

천초근 에탄올 추출물의 항산화 효능 및 대장암 세포 억제 효과

노종현[†], 심미옥[†], 정호경, 이무진, 장지훈, 정다운, 성태경, 안병관, 조현우*

한약진흥재단

Anti-colorectal Cancer and Anti-oxidant Activities of *Rubiae radix* Ethanol Extract *in vitro*

Jong Hyun Nho[†], Mi Ok Sim[†], Ho Kyung Jung, Mu Jin Lee, Ji Hun Jang, Da Eun Jung, Tae Kyoung Sung, Byeong Kwan An and Hyun Woo Cho*

National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung-gun 59338, Korea

Abstract - *Rubiae radix* is root of *Rubia akane* Nakai, it has been used to hemostasis and blood stasis in Korean and China. This study investigated that anti-oxidant and anti-colorectal cancer effect of ERA (ethanol extract of *Rubiae radix*) and WRA (water extract of *Rubiae radix*) using RAW 264.7 (murine macrophage from blood) and HCT-116 cells (human colorectal cancer cell line). ERA contained polyphenol (45.77 ± 2.03 mg/g) and flavonoid (22.82 ± 1.33 mg/g). 500 μ M H₂O₂-induced ROS generation was diminished by 500 μ g/ml ERA treatment in RAW 264.7 cells, but not WRA (125, 250, and 500 μ g/ml). Moreover, caspase-3 activity and DNA fragmentation increased by 500 μ g/ml ERA treatment during apoptotic cell death in HCT-116. Results demonstrated that anti-cancer effect of ERA against human colorectal cancer cells is mediated apoptotic cell death and DNA fragmentation through caspase-3 activation. However, further study is required to what active ingredient of ERA are important for anti-oxidant and anti-colorectal cancer effect *in vivo*.

Key words - Anti-oxidative effect, Colorectal cancer, *Rubia akane* Nakai, *Rubiae radix*

서 언

우리나라에서 대표적인 만성질환으로 알려져 있는 암은 신체 조직을 구성하고 있는 세포가 제한 없이 증식되어 악성종양을 형성하게 되는 질병으로서, 산업발달과 생활의 변화 또는 유전적인 요인에 의해 발병하게 된다(Lewis *et al.*, 2005).

대장암은 우리나라뿐만 아니라 서양에서도 흔히 발생하는 악성종양 중 하나이며 여성보다 남성에서 발생률이 더 높은 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2013). 대장암을 치료하는 방법으로, 일반적인 방법인 수술 이외에 화학요법과 방사선요법 등이 시행되고 있으나 이는 면역기능저하, 탈모, 신장독성, 심장독성과 같은 여러 부작용을 야기할 수 있다고 알려져 있다(Shariati *et al.*, 2010; Andersen *et al.*, 2006).

이러한 이유로 부작용이 없고 항암효과를 가지고 있는 천연 자원 소재의 탐색과 개발이 요구되며, 이를 이용한 기능성 식품 또는 의약품 개발하는 연구가 활발하게 진행되고 있다(Shin *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2011).

산화스트레스는 건강에 쉽게 영향을 미칠 뿐만 아니라, 질병에 쉽게 관여한다고 알려져 가장 많이 연구되고 있는 분야 중 하나로 알려져 있고(Lee *et al.*, 2013), 악성 종양의 원인들 중 하나로 알려져 있는 활성산소는 정상세포에게 영향을 끼쳐 암 또는 기능장애를 유발하게 된다고 알려져 있다(Kim and Kim, 2018).

천초근(*Rubiae radix*)은 꼭두서니(*Rubia akane* Nakai)의 뿌리를 건조한 것으로, 우리나라에서 예로부터 어혈을 없애고 지혈작용을 하는 것으로 알려져 다양하게 이용되었다(Kim *et al.*, 2012; Bae *et al.*, 2005).

이와 같은 이유에 의해 최근 항산화효능을 가진 천연 자원 소재를 찾기 위해 여러 분야에서 연구가 진행되고 있다(Woo *et al.*, 2018; You and Moon, 2018; Sim *et al.*, 2017; Jeong *et al.*, 2017).

*교신저자: thej01234@gmail.com

Tel.+82-61-860-2873

[†] Both authors contributed equally to this work.

