

창이자의 사람 세포주에서의 발암 억제효과

소명숙

대구보건대학 간호과 교수

Effect of *Xanthium sibiricum Patr.* on Carcinogenesis in Human Cell Lines

Myung Suk So

Professor, Department of Nursing, Daegu Health College, Daegu, Korea

Purpose: The aim of this study is to evaluate the effect of *Xanthium sibiricum Patr.* on carcinogenesis. **Method:** Water extract from *Xanthium sibiricum Patr.* (XPW) was prepared and investigated for the potential antitumor activity and inhibition of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation and free radical formation. **Result:** It was shown that the water possess considerable toxicity toward tumor cell lines. Concentration of XPW at 1.0 mg/mL and 2.5 mg/mL resulted in more than 30% inhibition of growth in HeLa cells. Toxicity of XPW to A549 revealed that 54% inhibition of growth at concentration of 2.5 mg/mL. At concentrations of 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL and 2.5 mg/mL of XPW, the binding of [³H]B[a]P metabolites to DNA of human Chang cell was inhibited by 19%, 33%, and 41%, respectively. There 18% and 32% inhibition in the free radical formation with XPW at the concentration of 1.0 mg/mL and 2.5 mg/mL, respectively. **Conclusion:** Water extract from *Xanthium sibiricum Patr.* (XPW) has antitumor and cancer chemopreventive activities.

Key Words : *Xanthium sibiricum Patr.*, Antitumor activity, Benzo[a]pyrene-DNA formation, Free radical

국문주요어 : 창이자, 항암활성, 발암물질-DNA 결합, 자유기

서 론

1. 연구의 필요성

악성종양은 병리학적으로는 암이라 규정하고 있으며, 체내 각 부위로의 확산과 빠른 침윤성 성장 및 전이와 같은 특이성을 지니고 있어 생명의 위협을 초래할 뿐만 아니라 현재 인류에게 있어서 가장 큰 위협성 있는 전신성 질환으로 인식하고 있다. 암은 정상세포가 외부의 발암물질원에 의해 다단계로 진행되며 크게 개시(initiation), 촉진(promotion), 그리고 진

행(progression)의 세 과정으로 진행된다. 먼저 개시단계에서 발암물질이 세포의 정보전달물질인 DNA에 구조적 손상을 주어 돌연변이를 유발하는 과정으로 비가역적으로 진행되는 것으로 알려져 있다. 일단 손상된 DNA가 수복되지 않으면 돌연변이(mutation)를 일으킨 DNA의 세포분화 과정에서 복제되어 세포가 암세포로 전환된다. 촉진단계는 유전자에 돌연변이를 일으킨 정상세포의 유전자적 손상이 점차적으로 확대되고 세포증식이 증가되어 전암세포로 전환된 후 양성암으로 발전하는 과정이다. 이후 양성암이 더욱 분화하여 악성으로 변형되는 최종단계를 진행단계라 한다. 이러한 다단계 과정으로 일어나는 암 발생과정은 여러 가지 천연 또는 화학적 화합물에 의해 억제되거나 지연될 수 있다. 암예방은 이러한 다단계적 발암과정을 저해하거나 억제시키는 효과를 말하는 것으로 발암물질로부터 노출을 막거나 개시단계를 억제함으로써 사람의 암을 감소시키는 데 이용되는 예방적인 방법

Corresponding author :

Myung Suk So, Professor, Department of Nursing, Daegu Health College,
San 7 Taejeon-dong, Buk-gu, Daegu 702-722, Korea
Tel: 82-53-320-1465 Fax: 53-320-1470
E-mail: soms@dhc.ac.kr

투고일 : 2010년 10월 29일
게재확정일 : 2010년 12월 6일

심사의뢰일 : 2010년 11월 2일

이다. 이러한 악성종양을 치료하기 위하여 여러가지 치료법들이 도입되고 있으나 한계성 및 독성문제, 부작용등의 문제점을 가지고 있는 실정이다. 이러한 문제를 해결하기 위한 방안으로 새로운 천연물에서 안전성이 있는 약물개발이 절실히 요구되고 있다(Song et al., 1999). 암에 관련된 제재 개발 연구는 발병된 암을 치료할 수 있는 항암제 개발과 암의 진행 과정을 저지할 수 있거나 암 발병을 예방할 수 있는 물질 개발 차원에서 이루어지고 있다. 특히 근래에는 항암제의 독성에 의한 부작용으로 암이 발병하기 전에 막을 수 있는 암발생 억제물질(chemopreventive agents)의 개발이 중점적으로 이루어지고 있다(Sheela et al., 1994).

