

Epigallocatechin gallate의 인체 피부흑색종세포와 인체 구강유상피암종세포에 대한 성장억제효과

한두석 · 박승택* · 백승화**

*원광대학교 치과대학 구강해부학교실, 의과대학 해부학교실,

**자연과학대학 화학과

(1998. 3. 13 접수)

The Growth Inhibitory Effects of Epigallocatechin Gallate Against Human Skin Melanoma Cells and Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells

Du Seok Han, Hong Seok Yang, Seung Taek Park* and Seung Hwa Baek**

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry

*Department of Anatomy, School of Medicine

**Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

ABSTRACT : Epigallocatechin gallate (EGCG) was reported to exert weak cytotoxicity against normal healthy cells such as C3H10T1/2 cells, but profound inhibitory effects on the initiation or promotion stage of chemical carcinogenesis in mammary gland, blood and mouse skin. This study was carried out to develop antitumor agents with weak side effects and strong antitumor activity. Human skin melanoma cells (HBT 69) and human oral epitheloid carcinoma cells (OCL 17) were cultured in RPMI-1640 media containing 10% fetal bovine serum, antibiotic, and fungizone. After incubation for 24 hrs, the cells were treated with various amounts of (EGCG) for 48 hrs. The growth inhibitory effects of EGCG in human oral epitheloid carcinoma cells were evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di phenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), neutral red (NR), and sulforhodamine B protein (SRB) assays of colorimetric methods. The light microscopic study was also carried out to observe morphological changes of the treated cells. These results obtained were as follows;

1. Significantly inhibitory effects of EGCG against cultured human oral epitheloid carcinoma cells.
2. Significantly inhibitory effects against cultured human skin melanoma cells treated with 50 μ M EGCG, but decreased inhibitory effects in 100 μ M EGCG.
3. Degenerative changes against cultured human oral epitheloid carcinoma cells.
4. Degenerative changes against human skin melanoma cells treated with 50 μ M EGCG, but recovered degenerative changes in 100 μ M EGCG.

Keywords : Epigallocatechin gallate, MTT assay, NR assay, SRB assay, Colorimetric method.

서 론

암은 세포의 증식과 분화의 기본 규칙을 따르지 않는 질병이다. 구강암은 인체에서 발생하는 전체 암종의 5%를 차지하

며 이 중 90% 이상은 편평세포암종이다. 구강암의 원인은 아직까지 명백하게 밝혀지지 않았으나 흡연, 음주, 부적절한 보철물, 바이러스 감염 및 전신질환 등이 요인으로 보고되었고 (Binnie *et al*, 1983), 구강편평상피세포암으로 확진을 받은 환

¹To whom correspondence should be addressed.

자들의 예후는 나빠서 3년 생존율은 43.5%이고 5년 생존율은 26.1%였다고 우리나라에서 보고하였다(정인교 등, 1996). 차에 대한 연구는 그 내용성분에서부터 인체에 대한 항암작용 규명뿐만 아니라 그 이용성에 이르기까지 연구가 활발히 진행되고 있다(나효환 등, 1992; Harold *et al.*, 1992; Mukhtar, *et al.*, 1994). 녹차의 성분 (Yosioka, *et al.*, 1970; Yosioka, *et al.*, 1971; 나효환 등, 1992)과 항암활성에 관한 연구도(Liao, *et al.*, 1995; Yamane, *et al.*, 1995; Stoner, *et al.*, 1995) 국제적으로 다양하게 이루어지고 있다. 녹차잎에 존재하는 tea catechin의 일종인 EGCG는 항돌연변이 활성작용, 항균작용, 저콜레스테롤 작용, 산화방지작용(antioxidant), 항암작용(antitumor activity) 및 암예방 작용(cancer preventive activity) 등이 밝혀지고 있어 (Valicic, *et al.*, 1996) 이에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있으나 구강암에 대한 연구는 없는 실정이다. Han(1997)은 V79세포를 이용하여 항돌연변이 활성을 측정할 결과 EGCG는 화학물질에 의한 발암과정의 초기(initiation stage)와 증식기(promotion stage)에 다른 녹차 성분에 비하여 가장 강한 효과가 나타났으며, Hirose(1997)등은 흰쥐의 유선에 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)를 처리한 후, 36주동안 관찰한 결과 발암과정의 초기 증식기(early promotion stage)에 EGCG는 강한 억제효과가 있으나, 진행기(progressive stage)에는 효과가 없었다고 보고하였다. 한편 Ariza(1996)등은 DMBA와 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)를 처리한 후 SENCAR생쥐에서 획득한 AS52 암세포주에 EGCG를 처리하면 항산화제(antioxidant)가 증가하여 암세포의 증식을 억제한다고 보고 하였다. 이에 본 연구는 EGCG를 인체 구강유상피암세포에 적용하여 일정한 조건에서 배양하면서 항암활성을 측정하기 위하여 일반적으로 검색에 많이 이용되는 MTT정량분석법, NR정량분석법 및 SRB정량분석법을 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