여러 연구에 따르면, 천초근 추출물은 human promyelocytic leukemia(전골수구백혈병) 세포의 증식을 세포자멸사(apoptosis) 과정을 통해 억제시킨다고 알려져 있으며(Choi *et al.*, 2008), *Bacillus cereus*와 *Pseudomonas aeruginosa*같은 식중독균의 증식을 억제한다고 알려졌다(Bae *et al.*, 2005). 현재까지 천초근 에탄올 추출물을 이용하여, 대장암을 억제할 수 있는 효능에 대한 연구가 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구는 천초근 물 추출물과 에탄올 추출물을 이용하여 대장암 세포에 대한 항암효능과 항산화 효능이 있는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료와 추출물의 제조

본 연구에 사용한 천초근은 꼭두서니과(*Rubiaceae*)에 속하는 *Rubia akane* Nakai의 뿌리로서 2015년 5월 27일에 전남 완도(위도 34.16'60"N, 경도 126.87'87"E)에서 채취하였으며, 목포대학교 한약자원학과 김휘 교수님의 식물학적 동정을 거쳤다. 실험에 사용한 시료의 확정표본(TKM-2097)은 한약진흥재단 한약자원본부에 보관하고 있다. 천초근은 멸균수로 수세 한 뒤, 50°C 조건에서 건조기를 이용하여 일주일간 건조하였다. 건조된 천초근은 분쇄하여, 증류수 또는 에탄올을 칭량한 시료 무게의 10배를 넣고 환류 냉각추출방법을 통해 각각 물추출은 100°C 조건에서, 에탄올 추출은 70°C 온도에서 3시간, 3회 반복하여 추출하였다. 추출물은 filter paper (Thermo, Waltham, MA, USA)를 이용하여 여과하고, 여과액을 동결 건조하여 시료를 PBS에 녹인 뒤 사용하였다.

세포배양

RAW 264.7 그리고 HCT-116 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM (Thermo, Waltham, MA, USA)에 10% FBS (fetal bovine serum), 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하고 유지하였다.

세포생존율 분석

세포생존율은 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell proliferation assay kit (Promega, Fitchburg, WI, USA)를 사용하였으며, 제조사의 프로토콜에 따라서 측정하였다. HCT-116 세포를 96 well plate에 5×10⁴ cells/ml 농도가 되도록 분주한

뒤 37°C, 5% 배양기에서 24시간 배양한 후 천초근 에탄올 추출물을 각각 31.3, 62.5, 125, 250, 그리고 500 µg/ml 농도로 24시간 동안 처리하였으며, MTS 시약 20 µl를 넣고 2시간 동안 배양한 후 microplate reader Infinite® 200 PRO (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 정상대조군에 대한 생존율로 표시하였고 이에 따라 추출물들의 암세포 사멸효과를 측정하였다.

Tunel 분석

Tunel 분석은 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA)을 사용하였으며, 제조사의 프로토콜에 따라서 수행하였다. HCT-116 세포를 12 well plate에서 cover slip 위에 5×10⁵ cells/ml 농도가 되도록 분주한 뒤, 37°C, 5% 배양기에서 24시간 배양했다. 배양된 세포에 천초근 에탄올 추출물(ERA)을 24시간동안 처리하였다. 그 후 10% neutralized buffered formalin (NBF)로 4°C에서 20분 동안 고정하였고, phosphate buffered saline (PBS)로 2번 씻어 주었다. 다음 0.2% Triton X-100 in PBS 용액으로 5분간 투과화한 뒤 PBS로 2번 씻어주었다. 남은 액체가 없도록 모두 제거하고 Equilibration buffer를 5분간 처리하였으며 100 µl rTdT incubation buffer를 처리하고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후 2×SSC buffer를 처리하고, PBS로 2번 씻은 뒤 Prolong™ Gold antifade mountant with DAPI (Thermo, Waltham, MA, USA)로 봉입하여 Epi-fluorescence microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)를 이용해 형광 정도를 관찰하였다.

