



페놀산의 구조가 암세포에 대한 세포독성에 미치는 영향

한두석 · 오상걸 · 오은상

원광대학교 치과대학 구강해부학교실

Selective Cytotoxicities of Phenolic Acids in Cancer Cells

Du-Seok Han, Sang-Keol Oh and Eun-Sang Oh

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Received January 26, 2003; Accepted March 3, 2003

ABSTRACT. The purpose of this study was to determine the role of substituted groups in phenolic compounds to develop an anticancer agent having strong cytotoxicity against cancer cells but weak against normal cells. The phenolic compounds used in this study were gallic acid and ferulic acid with hydroxyl and carboxyl groups, syringic acid with hydroxyl, carboxyl and methoxy groups, and pyrogallol with hydroxyl groups. Cytotoxicities of these compounds were evaluated by MTT assay for cell viability and XTT assay for cell adhesion activity in normal human skin fibroblast (Detroit 551) and human skin melanoma (SK-MEL-3) cells. Syringic acid, gallic acid and ferulic acid decreased the cell viability and cell adhesion activity in SK-MEL-3 cells but not in Detroit 551 cells while pyrogallol decreased in both cells. The susceptibility of cell viability based on the IC_{50} values of MTT assay in Detroit 551 cells was in the following order: pyrogallol > gallic acid > ferulic acid > syringic acid, while it was in SK-MEL-3 cells: Syringic acid > pyrogallol > ferulic acid > gallic acid. These results suggest that carboxyl and methoxy groups of these compounds play an important role in selectivity of cytotoxicity in normal and cancer cells.

Keywords: Phenolic acids, Normal human skin fibroblast cells, Human skin melanoma cells, Cytotoxicity.

서 론

암세포는 정상조직과는 달리 독자적으로 성장할 수 있고 주변 조직으로 침윤되거나 다른 장기로 전이하여 거의 무제한적으로 증식하는 성질을 가지고 있지만 정확한 발암기전은 밝혀지지 않고 있다. 발암요인으로 인체 유해물질이나 방사선, 일부 바이러스 등이 알려져 있으며, 그 치료법으로 외과적 수술, 방사선 요법, 면역요법 및 각종 항암 화학제제 등이 이용되고 있지만 그 치료의 우수성에도 불구하고 다양한 암의 종류에 대한 감수성 차이, 부작용, 재발 및 합병증 등의 문제점 때문에 인체에 무해하면서도 효과적으로 암을 치료할 수 있는 새로운 약제개발이 절실

하다.

페놀화합물(phenolic compounds)은 치환될 수 있는 수산기를 가진 방향족고리 구조를 가지고 있는 이차 대사산물의 총칭으로 화학적으로 이질적인 것이 많으며 지용성 또는 수용성 등 여러 가지 성질을 가진다. 페놀화합물의 대부분은 Shikimic acid pathway에 의해서 합성된 방향족 물질이며 사람이 일상생활에서 쉽게 섭취할 수 있는 과일, 채소, 포도주, 차 등에서 분리되는 성분으로 다른 페놀성 성분이 갖는 생물학적 효과인 항산화작용, 항돌연변이작용, 항암작용 및 항염증작용을 갖는 것으로 보고되고 있다(Duthie, 1999; Duthie Garry와 Alan, 2000). Gallic acid, syringic acid, ferulic acid 및 pyrogallol (Fig. 1)은 자연 식물에 다량 함유되어 있는 식물성 성분이고 페놀성 성분의 화학구조에서 방향족 고리를 중심으로 수산기, 카르복실기 및 메톡시기(methoxy)가 서로 다르게 결합되어 정상세포와 암세포에 나타내는 세포독성이 각각

Correspondence to: Du-Seok Han, Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea
E-mail: onett@wonkwang.ac.kr

