

# 승마추출액을 처리한 G361세포에서의 apoptosis 효과에 대한 연구

최별보<sup>1</sup>, 김규천<sup>2</sup>, 홍진우<sup>3</sup>, 박상례<sup>4</sup>

<sup>1</sup>피글, 부산대학교 <sup>2</sup>치의학전문대학원 구강해부학교실, <sup>3</sup>한의학전문대학원 한방내과학교실, <sup>4</sup>경남정보대학교 치위생과

## Effect of apoptosis on G361 cells by *Cimicifuga rhizoma* extract

Byul Bo Ra Choi<sup>1</sup>, Gyoo Cheon Kim<sup>2</sup>, Jin Woo Hong<sup>3</sup>, Sang Rye Park<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Feagle Co., Ltd., <sup>2</sup>Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, <sup>3</sup>Department of Korean Internal Medicine, Pusan National University, Yangsan, <sup>4</sup>Department of Dental Hygiene, Kyungnam College of Information & Technology, Busan, Korea

**Received:** January 29, 2019

**Revised:** March 26, 2019

**Accepted:** April 11, 2019

**Corresponding Author:** Jin Woo Hong  
Department of Korean Internal  
Medicine, Pusan National University, 49  
Busandaehak-ro, Seo-gu, Mulgeum-  
eup, Yangsan 50612, Korea  
Tel: +82-51-510-8481

Fax: +82-51-513-8481

E-mail: jwhong@pusan.ac.kr

https://orcid.org/0000-0002-9517-6513

**Corresponding Author:** Sang Rye Park  
Department of Dental Hygiene, Kyungnam  
College of Information & Technology, 45  
Jurye-ro, Sasang-gu, Busan 47011, Korea  
Tel: +82-51-320-2927

Fax: +82-51-320-2925

E-mail: sanglye5@naver.com

https://orcid.org/0000-0001-5427-0207

**Objectives:** To investigate whether the cytotoxic effect of *Cimicifuga rhizoma* extract is associated with cell death in the human keratinocyte (HaCaT) and human melanoma cell lines (G361).

**Methods:** Apoptosis induced by *Cimicifuga rhizoma* extract was confirmed by water-soluble tetrazolium salts-1 (WST-1) assay, immunocytochemistry, and western blot. Additionally, the release of cytochrome c and apoptosis-inducing factor (AIF) was visualized by confocal laser scanning microscopy.

**Results:** The results showed that *Cimicifuga rhizoma* extract significantly reduced the viability of G361 cells with half-maximal inhibitory concentration (IC 50) of 200 µg/ml, and the apoptotic process was found to occur via the activation of caspase-3 and caspase-9 pathways. Besides, the release of cytochrome c and AIF was also detected.

**Conclusions:** This study suggests that *Cimicifuga rhizoma* extract causes apoptosis of human melanoma cells through the intrinsic apoptotic pathway.

**Key Words:** Apoptosis, *Cimicifuga rhizoma*, Melanoma

## 서론

암은 현대 사회의 악성 신생물을 지칭하는 말로써 정상세포가 여러 자극이나 환경에 의해 변형이 일어나 무제한으로 증식함으로써 변형된 세포 집단을 의미한다. 암은 빠른 성장, 침윤, 그리고 전이 등의 특성을 가지고 있으며 사람에게서 발생 시 사망을 일으키

게 되는 주요 원인이다. 현재 암 발생률은 전 세계적으로 증가하는 추세에 있으며 그 중 악성 흑색종은 피부암 중에서 악성도가 가장 높은 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 악성 흑색종은 표피에 존재하는 멜라닌 세포에서 발생되며 주요 원인으로는 자외선 노출이나 비정형성의 특성을 띠는 색소 모반 등으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 악성 흑색종의 치료 방법은 암 치료법의 기본 술식인 광범위 절제술을 원칙으로 하

며 그 외 화학, 면역, 방사선 치료 등의 부가적인 치료방법을 시행한다<sup>3)</sup>. 그러나, 구강의 경우 절제술로서 치료 시 안면손상으로 인한 환자의 심리적 부담감이 작용하게 되며, 화학적 치료 및 방사선 치료 시 암세포 뿐만 아니라 정상세포까지 손상이 되는 문제가 발생하게 된다<sup>4)</sup>. 이에 암을 치료하기 위한 여러 방법 중 정상세포에 영향을 적게 미치는 세포자연사(apoptosis)를 이용한 연구가 지속되고 있다.

