

미역의 섭취가 화학적으로 유도된 쥐의 대장암화 표지자인 Aberrant Crypt 형성 및 상피세포 분열에 미치는 영향에 관한 연구

이은주 · 성미경[†]

숙명여자대학교 식품영양학과

Effect of Fiber-Rich Sea Mustard Feeding on AOM-Induced Colon Aberrant Crypt Formation and Colonic Cell Proliferation in Sprague Dawley Rats

Eun-Joo Lee and Mi-Kyung Sung[†]

Dept. of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract

The modulating effect of feeding sea mustard (*Undarina pinnatifida*), a fiber-rich seaweed, during initiation and post-initiation phases of colon carcinogenesis was investigated in Sprague Dawley rats. Four groups of animals were exposed to the two weekly injections of a chemical carcinogen, azoxymethane (AOM). Animals were placed on diet containing 15% sea mustard during initiation, post-initiation or initiation + post-initiation phase of carcinogenesis for 10 weeks, and colonic aberrant crypt formation and cell proliferation were compared to those of rats fed semi-synthetic control diet. Results showed that sea mustard feeding significantly reduced the numbers of both aberrant crypts and aberrant crypt foci. Also, labeling indices and proliferation zones were significantly reduced in the colon of the rats fed sea mustard diets. These results indicate that the diet containing sea mustard may decrease the risk of colon cancer development, and a part of such effect may be mediated through both the blocking of initiation and the suppression of cell proliferation in the colonic crypts, although precise mechanisms should be further examined.

Key words: sea mustard, colon carcinogenesis, aberrant crypt foci, cell proliferation

서 론

다수의 역학조사에 의하면 환경요인 특히 식습관은 대장암 및 유방암 등 주요 암의 발생과 직접적인 관련성을 갖는다(1). 최근의 통계청 자료에 의하면 그동안 서구 사회에서만 빈발하던 대장암의 발생률이 우리나라에서도 꾸준히 증가하고 있다(2). 이는 경제발전으로 인한 생활수준의 향상과 그에 따른 식생활 형태 변화로 열량 섭취와 동물성 식품의 소비가 늘어난 반면 곡류와 채소 등 식물성 식품의 섭취가 감소하였기 때문인 것으로 보인다.

암은 유전적인 요인과 환경적인 요인이 복합적으로 작용하여 진행되는 다단계과정이다. 정상세포에서 암조직으로 발달되는데는 크게 개시(initiation), 촉진(promotion), 진행(progression)의 세 단계를 거치야 하며 이때 관여하는 물질은 발암물질(initiator)과 촉진물질(promoter)이다. 동물을 이용한 화학적 암화과정(chemical carcinogenesis) 모델에 의하면 암조직의 형성은 발암물질에 의한 세포변이에 이어 촉진물질에 의한 비정상적인 세포분열에 의해 이루어지는 것으로 보인다. 식품 중에 존재하는 다양한 화합물들은 이 각각

의 단계를 촉진하거나 저해하게 되는데(3) 그 중에서도 식이 섬유소의 대장암 저해 효과에 관한 연구결과는 일찍부터 보고되고 있다 그러나 주요 섬유소 급원식품의 함양기능 등과 관련된 연구결과는 매우 다양하며 이는 고섬유소 함유식품 내에는 다양한 부류의 섬유소 성분이 포함되어 있고 그 조성비에 따라 생리활성에 차이가 나기 때문인 것으로 보인다(4-9). 따라서 섬유소 급원 식품의 효능 판정과 효율적 이용을 위해서는 식품자체에 의한 효과를 결정하는 것이 매우 중요하다.

