

Toxic Effect on Phenolic Compound by Colorimetric Assay in Normal NIH 3T3 Fibroblasts

Byung-Jo Jin¹, Joo-Hyun Lee¹, Ki-Wook Choi², Jae-Kyoo Lee² and Du-Seok Han^{1†}

¹Department of Oral Anatomy, College of Dental Medicine,

²School of Medicine, Wonkwang University, Jeonbuk 570-749, Korea

This study was carried out to evaluate the cytotoxic effect of phenolic compound on normal NIH 3T3 fibroblasts. The colorimetric assay for phenol compound, syringic acid was performed by MTT assay or XTT assay. MTT or XTT assays are known as a very sensitive method in measuring the cytotoxic effect of chemical agents in vitro. In the present study, syringic acid on normal NIH 3T3 fibroblasts did not show any cytotoxicity for MTT assay or XTT assay compared with control after cells were treated with various concentrations of syringic acid for 48 hours. MTT₅₀ and XTT₅₀ were 3,340.9 μ M and 2,462.4 μ M of syringic acid, respectively. From the above the results, it is suggested that phenolic compound of syringic acid did not have any cytotoxicity on normal NIH 3T3 fibroblasts.

Key Words: Normal NIH 3T3 fibroblast, Syringic acid, Colorimetric assay

서 론

페놀화합물은 식물로부터 정제, 추출되는 물질로서 syringic acid를 비롯하여 caffeic acid, ellagic acid와 같은 다수의 페놀산들이 있다 (Constabel et al., 2000). 이들 페놀화합물들은 polyphenols의 일종으로 이의 분자구조에 수산기를 가지고 있으며 이들 수산기들은 다른 염기와 치환반응을 일으킴으로서 선택적인 독성효과의 경감을 비롯하여 항돌연변이나 항암작용과 같은 면역반응을 나타낸다고 보고된 바 있다 (Duthie et al., 2000). 페놀화합물과 같이 약리활성을 나타내는 천연물 중에는 페놀화합물 외에도 카로티노이드 (carotenoid)를 비롯하여 파이토스테롤 (phytosterol) 및 파이토스탄올 (phytostanol)과 같은 수종의 천연화합물들이 알려져 있다 (이, 1988). 예로부터 동양에서는 녹차 속에 페놀화합물이 다량 함유되어 있어 건강보호에 매우 유익하다고 해서 꾸준히 애용하여 왔다 (정 등, 1996). 또한 남미나 유럽에 있어서는 코코아나 포도주의 섭취가 건강보호효과가 있다고 해서 널리 기호품으로 애용되어 왔다 (Wattenbergh, 1985). 이러한 현상은 페놀화합물이 인체에 유익한 약리활성을 나타내는 성분들을 다량 함유하고 있음을 증명하고 있으며 이들은 위에서

살펴본 것처럼 과일류를 비롯하여 보리, 야채류, 코코아, 포도주, 녹차 등 수많은 음식물들에 포함되어 있다 (이, 1988; Constabel et al., 2000). 페놀화합물의 약리활성 중 항산화능이 있어 활성산소의 제거에 매우 뛰어난 효능을 가지고 있다는 것이 보고된 바 있다 (Duthie et al., 2000; 양, 2003). 이는 페놀화합물의 구조식중 수산기와 카르복실기의 상호작용에 의하여 oxygen free radicals를 치환해 주기 때문에 산소라디칼 제거능의 효능을 나타낸 결과인 것으로 알려져 있다 (Sakagami et al., 2001). 페놀화합물의 일종인 syringic acid는 방향족 메틸기를 비롯한 수산기, 또는 아실기 (C₆-C₃)의 구조식을 가지고 있어 항산화작용은 물론 항암효과에도 매우 유용한 효능이 있는 것으로 제시된 바 있다 (Hirota et al., 2000).