세포사멸 기작은 크게 세포괴사(necrosis)와 세포자연사(apoptosis)로 구분되며, 세포 괴사는 외부 감염이나 독소 등에 의해 염증이 발생하여 세포막이 파괴되는데 최종적으로 세포막 항상성이 소실되어 세포 죽음을 유발한다<sup>5)</sup>. 반면 apoptosis는 특별한 자극 없이 세포 스스로 죽는 현상으로 세포막의 항상성은 유지되며, 조절 이상 시 여러 질병을 유발시킨다<sup>6)</sup>. 세포괴사는 수동적 사멸인 반면 apoptosis는 자연적인 사멸로 능동적인 작용에 의해 발생한다<sup>7)</sup>. Apoptosis가 발생할 시 외인성 경로와 내인성 경로로 구별되어 나타나는데 미토콘드리아를 통한 내인성 경로와 사멸 수용체를 거치는 외인성 경로로 활성화 된다<sup>8)</sup>. 내인성 경로는 미토콘드리아에서 배출된 cytochrome c가 caspase-9를 활성화시키고 그 다음 경로로 caspase-3를 활성화함으로써 여러 apoptosis의 특성을 보여준다<sup>9,10)</sup>.

최근 상대적으로 인체에 안전하며 약물에 의한 부작용이 거의 없는 천연 물질에 대한 관심이 증가하고 있으며, 이에 따라 한약재인 황기<sup>11)</sup>, 황련<sup>12)</sup>, 병풀<sup>13)</sup>, 승마<sup>14)</sup> 등의 추출물을 이용한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 보고에 따르면, 여성 호르몬인 에스트로겐은 유방암 발생에 중요한 역할을 하는데, 호르몬 대체 요법으로 사용되는 승마 추출액이 유방암 세포의 증식을 억제하는 것으로 보고되고 있다<sup>15)</sup>. 또한, 최근 연구에 따르면 승마 추출액이 항염증<sup>16)</sup>, 진통<sup>17,18)</sup> 및 구강 내 세균에 항균효과<sup>19)</sup>가 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 승마 추출액은 염증억제 및 암세포 사멸에도 영향을 주는 것으로 알려져 있으나, 승마 추출물을 이용한 흑색종 암세포와 관련하여 나타나는 효과에 대한 연구는 전무한 실정이다. 그러므로 이번 연구에서는 승마 추출액을 흑색종 세포인 G361 (Human melanoma cell)에 처리하여, 세포의 사멸 효과를 확인하고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 세포주 및 세포배양

실험에 이용한 암 세포와 정상 세포는 흑색종 세포인 G361과

각질 형성 세포인 HaCaT로 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 분양을 받아 실험에 사용되었다. 세포의 배양 조건은 다음의 Table 1과 같다.

### 2. 승마 추출액 처리

승마(화림제약, 부산, 대한민국)는 감압 및 농축 후 동결 건조하여 실험에 사용되었다. 승마를 추출하기 위해 작은 크기로 잘게 자른 다음 실험에 사용될 시료의 5배 부피의 70% 에탄올 용매를 가해 60℃에서 5-8시간 처리하여 상층액을 획득하였다. 그 후, 여과지로 여과한 뒤 감압 농축기(R-114; BÜCHI, Flawil, Switzerland)를 이용하여 50-55℃에서 농축한 다음 Dimethyl sulfoxide (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 0.1 g/ml의 농도로 용해시켜 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 농도는 0, 50, 100, 150, 200, 300 µg/ml로 IC 50 (The half maximal inhibitory concentration)이 나올 수 있는 최적의 농도 범위로 설정하였다. 모든 실험은 실험하기 직전 배지에 희석하여 세포에 처리하였다. 또한 용해된 Dimethyl sulfoxide의 농도는 실험에 사용된 세포의 성장률에 영향을 미치지 않는다는 사실을 확인한 후 실험에 사용하였다.