이에 근거하여 다수의 연구에서 주요 섬유소 급원 식품의 대장암 생성 억제 효과 판정을 위해 섬유소 급원을 함유한 식이와 부섬유소 함유 식이에 의한 영향을 비교하였다(10-12). Otsuka 등(10)은 wheat bran(섬유소 함량 35%)을 50% 첨가한 식이를 쥐에게 6주간 공급한 결과 암세포 증식에 관여하는 thymidine kinase 활성이 유의하게 감소하였다고 보고하였다. Zusman 등(11)에 의한 연구결과에서는 섬유소 함량이 높은 옥수수 속대(corn cob)를 첨가한 식이를 공급받은 쥐의 경우 무섬유소 식이를 섭취한 쥐에 비해 대장암화 표지자인 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)이 유의하게 감소하였고 tumor suppressor gene인 p53발현이 증가하였

[†]Corresponding author. E-mail: mksung@sookmyung.ac.kr
Phone: 82-2-710-9395, Fax 82-2-710-9395

다. Gallaher 등(12)은 주요 섬유소 급원인 사탕무, 귀리, 호밀, 보릿겨를 첨가한 식이는 무섬유소 함유식이에 비해 종양생성 촉진인자 전구체인 담즙산의 변 중 배설량을 유의하게 증가시키는 것을 관찰하였다.

미역, 다시마를 비롯한 해조류는 식이섬유소가 다량 함유된 식품으로 한국, 일본 및 중국 등 동북아시아 지역에서 서식하며(13) 우리나라에서는 약 60종이 식용되고 있다. 갈조류인 미역과 다시마는 칼슘과 점질성 다당류를 다량 함유하고 있으며 이들 다당류는 다양한 생리활성 작용을 소유한 것으로 알려지고 있다(14) Yasuji와 Kiyoka(15)는 미역, 톳, 다시마의 열수 추출물이 돌연변이원의 돌연변이 활성을 억제한다고 하였고 Ryu 등(16)은 AFB₁, MeIQ, Trp-p-2 등의 돌연변이원성 물질의 활성이 미역, 다시마, 곰피에 의해 저해된다고 보고하였다 Kim 등(17)의 연구에서는 해조류와 채소류의 수용성 추출물이 glucose-lysine HCl계 및 glucose-arginine계 maillard 반응생성물의 돌연변이원성을 억제하는 효과가 있다고 하였는데 특히 가열을 한 경우, 채소류는 돌연변이 억제효과가 감소하였으나 해조류는 가열에 의한 영향을 받지 않았다. 이 이외에도 해조류는 식품 및 생체내의 잔존 아질산염과 식품, 의약품 및 잔류농약 내의 아민이 반응하여 생성되는 발암성 니트로사민에 대해서도 항돌연변이 효과가 있는 것으로 보고되었다(18,19). 또 갈조류로부터 추출한 다당류의 일종인 fucoidan은 sarcoma 180, L-1210, Meth-A, B-16 melanoma 등 종양세포의 성장을 저해하는 것으로 관찰되었다(20,21).

이와 같이 해조류의 항암관련 생리활성에 관한 연구는 꾸준히 진행되어 왔으나 대부분 시험관 실험에서 수행되어져 오고 있었을 뿐, 생체 내의 암 발생에 미치는 효과에 관한 연구는 미미하다. 특히 우리나라에서 상용되고 있는 주요 섬유소 급원인 미역 등 식품자체에 의한 효과는 알려지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 화학적 발암원으로 유도된 쥐의 대장암 생성에 미역식이 미치는 영향을 판정하고 암 진행 단계별 효과를 관찰하였다. 대장암 진행 표지자로는 비정상적인 상피세포 분열에 의해 생성되는 대장상피의 aberrant crypt foci(ACF)와 상피세포 분열 영역을 측정하는 labeling index(LI)를 사용하였다.