Caspase-3 활성도 측정

Caspase-3의 활성도는 Caspase-3 colorimetric detection kit (Enzo, Farmingdale, NY, USA)를 이용해 실험을 진행했다. HCT-116 세포는 PBS로 세척한 뒤 Pierce™ protease and phosphatase inhibitor mini tablets (Thermo, Waltham, MA, USA)가 포함된 RIPA cell lysis buffer 2 (Enzo, Farmingdale, NY, USA)로 1시간 동안 용해하였다. 세포용해액은 원심분리기로 4°C, 13,000 × g 조건에서 10분간 원심분리하였고, 단백질 농도를 bradford assay를 이용하여 측정하였다. 총 20 µg의 단백질을 사용해 제조사가 제공한 프로토콜에 따라 실험을 진행했다.

FACS 분석

FACS를 이용한 분석에는 annexin V-FITC apoptosis detection kit (Enzo, Farthingale, NY, USA)와 DCFDA cellular ROS

detection assay kit (abcam, Cambridge, England)를 사용했다. 세포에 천초근 에탄올 추출물 처리 후 유도되는 apoptosis의 비율을 구하기 위해 제조사에서 제공한 protocol에 따라 Annexin V-FITC와 PI 시약으로 염색시켰으며, 마찬가지로 H₂O₂ 처리에 따른 활성산소종을 확인하기 위해 DCFDA 시약으로 염색하였다. 염색된 세포는 CytoFLEX (Beckman clulter, Indianapolis, IN, USA)를 이용해 분석하였다.

폴리페놀 함량 분석

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약을 이용하여 Folin과 Denis (1912)의 방법을 일부 변형시켜 측정하였다. 표준물질의 검량선 작성을 위해 gallic acid를 사용하였으며, 각각 추출물에 Folin-Ciocalteu's phenol solution을 각각 160 μl를 첨가하고, 3분간 상온에서 반응시킨 뒤 10% Na₂CO₃ 용액을 160 μl를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 다음 실온에서 10,000 rpm, 10분 동안 원심분리 하였으며 상등액을 microplate reader Infinite® 200 PRO (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

플라보노이드 함량 분석

각각 추출물의 플라보노이드 함량은 96 well plate에 농도별 시료 10 μl를 넣고, 10% aluminum nitrate와 1 M potassium acetate를 각각 4 μl, methanol 82 μl를 첨가하였다. 40분간 암소 반응 한 뒤 microplate reader Infinite® 200 PRO (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용해 415 nm에서 흡광도를 측정

하였다. 표준물질의 검량선 작성을 위해 rutin을 이용하였다 (Moreno *et al.*, 2000).

통계처리

통계처리는 평균 ± 표준편차(mean ± SD)로 나타냈다. 유의성을 검정하기 위해 SPSS (Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 사용하였다. 일원변량분석(one way ANOVA)을 실시하였으며, 유의성이 있는 경우 *p* < 0.05 수준에서, Duncan's Multiple Range Test (DMRT)를 실시하였다.

결과 및 고찰

천초근의 ROS 생성 억제 효과 및 폴리페놀, 플라보노이드 함량

WRA(천초근 물 추출물)와 ERA(천초근 에탄올 추출물)의 폴리페놀(Polyphenol) 및 플라보노이드(Flavonoid) 함량을 알아보기 위해 실험을 진행하였을 때, WRA는 폴리페놀이 14.50 ± 0.86 mg/g, 플라보노이드가 11.81 ± 1.30 mg/g이 포함되어있는 것으로 나타났다.

반면 ERA는 폴리페놀이 45.77 ± 2.03 mg/g, 플라보노이드가 22.82 ± 1.33 mg/g으로 WRA에 비해 각각의 함량이 조금 더 높은 것으로 확인되었다(Table 1).

