

紫草의 抗癌成分 誘導體 2-thioDMNQ-S160에 관한 연구

송규용 · 이효정 · 길재호¹ · 김성훈*

경희대학교 동서의학대학원 동서중양학과, 1:경희대학교 체육학부 스포츠의학 전공

Study on 2-thioDMNQ-S160, A Derivative of Shikonin, Antitumor Constituent of Lithospermum Erythrorhizon

Gyu Yong Song, Hyo Jung Lee, Jae-Ho Khil¹, Sung Hoon Kim*

Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, 1: Department of Sports Medicine, Kyunghee University

The purpose of this study was to investigate the effect of 2-thioDMNQ-S160, shikonin analogue isolated from Lithospermum Erythrorhizon, on the antitumor activity. In the present study, 2-thioDMNQ-S160 exhibited a significant cytotoxicity against L1210, A549, U937, and B16-BL6 cell lines with IC₅₀s of 2.4ug/ml, 2.0ug/ml, 4ug/ml and 20 ug/ml, respectively. 2-ThioDMNQ-S160 strongly inhibited adhesion of B16-BL6 cells to gelatin and matrigel coated matrices. Also, 2-ThioDMNQ-S160 exhibited anti-invasive effect of B16-BL6 cells. The T/C% was 123 % in 2-ThioDMNQ-S160 treated group in S-180 bearing ICR mice. These results suggested that 2-thioDMNQ-S160 might be a potent candidate of cancer drug.

Key words : Lithospermum Erythrorhizon, cytotoxicity, anti-adhesion, invasion assay, T/C %

서 론

紫草(Lithospermum erythrorhizon)는 芝草, 芝血, 紫根 등으로 부르는 여러해살이풀로 뿌리가 보랏빛이 나므로 紫草라는 이름이 붙은 紫草科(Borraginaceae) 식물로써 그 뿌리를 紫草根이라 한다. 보랏빛 뿌리가 땅 속을 파고 들면서 자라는데, 야생 자초는 나사모양으로 한두 번 뒤틀리면서 자라고 재배하는 것은 바로 자란다¹⁾. 자초는 본초학적으로 氣는 寒無毒 味는 甘하여 涼血活血, 解毒透疹하는 효능이 있어 血熱毒症으로인한 斑疹紫黑과 麻疹不透, 瘡瘍, 濕疹 등에 활용하는 것으로 나타나 있다²⁾. 자초의 주요성분은 shikonin인데, 자연과학적 연구를 통해 shikonin이 항암작용^{3,4,5)}을 비롯한 진통, 해열, 체온강하, 항균작용^{6,7)}, 항알레르기작용⁸⁾, 무릎연변이성⁹⁾등과 같은 다양한 생리활성^{10,11)}을 나타내는 것으로 알려져 있다. 최근에는 이러한 shikonin이 HL-60 암 세포에 대해서 apoptosis를 유발한다고 보고되었지만^{12,13)}, 정상세포에도 영향을 주는 심각한 부작용을 야기하기 때문에 의약품으로의 사용이 불가능한 실정이다. 이에 본

연구는 shikonin의 부작용을 감소시키면서 동시에 항암활성을 증가시킬 수 있는 물질을 찾는 과정에서 shikonin의 구조와 유사한 여러 가지 유도체들을 합성하여, 구조와 활성간의 관계를 살펴보았던 바, 그중 2-thioDMNQ-S160의 항암효과를 우선 보고하는 바이다.

재료 및 방법

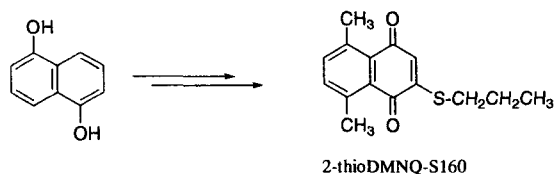
1. 동물 및 약제

동물은 자용 4주령의 ICR(International Cancer Research, U.S.A)계와 C57BL/6계 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 실험당일까지 고형사료와 물을 充分히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하면서, 2 주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. S-180 암세포에 대한 생존비 측정 실험에는 ICR계 생쥐를 사용하였다.