재료 및 방법

실험계획

생후 4주된 Sprague Dawley종 수컷쥐를 2주간 일반사료로 적응시킨 다음, 체중에 따라 난괴법에 의하여 10마리씩 4군으로 나누었다. 이때 체중은 150~200g이었다. 실험군은 암화과정별 실험식이 섭취기간에 따라 initiation 식이군, post-initiation식이군, initiation+post-initiation 식이군을 포함하는 세 군과 무섬유식이 대조군으로 하였다(Table 1). 실험식은 10주간 공급되었다. 화학적 발암원으로는 azoxymethane

Table 1. Experimental food composition

Ingredients	Fiber-free (g)	Sea mustard (15%) (g)
Casein	20.0	17.0
Corn starch	20.0	20.0
Sucrose	47.5	35.9
Corn oil	5.0	4.8
Lard	2.5	2.3
Fiber content	0.0	7.5
Vitamin mixture ¹⁾	1.0	1.0
Mineral mixture ²⁾	3.5	3.5
Choline chloride	0.2	0.2
DL-Methionine	0.3	0.3
Total	100.0	100.0

¹⁾Vitamin mixture (mg/100 g) VD₃ 0.582, α-tocopherol-acetate 1200.0, retinol-acetate 93.2, VK₃ 6.0, thiamin-HCl 59.0, VB₁₂ 0.2, VC 588.0, pyridoxine-HCl, 29.0, D-biotin 1.0, folic acid 2.0, inositol 1176.0, Ca-pantothenate 235.0, riboflavin 59.0, nicotinic acid 294.0, sucrose 96257.017.

²⁾Mineral mixture (g/100 g) CaCO₃ 29.29, CaHPO₄ 2H₂O 0.43, KH₂PO₄ 34.31, NaCl 25.06, MgSO₄ 2H₂O 9.98, Fe(C₆H₅O₇) 6H₂O 0.623, CuSO₄ 5H₂O 0.156, MnSO₄ H₂O 0.121, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O 0.0025, Na₂SeO₃·5H₂O 0.0015, ZnCl₂ 0.02, KI 0.005.

(AOM, Sigma Chemical Co. St. Louis, USA)을 사용하였고 AOM투여량은 15 mg/kg을 1주 간격으로 2회 복강투여하여 총 투여량이 30 mg/kg이 되도록 하였다(Fig. 1). 실험식은 AIN-76 diet에 기초하였고 모든 식이에서 총 열량 중 단백질은 20%, 당질은 65%, 지질은 15%가 되도록 구성하였고 다른 식이 성분의 양은 동일하게 하였다 실험식에서 미역은 15%수준으로 첨가하였으며 섬유소 함량은 약 7.5%였다.

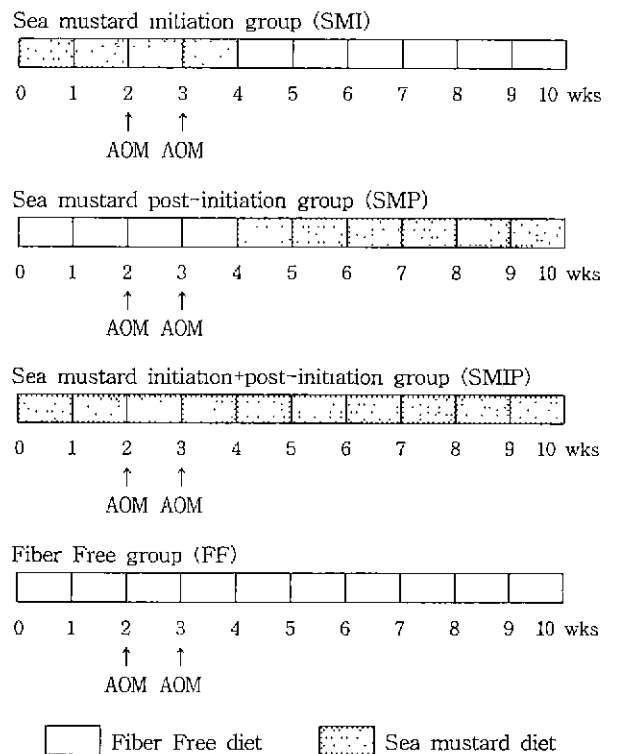


Fig. 1. Experimental design.

