 유사한 결과가 검색되었다.

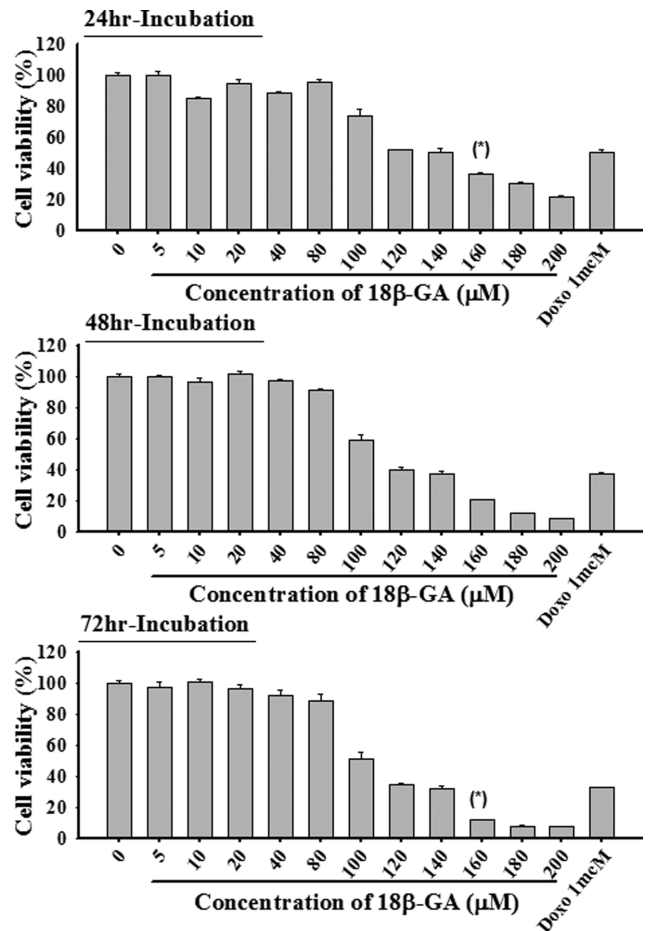


Fig. 2 – 18β-GA has killing activity of HT-29 human cancer cells and the activity is dose-dependent and time-dependent. The 18β-GA was added to the cancer cells and incubated for 24-, 48- or 72 hrs. Results revealed that the compound inhibited the proliferation of the cancer cells, and that the inhibitory activity seemed to be more efficient when the 18β-GA treatment was prolonged. For example, there was app. 30% inhibitory difference (*) between 24- and 72 hrs-incubations at 160 μ M dose of 18β-GA ($P < 0.05$). This implies that prolonged contact of 18β-GA to HT-29 cells can be an important factor to control the proliferation of the HT-29 cancer cells. Bar indicates SE. Note that 'Doxo 1 mcM' stands for doxorubicin at 1 μ M.

18β-GA의 Thymic mice에서 항종양효과

In-vitro 실험결과를 근거로 하여, 18β-GA의 항종양효과를 이종이식 동물모델을 사용하여 검색하였다. 정상적인 T 임파구가 존재하는 Balb/c 생쥐에 HT-29 암세포를 피하로 주사한 후, 18β-GA를 3일 간격으로 투여하면서 지정된 날짜에 종양의 크기를 측정하였다. 측정결과, 측정기간 동안에 18β-GA를 투여 받은 실험군의 평균 종양크기는 음성대조군의 평균 종양크기에 비해서 전 기간에 걸쳐 감소되었음을 알 수가 있었다(Fig. 3). 예를 들면, 18β-GA를 2회 투여 받은 후의 경우(Day 6)의 종양 크기를 18β-GA를 투여 받지 못한 음성대조군의 종양 크기에 비해서 약 60%