다른 것으로 보고되고 있다. Inoue 등(1995)은 페놀화합물의 세포독성과 화학적 구조와의 관계에 관한 연구에서 수산군(hydroxyl group)의 메틸화 또는 소실은 세포독성을 완전히 제거하기 때문에 페놀성 수산기는 세포독성에 필수적이라 보고하였다. 반대로 ethylgallate와 gallic acid의 ethylester인 tannic acid가 정상세포에 세포독성을 나타내고 gallic acid의 디카복실화(decarboxylation)는 암세포에서와 같이 정상세포에서도 세포독성을 나타낸 결과를 고려하면 카르복실군(carboxyl group)은 암세포에 선택적 독성을 유도하기 위하여 필수적이라고 보고하였다. Khan 등(1998)은 gallic acid는 tannic acid보다 DNA 분절능력이 강하나 gallic acid의 3개의 수산기 중 2개가 메틸화된 syringic acid는 DNA 분절능력이 급속히 감소하며 gallic acid의 카르복실기가 제거된 pyrogallol은 DNA 분절능력이 증가한다고 보고하였다.

Ishibashi 등(2002)은 Lamellarin 유도체의 구조와 활성과의 관계에 관한 연구에서 암세포인 HeLa cell에 대한 Lamellarin 유도체의 세포독성은 C-8과 C-20 위치에 수산기를 갖는 유도체가 강한 세포독성을 나타내나 C-13과 C-21 위치의 2개의 메톡시기가 세포독성에 덜 중요하다고 보고하였다. Lamellarin 유도체 중 C-8과 C-20 위치에 수산기를 갖는 유도체를 정상세포인 Vero 세포와 MDCK 세포에, 암세포인 HeLa 세포와 XC 세포에 적용한 후 집락분석법(colony assay)을 이용하여 IC₅₀을 결정한 결과 mitomycin C보다 강한 세포독성이 나타났으나 정상세포와 암세포에 나타내는 세포독성의 차이는 없었다고 보고하였다. 또한 Inoue 등(1995)은 gallic acid의 농도의 증가에 따라 정상세포들에 대한 세포독성이 각각 다르게 나타났으며 세포독성은 간세포(hepatocytes) > 대식세포 > 섬유모세포 순이었다. 특히 섬유모세포에 대한 gallic acid의 세포독성은 암세포에 나타내는 세포독성보다는 약하였으나 그 차이는 크지 않았다.

이에 저자는 페놀산에 수산기, 카르복실기 및 메톡시기가 각각 다르게 결합하고 있는 gallic acid, syringic acid, ferulic acid 및 pyrogallol이 나타내는 세포독성의 차이를 확인하기 위하여 정상세포인 인체 피부섬유모세포와 암세포인 인체 피부흑색종세포에 적용한 후 세포생존율을 측정하기 위하여 MTT assay를, 세포부착능을 확인하기 위하여 XTT assay로 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

시약: 세포배양에 사용한 MEM(Minimum Essential Medium)과 DMEM(Dulbecco's modified eagle medi-

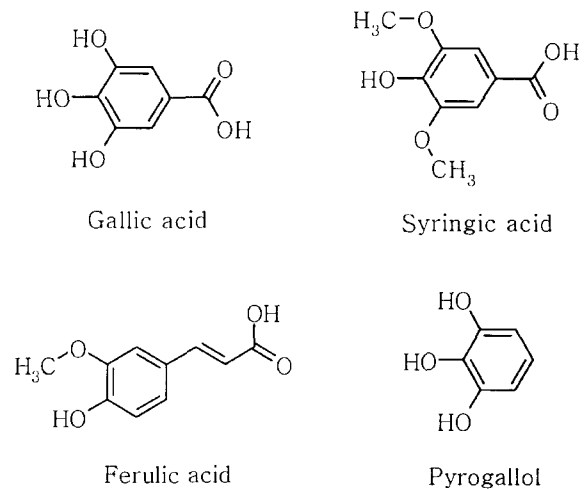


Fig. 1. Structures of gallic acid, syringic acid, ferulic acid and pyrogallol.

um), fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, fungizone은 Gibco제이었으며, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 정량과 XTT(2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) 정량에 사용한 시약과 페놀산(구조식 Fig. 1)은 Sigma Chemical Co.(St Louis, MD, USA)에서 구입하였다.

실험기기: 세포의 배양은 CO₂ incubator(Shellab. Co., Cornelius, U.S.A.)를 사용하였으며, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기(Marienfeld Co., Mergentheim, Germany)를 이용하였다. MTT 정량, XTT 정량에는 ELISA reader(Spectra max 250, Molecular Devices, sunnyvale, U.S.A.)를 사용하였다.