대장채취 및 처리방법

실험식이 10주 후 쥐를 희생하였고 세포분열 측정(BrdU test)을 위해 희생시키기 1시간 전에 BrdU를 체중 1 kg당 5 mg씩 복강주사를 하였다. 쥐를 CO₂ gas로 희생시킨 후 대장을 맹장에서 직장까지 잘라내어 총길이를 재고 PBS로 대장의 내용물을 제거한 후 길이로 잘라 폈다

Aberrant crypt foci(ACF) 측정

ACF 수는 Brd(22)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 준비된 대장조직을 10% buffered formalin으로 24시간 고정시켰다. 대장을 3등분하여 petri dish에 0.2% methylene blue/saline solution과 함께 5~15분간 방치하였다 Microscope slide에 mucosa을 위로 향하게 놓은 후 광학현미경(×40)으로 관찰하여 ACF 수를 세었다.

Cell proliferation(BrdU test)측정

대장상피세포의 분열정도를 보기 위해 대장부위 중 1 cm를 잘라 펴서 10% buffered formalin에 처리한 후 paraffin block을 만들고 albumin coated slides에 고정시킨 후 37°C에서 4~24시간 방치하였다. 이렇게 준비된 paraffin block에서 조직을 3~5 μm로 절편한 후 BrdU가 DNA에 결합된 정도를 관찰하였다 즉 조직절편을 xylene과 alcohol에 차례로 담근 후 H₂O₂에 10분간 담그어 둔다. 여기에 citrate buffer를 넣고 microwave oven에 12분간 끓여 식힌 후 monoclonal anti-BrdU를 실온에서 1~2시간 반응시킨 다음 peroxidase-linked antibody를 떨어뜨려 반응시켰다. Streptoavidin을 두 방울 떨어뜨린 후 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC) 발색제를 반응시켜 발색여부를 확인하였다. Hematoxyline에 5분간 담근 후 glycerin jelly로 mounting하여 광학현미경(×400)으로 붉은 색으로 염색된 세포수를 세었다(23,24).

통계처리

모든 실험결과와 통계처리는 SAS통계 program(SAS Institute Inc. 1998)을 이용하였다. 결과는 평균값과 standard deviation(S.D.)로 표시하였다. 암화단계별 미역첨가에 의한 영향을 비교 검증하기 위해 ANOVA로 분석한 후 평균간의 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 판정하였다.

결과 및 고찰

식이섭취, 체중증가량, 대장길이

실험동물의 식이섭취량과 평균체중증가량을 비교한 결과 군간의 유의한 차가 관찰되지 않았다(Table 2). Lee 등(25)의 연구에서는 15% 미역을 첨가한 경우 식이섭취량이 감소하는 것으로 나타났으나 본 실험에서는 미역식이로 인한 식이섭취량 차이가 없었으므로 섭취량 감소에 의한 부차적 생리적 영향은 없는 것으로 보여진다.

Table 2. Food intake, colon length and weight gain of rats fed different experimental diets

Group ¹⁾	Food intake (g/d)	Colon length (cm)	Weight gain (g)
SMI	19.79±1.60 ²⁾	14.57±1.28	187.8±42.1
SMP	19.70±2.06	15.65±2.71	202.1±29.5
SMIP	20.75±0.67	15.60±1.77	200.9±16.5
FF	19.89±0.49	15.64±1.80	213.0±7.8

¹⁾SMI: sea mustard initiation group.
²⁾SMP: sea mustard post-initiation group.
 SMIP: sea mustard initiation+post-initiation group.
 FF: fiber free group.
³⁾Not significantly different treatment groups (p≤0.05)

ACF 형성 및 세포분열

각 군의 대장에서 생성되는 암화표지자인 aberrant crypt foci(ACF)의 수 및 aberrant crypt(AC)의 수는 Table 3에 나타난대로 미역식이군이 대조군에 비해 매우 유의적으로 감소하였다. 또 AC 수는 일부기간을 먹인 군보다 전기간을 먹인 쥐에게서 유의하게 낮았다. Crypt length 및 labeling index, proliferation zone 모두 미역식이를 공급받은 동물의 대장에서 유의하게 감소하였다. 그러나 식이기간에 따른 차이는 관찰되지 않았다(Table 4).