최근 암발현에 산소자유라디칼이 관여하고 있음이 밝혀지면서 암 발생 기전을 활성산소의 산화적 손상측면에서 규명하려는 연구가 시도되고 있다 (Duthie et al., 2000). 이러한 측면에서 볼 때 항산화작용이나 항암효과는 서로 긴밀히 연관되어 있음을 제시하고 있다 (Duthie et al., 2000; Kawada et al., 2001). 현재 암의 치료로서 방사선요법을 비롯한 면역요법, 수술 등 여러 방법이 있지만 우선적으로 항암제가 널리 사용되고 있다 (Goodman et al., 1987). 이는 항암제가 암세포를 죽이는 강력한 약리작용이 있기 때문이다 (Kawada et al., 2001; Sharma et al., 1994). 그러나 기존의 항암제들은 대부분 장기간 복용 시 탈모를 비롯하여 신경장애나 소화기계통의 장애를 나타냄으로서 심각한 후유증을 초래하게 된다 (한 등, 1999). 그러므로 이러한 후유증을 줄이기 위해서는 암세포만을 선택적으로 죽일 수 있는 약제의 개발이 최우선적이다

*논문 접수: 2004년 8월 17일

수정재접수: 2004년 9월 8일

†교신저자: 한두석, (우) 570-749 전북 익산시 신룡동 344-2

원광대학교 치과대학 구강해부학교실

Tel: 063-850-6853, Fax: 063-255-3462

e-mail: onett@wonkwang.ac.kr

(Panizzi et al., 2002). 따라서 syringic acid와 같은 페놀화합물은 천연물로부터 정제되는 물질로서 우선 독성이 기존항암제에 비하여 적다는 것이다 (Wattenberg, 1985; 정 등, 1996). 특히, 페놀화합물 중 syringic acid의 약리작용에 대해서는 많은 연구가 되어 있지 않으나 항산화작용과 같은 DPPH radical-scavenging activity에 대해서 보고된 바 있다 (Sakagami et al., 2001; Andrade et al., 2001). 이 같은 syringic acid의 약리활성은 syringic acid의 메틸기를 비롯한 수산기 및 아실기의 구조변형과 관계되는데 이는 acyl moiety 또는 phenylethanoid moiety에서 메틸기에 의한 수산기의 대체나 sugar chain의 변형시 항산화작용의 감소현상에 기인한다고 하였다 (Yamane et al., 1995). 또한 syringic acid의 phenolic hydroxyl group의 메틸화와 carboxyl group의 에스테르화는 암세포가 아닌 정상세포에 대해 선택적으로 세포독성의 경감을 유도한다고 보고되기도 하였다 (Borenfreund et al., 1988). 실제로 이 (1988)는 인체구강유상피암종세포와 정상치은섬유모세포에 처리한 결과 정상세포에는 독성이 없었으나 암종세포에는 강한 독성을 나타냈음을 보고하였다. 이러한 현상은 syringic acid는 항암효과를 가지고 있다는 것을 증명하고 있으며 동시에 syringic acid를 비롯한 페놀화합물의 이러한 구조식의 변화는 확실히 세포독성의 제거능에 커다란 영향을 미친다는 것은 많은 연구에서 밝혀진 바 있다 (정 등, 1996; 한 등, 1999). 따라서 페놀화합물의 항암작용에 관련하여 암세포에 대한 세포독성은 꾸준히 연구가 진행되어 있으나 정상세포에 대한 세포독성에 대해서는 거의 연구가 되어 있지 않다 (Mosmann, 1983). 따라서 본 연구에서는 페놀화합물 중 강력한 항암작용을 나타내는 syringic acid가 정상세포인 NIH 3T3 섬유모세포에 미치는 독성효과를 조사하기 위하여 colorimetric assay에 의한 정량분석을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험약제

본 실험의 세포배양에 사용된 FBS (Fetal bovine serum)를 비롯한, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fungizone, penicillin 및 fungizone은 Gibco사에서, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 비롯한, 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide (XTT), phosphate buffered saline (PBS) 및 phenolic compound인 syringic acid는 Sigma Chemical사에서 각각 구입하였다.