세포배양: 페놀산 자체의 세포독성과 암세포에 대한 세포독성을 측정하기 위하여 서울대학교 암연구소에서 분양받은 인체 피부섬유모세포(Detroit 551)는 MEM 배지에, 인체 피부흑색종세포(SK-MEL-3)는 RPMI 1640 배지에 10% fetal bovine serum, penicillin(25 unit/ml) 및 fungizone을 첨가하여 사용하였다. 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 CO₂ 배양기를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2×10⁴ cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

실험방법

MTT 정량분석법: Mosmann의 방법(1983)에 의하여, 인체 피부섬유모세포와 인체 피부흑색종세포를 각 배양용기에 4×10⁴ cells/ml 세포수를 넣고 24시간 배양 후 페

놀산 자체의 세포독성과 암세포에 대한 페놀산의 세포독성을 측정하기 위하여 페놀산을 각각 농도별(1, 25, 50 및 100 μM)로 첨가한 후 48시간 배양하였다. 분석 당일 조제한 MTT 50 $\mu\text{g/ml}$ 가 포함된 배양액을 배양용기당 1 ml씩 넣어 3시간 배양 후, 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온 방치하여 MTT formazan을 용해한 후, 분광광도계 ELISA reader로 MTT의 흡광도를 540 nm에서 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

XTT 정량분석법: Laminin-coated plate는 laminin 1 mg을 PBS 2 ml에 용해하여 냉장고에 보관하면서 필요시에 laminin의 농도(20 mg/ml)를 결정하여 찬 PBS 용액으로 희석하였다. 이 용액을 24 well plate의 각 well에 200 μl 씩 분주하여 하룻밤 동안 건조시킨 뒤 PBS로 두 번 세척하여 3% BSA를 각 well에 200 μl 씩 첨가해 잘 흔들어 준 다음 제거하고 PBS로 두 번 정도 세척하였다. 배양된 인체 피부섬유모세포와 인체 피부흑색종세포 4×10^4 cell/ml 세포수를 laminin으로 coating한 배양용기에 넣고 24시간 배양한 후 MTT 정량분석법과 같은 방법으로 페놀산을 넣고 다시 48시간 배양한 후 배지는 조심스럽게 제거하고 PBS로 두 번 세척하였다. 여기에 XTT를 첨가하여 각 배양용기에 200 μl 씩 주입하고 4~6시간 동안 배양한 뒤 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

IC₅₀ 결정: 페놀산의 IC₅₀ 결정은 배양 중인 인체 피부섬유모세포와 인체 피부흑색종세포를 각 배양용기당 4×10^4 cell/ml씩 넣고 24시간 배양한 다음 1, 25, 50, 100 μM 의 페놀산을 첨가하여 48시간 배양한 후 MTT 정량 및 XTT 정량을 하여 이들 각각에 대한 50% 억제농도인 IC₅₀을 회귀직선식(채영암 등, 1991)에 의해 구하였다.

통계처리: 실험결과의 통계처리는 Students' t-test를 이용 일부는 one way ANOVA test를 사용하였으며 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

Gallic acid의 세포독성

Gallic acid를 정상세포인 인체 피부섬유모세포와 암세포인 인체 피부흑색종세포에 적용한 후 MTT 정량분석법에 의하여 세포생존률을 측정한 결과 인체 피부섬유모세포는 통계적으로 유의성이 없었으며 IC₅₀은 640.1 μM 이었다. 반면에 인체 피부흑색종세포는 gallic acid 50 μM 농도에서부터 통계적으로 유의성이 있게 감소하였으며 ($P < 0.05$) IC₅₀은 471.7 μM 이었다. 세포부착능을 측정할 XTT 정량분석에서도 인체 피부섬유모세포는 통계적으로 유의성이 없었으며 IC₅₀은 670.2 μM 이었다. 반면에 인체