시약

EGCG는 일본의 MITSUI NORTIN사에서 제조한(Fig. 1) 상품을 사용하였다. 세포배양에 사용한 RPMI 1640, fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin 및 fungizone 시약은 Gibco제 GR급이었으며, MTT정량분석법, NR정량분석법 및 SRB정량분석법에 사용한 시약은 Sigma사에서 구입하였으며, 증류수는 3차 증류하여 사용하였다.

실험기기

세포의 배양은 CO₂ incubator (Shellab Co., USA)를 사용하

였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은 도립현미경 (Inverted microscope, Olympus)을 사용하였다. MTT정량분석법, NR정량분석법 및 SRB정량분석법은 ELISA reader (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices Co., USA)를 사용하였다.

시료의 처리

사용직전에 EGCG (Mitsui Nordin Co., USA) μ M농도로 조절하여 사용하였다.

세포배양

인체 구강유상피암종세포(OCL-17)는 항암활성을 측정하기 위하여 RPMI 1640(Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum (Gibco, USA)과 항생물질을 첨가하여 배양하였다. 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기(CO₂ incubator, Shellab, USA)를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여 Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2×10^4 cells/ml 되도록 세포부유액을 만들었다. 세포배양용 24 well multidish (Nunc, USA)에 상기 세포부유액을 well당 2 ml씩 분주하고, 24시간 배양한 후 추출액과 EGCG를 1 ml 첨가하여 배양하였다.

MTT 정량분석법

Mosmann의 방법(1983)에 의하여 세포를 EGCG가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT(Sigma) 50 μ g/ml가 포함된 배양액을 well당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온방치하여 MTT formazan을 용해한 후 ELISA reader(540 nm)로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

NR정량분석법

Borenfreund와 Puerner의 방법(1984)에 의하여 인체 구강유상피암종세포를 배양용기당 2.0×10^4 cells/ml이 되도록 24 well multidish에 분주하여 24시간 배양 후, EGCG가 첨가된 배양액으로 교환하고, 48시간 동안 배양한 다음 50 μ g/ml이 neutral red(Sigma)가 포함된 배양액을 37°C 어두운 곳에서 overnight 시킨 후, well당 1 ml씩 넣어 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료후 배양액을 버리고 phosphate buffered saline (PBS)으로 2-3회 세척한 다음, 1% formaldehyde-1% CaCl₂를 넣어 실온에 방치하여 3시간동안 용해소체내에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR의 흡광도를 ELISA reader (550 nm)로 측정하여 대조군과 비교하였다.

SRB정량분석법

Skehan *et al.*, (1990)의 방법에 따라 세포를 EGCG가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후 배양액을 버리고, 5회 세척한 후 0.4% sulforhodamine B (SRB)를 200 µl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음, 1% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조하였다. 10 mM Tris base[tris(hydroxymethyl)aminomethane]에 결합된 protein stain을 녹인후 ELISA reader (540 or 510 nm)로 측정하여 대조군과 비교하였다.