폴리페놀은 식물에서 흔히 발견할 수 있는 화합물로, 식물의 대사에 의해 형성되며 항염증, 항당뇨, 항비만 등 여러 질병에

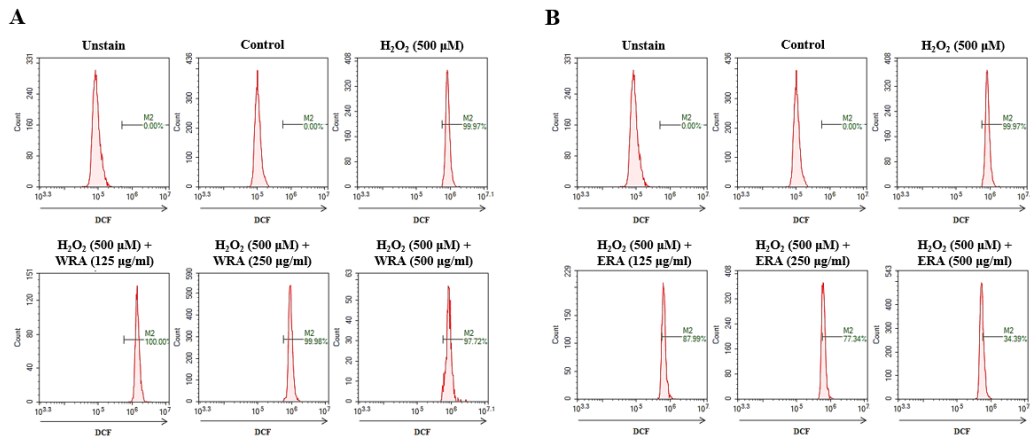


Fig. 1. Effect of extracts on H₂O₂-induced ROS generation in RAW 264.7 cells. (A-B) WRA; water extract of Rubiae radix, ERA; ethanol extract of Rubiae radix. After pretreatment with iridin for various concentration (125, 250, and 500 μg/ml), RAW 264.7 cells were treated with 500 μM H₂O₂ for 24 h. ROS was measured by flow cytometry. Representative images were taken from at least three independent experiments.

Table 1. Polyphenol and flavonoid contents of Rubiae radix extracts

Groups	Polyphenol (mg/g)	Flavonoid (mg/g)
WRA ^z	14.50 ± 0.86 ^x	11.81 ± 1.30 ^x
ERA ^y	45.77 ± 2.03	22.82 ± 1.33

^zWRA; water extract of Rubiae radix

^yERA; ethanol extract of Rubiae radix

^xEach value in the table is represented as mean ± S.D. (n=9)

대한 효능을 가지고 있음이 밝혀져 있다(Pandey and Rizvi, 2009; Horakova, 2011).

ERA의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 45.77 ± 2.03 mg/g, 22.82 ± 1.33 mg/g으로, Kwon *et al.* (2014)에 의해 알려진 모링가(*Moringa oleifera* Lam.) 잎 에탄올 추출물(폴리페놀; 40.72 ± 1.53, 플라보노이드; 10.03 ± 0.30)과 비교하여 조금 더 높은 것을 확인할 수 있었으며, 모링가 잎은 β-carotene, 플라보노이드 및 폴리페놀 함량이 높아 항산화 제품 소재로 매우 널리 이용되고 있기 때문에(Kwon, 2014; Anwar, 2007), 천초근 추출물 또한 추가 실험을 통해 항산화제로 이용될 수 있을 것이라고 사료된다.

다음으로 각각 추출물의 ROS (reactive oxygen species) 억제 효과를 확인하기 위해 실험을 진행하였다. RAW 264.7 세포주에 각각 추출물을 여러 농도(125, 250, and 500 µg/ml)로 30분 동안 전 처리한 뒤, 500 µM H₂O₂를 24시간 동안 처리하여 ROS 생성량을 flow cytometry로 분석했다.

WRA는 H₂O₂에 의해 증가된 ROS를 억제하지 못했으며(Fig. 1A), ERA는 H₂O₂ (99.97%)와 비교하여 500 µg/ml 농도에서 34.39%까지 ROS 생성을 억제하였다(Fig. 1B). ROS는 세포 내부 대사에 의해 생성되며, 세포 분화와 유전자 발현 등에 관여한다(Rhee *et al.*, 2006).

과도한 ROS생성은 세포자멸사를 유도할 뿐만 아니라, 염증 세포의 응집을 유도하여 염증반응을 일으키는 요인으로 알려져 있다(Kang, 2013; Mittal *et al.*, 2014).

이에 따라 ERA는 H₂O₂에 의해 증가된 ROS 생성을 억제하는 것으로 판단되며, 결과를 종합하면 WRA 보다 ERA가 항산화 효능이 높은 것으로 나타났다.