창이자(*Xanthium sibiricum Patr.*)는 국화과에 속하는 도꼬마리(*Xanthium strumarium L.*) 열매로서 약혈, 장기육, 풍양, 폐위, 두창, 응중, 여양, 음퇴, 요혈종통, 간열, 나역, 골절, 악창등의 효능이 있다고 알려져 있다(이시진, 1992). 이에 본 논문에서는 창이자 열수추출물을 준비하여 사람의 암세포에의 독성효과, 발암물질과 DNA 결합 억제 및 자유기 소거 효과를 측정하여 창이자의 암 발생 억제 효과에 대해 증명하고자 한다.

2. 연구 목적

본 연구의 목적은 창이자의 사람 세포주에서의 암세포 독성효과, Carcinogen-DNA 결합 억제 효과 및 자유기 소거효과를 통하여 발암 억제효과를 규명하는 것이다.

연구 방법

1. 연구 설계

본 연구는 창이자 열수추출물을 이용하여 사람 세포주에서의 발암 억제효과를 규명하기 위한 순수 실험연구이다.

2. 실험재료

1) 시약

Minimum Essential Medium Eagle's (MEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), RPMI 1640, antibiotics, trypan blue, dimethylsulfoxide (DMSO), [3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 99% ethyl alcohol anhydrous, Hanks' balanced salt solution (HBSS), phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA), cytochrome C, proteinase K, potassium

acetate, Tris-EDTA buffer, RNase A, RNase T1, Tris-HCl, bovine serum albumin (BSA)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 Join Bio-Innovation (JBI)사(Daegu, Korea) 제품을 사용하였다. 기타 시약은 세포 배양용 및 1급 시약을 사용하였다.

2) 시료 제조

창이자 60 g을 조말하여 3차 증류수 400 mL을 가한 뒤 rotary evaporator (BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 진탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 mL을 감압농축하여 pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 µm, Whatman, Germany)로 여과하고, 여과된 생약 열수추출액을 freezer dryer를 이용하여 완전 건조시킨 후 건조중량(2.9 g)을 측정하였다. 그리고 실험 조건에 사용되는 배지 및 증류수에 희석시켜 실험에 사용하였다.

3. 실험 방법

1) 세포배양

계대 보존 중인 사람의 자궁경부암 HeLa 세포는 10% FBS이 첨가된 MEM 배지로, 사람의 폐암세포주 A549와 사람의 정상 간세포 Chang cell은 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액으로, 사람 백혈병세포 HL-60은 10% FBS이 포함된 RPMI 1640 배양액에서 각각 배양하였다. 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 이들 세포는 액체질소의 기체상태(-150°C)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 실험에 사용하였으며, 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

2) 암세포 독성효과(MTT assay)

실험에 사용한 적정 세포수는 세포부유액을 세포 밀도 1/2로 희석하면서 접종한 후 96-well plate를 37°C, 5% CO₂ 하에서 3일간 배양한 후 MTT 처리 후의 흡광도를 측정하였다. 세포 농도에 따른 지수 곡선에서 흡광도가 0.6-0.7인 부분의 세포농도가 적정세포의 수로 본 실험에 사용하였다. 적정수의 세포(HeLa 1×10⁴, A549 1×10⁴)를 200 µL의 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 CO₂ incubator에서 24시간 배양 후 농도별 시료가 포함된 새 배지를 200 µL씩 각 well에 가하였다. 세포를 시료가 첨가된 배양액에서 72시간 배양한 후, PBS에 녹인 20 µL MTT 용액(5 mg/mL PBS)을

well에 넣고 4시간 배양하여 MTT가 환원되게 한다. 450×g에서 5분간 원심분리한 후 배양액을 버리고 DMSO와 ethanol을 1:1 섞어 만든 용액 150 μL씩 각각의 well에 넣어 20분간 fomazan 결정을 용해하여 ELISA microplate reader (Molecular Devices, CA, USA) 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Carcinogen-DNA binding 억제 효과 측정