세포의 형태학적 관찰- 광학현미경적으로 세포를 관찰하기 위하여 인체 구강유상피암종세포는 MTT정량 방법으로 처리한 후, MTT흡수능을 측정하기 전에 도립현미경 (Inverted microscope, Olympus)으로 관찰하였다.

통계처리

실험결과의 통계처리는 Student's t-test에 준하였고, P-value가 0.05이하일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

녹차잎의 성분 중 tea catechin의 일종인 EGCG가 발암초기 (initiation stage)와 증식기(promotion stage)에 억제효과가 있는 것으로 밝혀지고 있으나, 구강편평상피암에 대한 효과에 관하여는 보고된 바 없고, 그동안 본 연구실에서 구강암세포와 비교하기 위하여 실험에 사용하여온 인체 피부흑색종세포(HTB 67)와 인체 구강유상피암종세포(OCL 17)에 EGCG의 µM농도를 증가시키면서 처리한 후, 48시간이 지난 다음 MTT정량분석법, NR정량분석법 및 SRB정량분석법으로 흡광도를 측정하고, 광학현미경적으로 관찰한 결과는 Table 1~3과 사진 1~4와 같다.

MTT분석에 의한 실험결과는 Table 1에서 보는 바와 같이, EGCG는 인체 피부흑색종세포와 인체 구강유상피암종세포에

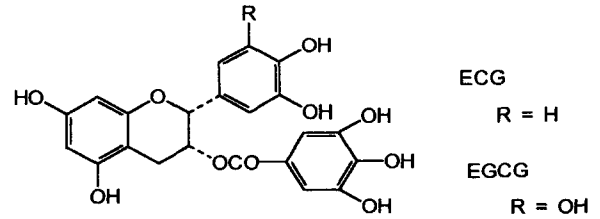


Fig. 1. The chemical structures of ECG and EGCG.

대하여 EGCG 1 µM과 25 µM MTT농도에서 유의적인 항암 활성을 보이지 않았으나, EGCG는 인체 피부흑색종세포에 대하여 50 µM농도에서부터 MTT량을 통계적으로 유의하게 감소시키기 시작하여 100 µM농도에서는 오히려 50 µM농도에서보다 MTT량이 더욱 감소하였으며, MTT50은 166.10 µM이었다. 인체 구강유상피암종세포에 대하여는 50 µM농도와 100 µM농도에서 통계적으로 유의한 감소(P<0.001)를 나타내어 EGCG량이 증가하면 MTT량은 감소하여 MTT50은 77.14 µM이었다. NR정량에 있어서도 MTT정량에서와 유사한 결과가 나타났다. EGCG는 인체 피부흑색종세포에 대하여 50 µM농도에서 NR량을 통계적으로 유의하게 감소시켰으나, 100 µM농도(P<0.001)에서는 50 µM농도에서 보다NR량의 감소현상이 증가하였고, NR50은 123.72 µM이었다. 인체 구강유상피암종세포에서는 50 µM농도와 100 µM농도에서 통계적으로 유의하게 감소하여 NR50은 78.89 µM이었다, MTT정량분석법에서와 같이 EGCG의 농도가 증가함에 따라 NR량이 감소하였으며, 1 µM과 25 µM에서는 유의한 억제효과를 볼 수 없었다. (Table 2). SRB정량에 있어서도 MTT정량과 NR정량에서와 같이 50 µM농도에서 인체 피부흑색종세포의 SRB량을 통계적으로 유의하게 감소시켰으나, 100 µM농도에서는 정량을 측정할 값과는 달리 50 µM농도에서보다 증가시켰는데 SRB 50은 357.23 µM이었다. 인체 구강유상피암종세포에서는 50 µM농도와 100 µM농도에서 통계적으로 유의하게 감소하였는