AC(aberrant crypt)는 비정상적인 세포분열에 의해 주변의 정상 crypt에 비해 세포의 크기와 모양이 달라지고 상피조직이 두꺼워진 crypt를 지칭하며 이러한 비정상적인 crypt가 여러개 모여 생성된 것이 aberrant crypt foci이다(26,27). 이 ACF는 세포분열을 계속하여 증양을 생성하게 되는데 특

Table 3. Effect of sea mustard on AOM-induced ACF formation in rats

Group ¹⁾	ACF/colon	AC/colon	AC/ACF
SMI	70.2±13.2 ^{b2)}	216.9±31.8 ^b	3.7±0.7 ^a
SMP	71.1±14.4 ^b	209.2±48.3 ^b	2.9±0.5 ^{ab}
SMIP	58.0±12.7 ^b	159.8±37.3 ^a	2.8±0.2 ^b
FF	120.1±25.5 ^a	382.4±81.1 ^a	3.2±0.3 ^a

¹⁾Refer to the legend in Table 2.
²⁾Means with different letters within a column are significantly different from each other at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

Table 4. Crypt length, labeling index (%), proliferation zone (%) on colonic epithelium of experimental animal

Group ¹⁾	Crypt length (No. of cell)	Labeling index (%) ²⁾	Proliferation zone (%) ³⁾
SMI	26.5±0.5 ¹⁾	9.2±0.4 ^b	46.6±2.9 ^b
SMP	26.6±0.5 ^b	8.2±0.5 ^b	47.6±1.8 ^b
SMIP	26.4±0.4 ^b	8.0±0.5 ^b	46.1±0.6 ^b
FF	27.6±0.8 ^a	12.8±0.8 ^a	73.0±4.7 ^a

¹⁾Refer to the legend in Table 2.
²⁾LI (%)=No. of labeled cell/crypt length×100
³⁾Proliferation zone (%)=highest labeled cell/crypt length×100.
⁴⁾Means with different letters within a column are significantly different from each other at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

히 4개 이상의 AC를 포함하는 ACF와 중앙발생에는 높은 상관성이 보고되었다(24). K-ras 점돌연변이는 대장종양에서 흔히 발견되는 유전자 변이로 암환자 대장조직의 ACF 발생과 밀접한 관련을 가진다(28,29). 이와 같이 인체대장 상피세포의 세포분열증가는 대장암 발생율과 양의 상관성을 소유하므로 과다 세포분열을 대장암의 전단계로 보고 있다(30, 31) 특히 정상세포의 경우 대장 상피세포는 crypt의 아랫부분 1/3정도에서 분열을 진행하나 암화세포의 경우는 그 분열영역이 crypt길이의 2/3까지 확대되고(32) 이를 촉진하는 인자를 암화촉진 물질(promoter)로 간주한다. 본 연구에서 미역식이는 이러한 암화표지자들을 통해 볼 때 매우 효과적인 암화차단 효과를 가지고 있는 것으로 나타났다.

식이섬유소는 다양한 생리활성을 소유한 다당류를 총칭하는 것으로 식품에 따라 그 총합량 뿐 아니라 식이섬유소의 구성비에 많은 차이가 있다. 따라서 고식이섬유 함유식품이 가지는 항암성을 포함한 질병예방 효능도 매우 다양하다. Macrae(33)의 연구에 의하면 불용성 섬유소를 다량 함유한 wheat bran이 다른 종류의 식이 섬유소 급원에 비해 대장 종양 억제 효과가 큰 것으로 나타났다 이와 비교해 미역은 건중량 약 100 g 당 약 55 g의 식이섬유소를 함유하고 있다(34). 이는 지금까지 서구에서 가장 많이 연구가 되어오던 대장암 생성 억제 식품인 wheat bran의 총섬유소 함량을 초과하는(35) 것으로 본 연구에서 시도된 생체실험을 통한 항암성 입증에 매우 의미가 있을 것으로 보인다.