2. 2-thioDMNQ-S160의 합성

1,5-Dihydroxy-1,4-naphthoquinone을 출발물질로 하여 Terada¹⁴⁾ 등의 방법을 변형하여 목적하는 2-thioDMNQ-S160을 합성하였다.

* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서천리, 경희대학교 동서의학대학원
E-mail : sungkim7@khu.ac.kr Tel : 031-201-2179
· 접수: 2002/04/06 · 수정: 2002/05/10 · 채택 : 2002/06/01



3. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), HBSS(Hank's balanced salt solution), glycerol, bromophenol blue, trypsin-EDTA, 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium-bromide(MTT), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma 製品, ethanol, HCl은 Merck 製品, sodium bicarbonate는 Gibco 製品, acetic acid는 Glacial 製品을 각각 使用하였다. 기구는 CO₂ incubator(Vision scientific Co., Model VS-9108 MS), clean bench(Vision scientific Co., KMC-14001), centrifuge(Beckman Co., GS-6R), inverted microscope(Nikon Co., Japan), bright microscope(UFX-DX, Nikon), linear accelerator(Varian Co, U.S.A.), ELISA-reader(Emax, U.S.A), rotary vacuum evaporator(Büchi 461), autoclave(Hirayama, Japan), micropipet(Gilson, U.S.A), autostill WG25(Japan), titer plate shaker(Labline Inst., U.S.A), culture flask(Falcon 3024), multiwell plate(96-well, Falcon), conical tube, disposable pipet(5ml, 10ml, 25ml, Falcon) 및 syringe filter(0.22, 0.45µm, Falcon)등을 使用하였다.

4. 세포배양

In vitro 細胞毒性 測定에는 A549(ATCC CCL-185) 肺癌株, U937(ATCC CRC-1593.2) 血液癌株, B16-BL6(ATCC CRC-6322), 및 L1210(ATCC CCL-219) 암 세포를 使用하였는데 이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 培地에 56°C 水槽에서 30分間 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum(FBS)을 10% 包含하고 1% 抗生劑(penicillin-G 10만units/streptomycin 100mg)와 NaHCO₃ 2g을 添加하여 製造하였다.

5. L1210, U937 癌株에 對한 細胞毒性 測定¹⁵⁾

細胞毒性 實驗에서 logarithmic phase에 도달한 L1210 細胞를 얻기 위하여 實驗 24時間 前에 36~37°C로 加溫한 medium을 넣은 culture dish에 P388 細胞를 2~3×10⁵cells/ml 濃도가 되게 調整하여 1日間 培養시킨 後, 約 0.8~1.0×10⁶cells/ml의 濃도가 되도록 L1210 細胞 懸濁液을 만들었다. 細胞 懸濁液(4×10⁴cells/ml)을 100µl씩 96well plate에 넣고 試料는 實驗하기 바로 전에 培地에 溶解시키고 20分間 sonication한 後 일정농도로 만든 시료용액 100µl를 가하여 실험군으로 하였으며, 대조군에는 懸濁液만을 넣고 37°C, CO₂ incubator에서 48時間 培養 후 MTT법에 의하여 細胞數를 計算하였다.

6. A549, U937, B16-BL6 癌株에 對한 細胞毒性 측정

10% FBS가 첨가된 MEM과 RPMI 1640으로 5% CO₂, 37°C의 조건에서 세포들을 배양하며 사용하였다. In vitro 세포독성 효과를 조사하기 위하여 B16-BL6와 A549 세포는 1×10⁴cells을 U937 cell은 2×10⁴ cells을 일정농도의 2-thioDMNQ-S160과 섞어 well 당 100µl씩 96 well plate에 분주하였다. 이를 48시간 배양한 후 배양액을 모두 버리고 B16-BL6, A549 cell에 MTT(5mg/ml) 10µl씩 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 plate를 PBS로 세척한 후 DMSO 100µl를 넣고 상온에서 20분 방치한 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. B16-BL6 癌株의 附着 阻止 作用 測定¹⁶⁾