천초근 에탄올 추출물의 HCT-116 세포주 사멸 효과

대장암세포 사멸효과를 *in vitro* 수준에서 확인하기 위해 대장암 세포주인 HCT-116 세포를 이용하여 실험을 진행하였다. WRA를 HCT-116 세포에 여러 농도(31.3, 62.5, 125, 250, and 500 µg/ml)로 24시간 동안 처리하여 세포생존율을 확인한 결과, 세포생존율이 유의적으로 감소하지 않았다(Fig. 2A).

하지만 ERA를 같은 조건으로 처리하였을 때 31.3 µg/ml 농도부터 세포생존율이 농도 의존적으로 감소하면서 500 µg/ml 농도에선 HCT-116 세포의 생존율이 71.22 ± 3.13%까지 감소하였다(Fig. 2B).

이와 같은 조건에서 Kim (2015)의 보고에 의하면, 개똥쑥 (*Artemisia annua* Linne) 에탄올 추출물은 100 µg/ml 농도에서 대장암 세포주인 HCT-116 세포에 대해 뛰어난 사멸효과를 나타낸다고 보고하였다.

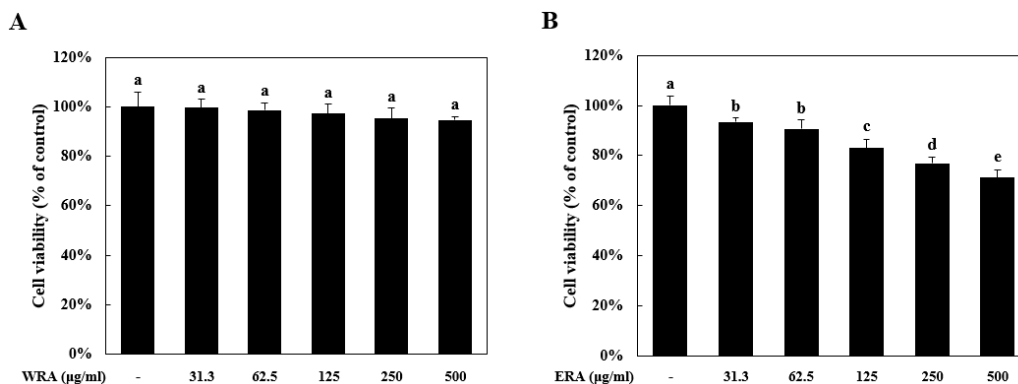


Fig. 2. ERA (ethanol extract of *Rubia akane* Kakai) induced cell death in HCT-116 cells. (A-B) WRA; water extract of Rubiae radix, ERA; ethanol extract of Rubiae radix. HCT-116 cells were treated with various concentration (31.3, 62.5, 125, 250, and 500 µg/ml) for 24 h. Cell viability was measured by MTS assay. Means values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Means with difference letters are significantly different at *p* < 0.05 by Duncan's multiple range test.