Wattenberg(36)에 의하면 항암물질은 다수의 기전을 통해 암화과정 중에 작용한다. AOM 등의 화학적 발암원은 체내 효소에 의해 대사되어 DNA 손상을 일으키며 이 과정을 initiation이라 칭하는데 식품 중에 존재하는 다양한 화합물들은 이에 관여하는 효소활성 억제 및 발암물질의 무독화, DNA복구 등을 통해 이 단계를 억제할 수 있다. 한편 돌연변이가 일어난 세포는 promoter에 의해 비정상적인 분열 즉 promotion단계를 거쳐 암화를 진행하게 되는데 식품 성분들은 promoter와의 결합, 세포분열의 정상화 유도 등을 통해 이 과정 역시 저해한다(15-19). 최근 Ames test를 이용한 해조류의 항돌연변이 효과가 다수 보고되었는데(15-19) 이미 니트로사민 생성억제제로 널리 알려진 비타민 C와 그 효과를 비교한 결과 동일한 억제율을 보임으로 탁월한 발암억제 효과를 나타내었다. 또 해조류에 존재하는 함황다당류인 류코이당은 대장암 생성 저해효과가 큰 것으로 여겨지고 있으나 아직 그 기전에 대해서는 밝혀지지 않고 있다 HT-29 대장암 세포는 알긴산 첨가시 세포증식이 크게 감소되었다고 보고된 바 있는데(37) 특히 미역은 해조류 중에서도 알긴산의 함량이 매우 높으므로 미역 내에 함유된 알긴산에 의한 세포분열 저해효과도 있을 것으로 보인다. 본 연구 결과에서 나타난 미역식이의 효과는 이 이외에도 미역 내에 다량 존재하는 불용성 식이섬유소가 발암원과 결합하거나 불용성 섬유소의 bulking effect에 의한 발암원 희석도 관여할 것으로 보여진

다. 그러나 구체적인 기전 규명 및 각각의 섬유소와 그 구성비에 의한 효과와 관련하여서는 후속 연구가 필요할 것으로 보여진다.

요 약

본 연구는 미역을 섬유소원으로 첨가한 식이가 대장암 발생에 미치는 효과를 생체 내에서 판정하기 위해 실시되었다. 발암원을 주사한 쥐의 식이에 15% 수준으로 미역분말을 첨가하여 암화단계별로 공급한 결과 대장에서 생성되는 aberrant crypt foci(ACF) 수 및 aberrant crypt(AC) 수가 미역식이에 의해 현저하게 감소하는 효과를 관찰할 수 있었다. 특히 AC의 수는 일부기간 먹인 군보다 전기간 먹인 군에게서 유의하게 적었다. 또 미역식이는 발암원 처리에 의한 crypt length, labeling index(%) 및 proliferation zone(%)의 증가를 억제하였다. 이를 기초로 효과성분 분리 및 구체적 기전규명이 이루어진다면 미역을 포함하는 해조류의 암 예방 효과 및 치료 효과와 관련한 새로운 가치가 부각되리라 본다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 숙명여자대학교 교내 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Doll, R. and Peto, R.: The causes of cancer. Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 1191-1308 (1981)
- National Statistical Office The census of death statistics. (2000)
- Johnson, I T, Williamson, G and Musk, S.R.R.: Anticarcinogenic factors in plant foods a new class of nutrients? *Nutr. Res. Rev.*, **7**, 175-204 (1994)
- Howe, G.R., Benito, E., Castelleto, R., Cornee, J, Esteve, J., Gallagher, R.P., Iscovich, J.M., Kaak, R. and Kune, G.A.: Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: the combined analysis of 13 case-control studies. *J. Natl. Cancer Inst.*, **84**, 1887-1896 (1992)
- Giovanucci, E., Rimm, E.B., Stempfer, M.J., Colditz, G.A., Ascherio, A. and Willet, W.C.: Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res.*, **54**, 2390-2397 (1994)
- Heilbrun, L.K., Nomura, A., Hankin, J.H and Stemmermann, G.N.: Diet and colorectal cancer with special reference to fiber intake. *Int J Cancer*, **44**, 1-6 (1989)
- Slob, I.C.M., Lambregts, J.L.M.C., Schuit, A J and Kok, F. J Calcium intake and 28-year gastrointestinal cancer mortality in Dutch civil servants. *Int. J. Cancer*, **54**, 20-25 (1993)
- The American Institute for Cancer Research *Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective*. AICR, p.227-228 (1997)
- Lee, H.S., Choi, M.S., Lee, Y.K., Park, S.H and Kim, Y.J.: A Study on the development of high-fiber supplements for the diabetic patients (2)-Effect of seaweed supplementation