0.1% gelatin을 96 well plate에 100µl씩 분주하여 coating 하였다. 이 plate를 4°C에서 12시간 이상 방치한 후 PBS로 3회 세척한 다음 건조시켰다. 각 well에 BSA(10mg/ml)를 100µl씩 분주하여 37°C 배양기에서 1시간 동안 방치한 후 PBS로 동일한 방법으로 세척하였다. 배양한 B16-BL6(5×10⁴ cells)를 각 well에 분주한 후 일정농도의 2-thioDMNQ-S160를 넣고 37°C 배양기에서 배양하였다. 암 세포가 well 바닥면에 붙기 시작할 때 약물과 배지를 모두 제거하고 PBS로 세척한 후 MTT(5mg/ml) 10µl씩 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 plate를 PBS로 세척한 후 DMSO(100µl)를 넣고 상온에서 20분 방치한 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. B16-BL6 invasion assay^{17,18,19)}

Polycarbonate membrane(pore size: 8µm)을 matrigel(50µg)으로 1시간 동안 충분히 코팅 후 24시간 공기 중에서 말렸다. Boyden chamber의 lower compartment에는 0.1% BSA가 들어있는 conditioned media를 30µl씩 분주 하였다. Upper compartment에는 0.1% BSA가 들어있는 B16-BL6 세포 현탁액(1×10⁶)을 FBS가 없는 MEM 배지로 사용하여 cell과 2-thioDMNQ-S160를 섞어 50ul씩 농도별로 분주 하였다. 37°C 5% CO₂ 배양기에서 16시간 배양시킨 후 membrane을 꺼내어 methanol로 고정된 뒤 Diff Quic 용액으로 염색한 후 현미경으로 관찰하여 invasion된 세포를 세었다.

9. S-180 癌細胞에 對한 生存比 測定²⁰⁾

ICR 마우스의 腹腔內에 7日間 培養된 sarcoma 180 細胞를 腹水와 함께 취하여 滅菌된 冷生理食鹽水를 加해 400×g로 2分間 遠心 分離하여 細胞 沈澱物을 分離했다. 分離된 細胞 沈澱物을 冷滅菌 生理食鹽水에 浮遊시켜 다시 遠心分離하여 上澄液을 除去한 後 혼재된 赤血球를 溶血시키고 sarcoma 180 細胞만을 取하였다. 同一한 方法으로 3회 洗滌한 後 hemacytometer로 세어 107cells/ml의 濃도가 되도록 細胞 浮游液을 만들고 이 浮游液을 0.1ml씩 腹腔內에 移植하였다. 移植 後 24時間부터 各 群을 8마리로 配定하였다. 試料는 生理食鹽水로 溶解시켜 保存溶液(12mg/20g/day)을 만든 후 4°C에 保存하였으며 0.2ml씩 經口로 1週日간 連續 投與하였으며 對照群에는 同量의 生理食鹽水液을

投與하였다. 生存比(T/C%)는 美國立 癌研究所 protocol²¹⁾에 及된 식에 따라 計算하였다.

결과 및 고찰

1. 암세포에 대한 세포독성효과

1) L1210 癌株에 대한 세포독성

2-thioDMNQ-S160은 L1210 癌株에 대해서 실험에 사용한 0.5, 1, 2.5 및 5 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 細胞成長率이 各各 85.34 \pm 2.94, 60.05 \pm 1.72, 45.02 \pm 0.89, 10.78 \pm 1.63%로 濃도의존적으로 강한 세포독성을 나타내었다(Table 1).