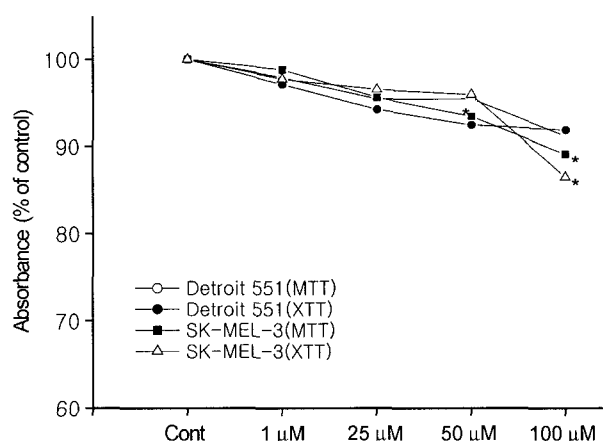


Fig. 2. Cytotoxicities of gallic acid based on MTT and XTT assays in human skin fibroblast (Detroit 551) and human skin melanoma cells (SK-MEL-3). The cells were incubated for 48 hrs. The values represent the mean \pm standard deviations (%) from triplicate experiments. Significantly different from the control value (Cont): * $P < 0.05$ (Students' t-test).

피부흑색종세포는 gallic acid 100 μM 농도에서 통계적으로 유의성이 있었으며 ($P < 0.05$) IC₅₀은 412.7 μM 이었다.

Syringic acid의 세포독성

Syringic acid를 정상세포인 인체 피부섬유모세포와 암세포인 인체 피부흑색종세포에 적용한 후 MTT 정량분석법에 의하여 세포생존률을 측정한 결과 인체 피부섬유모세포는 통계적으로 유의성이 없었으며 IC₅₀은 1,172.9 μM 이었다. 인체 피부흑색종세포는 syringic acid 100 μM 농

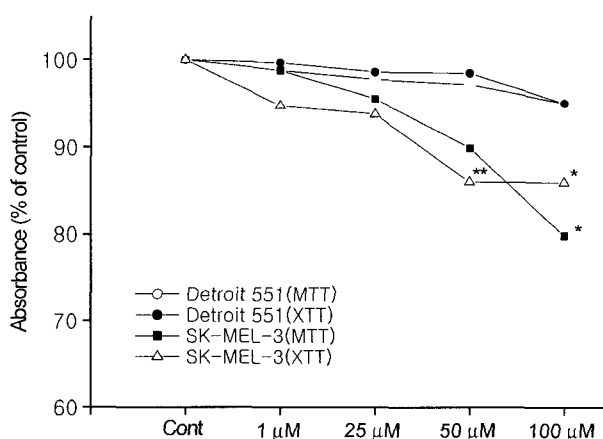


Fig. 3. Cytotoxicities of syringic acid based on MTT and XTT assays in human skin fibroblast (Detroit 551) and human skin melanoma cells (SK-MEL-3). The cells were incubated for 48 hrs. The values represent the mean \pm standard deviations (%) from triplicate experiments. Significantly different from the control value (Cont): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Students' t-test).

도에서부터 통계적으로 유의성이 있게 감소하였으며($P < 0.05$) IC_{50} 은 $251.6 \mu M$ 이었다. 세포부착능을 측정한 XTT 정량분석에서도 인체 피부섬유모세포는 통계적으로 유의성이 없었으며 IC_{50} 은 $1,110.9 \mu M$ 이었다. 반면 인체 피부흑색종세포는 syringic acid $50 \mu M$ 농도에서부터 통계적으로 유의성이 있었으며($P < 0.01$) IC_{50} 은 $438.0 \mu M$ 이었다.

Ferulic acid의 세포독성

Ferulic acid를 정상세포인 인체 피부섬유모세포와 암세포인 인체 피부흑색종세포에 적용한 후 MTT 정량분석법에 의하여 세포생존률을 측정한 결과 인체 피부섬유모세포는 통계적으로 유의성이 없었으며 IC_{50} 은 $938.6 \mu M$ 이었다. 반면에 인체 피부흑색종세포는 ferulic acid $100 \mu M$ 농도에서부터 통계적으로 유의성이 있게 감소하였으며($P < 0.01$) IC_{50} 은 $333.8 \mu M$ 이었다. 세포부착능을 측정한 XTT 정량분석에서도 인체 피부섬유모세포는 통계적으로 유의성이 없었으며 IC_{50} 은 $844.6 \mu M$ 이었다. 인체 피부흑색종세포는 ferulic acid $1 \mu M$ 농도에서 통계적으로 유의성이 있었으며($P < 0.01$) IC_{50} 은 $311.6 \mu M$ 이었다.