2. 실험기기

정상 NIH 3T3 섬유모세포의 배양은 CO₂ 항온기 (Shellab Co., Cornelius, U.S.A.)를 사용하였으며 세포수의 계산은 Turk

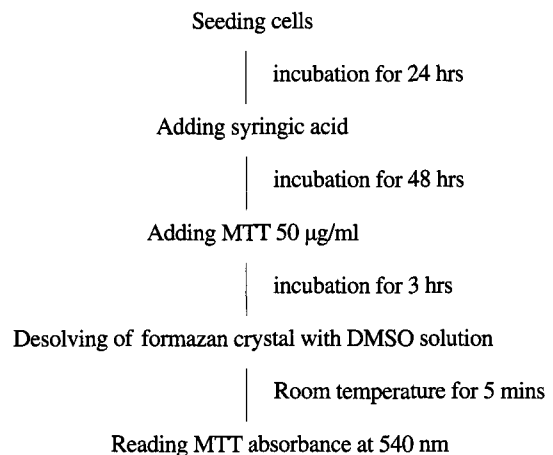


Fig. 1. Flow scheme of MTT assay.

형 혈구계산기 (Marienfeld Co., Mergentheim, Germany)를 사용하였다. MTT와 XTT 정량분석은 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, U.S.A.)를 사용하였다.

3. 세포배양

정상 NIH 3T3의 배양은 MEM 배지에 10% FBS를 비롯하여 penicillin (25 unit/ml), fungizone을 첨가하여 사용하였다. 세포연속배양은 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 처리한 후 Turk 형 혈구계산기로 세포를 5×10^4 cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

4. MTT 정량

MTT 정량은 Mosmann (1983)의 방법에 의하여 정상 NIH 3T3 섬유모세포에 5×10^4 cells/ml 세포수를 넣고 24시간 배양한 후 phenolic compound인 syringic acid를 농도별로 처리한 다음 48시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 MTT (Sigma Co.) 50 µg/ml가 포함된 배양액을 배양용기당 1 ml씩을 넣어 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide (DMSO)를 배양용기당 2 ml/well씩을 넣어 5분간 실온에서 방치하여 MTT formazan을 용해한 다음 분광광도계 ELISA reader로 MTT 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다. 분석방법의 개요는 다음과 같다 (Fig. 1).

5. XTT 정량분석

1 mg laminin을 PBS에 용해시킨 저장액을 냉장고에 보관한 후 실험당일 필요한 양을 희석한 다음 24 well plate에 200 µl씩 분주하여 하룻밤 동안 건조시켰다. 건조 완료 후 PBS로 두세 번 세척한 다음 3% BSA (Bovine serum albumin, Sigma Co.)를 각 well당 200 µl씩 첨가하여 잘 진탕한 후 다시 이를 PBS로 두세 번 세척하였다. 배양된 정상 NIH 3T3

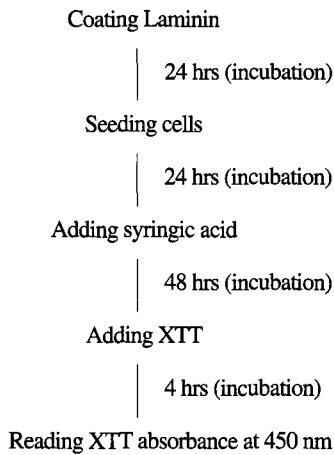


Fig. 2. Flow Scheme of XTT assay.

섬유모세포를 5×10^4 cells/ml 밀도로 배양용기에 넣고 24시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 phenolic compound인 syringic acid를 각각의 농도를 처리한 다음 48시간 동안 배양한 다음 PBS로 두세 번 세척하였다. 세척 완료 후 XTT와 혼합 후 각 배양용기에 200 μ l씩을 주입하여 4시간 동안 배양한 다음 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 분석방법의 개요는 다음과 같다 (Fig. 2).