- on the lipid and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Nutr.*, **29**, 296-306 (1996)
10. Otsuka, M., Satchithanandan, S. and Calvert, R.J. : Influence of meal distribution of wheat bran on fecal bulk, gastrointestinal transit time and colonic thymidine kinase activity in the rats. *J. Nutr.*, **119**, 566-572 (1989)
 11. Zusman, I., Reinfen, R., Livin, O., Smirnof, P., Gurevich, P., Sandler, B., Nyska, A., Gal, R., Tendler, Y. and Madar, Z. : Role of apoptosis, proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in chemically induced colon cancer in rats fed corn-cob fiber treated with the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Anticancer Res.*, **17**, 2105-2113 (1997)
 12. Gallaher, D.D., Locket, P.L. and Gallaher, C.M. : Bile acid metabolism in rats fed two levels of corn oil and brans of oat, rye and barley and sugar beet fiber. *J. Nutr.*, **122**, 473-481 (1992)
 13. Suzuki, T., Nakai, Y., Yoshie, Y., Shira, T. and Hirano, T. : Seasonal variation in the dietary fiber content and molecular weight of soluble dietary fiber in brown algae. *Hijiki Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1633-1637 (1993)
 14. Cho, K.J., Lee, Y.S. and Ryu, B.H. : Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **23**, 345-352 (1990)
 15. Yasuji, O. and Kiyoka, H.O. : Identification of antimutagenic activities in the extract of an edible brown algae. *Hijikia fusiform (Hijiki)* by *muc* gene expression system in *Salmonella typhimurium* (TA1535/pSK1002). *J. Sci. Food Agric.*, **66**, 103-107 (1994)
 16. Ryu, B.H., Choi, B.H., Kim, D.S. and Ha, M.S. : Desmutagenic effect of extracts obtained from seaweeds. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **19**, 502-508 (1986)
 17. Kim, I.S., Kim, S.B. and Park, Y.H. : Desmutagenic effects of seaweed and vegetable extracts against mutagenicity of Maillard reacting products. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **27**, 133-139 (1994)
 18. Ahn, B.W., Lee, D.H., Yeo, S.G., Kang, J.H., Do, J.R., Kim, S.B. and Park, Y.H. : Inhibitory action of natural food components on the formation of carcinogenic nitrosamine. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **26**, 289-295 (1993)
 19. Oh, C.K., Oh, M.C., Kim, S.H., Lim, S.B. and Kim, S.H. : Antimutagenic and antimicrobial effect of ethanol extracts from sea-mustard and sea-tangle. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **31**, 90-94 (1998)
 20. Yamamoto, I., Takahashi, M., Tamura, E., Maruyama, H. and Mori, H. : Antitumor activity of edible marine algae: effect of crude fucoidan fraction prepared from edible brown seaweeds against L-1210 leukemia. *Hydrobiologia*, **116**, 145-150 (1984)
 21. Yamamoto, I., Nagumo, T., Takahashi, M., Fujihara, M., Suzuki, Y. and Izuma, N. : Antitumor effect of seaweeds: III. Antitumor effect of an extract from *Sargassum kjellmanianum*. *Jap. J. Exp. Med.*, **51**, 187-189 (1981)
 22. Bird, R.P. : Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.*, **37**, 147-151 (1987)