### 3. 세포 성장률 측정

세포 성장률을 분석하기 위해 G361 세포와 HaCaT 세포를 96-well plate에  $1 \times 10^4$ 으로 분주한 후 24시간 배양하였다. 24시간 배양한 후 실험에 사용될 승마 추출액을 각각의 농도(0, 50, 100, 150, 200, 300 µg/ml)로 처리하였다. 각각의 승마 추출액이 처리된 세포를 24시간으로 배양한 다음 WST-1 용액을 처리하였다. 2-4시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 반응시킨 후 ELISA reader (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)로 450 nm 파장에서 각 샘플의 흡광도를 측정하였다. 실험의 유의한 분석을 위해 독립적으로 세 번씩 시행하고 통계 분석을 시행하였다.

### 4. 면역화학 형광 염색

다른 농도의 승마 추출액을 처리한 세포를 세포원심분리법(cytospin)을 이용하여 코팅된 슬라이드에 부착시켰다. 그 후 고정액인 4% paraformaldehyde 용액을 이용하여 고정 처리하고 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 세척 후 0.1% Triton X-100을 이용하여 세포막을 20분간 투과시켰다. 1차 항체인 AIF (apoptosis inducing factor)와 cytochrome c를 처리하고 4℃의 암실에서 하루 동안 반응시켰다. DPBS로 10분간 3번씩 세척한 후 형광이 부착된 2차 항체(Alexa 488, 594)를 처리하고

**Table 1.** The cell culture condition of G361 and HaCaT cells

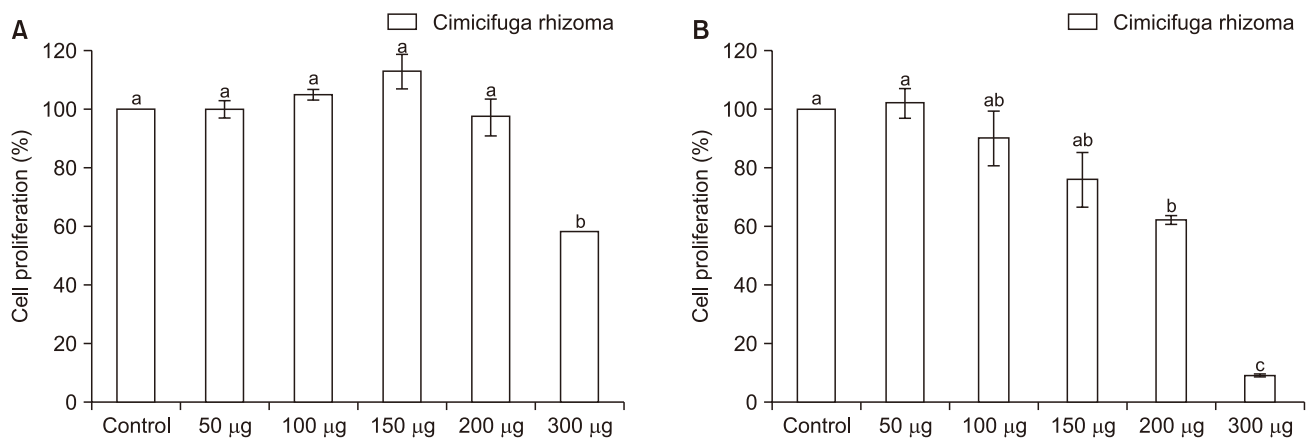
Cell name	Organism	Media	Serum	Antibiotics	Cell condition
G361	Human melanoma cell line	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Fetal Bovine serum (10%)	100X Penicillin-streptomycin (1%)	37℃, 5% CO <sub>2</sub> incubator
HaCaT	Human keratinocyte cell line	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Fetal Bovine serum (10%)	100X Penicillin-streptomycin (1%)	37℃, 5% CO <sub>2</sub> incubator

37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)가 포함된 용액(Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)으로 봉입하였다. 세포의 변화된 모습은 공초점 레이저 현미경 CLSM 700 (Carl Zeiss, Baden-Württemberg, AG, Germany)로 관찰하였다.