6. IC₅₀ 측정

Syringic acid의 독성에 대한 midcytotoxicity (MCV₅₀)의 측정은 배양 중인 정상 NIH 3T3 섬유모세포를 각 용기당 5×10^4 cells/ml씩 넣어 24시간 동안 배양한 다음 100~4,000 μ M의 각각의 syringic acid를 첨가하여 12~72시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 MTT 정량 및 XTT 정량을 한 후 이들 각각에 대한 IC₅₀ 값을 측정하였으며 이 때 각 농도에서 48시간 동안 배양함에 있어서 IC₅₀ 값을 나타냄으로서 모든 실험은 48시간 배양한 후 측정하였다.

7. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 students' t-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. MTT 정량

25 μ M, 50 μ M, 100 μ M phenolic compound인 syringic acid가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 정상섬유모세포인 NIH 3T3을 48시간 동안 배양한 다음 MTT를 정량분석하였다. 그 결과 25 μ M의 농도에서는 MTT 흡광도는 대조군에 비하여 99.9%로 나타났으며 50 μ M의 처리에서는 99.5%로 나타났다.

Table 1. The cytotoxicity of phenolic compound, syringic acid by MTT assay on normal NIH 3T3 fibroblasts

Group	MTT	
	Mean \pm S.D.	(% of control)
Concentration of syringic acid (μ M)		
control	4.16 \pm 0.00	100
25	4.16 \pm 0.01	99.9
50	4.14 \pm 0.03	99.5
100	4.10 \pm 0.01	98.4

Normal NIH 3T3 fibroblasts were incubated with or without phenolic compound, syringic acid for 48 hours. The value represent the mean \pm SD for triplicate experiments

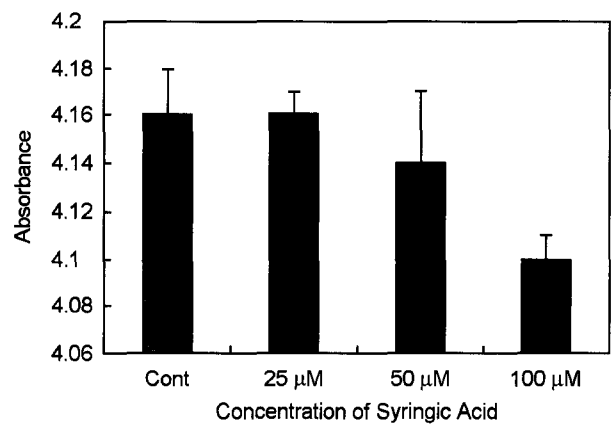


Fig. 3. Cytotoxicity was measured by MTT assay in normal NIH 3T3 fibroblasts after cells were treated with 25, 50, 100 μ M picric acid for 48 hours, respectively.

또한 100 μ M syringic acid의 흡광도는 대조군에 비하여 98.4%로 나타나 약제의 농도가 증가할수록 다소 흡광도의 감소를 보였으나 유의성은 없었다 (Table 1, Fig. 3).

2. XTT 정량

정상세포인 NIH 3T3 섬유모세포에 phenolic compound인 syringic acid가 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M의 각각 농도로 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 다음 XTT의 정량을 분석하였다. 그 결과 25 μ M의 농도에서는 XTT 흡광도는 대조군에 비하여 98.5%로 나타났으며 50 μ M의 처리에서는 98.1%로 나타났다. 또한 100 μ M syringic acid의 흡광도는 대조군에 비하여 97.3%로 나타나 약제의 농도가 증가할수록 다소 흡광도의 감소를 보였으나 유의성은 없었다 (Table 2, Fig. 4).