Table 1. Cytotoxic Effect of 2-thioDMNQ-S160 on L1210 Cells

Concentration($\mu\text{g/ml}$)	Percent of control
Control	100 \pm 3.75 ^{a)}
0.5	85.34 \pm 2.94
1	60.05 \pm 1.72
2.5	45.02 \pm 0.89
5	10.78 \pm 1.63

a) : Mean \pm standard error, Control : Non-treated group.

2) A549 癌株에 對한 세포독성

2-thioDMNQ-S160은 A549 癌株에 대해서 실험에 사용한 0.7, 3.13, 6.25 및 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 細胞成長率이 各各 70.7 \pm 1.64, 38.3 \pm 0.74, 19.1 \pm 1.70, 11.3 \pm 0.08%로 濃도의존적으로 강한 세포독성을 나타내었다(Table 2).

Table 2. Cytotoxic Effect of 2-thioDMNQ-S160 on A549 Cells

Concentration($\mu\text{g/ml}$)	Percent of control
Control	100 \pm 3.74 ^{a)}
0.7	70.7 \pm 1.64
3.12	38.3 \pm 0.74
6.25	19.1 \pm 1.17
12.5	11.3 \pm 0.08

3) U937 癌株에 對한 세포독성

2-thioDMNQ-S160은 U937 癌株에 대해서 실험에 사용한 0.04, 0.7 및 3.12 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 細胞成長率이 各各 61.0 \pm 0.96, 37.6 \pm 0.38, 5.9 \pm 0.67%로 濃도의존적으로 강한 세포독성을 나타내었다(Table 3).

Table 3. Cytotoxic Effect of 2-thioDMNQ-S160 on U937 Cells

Concentration($\mu\text{g/ml}$)	Percent of control
Control	100 \pm 3.60 ^{a)}
0.04	61.0 \pm 0.96
0.7	37.6 \pm 0.38
3.12	5.9 \pm 0.67

4) B16-BL6 癌株에 對한 세포독성

2-thioDMNQ-S160은 B16-BL6 癌株에 대해서 실험에 사용한

6.25, 12.5, 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 細胞成長率이 各各 89.8 \pm 2.16, 73.6 \pm 2.61, 36.5 \pm 1.50, 12.2 \pm 0.07%로 濃도의존적으로 강한 세포독성을 나타내었다(Table 4).

Table 4. Cytotoxic Effect of 2-thioDMNQ-S160 on B16-BL6 Cells

Concentration($\mu\text{g/ml}$)	Percent of control
Control	100 \pm 2.93 ^{a)}
6.25	89.8 \pm 2.16
12.5	73.6 \pm 2.61
25	36.5 \pm 1.50
50	12.2 \pm 0.07

3. B16-BL6 癌株의 附着 阻지효과

B16-BL6 세포의 gelatin과 matrigel로 coating된 well의 바닥면에 대한 附着阻止 實驗을 한 結果, 2-thioDMNQ-S160은 실험에 사용된 세포독성을 나타내지 않는 저농도인 1.56, 3.12, 6.25 및 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 濃度에서 濃도의존적인 細胞附着 阻止效果를 나타냈다(Fig. 1).

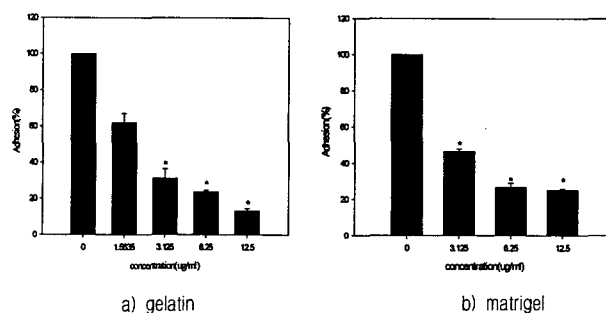


Fig. 1. Inhibitory effect of 2-thioDMNQ-S160 on cell adhesion of B16-BL6 to gelatin and matrigel matrix. 0 : Control, *Statistically significant value compared with control data(*P<0.05)

4. B16-BL6 癌株의 invasion 阻지효과

2-thioDMNQ-S160은 실험에 사용된 세포독성을 나타내지 않는 저농도인 1.56, 3.12 및 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 의 濃度에서 濃도의존적인 invasion 阻止效果를 나타냈다(Fig. 2).