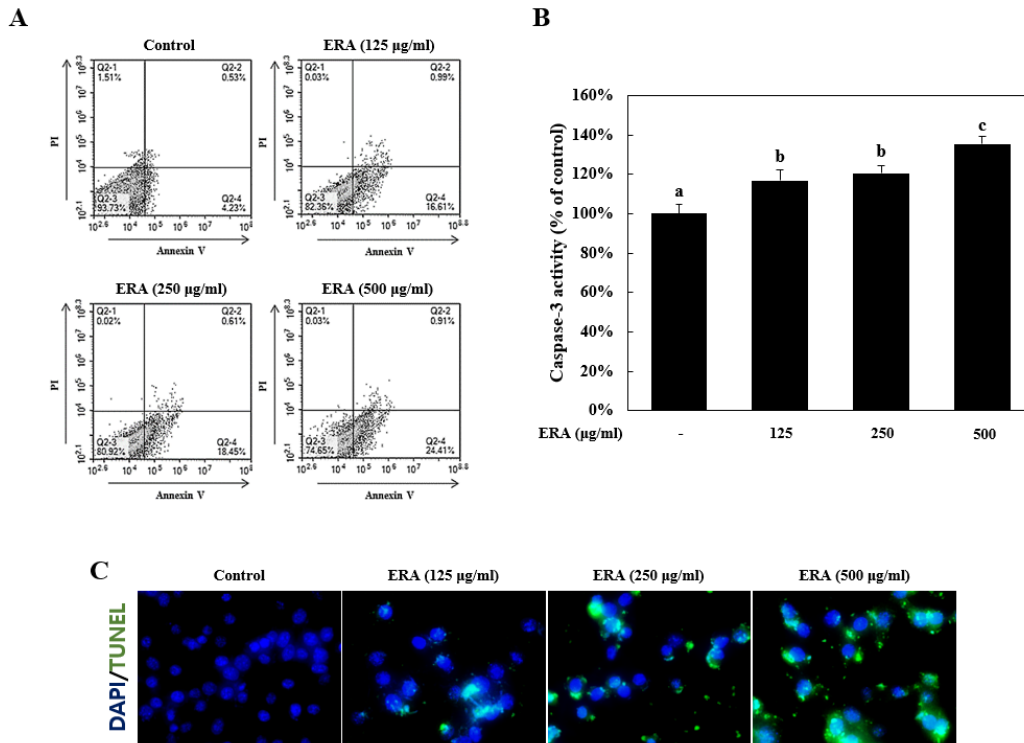


Fig. 3. ERA induced caspase-3 activation and DNA fragmentation during apoptotic cell death in HCT-116 cells. ERA; ethanol extract of *Rubiae radix*. HCT-116 cells were treated with various concentration (125, 250, and 500 µg/ml) for 24 h. (A) Annexin V and propidium iodide staining were analyzed by flow cytometry. (B) Caspase-3 activity was measured by caspase-3 activity assay. and (C) HCT-116 cells visualized by tunel assay. Representative images were taken from at least three independent experiments. Means values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Means with difference letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

개풍속은 항암효과가 매우 뛰어난 것으로 알려져 있으며 (Singh, 2004), 이에 비교하였을 때 천초근 에탄올 추출물의 대장암세포 사멸효과는 개풍속 에탄올 추출물 보다 낮은 것으로 보아 천초근 에탄올 추출물에 존재하는 유효성분을 탐색하는 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

천초근 에탄올 추출물의 HCT-116 세포주에 대한 caspase-3 활성화, DNA 단편화 유도활성

천초근 에탄올 추출물이 HCT-116 세포주에 대해 세포자멸사(apoptosis) 또는 세포괴사(necrosis)를 일으키는지 알아보기 위해, HCT-116 세포주에 ERA를 여러 농도(125, 250, and 500 µg/ml)로 24시간 동안 처리하고, Annexin Vand propidium iodide (PI) 염색을 통해 유세포분석기를 이용하여 세포사의 비율을 확인하였다.

그 결과 500 µg/ml ERA를 24시간 동안 처리하였을 때 apoptotic cell death (apoptosis, Q2-4 + cell death, Q2-2)를

25.32%까지 증가시키는 것으로 확인했다(Fig. 3A).

다음으로 세포사에 관여하는 단백질인 caspase-3의 활성도를 확인한 결과, ERA를 500 µg/ml 농도로 처리하였을 때 정상대조군에 비교하여 135.44 ± 3.65% 까지 증가하였다(Fig. 3B).

앞선 결과와 마찬가지로, DNA fragmentaion을 확인하기 위해 TUNEL 염색을 수행한 결과 ERA를 500 µg/ml 농도로 처리하였을 때 TUNEL positive signal이 가장 많이 나타났다(Fig. 3C).

결과를 종합하면, ERA는 대장암세포주인 HCT-116 세포에 500 µg/ml 농도로 처리될 때 apoptotic cell death와 DNA 단편화 및 caspase-3 활성화를 나타낸다. DNA 단편화(DNA fragmentation)는 apoptosis의 여러 특징 중 하나로 알려져 있으며, 이 과정에는 caspase-3, cytochrome c, and Apaf-1 같은 단백질들이 관여한다고 밝혀져 있다(Kitazumi and Tsukahara, 2010; Zhang and Xu, 2000).

밝혀진 바와 같이 ERA를 처리하였을 때 500 µg/ml 농도에서 apoptosis 뿐만 아니라 caspase-3 활성화와 DNA단편화가 유

도되는 것으로 확인되었으며, 이는 ERA가 HCT-116 세포주에서 apoptosis를 통해 항암효과를 나타내는 것으로 생각된다.