## 5. Western blot assay

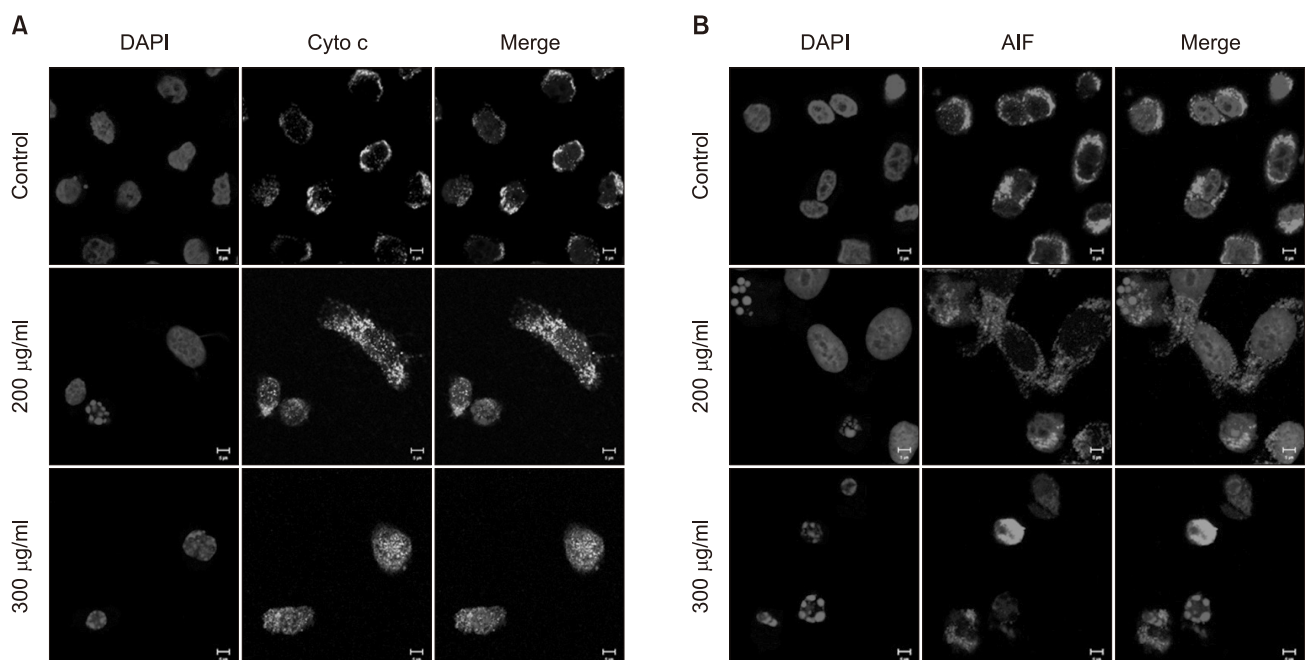
G361 세포를 100  $\phi$  dish에  $1 \times 10^6$ 으로 분주한 후 24시간 배양하였다. 24시간 배양한 후 실험에 사용될 승마 추출액을 각각의 농도(0, 50, 100, 150, 200, 300  $\mu$ g/ml)로 처리하였다. 24시간 이

후 DPBS로 세척하고, 세척한 세포들을 lysis buffer에 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 원심 분리를 하여 상층액에 있는 추출된 단백질을 따로 분리했다. 각 단백질의 농도는 Bradford assay를 통해 595 nm에서 정량하였다. 동량 단백질의 sample을 만든 후 6-15% polyacrylamide SDS gel을 이용해 전기영동으로 분리하고 PVDF (Polyvinylidene difluoride) membrane으로 전이시켰다. 전이시킨 PVDF membrane은 각각 1차, 2차 항체를 처리하고 특정 단백질의 발현 양을 ImageQuant LAS 4000 (GE, Piscataway, NJ, USA)를 통해 이미지화하고 분석하였다.