5. S-180이 移植된 생쥐의 生存比에 미치는 效果

2-thioDMNQ-S160 S-180이 移植된 생쥐에 10일간 經口 投與한 後 體重 增加를 測定하였던 바 腹水癌으로 인한 體重 增加는 對照群에서는 癌株 移植 後 18일에 급격히 增加하여 23일에 모두 죽었다. 平均 生存日數에서 對照群의 MST는 19.4日, 2-thioDMNQ-S160 投與群은 23.28日로 나타나, T/C%는 123%로 나타났었다(Table 5).

Table 5. Effect of 2-thioDMNQ-S160 on MST and T/C % in ICR Mice Bearing Sarcoma 180.

Group	No. of animals	MST(day)	T/C(%)
Control	8	19.4	100
2-thioDMNQ-S160	8	23.28	123

MST : 평균수명

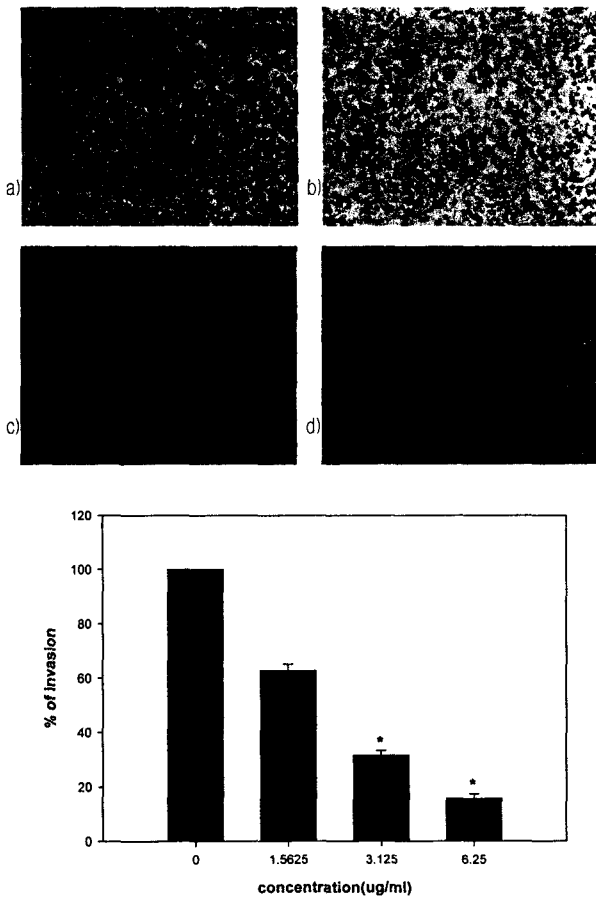


Fig. 2. Inhibitory effect of 2-thioDMNQ-S160 on invasion of B16-BL6 cells. a) : Control, b) : 2-thioDMNQ-S160 treated group(1.56 µg/ml), c) : 2-thioDMNQ-S160 treated group(3.125 µg/ml), d) : 2-thioDMNQ-S160 treated group(6.25 µg/ml), *Statistically significant value compared with control data(*P<0.05)