Pyrogallol의 세포독성

Pyrogallol을 정상세포인 인체 피부섬유모세포와 암세포인 인체 피부흑색종세포에 적용한 후 MTT 정량분석법에 의하여 세포생존률을 측정한 결과 인체 피부섬유모세포는 pyrogallol $25 \mu M$ 농도에서 통계적으로 유의성이 있었으며($P < 0.05$) IC_{50} 은 $327.6 \mu M$ 이었다. 인체 피부흑색종세포에서도 pyrogallol은 $50 \mu M$ 농도에서 통계적

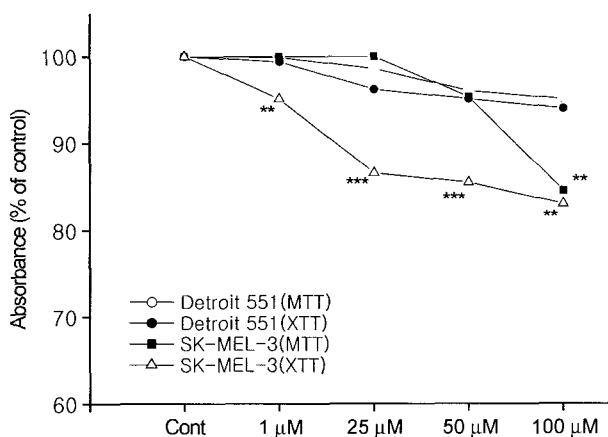


Fig. 4. Cytotoxicities of ferulic acid based on MTT and XTT assays in human skin fibroblast (Detroit 551) and human skin melanoma cells (SK-MEL-3). The cells were incubated for 48 hrs. The values represent the mean±standard deviations (%) from triplicate experiments. Significantly different from the control value (Cont): ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Students' t-test).

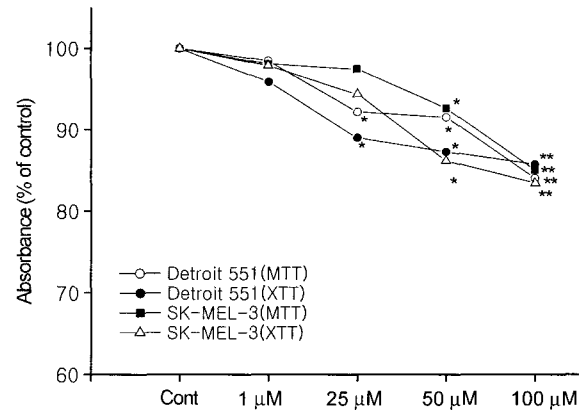


Fig. 5. Cytotoxicities of pyrogallol based on MTT and XTT assays in human skin fibroblast (Detroit 551) and human skin melanoma cells (SK-MEL-3). The cells were incubated for 48 hrs. The values represent the mean±standard deviations (%) from triplicate experiments. Significantly different from the control value (Cont): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Students' t-test).

로 유의성이 있었으며($p < 0.05$) IC_{50} 은 $349.7 \mu M$ 이었다. 세포부착능을 측정한 XTT 정량분석에서도 인체 피부섬유모세포는 $25 \mu M$ 농도에서 통계적으로 유의성이 있었으며($P < 0.05$) IC_{50} 은 $369.0 \mu M$ 이었고 인체 피부흑색종세포에서도 pyrogallol $50 \mu M$ 농도에서 통계적으로 유의성이 있었으며($P < 0.05$) IC_{50} 은 $292.2 \mu M$ 이었다.