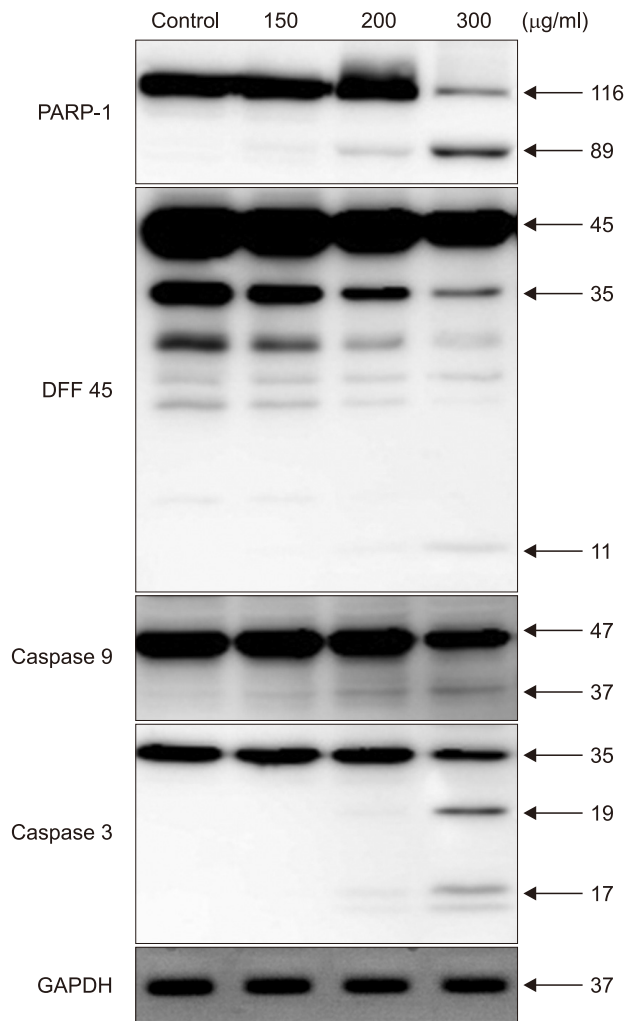


**Fig. 1.** Effects of *Cimicifuga rhizoma* in HaCaT (A) and G361 cells (B). Cell viability was measured by WST-1 assay ( $P < 0.05$ ).

<sup>a,b,c</sup>The same character indication shows that there is no statistical significance.



**Fig. 2.** Cytochrome c (A) and AIF (B) release visualized by confocal immunofluorescence microscopy.



**Fig. 3.** The total protein lysates were used for SDS-PAGE followed by western blot analysis. Antibodies against PARP-1, DFF 45, caspase-9, and caspase-3 were used.

## 6. 통계 분석

승마추출물이 처리되지 않은 대조군과 처리된 실험군의 결과는 통계분석 소프트웨어인 IBM SPSS Statistics 24.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 검정하였다. 정규분포를 따르지 않은 각 군들을 비교하기 위해 비모수 검정 방법으로 Kruskal-Wallis 분석법을 이용하였고, 유의수준은 0.05로 하였으며, 사후 분석은 Tukey test를 이용하였다.