DMEM 배지에 Chang cell을 부유시켜 6-well plate에 접종시키고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 18시간 경과 후, 배지를 교환하여 시료를 농도별로 처리하고, 10 μM [³H]B[a]P (Amersham Life Science, Buckinghamshire, England)을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. DNA 추출은 다음과 같이 실시하였다(Sharma et al., 1994). [³H]B[a]P에 처리된 세포는 PBS로 세척하고, proteinase K (100 μg/mL)가 함유된 0.2 M Tris-0.1 M EDTA (pH 8.5) buffer 0.5 mL을 각 well에 처리하였다. 효소의 반응을 활성화시키기 위해 10분 동안 배양한 뒤, well로부터 세포를 떼어내어 회수하였다. 회수된 세포를 10% SDS 용액을 첨가하여 55°C에서 3시간 동안 배양하여 단백질을 제거하였으며, 5 M potassium acetate 용액을 첨가하여 30분 동안 4°C에서 세포를 방치한 뒤, 13,000×g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액만을 취한 뒤, 상층액 2배의 양의 cold ethanol을 첨가하였고, DNA를 침전시키기 위하여 -20°C에 12시간 이상 방치하였다. 13,000×g에서 15분 동안 원심분리한 뒤 상층액을 제거하여 DNA를 회수하였다. DNA pellet은 70% ethanol에 세척한 뒤 500 μL of 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 8.0) buffer로 현탁하였으며, RNA를 제거하기 위하여 RNase A와 RNase T1을 각각 5 μL씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 방치하였다. DNA 함유량은 260 nm (1 A260 nm unit=50 μg)에서 흡광도를 측정하여 결정하였고, 흡광도를 측정한 뒤 잔량의 DNA는 liquid scintillation counter (Beckman LS 6500, Fullerton, USA)를 이용한 radioactivity 측정에 사용하였다. 시료에 의한 carcinogen-DNA binding 억제 효과는 다음 공식으로 계산하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = [1 - \text{cpm per } \mu\text{g DNA (sample-treated cells)}] \times 100 \text{cpm per } \mu\text{g DNA (control cells)}$$

4) 자유기 소거효과 측정

자유기(free radical) 소거효과는 다음과 같이 실시하였다

(Davis et al., 1980). 1×10⁶개의 HL-60 세포를 HBSS에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 자유기를 형성시키기 위하여 8 μM phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA)를 처리하여 1 시간 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에 배양 하였다. 배양 후 시료를 각각 처리한 뒤, 160 μM cytochrome C을 각 well에 첨가하여 배양기에 20분 동안 배양하였다. Cytochrome C의 환원은 550 nm에서 측정하였다. 최대 자유기(maximum free radical) 형성을 보기 위해서 TPA에 cytochrome C를 처리하였고, 창이자 열수추출액에 의한 자유기 소거효과는 다음과 같은 공식으로 계산되었다.

$$\% \text{ of inhibition} = [1 - (\text{tested sample}/\text{control})] \times 100$$

4. 자료 분석 방법

실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정은 Student's t-test를 수행하여 결과치는 p 값이 .05 미만을 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다.

연구 결과

1. 암세포 독성효과

창이자 열수추출물을 암세포(HeLa, A549)에 처리하여 살펴 보았다. 사람의 HeLa 세포주와 A549 세포주에 대한 창이자 열수추출물의 세포 독성 실험을 실시한 결과, HeLa 세포에서 시료 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL과 2.5 mg/mL를 처리한 후 72시간 배양에서 29%, 34%와 47%의 세포 성장 억제효과가 나타났다(Fig. 1). A549 세포에서는 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL과 2.5 mg/mL를 처리했을 때 37%, 49%와 54%의 억제효과가 나타났으며(Fig. 2), A549 세포에서 HeLa 세포보다 더 높은 성장 억제 효과가 있었다. 이와 같이 창이자 열수추출물은 농도가 높을수록 암세포 독성효과가 증가하였으며, HeLa세포와 A549 세포를 비교하면 A549 세포에서 더 높은 세포 성장 억제효과가 있었다.