하지만 이는 다른 연구논문들과 비교하였을 때 농도 대비 효과가 미미한 것으로 생각되며, 천초근 에탄올 추출물에 대장암 세포의 성장을 억제하는 유효성분을 찾을 뿐만 아니라 HCT-116 세포를 제외한 다른 대장암 세포주를 이용해 그 효능을 탐색하는 추가적인 실험이 필요할 것이라고 사료된다.

적 요

본 연구는 꼭두서니의 뿌리인 천초근의 물 추출물과 에탄올 추출물을 이용하여 대장암 세포에 대한 암세포 성장 억제 및 사멸효과가 있는지 알아보려고 수행하였다. ERA(천초근 에탄올 추출물)은 폴리페놀($45.77 \pm 2.03 \text{ mg/g}$)과 플라보노이드($22.82 \pm 1.33 \text{ mg/g}$)를 함유하고 있었으며, H_2O_2 에 의해 증가된 ROS (reactive oxygen species)를 억제하는 효과를 나타냈지만 WRA(천초근 물 추출물)은 효과가 없었다. 또한 ERA는 $500 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 대장암 세포주(HCT-116)에 처리했을 때 세포사멸을 유도할 뿐만 아니라 caspase-3 단백질 활성화, DNA fragmentation 및 apoptotic cell death를 일으키는 것으로 확인되었다. 이는 ERA가 HCT-116 세포주에 대해 apoptosis(세포자멸사)를 통해 항암효과를 나타내는 것으로 생각되지만 다른 연구결과들과 비교하였을 때 농도 대비 효능이 미미하다. 따라서 천초근 에탄올 추출물에 대장암 세포의 성장을 억제하는 유효성분을 분석하여 그 효능을 탐색하는 추가실험이 필요할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 한의약의 과학화, 한의약 육성 및 산업진흥을 통해 국민의 건강한 삶과 국가 경제에 기여할 수 있도록 보건복지부 한국 토종자원의 한약재기반구축사업 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

References

Andersen, C., L. Adamsen, T. Moeller, J. Midtgaard, M. Quist, A. Tveteraas and M. Rorth. 2006. The effect of a multidimensional exercise programme on symptoms and side-effects in cancer patients undergoing chemotherapy-the use of semi-structured diaries. *Eur. J. Oncol. Nurs.* 10:247-262.

Anwar, F., S. Latif, M. Ashraf and A.H. Gilarni. 2007. *Moringa*

oleifera : a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother. Res.* 21:17-25.

Bae, J.H., H.J. Jang and J.I. Jung. 2005. Antimicrobial effect of *Rubia akane* Nakai on food-borne pathogens. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34:389-394.

Choi, H.S., J.M. Park, S.M. Ju, S.H. Kim, D.K. Kim, W.S. Kim and B.H. Jeon. 2008. Influence of *Rubiae radix* extract on the mechanism of apoptosis in HL-60 cells. *J. Physiol and Pathol. Korean Med.* 22:548-555.

Folin, O. and W. Denis. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12:239-243.

Horakova, L. 2011. Flavonoids in prevention of diseases with respect to modulation of Ca-pump function. *Interdiscip. Toxicol.* 4:114-24.

Jeong, J.H., W.H. Hwang, S.H. An, H.Y. Jeong, H.S. Lee, J.S. Baek, K.J. Choi, G.H. Lee, J.E. R, N.J. Chung, S.J. Lee and S.J. Yun. 2017. Seed germination, plant growth and antioxidant capacity of *Limonium tetragonum* under different salt concentrations. *Korean J. Plant Res.* 30:364-371.

Kitazumi, I. and M. Tsukahara. 2010. Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *FEBS J.* 278-427-441.

Kwon, H.N., W.S. Bang, J.Y. Kim, J.R. Park and J.R. Jeon. 2011. Effect of *Acer tegmentosum* M. extracts on hepatocarcinoma cell. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43:787-790.

Kwon, H.N., W.S. Bang, J.Y. Kim, J.R. Park and J.R. Jeon. 2011. Effect of *Acer tegmentosum* M. extracts on hepatocarcinoma cell. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43:787-790.