## 연구 성적

### 1. HaCaT와 G361 세포에서 승마 추출액이 생존율에 미치는 영향

HaCaT와 G361 세포에 승마 추출액을 처리하여 세포 증식 및 생존율에 미치는 영향을 WST-1 분석을 통해 관찰하였다(Fig. 1). Fig. 1과 같이 G361 세포에서는 각각  $100 \pm 0$ ,  $102 \pm 5$ ,  $91 \pm 9$ ,  $76 \pm 9$ ,  $65 \pm 1$ ,  $9 \pm 1\%$ 으로 처리 농도에 따라 유의하게 감소하였고,

HaCaT 세포에서는 각각  $100 \pm 0$ ,  $105 \pm 3$ ,  $113 \pm 2$ ,  $106 \pm 6$ ,  $97 \pm 6$ ,  $58 \pm 0\%$ 의 세포 생존율을 보였다. 이번 연구 결과, G361 세포에 승마추출액을 처리 시 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의하게 생존률이 감소하며, 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 IC 50의 값을 나타내었다. 하지만 HaCaT 세포에서는 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 생존률이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다.

### 2. 승마 추출액이 G361 세포에 미치는 영향

승마 추출액이 G361 세포에 미치는 영향을 알아보고자 면역화학형광염색법, western blot assay를 시행하였다. 그 결과 원래 정상적인 세포 활동을 하는 미토콘드리아에 위치하고 있는 cytochrome c와 AIF가 apoptosis에 의해 핵이나 세포질로 이동한다는 사실을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 이는 승마 추출액이 G361 세포에서 apoptosis를 일으킨다는 사실을 시사하고 있다. 이에 apoptosis가 caspase의 활성화에 의한 것인지 확인하기 위해 western blot assay를 이용한 단백질 분석을 시행하였다. Apoptosis의 최종 산물로 알려진 caspase 3, 그 기질인 PARP-1 (Poly [ADP-ribose] polymerase 1), caspase 3의 전 단계인 caspase 9, 그리고 caspase 3의 표적 기질인 DFF 45 (DNA fragmentation factor 45)를 확인하였다. PARP-1은 각각 116 kDa와 89 kDa으로 분절되었으며, DFF 45는 45 kDa, 35 kDa, 11 kDa으로, Caspase 9는 47 kDa, 37 kDa으로, caspase 3는 35 kDa, 19 kDa, 17 kDa으로 각각 깨어짐을 확인하였다(Fig. 3).

## 고 안

한의학적인 암치료를 위한 한방 추출물이 최근 각광받고 있으며, 그 중 승마는 약 2,000년 전부터 써왔던 한약재로써 항면역, 항산화, 항보체 활성화의 특성을 가지며 미백 효과도 뛰어나 화장품으로도 쓰이고 있다<sup>20)</sup>. 그러나, 승마는 만성적 질환과 대사성 질환에 효과적이라 알려져 있으나, 아직까지 정확한 구강암과 관련한 작용 기전은 알려져 있지 않다. 환자가 구강암에 이환되어 약물치료나 방사선 치료를 시행할 경우 다양한 부작용이 발생되며, 외과적 절제술로써 조직을 제거할 경우 구강 악안면 구조가 결손되어 저작이나 발음 시 불편감 및 심리적 상실감을 초래하게 된다. 그러므로 구강암 세포를 제거하기 위해 정상조직을 파괴하지 않으면서 암세포에만 효과를 나타내는 것이 매우 중요하다. 암 세포를 사멸시키기 위해 소목<sup>21)</sup>, 황련<sup>22)</sup>, 녹차<sup>23)</sup> 등의 천연 추출물을 이용하여 apoptosis 이전에 대한 암 세포 치료 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 이번 연구는 pro-apoptosis 단백질인 apoptosis-inducing factor (AIF), caspase 3, caspase 9 및 DNA fragmentation에 관여하는 DFF 45 단백질 발현 정도를 확인 하고자 하였다. 승마 추출액이 HaCaT 세포와 G361 세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 농도별로 처리한 결과, HaCaT 세포에서는 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군과 비교 시 증식률에 차이가 없었다. 그러나 G361 세포에서 농도 의존적으로 승마 추출액 처리 시 유의하게 세포의 증식률이 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 승마 추출액이



정상세포에는 독성효과를 나타내지 않고 암 세포에만 선택적으로 독성효과를 나타내는 것으로 생각된다.