Table 1. The Results of MTT Assay on the Antitumor Activity of EGCG

EGCG Concentration (µM)	Human Skin Melanoma Cells MTT	Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells
	Mean ± S.D.* (% of control)	Mean ± S.D.* (% of control)
Control	3.25 ± 0.13 (100.0)	3.20 ± 0.15 (100.0)
1	2.64 ± 0.11 (89.1)	3.05 ± 0.35 (95.2)
25	2.77 ± 0.11 (85.2)	2.36 ± 0.40 (73.7)
50	2.56 ± 0.03* (78.8)	1.57 ± 0.24*** (48.9)
100	1.20 ± 0.05*** (36.8)	1.49 ± 0.11*** (46.6)
MTT ₅₀	166.10	17.14

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with Trypsin-EDTA.

*The values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value:

*P < 0.05, ***P < 0.001 (Student's t-test).

Table 2. The Results of NR Assay on the Antitumor Activity of EGCG

EGCG Concentration (μM)	Human Skin Melanoma Cells		Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells	
	NR quantity		NR quantity	
	Mean \pm S.D.* (% of control)		Mean \pm S.D.* (% of control)	
Control	1.34 \pm 0.28 (100.0)		2.00 \pm 0.25 (100.0)	
1	1.06 \pm 0.09 (79.0)		2.33 \pm 0.31 (116.2)	
25	0.98 \pm 0.16 (72.8)		2.18 \pm 0.09 (109.1)	
50	0.88 \pm 0.18* (65.6)		1.17 \pm 0.21* (58.3)	
100	0.49 \pm 0.12** (36.5)		0.73 \pm 0.10*** (36.3)	
NR ₅₀	123.72		78.89	

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with Trypsin-EDTA. *The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Student's t-test).

데, SRB50은 467.66 μM 이었다 마찬가지로, 1 μM 과 25 μM EGCG에서 항암활성에 대한 유의성이 나타나지 않았다. (Table 3). 위의 결과에서 EGCG는 인체 피부흑색종세포에 대하여는, 100 μM 농도에서는 억제효과가 떨어지는 경향이였으며, 인체 구강유상피암종세포에 대하여는 EGCG의 농도를 증가하면 세포의 기능이 저하하는 것으로 나타났다. 위의 세 가지(MTT,NR,SRB)정량 분석법에 의한 결과로부터, EGCG의 농도 50 μM 와 100 μM 에서 인체 피부흑색종세포와 구강유상피세포에 대하여 통계적으로 유의적인 항암활성을 나타냄을 알 수 있었다(백순옥등, 1998). 한편, 각 정량분석들간의 P값을 비교해 볼 때, SRB 정량 분석법엿 가장 유의성이 높은(P < 0.001)결과를 보였으므로, EGCG가 인체의 피부흑색종 세포에 미치는 항암효과를 평가하는데에 SRB정량 분석법이 MTT나 NR정량 분석법보다도 예민함을 알 수 있었다(백순옥 등, 1998). 그러나 인체 구강유상피암종 세포에 미치는 항암효과를 평가하는데에 MTT정량분석법이 SRB나 NR정량 분석법보다도 예민함을 알 수 있었다. 24시간 배양한 인체 구강유

상피암종세포는 well바닥에 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로 빈틈없이 부착하고 있었으며, 72시간후에는 여러형태의 세포들이 층을 이루고 있었다(사진 1, 2). 100 μM EGCG를 인체 피부흑색종세포에 처리한 well에서는 세포의 형태가 대조군의 형태로 회복되는 경향이였다 (사진 3). 100 μM EGCG를 인체 구강유상피암종세포에 처리한 well에서는 여러 형태의 위축된 세포들이 관찰되었다(사진 4). 이와 같은 다양한 연구에도 불구하고 생쥐의 피부암에 대한 항암효과가 보고되어 있을뿐 인체 피부암세포와 인체 구강암세포에 관한 연구는 없는 실정 이어서, 본 연구에서는 인체 피부흑색종세포와 인체 구강유상피암종세포에 EGCG를 적용한 후, 암연구에 검색방법으로 많이 이용되고 있는 MTT정량분석법, NR정량분석법 및 SRB정량분석법을 이용하여 각각의 흡광도를 측정하고 세포의 광학현미경적 관찰을 실시한 결과, 두세포 모두에 대하여 MTT흡광도와 NR흡광도를 Borenfreund(1984)등의 판정기준에 의하면, 고독성 또는 중간독성으로 판정할 수 있었고 SRB흡광도에서는 인체 구강유상피암종세포에 대하여는 중간독성을, 인