고찰

수종의 천연식물을 대상으로 암 세포에 대한 세포독성을 관찰한 결과 자초의 뿌리가 강한 세포독성을 나타냄을 발견하였다. 이러한 자초근의 세포독성을 나타내는 주 성분인 shikonin은 독성이 너무 강하여 실제적으로 의약품로의 사용이 불가능 한 바, shikonin 유도체인 2-thioDMNQ-S160을 1,5-dihydrxynaphth-alene으로부터 높은 수율로 합성하였다. 합성한 2-thio-DMNQ-S160의 항암활성을 검토하기 위하여 1차적으로 여러 가지 암 세포에 대한 in vitro 세포독성을 측정 한 결과, 2-thio-DMNQ-S160은 A549, B16-BL6와 같은 고형암에 비해서 마우스 백혈병 세포인 L1210과 사람의 백혈병세포인 U937과 같은 혈액 암에 대해서 강력한 세포독성을 나타냈다(Table 1-4). 특히 U937 암 세포에 대한 2-thioDMNQ-S160의 ED₅₀ 값은 0.7 µg/ml 이하로써 강력한 세포독성 효과를 나타냈다(Table 3). 한편, 이와같은 2-thioDMNQ-S160의 여러 가지 암세포에 대한 직접적인 세포독성 외에 암 치료에 있어서 가장 문제시되고 있는 암 전이에 대한 효과를 관찰하고자 하였다. 암 세포가 primary site에서 떨어져 나와 혈중에서 순환하는 도중 다른 조직으로 전이하기 위하여 1차적으로 혈관벽에 부착한 다음 혈관벽을 뚫고 조직으로

invasion한다. 따라서 본 실험에서는 in vitro에서 B16-BL6 암 세포의 gelatin과 matrigel로 coating된 matrix에 대한 세포附着 抑制 효과를 관찰한 결과, 세포독성을 나타내지 않는 농도인 1.56, 3.12, 6.25 및 12.5 µg/ml와 같은 저농도에서 유의성(P>0.05) 있는 농도의존적인 세포附着 阻止효과를 나타냈다(Figure 1). 또한 in vitro invasion assay 실험에서도 2-thioDMNQ-S160은 실험에 사용된 1.56, 3.12 및 6.25 µg/ml의 농도에서 유의성(P>0.05) 있는 농도의존적인 anti-invasion 작용을 나타냈다. 이러한 결과는 2-thioDMNQ-S160은 암 전이 초기 단계에 작용하므로써 암세포가 다른 조직으로의 전이를 억제한다는 것을 시사하는 결과로써, 향후 in vivo 폐암전이 억제 실험과 같은 추가 실험이 필요하다고 사료된다. 또한 2-thioDMNQ-S160은 이와 같은 암 전이 억제 효과와 더불어 S-180을 암을 이식한 마우스에 대해서 123%의 생명 연장 효과를 나타내었다(Table 5).

결론

자초의 주 성분인 shikonin 유도체인 2-thioDMNQ-S160의 항腫瘍효과를 糾明하고자 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, A549에 對한 附着 阻止作用, B16/BL6의 invasion 억제작용, sarcoma 180에 對한 生命延長率 等を 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다. 2-thioDMNQ-S160은 in vitro 실험에서 고형암에 비해서 L1210 및 U939과 같은 혈액암에 대해서 강력한 세포독성을 나타냈으며, 암세포의 부착 및 invasion을 세포독성이 없는 농도에서 유의성 있게 농도의존적으로 강한 저해작용을 보였고, 123%의 생명연장율을 보여 항암효과를 시사하고 있으나 지속적인 기전연구와 전이 관련 동물실험이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 보건복지부 과제인 한방치료기술 중점공동연구과제(01-PJ9-PG1-01C005-004)와 Brain Korea 21 project의 지원에 의해 수행되었는바 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 이창복,대한식물도감, 향문사,640
2. 감소중의학원편:중약대사전, 下冊,2342,1979
3. Sankawa, U., Ebizuka, Y., Miyazaki, T., Isomura, Y., Otsuka, H., Shibata, S., Inomato, M. and Fukuoka, F. : Antitumor activity of shikonin and its derivatives I. Chem. Pharm. Bull., 25(9), pp.2932-2935, 1977.
4. Sankawa, U., Otsuka, H., Kataoka, Y., Hoshi, Y. A. and Kuretani, K. : Antitumor activity of shikonin and its derivatives II. Chem. Pharm. Bull., 29(1), pp.116-122, 1981.
5. Sankawa, U., Otsuka, H., Kataoka, Y., Hoshi, Y. A. and Kuretani, K. : Antitumor activity of shikonin and its derivatives II. Chem. Pharm. Bull., 29(1), pp.116-122, 1981.