승마 추출액이 G361 세포에서 apoptosis 과정에 의하여 사멸되는지 확인하기 위하여 승마 추출액 200 µg/ml의 농도에서 pro-apoptosis 단백질 발현정도를 확인하였다. 그 결과 세포의 DNA 손상 시 발생하는 cytochrome c 및 미토콘드리아의 파괴로 인한 AIF 단백질이 세포질과 핵으로 유리되어 최종적으로 caspase 3와 9가 활성화되어 apoptosis를 유발시키는 것을 확인하였다. DNA 손상을 감지하는 PARP-1의 경우 세포 DNA 손상 시 NF-κB를 활성화시켜 복구하는 작용을 하나, 이번 실험 결과 G361 세포에 승마추출액 처리 시 농도 의존적으로 발현이 감소함을 확인하였다. Caspase는 apoptosis를 유도하는데 핵심적인 역할을 하는 효소로서 apoptosis가 진행시 활성화되고, 조절 단백질인 caspase-9가 활성화 되면 연속적으로 caspase-3을 활성화시키며, caspase-3는 apoptosis에서 가장 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다<sup>24)</sup>. 승마 추출액 처리 시 세포질에서 caspase-3가 활성화되어 DNA 복구에 관여하는 PARP-1 비활성화가 시작되어 DNA 분절화를 일으키는 것을 관찰하였다. DNA 분절화는 caspase 3가 활성화되어 DFF 45가 절단되며, cell condensation과 DNA fragmentation이 유도되어 apoptosis가 나타나는 현상이며, 승마 추출액이 암세포 성장 및 증식 억제에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 승마 추출액이 세포 사멸의 중요한 단백질인 caspase 경로를 통해 세포사멸을 유도할 수 있음을 확인하였다.

이번 연구 결과는 승마 추출액이 구강암 세포인 G361 세포에서 apoptosis를 유발시킬 수 있음을 제시한다. 그러나 실험 시 사용된 시편 및 사용한 세포의 종류가 제한적이고, 승마 추출액이 단일 성분만을 추출하지 않은 혼합 추출물로서 승마 추출액의 성분에 대한 추가실험과 후속연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결론

이번 연구에서는 흑색종 세포인 G361에서 한방추출물인 승마 추출액이 미치는 영향을 알아보고자 하였으며, 다음과 같은 결과를 확인하였다.

1. 승마 추출액 200 µg/ml이 처리된 군에서 유의하게 생존률이 감소하며, 농도 의존적으로 현저한 세포 감소 형태를 보였다.
2. AIF와 cytochrome c가 미토콘드리아에서 각각 핵과 세포질로 위치이동을 하였고, apoptosis의 필수적인 역할을 하는 PARP-1, DFF 45, caspase 9, 그리고 caspase 3가 분절화 되어 활성화되는 경향을 관찰하였다.

이상의 결과, 승마 추출액은 흑색종 세포에서 생존 억제 효과를 나타내며, 이는 apoptosis의 경로로 파악된다. 이는 승마 추출액이 항암제로 사용될 수 있는 근거자료로서의 가능성을 보이는 것으로 사료된다.

## Acknowledgements

This work was supported by clinical research grant from Pusan National University Hospital in 2018.

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIP) (No. NRF-2017R1A2B4006654).