3. MTT IC₅₀

MTT₅₀을 측정하기 위하여 정상 NIH 3T3 섬유모세포에 100 μ M 이상의 phenolic compound인 syringic acid가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 다음 MTT

Table 2. The cytotoxicity of phenolic compound, syringic acid by XTT assay on normal NIH 3T3 fibroblast

Group	XTT	
	Mean \pm S.D.	(% of control)
Concentration of syringic acid (μ M)		
control	4.03 \pm 0.01	100
25	3.97 \pm 0.02	98.5
50	3.95 \pm 0.03	98.1
100	3.92 \pm 0.07	97.3

Normal NIH 3T3 fibroblasts were incubated with or without phenolic compound, syringic acid for 48 hours. The value represent the mean \pm SD for triplicate experiments

Table 3. The cytotoxicity of IC₅₀ on phenolic compound, syringic acid by MTT or XTT assays in normal NIH 3T3 fibroblasts

Cell line	IC ₅₀ (μ M)	
	MTT	XTT
Normal NIH 3T3 fibroblast	3,340.9**	2,462.4**

Cells were incubated with phenolic compound, syringic acid for 48 hours. The values represent the mean \pm SD for triplicate experiments. **P<0.01

정량을 측정하였다. 그 결과 MTT₅₀은 3,340.9 μ M에서 나타났다 (Table 3, Fig. 5).

4. XTT IC₅₀

XTT₅₀을 측정하기 위하여 정상 NIH 3T3 섬유모세포에 100 μ M 이상의 phenolic compound인 syringic acid가 여러 농도로 각각 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 다음 XTT 정량을 측정하였다. 그 결과 XTT₅₀은 2,462.4 μ M에서 나타났다 (Table 3, Fig. 5).

고 찰

약제의 선택적인 세포독성은 병변의 치료에 매우 중요하다 (이 등, 1988: Hirota et al., 2000). 왜냐하면, 암의 경우 암세포에는 강력한 세포독성을 나타낸다면 가장 효과적인 항암치료제임은 말할 것도 없다 (Cha et al., 1996). 반면, 약제가 정상세포에 까지 세포독성을 나타낸다면 이로 인한 병변의 완치 후에도 매우 심각한 각종 부작용과 후유증으로 인하여 환자는 많은 고통에 시달리게 된다 (Mosmann, 1983: Wattenberg, 1985). 기존의 항암제들은 정상세포에 강한 독성을 나타냄으로서 이를 대체할 수 있는 신약개발이 시급한 시점에 있다 (Wattenberg, 1985: 한 등, 1999). 각종 식물로부터 얻는 천연물들은 기존의 항암제보다는 독성이 적거나 거의 없는 경우가 많다 (Constabel et al., 2000: Hirota et al., 2000). 이는 천연물 성분이 정상세포 보다는 암세포에 더욱 강한 독

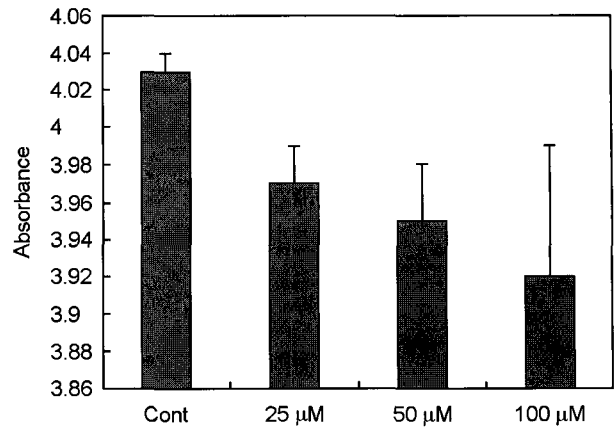


Fig. 4. Cytotoxicity was measured by XTT assay in normal NIH 3T3 fibroblasts after cells were treated with 25, 50, 100 μ M picric acid for 48 hours, respectively.

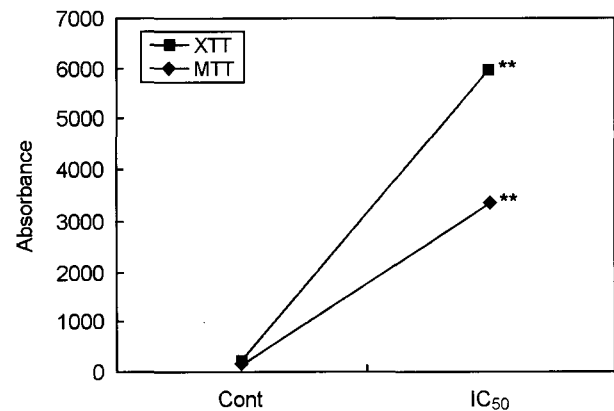


Fig. 5. Midcytotoxicity of IC₅₀ was measured by MTT and XTT assays in normal NIH 3T3 fibroblasts after cells were treated with gallic acid for 48 hours, respectively.