Kim, J.Y., E.J. Jung, Y.S. Won, J.H. Lee, D.Y. Shin and K.I. Seo. 2012a. Cultivated *Orostachys japonicus* induces apoptosis in human colon cancer cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44:317-323.

Kim, D.H., J.H. Park, S.H. Kim and S.H. Sung. 2012b. Case study: regression of a residual tumor and prolongation of overall survival with allergen-removed *Rhus verniciflua* stokes after chemoradiotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *Korean J. Intern. Med.* 36:200-206.

Kim, Y.Z., J.H. Kim, J.Y. Lee, S.E. Park, J.M. Choi and Y.G. Park. 2013. symptoms and initial diagnostic test in colorectal cancer patients. *Korean J. Fam. Pract.* 3:58-64.

Kwon, Y.R. and K.S. Youn. 2014. Antioxidant activity and physiological properties of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves extracts with different solvents. *Korean J. Food Preserv.* 21:831-837.

Kim, B.M., G.T. Kim, E.G. Lim, E.J. Kim, S.Y. Kim, S.H. Ha

- and Y.M. Kim. 2015. Cell cycle arrest of extract from *Artemisia annua* Linne via Akt-mTOR signaling pathway in HCT116 colon cancer cells. Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J. 30:223-229.
- Kim, J.H. and E.J. Kim. 2018. Evaluation of anti-oxidative, anti-thrombin, anti-invasive and pro-apoptotic activities of *Paeonia japonica*. Korean J. Plant Res. 31:16-23.
- Lee, S.E., J.H. Choi, J.H. Lee, H.J. Noh, G.S. Kim, J.K. Kim, H.Y. Chung and S.Y. Kim. 2013. Screening of useful plants with anti-inflammatory and antioxidant activity. Korean J. Plant Res. 26:441-449.
- Lewis, J.K. and W. Addison. 2015. Principles of cancer biology. San Francisco, USA. pp. 11-30.
- Moreno, M.I., M.I. Isla, A.R. Sampietro and M.A. Vattuone. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol. 71:109-114.
- Pandey, K.B. and S.I. rizvi. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human disease. Dxid. Med. Cell Longev. 2:270-278.
- Rhee, S.G. 2006. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signlaing. Science 312:1182-1183.
- Shin, Y.J., D.Y. Jung, H.K. Ha and S.W. Park. 2004. Anticancer effect of *Erythronium japonicum* extract on ICR mouse and L1210 cells with alteration of antioxidant enzyme activities. Korean J. Food Sci. Technol. 36:968-973.
- Singh, N.P. and H.C. Lai. 2004. Artermisinin induces apoptosis in human cancer cells. Anticancer Res. 24:2277-2280.
- Shariati, A., S. Haghighi, S. Fayyazi, H. Tabesh and M.M. Kalboland. 2010. The effect of exercise on the severity of the fatigue in colorectal cancer patients who received chemotherapy in ahwaz. Iran J. Nurs. Midwifery Res. 15:145-149.
- Sim, M.O., H.J. Lee, J.H. Jang, H.E. Lee, H.K. Jung, T.M. Kim, J.H. No, J.K. Jung and H.W. Cho. 2017. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Spiraea prunifolia* Sieb. et Zucc. var. *simpliciflora* Nakai in RAW 264.7 cells. Korean J. Plant Res. 30:335-342.
- Woo, K.W., M.O. Sim, H. Bak, H.K. Jung, B.K. An, S.H. Ham, J.H. Park and H.W. Cho. 2018. Protective effects of flavonoids from *Boehmeria quelpaertense* against H₂O₂-induced cytotoxicity in H9c2 cardiomyblast cells. Korean J. Plant Res. 31:1-9.
- Yu, J.M and H.I. Moon. 2018. Antioxidants and acetyl-cholinesterase inhibitory activity of solvent fractions extracts from *Dendropanax morbiferus*. Korean J. Plant Res. 30:335-342.
- Zhang, J.H. and M. Xu 2000. DNA fragmentation in apoptosis. Cell Res. 10:205-211.

(Received 22 September 2017 ; Revised 11 December 2017 ; Accepted 19 January 2018)