Table 3. The Results of SRB Assay on the Antitumor Activity of EGCG

EGCG Concentration (μM)	Human Skin Melanoma Cells		Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells	
	SRB quantity		SRB quantity	
	Mean \pm S.D.* (% of control)		Mean \pm S.D.* (% of control)	
Control	2.72 \pm 0.03 (100.0)		3.05 \pm 0.02 (100.0)	
1	2.70 \pm 0.02 (99.1)		2.98 \pm 0.06 (97.5)	
25	26.5 \pm 0.12 (97.3)		2.92 \pm 0.05 (95.7)	
50	1.52 \pm 0.32*** (55.8)		2.75 \pm 0.10* (90.2)	
100	2.03 \pm 0.15*** (74.7)		2.72 \pm 0.08** (89.2)	
SRB ₅₀	357.23		467.66	

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with Trypsin-EDTA.

*The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Student's t-test).

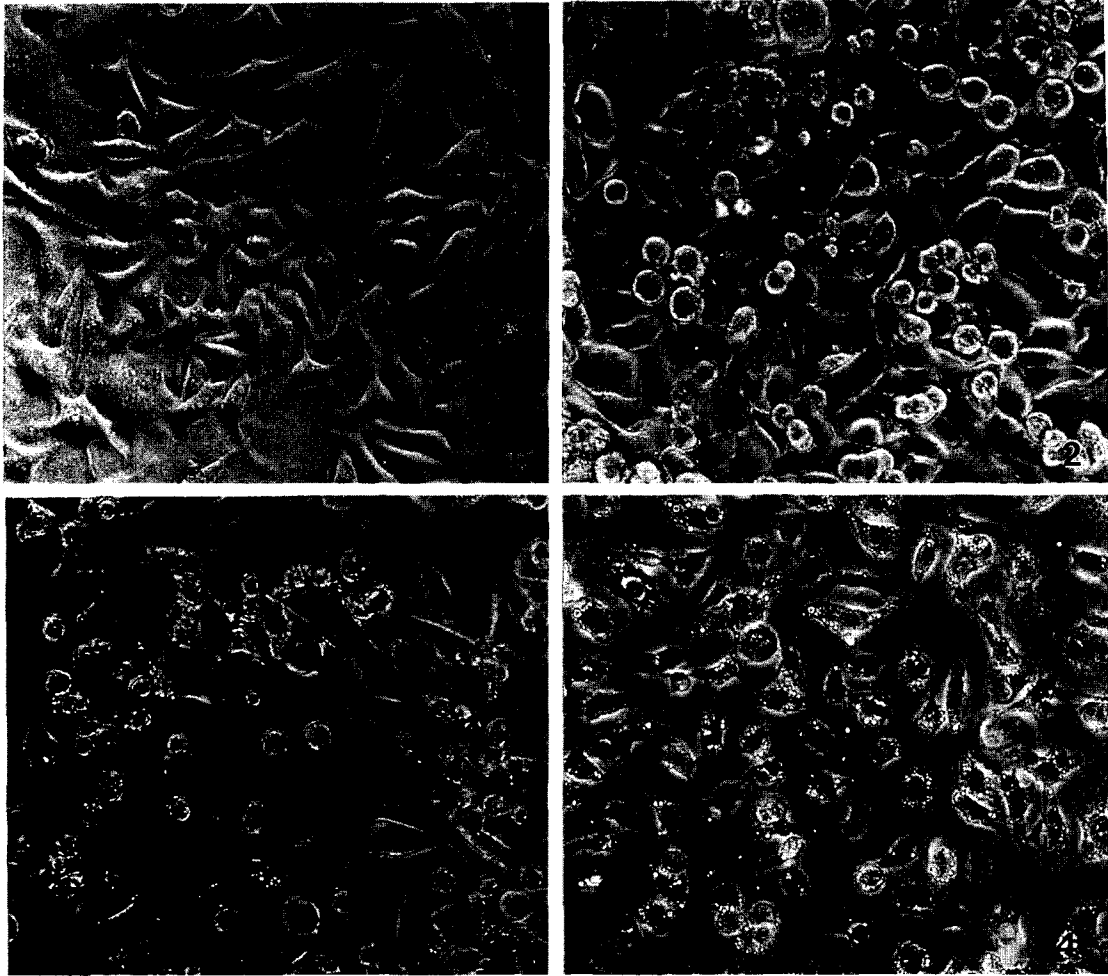


Fig. 2. An inverted photomicrograph of human skin melanoma cells treated with unmodified medium(control) for 48 hrs (panel 1). $\times 400$. Most cells had abundant cytoplasm and cytoplasmic process. An inverted photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells. treated with unmodified medium(control) for 48 hrs (panel 2). $\times 400$. Most cells showed spindle shape or type of promotional stage. An inverted photomicrograph of human skin melanoma cells treated with 100 μM EGCG containing medium for 48 hrs (panel 