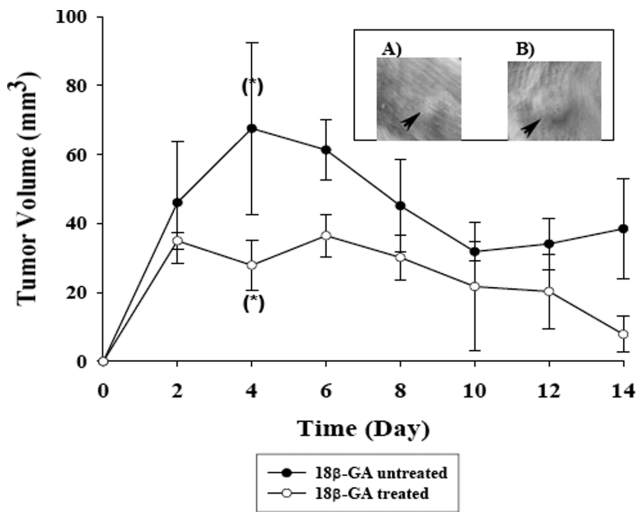


Fig. 3 – The 18β-GA has anti-tumor activity against HT-29 caused tumors in the thymic mice (Balb/c strain of mouse). The 18β-GA treatment reduced the tumor-volume as compared to tumor-volume of 18β-GA-untreated control animals during a period of 14 days-observation. For instance, at Day 4, there was app. 60% reduction of the tumor-size as compared to that of the control. The difference between the two groups is statistically significant (*) ($P < 0.05$). Each group contained five mice. This experiment repeated three times. Bar indicates S.E. The inset shows that at Day 4 the degree of tumor-sizes from mice treated with 18β-GA- (A) or without 18β-GA-treatment (B). Note that the arrows indicate the area of tumor formed.

정도의 감소가 측정되었다($P < 0.01$)(Fig. 3). 이때 (Day 4)의 실험군과 대조군간의 종양의 외형을 비교하면 크기의 차이점을 쉽게 알 수가 있었다(Fig. 3 Inset). 즉, 대조군의 경우에는 확연한 종양형성이 인식되었다. 또 다른 예로, 관측 14일째에는 거의 80%의 종양 크기의 감소가 검출되었으며, 음성대조군의 종양크기는 증가하는 추세로 관측되었다(Fig. 3).

18β-GA의 항종양효과의 작용기전: T 림파구의 영향

18β-GA의 항종양효과 발현 시, T 림파구의 관여 여부를 조사하기 위해 T 림파구의 기능이 없는 Athymic mice(Balb/c nu/nu)을 사용하여 본 동물모델에서 18β-GA의 항암효과를 검색하였다. 각 지정된 시각에서 측정된 결과에 의하면, Thymic mice에서 검색된 결과와는 달리 실험군과 대조군 간에 형성된 종양의 크기는 18β-GA의 투여여부에 관계없이 거의 동일한 크기로 각각 형성되었다(Fig. 4). 한편, 관측 전체기간 동안 종양의 크기는 시간이 경과함에 따라 양 그룹 모두 증가하는 패턴을 나타냈었으며, 종양의 크기도 Balb/c 생쥐를 사용했을 때 보다 월등히 크게 형성이 되었다(Fig. 4). 결과적으로 Thymic mouse와 Athymic mouse에서의 결과(Fig. 3 & 4)를 비교해보면, 18β-GA의 항암효과 발현에는 T 림파구의 관여가 중요한 것으로 평가되었다.

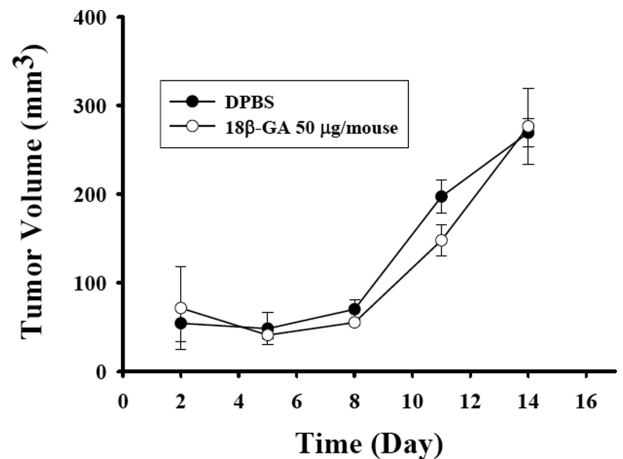


Fig. 4 – The anti-tumor activity of 18β-GA is demolished when athymic mice (Balb/c nu/nu) were used as test animals. Regardless of the 18β-GA treatment, there was no anti-tumor activity observed. This indicated that the T cells may play an important role in the anti-tumor activity. Each group contained five mice. Bar indicates S.E.