6. Kyogoku, K., Terayama, H., Tachi, Y., Suzuki, T. and Komatsu, M. : Comparison of contents, constituents, and antibacterial effects of fat soluble fraction between nanshikon and koshikon. *Shoyakugaku Zasshi.*, 27, pp.31-36, 1973.
7. Papageorgiou, V. P., Winkler, A., Sagredos, A. N. and Digenis, G. A. Studies on the relationship of structure to antimicrobial properties of naphthoquinones and other constituents of *Alkanna tinctoria.*, 35, pp56-60, 1979.
8. 1,4,5,8-Tetramethoxynaphthalene derivatives를 함유한 약제 : Japan Patent, 61-145147.
9. Tikkanene, L., Matsushima, T., Natori, S. and Yoshihira, K. : Mutagenicity of natural naphthoquinones and benzoquinones in the salmonella/microsome test. *Mutation Research.*, 124, pp25-34, 1983.
10. Hayashi, M. : Pharmacological studies on crude plant drugs, shikon and Tooki. (II). Shikonin and acetylshikonin. *Nippon Yakurigaku Zasshi.*, 73, pp177-191, 1977.
11. Hayashi, M. : Pharmacological studies on crude plant drugs, shikon and Tooki. (II). Shikonin and acetylshikonin. *Nippon Yakurigaku Zasshi.*, 73, pp193-203, 1977.
12. Yoon, Y., Kim, Y. O., Lim, N. Y., Jeon, W. K. and Sung, H. J. : Shikonin, an ingredient of *Lithospermum erythrorhizon* induced apoptosis in HL60 human promyelocytic leukemia cell line. *Planta Med.*, 65(6), pp532-5, 1999.
13. Hashimoto, S., Xu, M., Masuda, Y., Aiuchi, T., Nakajo, S., Cao, J., Miyakoshi, M., Ida, Y. and Nakaya, K. : beta-Hydroxyisovalerylshikonin inhibits the cell growth of various cancer cell lines and induces apoptosis in leukemia HL-60 cells through a mechanism different from those of Fas and etoposide. *J Biochem.*, 125(1), pp17-23, 1999.
14. Terada, A., Tanoue, Y., Hatada, A. and Sakamoto, H. : Synthesis of shikalinal and related compounds. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 60, pp205-213, 1987.
15. Rubinstein, L.V., Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Simmon, R.M., Skehan, P. and Boyd, M.R. : Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 30, p.2418, 1989.
16. Yan, C. and Han, R. Suppression of adhesion-induced protein tyrosine phosphorylation decreases invasive and metastatic potentials of B16-BL6 melanoma cells by protein tyrosine kinase inhibitor genistein. *Invasion Metastasis.*, 17(4), pp189-98, 1997.
17. Yudoh, K., Matsuno, H. and Kimura, T. : alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits in vitro invasiveness through the extracellular matrix and in vivo pulmonary metastasis of B16 mouse melanoma. *J Lab Clin Med.*, 133(2), pp120-8, 1999.
18. Li, D., Yee, J. A., McGuire, M. H., Murphy, P. A. and Yan, L. Soybean isoflavones reduce experimental metastasis in mice. *J Nutr.*, 129(5), pp1075-8, 1999.
19. Kang, Y. H., Kim, W. H., Park, M. K. and Han, B. H. : Antimetastatic and antitumor effects of benzoquinonoid AC7-1 from *Ardisia crispa*. *Int J Cancer.*, 93(5), pp736-40, 2001.
20. Hellmann, K. and Carter, S.K. : *Fundamentals of cancer chemotherapy*, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132 -140, 1987.
21. National Cancer Institute, Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600, *Cancer Chemother. Res. Part 3*, 3, 17, 1972.