3). $\times 400$. Most cells were recovered to normal shape. An inverted photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells treated with 100 μM EGCG containing medium for 48 hrs (panel 4). $\times 400$. Most cells were observed degenerative changes.

체 피부흑색종세포에 대하여는 무독성으로 판정할 수 있었으며, 광학현미경적 관찰에서도 인체 구강유상피암종세포는 EGCG의 광적 증가에 따라 퇴행성 변화가 심하였으나 인체 피부흑색종세포는 50 μM EGCG에서는 퇴행성 변화가 심하게 나타났으나, 100 μM EGCG에서는 오히려 세포의 형태가 대조군과 유사하게 변화하는 경향이였다. 이 결과에서 100 μM EGCG를 인체 피부흑색종세포에 처리하였을때 오히려 흡광도가 증가하고 세포의 형태가 대조군과 유사하였는데, 그 이유에 대하여는 앞으로 계속 연구하여야 할 부분이며 같은 성분을 동일한 조건에서 암세포에 처리하여도 암세포의 종류에 따라서 항암작용이 다르게 나타남을 본 연구에서도 실감할 수

있었다. 이와 같은 결과에서 모든 항암제는 암세포에 대한 억제효과를 연구함과 동시에, 암세포에 대한 작용기전에 관한 연구가 필수적임을 알 수 있으므로 앞으로 작용기전에 관한 연구를 병행할 계획이다.

결 론

독성에 의한 부작용이 적고, 항암활성이 강한 항암물질을 개발하기 위하여, 건강세포에 대한 세포독성이 약하고, 유방암, 백혈병 및 생쥐 피부암등의 발암과정 초기 또는 증식기에 억제 효과가 있는 것으로 알려진 EGCG를 인체 피부흑색종세

포와 인체 구강유상피암종세포에 처리한 후, 48시간 배양하여 일반적으로 암검사에 이용되는 MTT분석법, NR분석법 및 SRB분석법으로 항암활성을 측정하였다. 동시에 광학현미경적으로 암세포를 관찰하였다.

1. EGCG는 인체 구강유상피암종세포에 대하여 고독성의 억제효과를 나타냈다.

2. EGCG는 인체 피부흑색종세포에 대하여 50 μ M농도에서는 고독성의 억제효과를 나타냈으나, 100 μ M농도에서는 억제효과가 감소하는 경향이였다.

3. 암세포의 광학현미경적 관찰에서 EGCG는 인체 구강유상피암종세포에 대하여 농도증가에 따라 퇴행성변화가 심하게 나타났고, 인체 피부흑색종세포에 대하여는 50 μ MEGCG에서는 퇴행 성변화가 심하게 나타났으나 100 μ MEGCG에서는 대조군의 세포형태와 유사하였다.