고찰 및 결론

감초의 지표성분인 glycyrrhizin의 비당부인 18β-GA에 대한 다양한 약물학적효과 - 주로 항염증효과와 면역보조효과 - 가 많이 보고되고 있지만, 18β-GA의 암세포에 대해 알려진 보고는 극소수에 불과하다. 특히 그 중에서도 18β-GA의 항암효과에서 T 림파구의 역할에 대한 보고는 거의 전무한 형편이다. 그 뿐만 아니라, 이종이식(xenograft transfer)으로 형성한 종양에 대한 18β-GA의 치료효과에 관한 연구결과는, 본 연구실의 기 보고에서 사람 폐암 암세포인 A549에 대한 18β-GA의 항암효과를 보고¹⁷⁾한 것이 거의 유일한 것으로 사료된다. 이런 까닭에, 본 연구에서는 18β-GA의 항암효과의 일반성과 T 림파구의 관여 여부를 규명하기 위해, HT-29 사람 대장암세포를 사용하여 연구조사 하였다.

이를 위해, 먼저 18β-GA의 HT-29에 대한 세포독성효과를 검색하였다. 이 실험결과를 분석해보면, HT-29 암세포에 18β-GA의 접촉기간이 길수록 세포독성효과가 증가하여 항암효과가 더 유효함을 알 수 있었다. 즉, 24시간과 72시간 배양의 경우를 상호 비교해보면 48시간의 연장된 배양을 통해서 거의 30% 정도의 세포증식 감소가 있었고, 각 경우의 LD₅₀ 비교에서도 약 40 μM 정도의 차이가 있었다. 이 분석결과에 의하면 18β-GA는 약물과 암세포간의 장기 접촉이 항암효과를 증진시킬 수 있는 중요 인자(factor)로 사료된다. 이 결과를 통해 유추되는 평가는 다음과 같다. 즉, 일반적으로 항암제의 세포막 투과성이 낮은 경우에 일정량의 약물의 도달을 위해서 과량의 약물투여가 요구된다. 하지만, 과량의 약물투여는 신장에 독성을 일으킬 수 있다. 그렇다면, 적정 용량의 항암제가 체내에 오래 잔류할 수 있는 체형의

개발이 바람직할 것이다. 이에 대한 예로 18 β -GA의 liposome 제형화를 고려해볼 수가 있을 것이다. 또한, 72시간 배양 시 18 β -GA의 항암효과를 현재 임상에서 사용하는 doxorubicin의 항암효과와 산술적인 측면에서 비교하였을 때, 대략 100 μ M 용량의 18 β -GA의 세포독성효과가 1 μ M 용량의 doxorubicin과 유사하다. 하지만 이는 단순히 *In-vitro* 실험상에서 산출된 결과로, 체내투여 시에 필수적으로 고려해야 할 약물투과성이 전혀 반영되지 않았다는 점을 염두에 두어야 한다.

이 결과들을 근거로 해서 18 β -GA의 항종양효과를 이중이식 동물모델을 사용하여 검색하였다. 먼저, T 임파구가 정상적으로 존재하는 Balb/c 생쥐를 사용하여 18 β -GA의 항암효과를 검색했을 때, HT-29 기인성 종양형성에 대해 억제효과가 있었다. 그리고 이 항암효과는 전 관측기간 동안에 유사한 패턴으로 유지가 되었다. 이로서 18 β -GA는 HT-29 기인성 종양에 대해서 *In-vivo* 실험상에서도 항암효과가 확인되었다.