## ORCID

Byul Bo Ra Choi, <https://orcid.org/0000-0001-7134-9734>

Gyoo Cheon Kim, <https://orcid.org/0000-0003-3568-3529>

## References

1. Chung SH, Jo HI. The analysis of post operative treatment of malignant melanoma using high dose interferon-α2b immunotherapy: preliminary report. J Korean Bone Joint Tumor Soc 2012;18:78-82.
2. Lee SJ, Chae YS. New systemic treatment for malignant melanoma. Korean J Med 2013;85:357-363.
3. Kim SH, Chung SH. Comparison of high dose interferon-α2b immunotherapy and dacarbazine chemotherapy as postoperative treatment of malignant melanoma. Korean Orthop Assoc 2016;51:426-431.
4. Sohn HO, Park EY, Jung YS, Lee EK, Lee HK, Kim EK. A study on oral health-related quality of life following radiotherapy in patients with head and neck cancer. J Korean Acad Oral Health 2017;41:110-115.
5. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infect Immun 2005;73:1907-1916.
6. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007;35:495-516.
7. Kang SW. Role of reactive oxygen species in cell death pathways. Hanyang Med Rev 2013;33:77-82.
8. Soung YH, Lee JW, Kim SY, Nam SW, Park WS, Lee JY, et al. Mutational analysis of proapoptotic bcl-2 family genes in colon carcinomas. J Pathol Transl Med 2005;39:168-171.
9. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. BMC Cell Biol 2013;14:32.
10. Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, et al. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. Oncotarget 2017;8:23996-24008.
11. Bae HK, You SH. Biological activity study on anti-oxidant, whitening, and anti-inflammatory effects of astragalus membranaceus ethanol extracts and bioconversion extracts. Asian J Beauty Cosmetol 2017;15:489-499.
12. Cha HY, Ahn SH, Jeong AR, Cheon JH, Park SY, Choi JY, et al. Anti-inflammatory effects of hataedock extracted from coptidis rhizoma and glycyrrhiza uralensis on atopic dermatitis-like skin lesions of NC/Nga mouse. J Int Korean Med 2015;36:486-497.
13. Goo YM, Kil YS, Sin SM, Lee DY, Jeong WM, Ko KH, et al. Analysis of antibacterial, anti-inflammatory, and skin-whitening effect of Centella asiatica (L.) Urban. J Plant Biotechnol 2018;45:117-124.
14. Jeong SH, Lee JE, Kim BB, Ko Y, Park JB. Evaluation of the effects of Cimicifugae rhizoma on the morphology and viability of mesenchymal stem cells. Exp Ther Med 2015;10:629-634.

15. Hostanska K, Nisslein T, Freudenstein J, Reichling J, Saller R. Cimicifuga racemosa extract inhibits proliferation of estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 2004;84:151-160.
16. Jeong SH, Guo H, Kim HY, Park JB. Ethanol extract of Cimicifugae rhizoma exerted more potent anti-inflammatory and tumor suppressor activities compared with methanol and water extracts. *Biomed Res* 2016;27:1054-1059.
17. Li JX, Yu ZY. Cimicifugae rhizoma: from origins, bioactive constituents to clinical outcomes. *Curr Med Chem* 2006;13:2927-2951.
18. Kim SJ, Kim MS. Inhibitory effects of Cimicifugae rhizoma extracts on histamine, bradykinin and COX-2 mediated inflammatory actions. *Phytother Res* 2000;14:596-600.
19. Jeong SH, Lee JE, Kim BB, Ko Y, Park JB. Evaluation of the effects of Cimicifugae rhizoma on the morphology and viability of mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med* 2015;10:629-634.
20. Lee JE, Kim BB, Ko Y, Jeong SH, Park JB. Effects of Cimicifugae rhizoma on the osteogenic and adipogenic differentiation of stem cells. *Exp Ther Med* 2017;13:443-448.
21. Lee JS, Kim JH, Kim YG. Anticancer effects of caesalpinia sappan extracts on oral carcinoma and osteosarcoma cells. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2007;33:583-590.
22. Yoo TM, Kim BS, Yoo BC, Yoo HS. Monitoring the change of protein expression in human colon cancer cell SNU-81 treated with the water-extract of coptis japonica. *J Pharmacopuncture* 2009;12:5-12.
23. Fujiki H, Watanabe T, Sueoka E, Rawangkan A, Suganuma M. Cancer prevention with green tea and its principal constituent, EGCG: from early investigations to current focus on human cancer stem cells. *Mol Cells* 2018;41:73-82.
24. Lee JH, Hong SH, Han MH, Jin CY, Choi BT, Choi YH. Apoptosis by Quercetin through induction of Bax and activation of Caspase in human lung carcinoma cells. *Cancer Prev Res* 2008;13:169-176.