참고문헌

- Ariza, M.E., A.S. Oberyszyn, F.M. Robertson and M.V. Williams (1996): Mutagenic potential of peripheral blood leukocytes: *in vivo* exposure to the carcinogen 7,12-dimethyl-benz (a)anthracene, and the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol acetate followed by *in vitro* co-culture with AS52 cells, *Cancer Lett.* **106**: 9-16.
- Binnie, W.H., K.V. Rankin and I.C. Mackenzie (1983): Etiology of oral squamous cell carcinoma, *J Oral Pathol.* **12**: 12-29, 1983.
- Borenfreund, E and J.A. Puemer (1984): A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays(HTD/Nr-90). *J. Tissue Culture Meth.*, **9**: 7-9.
- Han, C. (1997): Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols, *Cancer Lett.* **114**: 153-158.
- Hirose, M., Y. Mizoguchi, M. Yaono, H. Tanaka, T. Yamaguchi, and T. Shirai (1997): Effects of green tea catechins on the progression or late promotion stage of mammary gland carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats pretreated with 7, 12-dimethylbenz (a)anthracene, *Cancer Lett.* **112**: 141-147.
- Harold, N. and P.D. Graham (1992): Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine* **21**: 334-350.
- Liao, S., Y. Umekita, J. Guo, J.M. Kokontis and R.A. Hiipakka (1995): Growth inhibition and regression of human proxstate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate. *Cancer Lett.* **96**: 239-243.
- Mukhtar, H., S.K. Katiyar and R. Agarwal (1994): Green tea and anticarcinogenic effects. *J. Inverst. Dermatol.* **102**: 3-7.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.
- Stoner, G.D. and H. Mukhtar (1995): Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell Biochem. Suppl.* **22**: 169-180.
- Skehan, P., S. Storeng, D. Studiero, A. Monke, T. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bodesh, S. Kenny and M.R. Boyd (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1107-1112.
- Valcic, S., B.N. Timmermann, D.S. Alberts, G.A. Wachter, M. Krutzsch, H. Wymer, and J.M. Guillen (1996): Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines, *Anticancer Drugs*, **7**: 461-468.
- Yosioka, L., T. Nishimura, A. Matsud and I. Kitagawa (1970): Sponin and Sapogerol 1. Seed sapogenols of *Thea sinensis* L. (1). *Barringtonol C(=Theasapogenol B)*. *Chem. Pharm. Bull.* **18**: 1610-1620.
- Yosioka, I., T. Nishimura, A. Matsude and I. Kitagawa (1971): Saponin and Sapogerol. III. Seed sapogenols of *Thea sinensis* L. (3) *Theasapogenol E* and minor sapogenols. *Chem. Pharm. Bull.* **19**(6): 1186-1199.
- Yamane, T., T. Takahashi, K. Kuwata, k. Oya, M. Inagake, Y. Kitao, M. Suganuma and H. Fujiki (1995): Inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced carcinogenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the rat glandular stomach. *Caner Res.* **55**: 2018-2084.
- 나효환, 백순옥, 한상빈, 복진영. (1992): 녹차종자의 일반성분, *J. Korean Agri. Chem. Soc.* **35**: 272-275.
- 나효환, 백순옥, 한상빈, 복진영. (1992): 녹차의 카테킨류 분석법 개선, *Korean Agri. Chem. Soc.* **35**: 276-280.
- 백순옥, 김일광, 백승화, 한두석. (1998): 비색분석법에 의한 Epigallocatechin gallate의 항암효과 평가, 대한화학회, submitted.
- 정인교, 김택규, 김종렬, 양동규, 신상훈, 정기돈. (1996): 구강편평상피세포암의 치료와 예후에 관한 임상적 연구, 대한구강악안면외과학회지, **22**: 346-355.