성효과를 나타내는 약리활성물질을 가지고 있기 때문이다 (Yamane et al., 1995). 이의 대표적인 천연물의 하나가 페놀화합물이다. 페놀화합물은 페놀산의 성분을 가지고 있는 방향족 화합물로서 항암작용을 비롯하여 항산화작용, 항균작용과 같은 약리활성을 나타낸다 (Hirota et al., 2000: Kawada et al., 2001). 페놀화합물 중 강력한 항암작용을 가지고 있는 syringic acid는 암세포에 대하여 많은 연구가 되어 있으나 정상세포에 대한 독성효과에 대해서는 잘 알려져 있지 않다 (정 등, 1996: 한 등, 1999). Syringic acid는 수산기와 아실기, 카르복실기와 같은 화학적 구조를 가지고 있어 해독작용이나 항산화작용이 매우 높다고 알려져 있다 (정 등, 1996). 따라서 본 연구에서는 syringic acid가 정상세포에 미치는 독성효과를 알아보기 위하여 NIH3T3 섬유모세포를 배양한 후 25 μ M에서 100 μ M까지의 syringic acid가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 후 이의 독성효과를

MTT 정량과 XTT 정량으로 조사하였다. 그 결과 syringic acid의 농도가 증가함에 따라 대조군에 비하여 약간의 흡광도의 감소는 있었으나 유의성은 나타나지 않았다. 이러한 결과는 syringic acid가 정상 섬유 NIH 3T3 섬유모세포에 대하여 독성을 가지고 있지 않다는 것을 말해주고 있으며 Sakagami 등 (2001)도 syringic acid나 gallic acid와 같은 페놀산이 정상세포 보다 암세포에 선택적으로 독성이 강하게 작용하였다고 보고함으로써 본 연구의 결과와도 부합되는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 syringic acid의 수산기와 카르복실기 간의 상호작용에 의해 선택적으로 세포독성을 나타낸 것으로 생각된다 (Mosmann, 1983; Duthie et al., 2000; Andrade et al., 2001). 한편, 페놀화합물인 syringic acid의 독성 정도를 측정하기 위하여 syringic acid가 100 μM 이상 포함된 배양액에서 48시간 동안 정상 NIH 3T3 섬유모세포를 배양한 후 MTT와 XTT 정량분석에 의하여 midcytotoxicity (MCV)값인 IC_{50} 농도를 측정하였다. 그 결과 MTT 정량에서는 IC_{50} 값이 3,340.9 μM 에서 나타났으며, XTT 정량분석에서는 2,462.4 μM 에서 각각 나타났다. 이러한 실험결과는 페놀화합물인 syringic acid가 정상 NIH 3T3 섬유모세포에 대하여 무독성인 것으로 나타났다. 이러한 이유는 Borenfreund 등 (1988)이 각종 약제에 대하여 독성판정기준을 정함에 따라 피검체의 MTT_{50} 값이나 XTT_{50} 값이 100 μM 이하이면 고독성인 것으로 분류하였으며 100 μM 에서 1,000 μM 의 범위에서는 중독성, 1,000 μM 에서 2,000 μM 범위에서는 저독성으로, 2,000 μM 이상인 경우는 무독성인 것으로 분류하였다. 이러한 분류기준에 의하여 본 실험에서는 MTT_{50} 과 XTT_{50} 값이 모두 2,000 μM 이상에서 나타남으로써 무독성인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 이 (1998)가 정상치은섬유모세포에 syringic acid를 처리한 바 독성이 없었다는 보고와 일치하였는데 이는 아마도 Borenfreund 등 (1988)이 제시한 바와 같이 syringic acid의 수산기 메틸화와 카르복실기의 에스테르화의 상호작용의 결과일 가능성이 클 것으로 생각된다 (Wattenberg, 1985; Duthie et al., 2000). 그러나 syringic acid와 같은 페놀화합물의 세포독성에 대한 자세한 기전을 밝히기 위해서는 암세포의 전사나 발현에 관계되는 세포내 이차전달자를 비롯하여 세포내 칼슘채널 및 이와 관련이 깊은 Ca^{2+} channel associated NMDA receptor 및 G protein과 같은 신호전달체계 등과 같은 다양한 분야에서 연구가 동시에 수행되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행되었음.