 23. Risio, M., Coverlizza, S., Ferrari, A., Candelaresi, G. and Rossini, F.P. : Immunohisto-chemical study of epithelial cell proliferation in hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the large bowel. *Gastroenterology*, **94**, 899-906 (1988)
 24. Roncucci, L., Pedroni, M., Scalmati, A., Bormioli, M.L., Sassetelli, R., Fante, R., Losi, L., Gregorio, C., Petocchi, B. and Ponz de Leon, M. : Cell kinetics evaluation of colorectal tumors after *in vivo* administration of bromodeoxyuridine. *Int. J. Cancer*, **52**, 856-861 (1992)
 25. Lee, H.A., Lee, S.S. and Shim, H.K. : Effect of dietary fiber sources on the composition of intestinal microflora in rats. *Korean J. Nutr.*, **27**, 988-995 (1994)
 26. Bird, R.P. : Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.*, **93**, 55-71 (1995)
 27. Shivapurkar, N., Tang, Z. and Ferreira, A. : Sequential analysis of K-ras mutation in aberrant crypt foci and colonic tumors induced by azoxymethane in Fischer 344 rats on high-risk diet. *Carcinogenesis*, **15**, 775-778 (1994)
 28. Alabaster, O., Tang, Z. and Shivapurkar, N. : Dietary fiber and the chemopreventive modulation of colon carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **350**, 185-197 (1996)
 29. Shivapurkar, N., Huang, L., Ruggeri, B., Swalsky, P.A., Bakker, A., Finkelstein, S., Frost, A. and Silverberg, S. : K-ras and p53 mutation in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Lett.*, **115**, 39-46 (1997)
 30. Lupkin, M. and Higgins, P. : Biological markers of cell proliferation and differentiation in human gastrointestinal disease. In "Advances in Cancer Research" Klein, G. and Weinhouse, S. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 50, p.1-24 (1988)
 31. Stadler, J., Yeung, K.S., Furrer, R., Marcon, N., Hinal, H.S. and Bruce, W.R. : Proliferative activity of rectal mucosal and soluble fecal bile acids in patients with normal colons and in patients with colonic polyps or cancer. *Cancer Lett.*, **38**, 315-320 (1988)
 32. Verstovsek, G., Byrd, A., Frey, M.R., Petrelli, N.J. and Black, J.D. : Colonocyte differentiation is associated with increased expression and altered distribution of protein kinase C isozymes. *Gastroenterol.*, **115**, 75-85 (1998)
 33. Macrae, F. : Wheat bran fiber and development of adenomatous polyps: evidence from randomized, controlled clinical trials. *Am. J. Med.*, **106**, 38S-42S (1999)
 34. Han, K.H., Lee, E.J. and Sung, M.K. : Physical characteristics and antioxidative capacity of major seaweeds. *J. Food Sci. Nutr.*, **4**, 180-183 (1999)
 35. Souci, S.E., Fachmann, W. and Kraut, H. : *Food composition and nutrition tables*. CRC Press, Stuttgart/Medpharm/Boca Raton, p.569 (1994)
 36. Wattenberg, L. : Chemoprevention of carcinogenesis by minor non-nutrient constituents of the diet. In "Food, nutrition and chemical toxicity" Parke, D.V., Ioannides, C. and Walker, R. (eds.), Smith-Gordon Co., Ltd./Nishimura Co. Ltd., London/Nagata, p.287-300 (1993)
 37. Shimi, S.M., Hopwood, D., Newman, E.L. and Cuschieri, A. : Microencapsulation of human cells: its effects on growth of normal and tumour cells *in vitro*. *Br. J. Cancer*, **63**, 675-680 (1991)