정상세포와 암세포에 대한 세포독성 비교

Fig. 6과 7에서 보는 바와 같이 수산기 하나, 카르복실

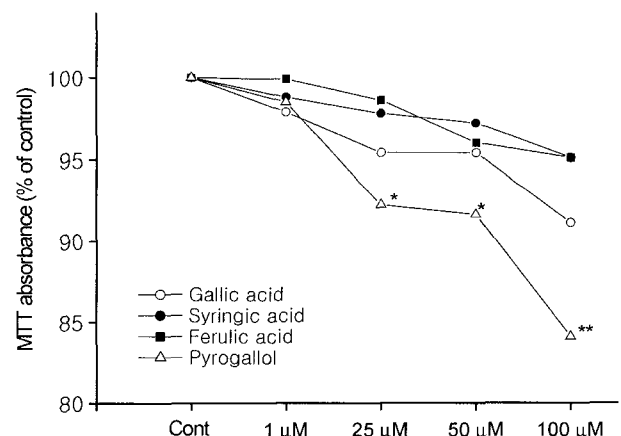


Fig. 6. Cytotoxicities of gallic acid, syringic acid, ferulic acid and pyrogallol based on MTT assays in human skin fibroblast (Detroit 551). The cells were incubated for 48 hrs. The values represent the mean±standard deviations (%) from triplicate experiments. Significantly different from the control value (Cont): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Students' t-test).

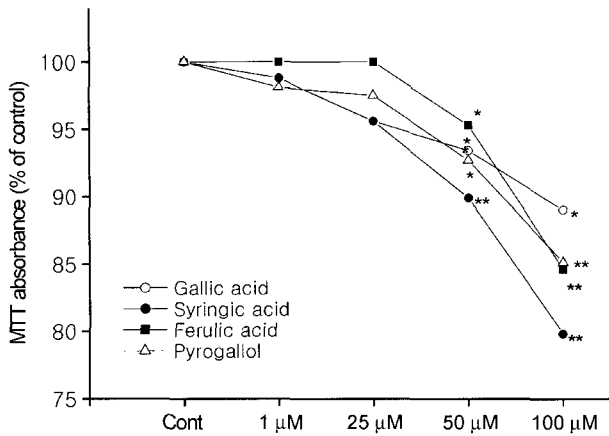


Fig. 7. Cytotoxicities of Gallic acid, Syringic Acid, Ferulic acid and Pyrogallol based on MTT assays in Human Skin Melanoma cells (SK-MEL-3). The cells were incubated for 48 hrs. The values represent the mean±standard deviations (%) from triplicate experiments. Significantly different from the control value (Cont): *P < 0.05, **P < 0.01 (Students' t-test).

기 하나 및 메톡시기 2개가 결합된 syringic acid의 정상 세포인 인체 섬유모세포와 암세포인 인체 피부흑색종세포에 대한 세포독성의 차이가 가장 컸다. 반면 수산기 3개만 결합된 pyrogallol의 정상세포인 인체 피부섬유모세포와 암세포인 인체 피부흑색종세포에 대한 세포독성의 차이가 가장 작았다. 수산기 3개와 카르복실기 하나가 결합된 gallic acid와 수산기 하나, 카르복실기 하나, 메톡시기 하나가 결합된 ferulic acid는 정상세포인 인체 피부섬유모세포보다 암세포인 인체 피부흑색종세포에 세포독성이 강하게 나타났으나 syringic acid 보다 세포독성의 차이가 작았다.

정상세포인 인체 피부섬유모세포에 대한 세포독성은 pyrogallol>gallic acid>ferulic acid>syringic acid 순이었으며 암세포인 인체 피부흑색종세포에 대한 세포독성은 syringic acid>pyrogallol>ferulic acid>gallic acid 순이었다.

고 찰

천연물로부터 정상세포에 대한 독성부작용이 적고 항암활성은 강한 항암물질을 합성하거나 찾아내기 위한 연구는 다양하게 이루어지고 있고 이들 연구중 천연물에 함유되어 있는 각종 성분의 화학적 구조식과 항암활성과의 관계에 관한 연구도 많이 이루어지고 있다(Inoue 등, 1995; Khan 등, 1998; Ishibashi 등, 2002). 화학적 구조식에 영향을 미칠수 있는 산소, 과산화수소, superoxide 및 peroxynitrite(ONOO-) 등의 산화물에 관한 연구(Chung

등, 2000; Virag 등, 1998; Szabo와 Salzman, 1995)와 항산화물질에 관한 연구 등도 다양하게 이루어지고 있다. 본 연구에서는 수산기, 카르복실기 및 메틸기가 방향족 고리구조에 각각 다르게 결합되어 있는 페놀산 중 gallic acid, syringic acid, ferulic acid 및 pyrogallol을 선정하여 정상세포인 인체 피부섬유모세포와 암세포인 인체 피부흑색종세포에 적용한 후 암세포에 선택적 세포독성을 나타내는 페놀산을 찾아내기 위하여 실험한 결과 syringic acid>ferulic acid>gallic acid>pyrogallol 순으로 선택 세포독성을 나타냈다.