그 다음, 본 18 β -GA의 항암효과와 작용기전을 검색하였다. 이 감초성분이 암세포에 미치는 다양한 작용기전에 대한 타 연구자들의 *In-vitro* 연구결과에 대한 보고를 서론에 기술하였다. 하지만, T 임파구에 미치는 18 β -GA의 효과에 관해서는 연구 조사된 바가 없다. 이에, T 임파구가 없는 nude mice(=athymic mice) 사용하여 18 β -GA의 항암효과를 조사하였는데, thymic mice의 경우에서와는 다르게 18 β -GA의 항암효과는 없었다. 이 결과를 고찰해보면, 최소한 두 가지 점을 유추해볼 수가 있다. 첫째, 18 β -GA의 항암효과와 발현에는 T 임파구가 관여한다는 점은 분명하지만, 본 실험의 결과를 통해서 어떤 종류의 T 임파구가 관여하는지의 여부는 알 수가 없다. 하지만 본 실험실의 기초 실험에서 Balb/c 생쥐에 anti-CD4 항체로 전처리한 후 암세포를 주입하였을 때 암세포가 급속히 증식함(data not shown)을 근거로 할 때, CD4+ T 임파구의 관여성이 추정된다. 둘째, 만약에 첫 번째의 추정이 옳다면, T 임파구를 18 β -GA로 조절하여 항암효과를 증감시킬 수 있는 가능성이 대두된다. 아마도 Treg과 Th17의 상호간의 조절성을 고려해볼 수가 있을 것이다. 또한, 본 연구에서 적용한 실험조건에서 규명된 18 β -GA의 항암효과가 면역활성 이외에도 또 다른 약물작용기전이 있을 것으로 추정된다. 예를 들면, Fig. 3에서 제시되었듯이, 대조군과 실험군 모두에서 시간이 경과함에 따라 종양의 크기가 감소함이 관측되었는데, 이는 아마도 또 다른 작용기전에 의한 것으로 추정된다. 향후 이점에 대한 연구의 필요성이 요구된다.

모든 연구결과를 종합해 보면, 18 β -GA를 기존의 항암제와 병용하여 암치료에 적용하는 병용요법(combination therapy)를 적용해 볼 수 있다. 이 요법은 항암제의 용량감소를 통해 약물의 부작용을 감소하는데 효과적인 것으로 사료된다. 실제로, 최근 타 연구자의 연구결과에 의하면 doxorubicin과 효소를 병용 투여하여 doxorubicin의 용량을 줄이면서도 항암효과를 극대화 할

수 있다는 보고가 있다.^{24,25)} 이에 따라, doxorubicin과의 병용효과와 관련된 후속 연구가 본 연구실에서 현재 진행 중에 있다. 아울러 18 β -GA의 T 임파구를 인위적으로 조절하여 항암효과를 발현할 수 있는 항암요법에 대해서도 초기 실험 중에 있다.

감사의 말씀

이 논문은 2014년도 동덕여자대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

References

- 1) Teelucksingh, S., Mackie, A. D., Burt, D., McIntyre, M. A., Brett, L. and Edwards, C. R. : Potentiation of hydrocortisone activity in skin by glycyrrhetic acid. *Lancet* **335**, 1060 (1990).
- 2) Marandici, A. and Monder, C. : Inhibition by glycyrrhetic acid of rat tissue 11-hydroxysteroid dehydrogenase in vivo. *Steroids* **58**, 153 (1993).
- 3) Gumprich, E., Dahl, R., Devereaux, M. W. and Sokol, R. J. : Licorice compounds glycyrrhizin and 18 β -glycyrrhetic acid are potent modulators of bile acid-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 10556 (2005).
- 4) Han, Y. : 18 β -Glycyrrhetic acid induces protective anti-*Candida albicans* antibody by its immunoadjuvant activity. *Yakhak Hoeji* **52**, 494 (2008).
- 5) Kim, J., Joo, I., Kim, H. and Han, Y. : 18 β -Glycyrrhetic acid induces immunological adjuvant activity of Th1 against *Candida albicans* surface mannan. *Phytomedicine* **20**, 951 (2013).
- 6) Han, Y. : Effect of 18 β -glycyrrhetic acid on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Yakhak Hoeji* **51**, 476 (2007).
- 7) Han, Y. and Rhew, K. Y. : Ginsenoside Rd induces protective anti-*Candida albicans* antibody through immunological adjuvant activity. : *Int. Immunopharmacol.* **17**, 651 (2013).
- 8) Takashi, N., Minoru, N., Marimo, S., Kenji, I., Hidemitsu, K., Masashi, S., Akio, O., Toshiaki, K. and Shinichiro, N. : The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **46**, S52 (2000).
- 9) Baier, P. K., Wolff-Vorbeck, G., Eggstein, S., Baumgartner, U. and Hopt, U. T. : Cytokine expression in colon carcinoma. *Anticancer Res.* **25**, 2135 (2005).
- 10) Abe, H., Ohya, N., Yamamoto, K. F., Shibuya, T., Arichi, S. and Odashimag, S. : Effect of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on growth and melanogenesis in cultured B16 melanoma cells. *Eur. J. Cancer Clin. On.* **23**, 1541 (1987).
- 11) Agarwal, M. K., Iqbal, M. A. and Athar, M. : Inhibitory effect of 18 β -glycyrrhetic acid on 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate-induced cutaneous oxidative stress and tumor