REFERENCES

- Andrade PB, Oliveira BM, Seabra RM, Ferreira MA, Ferreres F, Garcia-Viguera C. Analysis of phenolic compounds in Spanish Albrarino and Portuguese Alvarinho and Loureiro wines by capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis*. 2001. 22: 1568-1572.
- Borenfreund E, Babichi H, Matin-Alcuacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assay. The neutral red(NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro*. 1988. 2: 1-8.
- Cha HJ, Bae SK, Lee HY, Sato H, Seiki M, Park BC, Kim KW. Anti-invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibroblastoma cells. *Cancer Res*. 1996. 2281-2284.
- Constabel CP, Yip L, Patton JJ, Christopher ME. Nucleotide, Free in PMC, Protein Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol*. 2000. 124: 285-295.
- Duthie GC, Alan. Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. Lippincott williams and wilkins. 2000. 3: 447-451.
- Goodman GE, Yen YP, Cox TC, Crowley J. Effect of verapamil on in vitro cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in human tumor cells. *Cancer Res*. 1987. 47: 2295-2304.
- Hirota A, Taki S, Kawaii S, Yano M, Abe N. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso and antiproliferative activity of isoflavones from soybean miso toward the cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000. 64: 1038-1040.
- Kawada M, Ohno Y, Ri Y, Ikoma T, Yuuetu H, Asai T, Watanabe M, Yasuda N, Akao S, Takemura G, Minatoguchi S, Gotoh K, Fujiwara H, Fukuda K. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs*. 2001. 12. 847-852.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983. 65: 55-63.
- Panizzi L, Caponi C, Catalano S, Cioni PL, Morelli I. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *J Ethnopharmacol*. 2002. 79: 165-168.
- Sakagami H, Arakawa H, Maeda M, Satoh K, Kadofuku T, Fukuchi K, Gomi K. Production of hydrogen peroxide and methionine sulfoxide by epigallocatechin gallate and antioxi-

- dants. *Anticancer Res.* 2001. 21: 2633-2641.
- Sharma S, Jilka DS, Kelloff GJ, Vernon ES. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* 1994. 54: 5848-5855.
- Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* 1985. 45: 1-8.
- Yamane T, Takahashi T, Kuwata K, Oya K, Inagake M, Kitao Y, Suganuma M, Fujiki H. Inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine -induced carcinogenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the rat glandular stomach. *Cancer Res.* 1995. 55: 2018-2084.
- Yang HS. In Vitro Evaluation of Ferulic Acid and Vitamin A. *The Korean J Anat.* 2003. 27: 1-10.
- Lee MH. Antitumor Effect of Taraxaci Herba Water Soluble Extracts on the Cultured Human Oral Epitheloid Carcinoma cells. *The Journal of Wonkwang Biomaterial Implant Research Institute.* 1988. 7: 1-16.
- Jung GH, Han DS. Antitumor Activity and Cytotoxicity of Extracts of Green Tea Seed. *The Korean J Anat.* 1996. 20(2): 297-305.
- Han SS, Lo SC, Choi YH, Kim MJ, Kwak SS. Antioxidative Compounds in Extracts of *Accr ginnala Max.* *KJMCS.* 1999. 7: 51-57.