Khan과 Hadi(1998)는 gallic acid는 tannic acid보다 DNA 분절능력이 강하나 gallic acid에 결합되어 있는 3개의 수산군 중 2개의 수산군이 메틸화된 syringic acid의 DNA 분절능력은 급속히 감소하여 gallic acid에 결합되어 있는 카르복실군이 dicarboxylation된 pyrogallol은 다시 DNA 분절능력이 증가하므로 이들 페놀산에 결합된 수산군은 DNA 분절능력에 필수적이라고 하였다. 또한 tannic acid, gallic acid, syringic acid 및 pyrogallol의 DNA 분절능력은 pyrogallol > gallic acid > tannic acid > syringic acid 순이었다고 보고하여 본 연구 결과와 일치함을 알 수 있었다. 한편 항산화물질로 알려진(Gali 등, 1992; Sroka 등, 1994) 식물의 2차대사산물인 tannic acid와 gallic acid는 ascorbate(Rowley와 Halliwell, 1983; Stoewe와 Prutz,1987), uric acid(Shamsi와 Hadi, 1995), GSH(Jain 등, 1996), 및 flavonoids 등(Ahmad, 1992)과 같이 구리, 망간, 코발트와 같은 transition metal ion이 존재하든 않든 자체적으로 DNA 손상을 일으킬 수 있고 암세포인 promyelocytic leukemic cells에 세포고사(apoptosis)를 유도한다.

Inoue 등(1995)은 페놀화합물의 세포독성과 화학적 구조와의 연구에서 페놀성 수산군은 세포독성에 필수적이고 카르복실군은 암세포에 선택적 세포독성을 나타내기 위하여 필수적이라 보고하였다. 또한 gallic acid의 세포독성은 면역반응과 관계없이 항산화작용과 hydroxyperoxide 생산억제에 의하여 나타나므로 prooxidative stress에 의한 세포고사로부터 세포를 보호한다고 보고하였다. 한편 gallic acid의 정상세포에 대한 세포독성실험에서 간세포와 대식세포에는 세포독성이 거의 없지만 섬유모세포와 내피세포에는 세포독성이 나타나는데 암세포에 대한 세포독성보다는 약하다고 보고하였다.

방향족 고리구조에 메톡시기 6개가 결합된 flavonoid인 nobiletin은 인체 섬유종세포의 침습능(tumor-invasive activity)을 억제하고(Sato 등, 2002) nobiletin은 항전이 약물이며(Minagawa, 2001) nobiletin은 NO와 O₂의 생산을 억제하며 염증과 관련된 암형성과정의 화학적 치료

제로 사용할 가능성이 있다(Murakami 등, 2000).