- promotion in mice. *Redox Report* **10**, 151 (2005).
- 12) Inoue, H., Mori, T., Shibata, S. and Koshihara, Y. : Modulation by glycyrrhetic acid derivatives of TPA-induced mouse ear oedema. *Br. J. Pharmacol.* **96**, 204 (1989).
- 13) Makino, T., Tsubouchi, R., Murakami, K., Haneda, M. and Yoshino, M. : Generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis of HL60 cells by ingredients of traditional herbal medicine, Sho-saiko-to. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **98**, 401 (2006).
- 14) Kamran, G., Weining, Z., Monika, F. S., Thomas, S. and Hiremagalur, N. J. : Studies on the antitumor activity and biochemical actions of cyclopentenyl cytosine against human colon carcinoma HT-29 in vitro and in vivo. *Life Science* **64**, 103 (1998).
- 15) Nishikawa, T., Ramesh, R., Munshi, A., Chada, S. and Meyn, R. E. : Adenovirus-mediated mda-7 (IL24) gene therapy suppresses angiogenesis and sensitizes NSCLC xenograft tumors to radiation. *Mol. Ther.* **9**, 818 (2004).
- 16) Aparicio, S., Hidalgo, M. and Kung, A. L. : Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 311 (2015).
- 17) Kim, H., Kim, S., Lee, J. H. and Han, Y. : Antitumor effect of 18 β -glycyrrhetic acid against human tumor xenografts caused by A549 cancer cell. *Yakhak Hoeji* **55**, 39 (2011).
- 18) Jung, K. W., Won, Y. J., Kong, H. J., Oh, C. M., Cho, H., Lee, D. H. and Lee, K. H. : Cancer statistics in Korea: Incidence, Mortality, Survival, and Prevalence in 2012. *Cancer Res. Treat.* **47**, 127 (2015).
- 19) Siegel, R. L. Miller, K. D. and Jemal, A. : Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J. Clin.* **65**, 5 (2015).
- 20) Manning, D. D., Reed, N. D. and Shaffer, C. F. : Maintenance of skin xenografts of widely divergent phylogenetic origin of congenitally athymic (nude) mice. *J. Exp. Med.* **38**, 488 (1973).
- 21) Price, J. E. : Spontaneous and experimental metastasis models: nude mice. *Methods Mol. Biol.* **1070**, 223 (2014).
- 22) Lee, J. Y., Lee, J. H., Park, J. H., Kim, S. Y., Choi, J. Y., Lee, S. H., Kim, Y. S., Kang, S. S., Jang, E. C. and Han, Y. : Liquiritigenin, a licorice flavonoid, helps mice resist disseminated candidiasis due to *Candida albicans* by Th1 immune response, whereas liquiritin, its glycoside form, does not. *Int. Immunopharm.* **9**, 632 (2009).
- 23) Lee, J. H., Park, J. H., Kim, Y. S. and Han, Y. : Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int. Immunopharmacol.* **10**, 1681 (2008).
- 24) Sirotnak, F. M., Zakowski, M. F., Miller, V. A., Scher, H. I. and Kris, M. G. : Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Clin. Cancer Res.* **6**, 4885 (2000).
- 25) Ma, Y., Trump, D. L. and Johnson, C. S. : Vitamin D in combination cancer treatment. *J. Cancer.* **15**, 101 (2010).