이상의 연구결과들을 참고하면 방향족 고리구조에 결합된 수산기, 카르복실기 및 메톡시기가 세포독성에 관여하는 것은 사실이나 이들 결합군에 영향을 미치는 산소, 과산화수소, superoxide 및 peroxynitrite 등과 transition metal ion의 존재에 의하여 세포독성은 변화할 수 있으며 정상세포와 암세포의 종류에 따라 세포독성이 다르게 나타나는 것으로 판단할 수 있으며 앞으로 다양한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각한다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 원광대학교의 교비지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ahmad, M.S., Fazal, F., Rahman, A., Hadi, S.M. and Parish, J.H. (1992): Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu(II): correlation with generation of active oxygen species. *Carcinogenesis*, **13**, 605-608.
- Chung, H.Y., Yokozawa, T., Kim, M.S., Lee, K.H., Kim, K.W., Yang, R. and Choi, J.H. (2000): The mechanism of nitric oxide and/or superoxide cytotoxicity in endothelial cells. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **52**(3), 227-233.
- Duthie Garry, C. and Alan (2000): Plant-derived phenolic antioxidants. current opinion in clinical nutrition and metabolic care. *Lippincott Williams and Wilkins*, **3**(6), 447-451.
- Duthie, G.G. (1999): Parsley, polyphenols and nutritional antioxidants. *Br. J. Nutr.*, **81**, 425-626.
- Gali, H.U., Perchellet, E.M., Klish, D.S., Johnson, J.M. and Perchellet, J.P. (1992): Hydrolyzable tannins: potent inhibitors of hydroperoxide production and tumour promotion in mouse skin treated with 12-O-tetra decanoyl-phorbol-13-acetate *in vivo*. *Int. J. Cancer*, **51**, 425-432.
- Inoue, M., Suzuki, R., Sakaguchi, N., Li, Z., Takeda, T., Ogi-hara, Y., Jiang, B.Y. and Chen, Y. (1995): Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biol. Pharm. Bull.*, **18**(11), 1526-1530.
- Ishibashi, F., Tanabe, S., Oda, T. and Iwao, M. (2002): Synthesis and structure-activity relationship study of lamellarin derivatives. *J. Nat. Prod.*, **65**, 500-504.
- Jain, A., Alvi, N.K., Parish, J.H. and Hadi, S.M. (1996): Oxygen is not required for degradation of DNA by glutathione and Cu(II). *Mutat. Res.*, **357**, 83-88.
- Khan, N.S. and Hadi, S.M. (1998): Structural features of tannic acid important for DNA degradation in the presence of Cu(II). *Mutagenesis*, **13**(3), 271-274.
- Minagawa, A., Otani, Y., Kubota, T., Wada, N., Furukawa, T., Kumai, K., Kameyama, K., Okada, Y., Fujii, M., Yano, M., Sato, T., Ito, A. and Kitajima, M. (2001): The citrus flavonoid, nobiletin, inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma in SCID mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, **92**(12), 1322-1328.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55-63.
- Murakami, A., Nakamura, Y., Torikai, K., Tanaka, T., Koshiba, T., Koshimizu, K., Kuwahara, S., Takahashi, Y., Ogawa, K., Yano, M., Tokuda, H., Nishino, H., Mimaki, Y., Sashida, Y., Kitanaka, S. and Ohigashi, H. (2000): Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Res.* **15**, **60**(18), 5059-5066.
- Rowley, D.A. and Halliwell, B. (1983): Superoxide dependent and ascorbate dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: a physiologically significant reaction? *Biochem. Biophys.*, **225**, 279-284.
- Sato, T., Koike, L., Miyata, Y., Hirata, M., Mimaki, Y., Sashida, Y., Yano, M. and Ito, A. (2002): Inhibition of activator protein-1 binding activity and phosphatidylinositol 3-kinase pathway by nobiletin, a polymethoxy flavonoid, results in augmentation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 production and suppression of production of matrix metalloproteinases-1 and -9 in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Cancer Res.* **2002** **15**, **62**(4), 1025-1029.
- Shamsi, F.A. and Hadi, S.M. (1995): Photoinduction of strand scission in DNA by uric acid and Cu(II). *Free Radical Biol. Med.*, **19**, 189-196.
- Sroka, Z., Bodlaska, H.R. and Mazol, I. (1994): Antioxidative effect of extracts from *Erodium cicutarium* L. *Z. Naturf.*, **49C**, 881-884.
- Stoewe, R. and Prutz, W.A. (1987): Copper catalyzed DNA damage by ascorbate and hydrogen peroxide: kinetics and yield. *Free Radical Biol. Med.*, **3**, 97-105.
- Szabo, C. and Salzman, A.L. (1995): Endogenous peroxynitrite is involved in the inhibition of mitochondrial respiration in immuno-stimulated J774.2 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**, **209**(2), 739-743.
- Virag, L., Salzman, A.L. and Szabo, C. (1998): Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J. Immunol.* **1**, **161**(7), 3753-3759.
- 채영암, 구자옥, 서학수, 이영만 (1991): 기초생물통계학 제 9장 직선회귀. 향문사(서울대학교 농학도서관), 179-198.