2. Carcinogen-DNA 결합 억제 효과

창이자 열수추출물에 의한 carcinogen-DNA 결합 억제효과를 측정한 결과, 1.0 mg/mL 농도에서는 33% (p<0.05), 그리고 2.5 mg/mL 농도에서는 41% (p<0.01)로 통계학적으로 유의성 있는 결과를 나타내었다(Fig. 3).

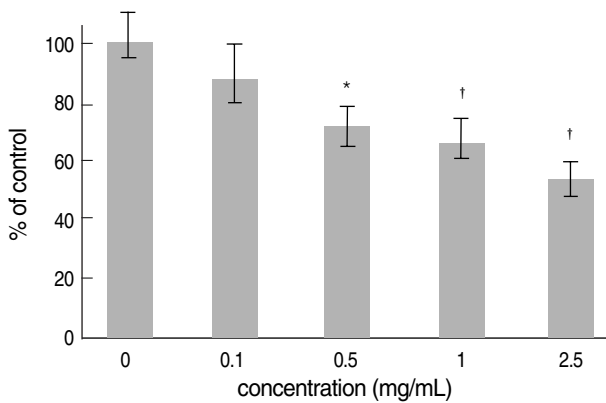


Fig. 1. *In vitro* toxicity assay of XPW to HeLa cells. The cells were incubated for 72 hrs with XPW at the concentrations indicated. Values represent mean \pm SD (n=3). * p <.01, † p <.005 compared with the control.

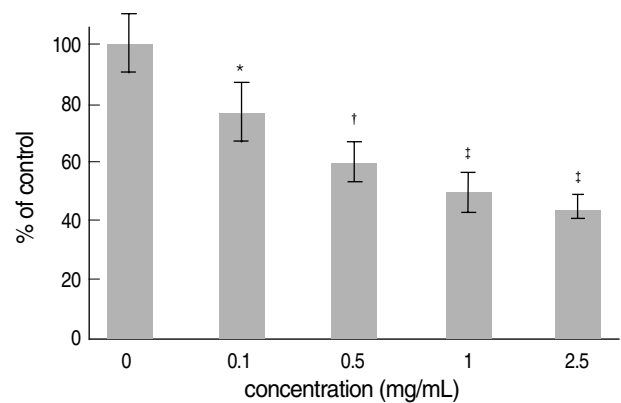


Fig. 2. *In vitro* toxicity assay of XPW to A549 cells. The cells were incubated for 72 hr with XPW at the concentrations indicated. Values represent mean \pm SD (n=3). * p <.05, † p <.01, ‡ p <.005 compared with the control.

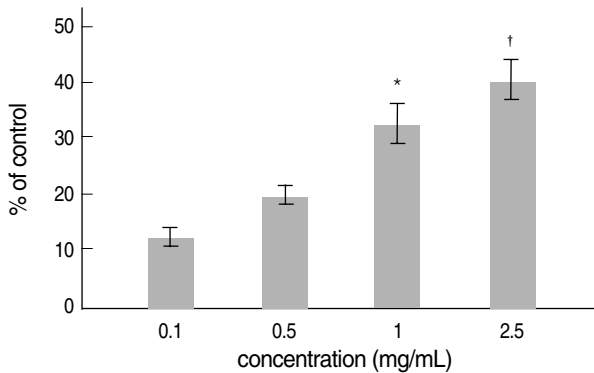


Fig. 3. Inhibition of the binding of B[a]P metabolites to DNA of Chang cells. B[a]P-DNA binding was determined in the presence of XPW. Values represent mean \pm SD (n=3). * p <.05, † p <.01 compared with the control.

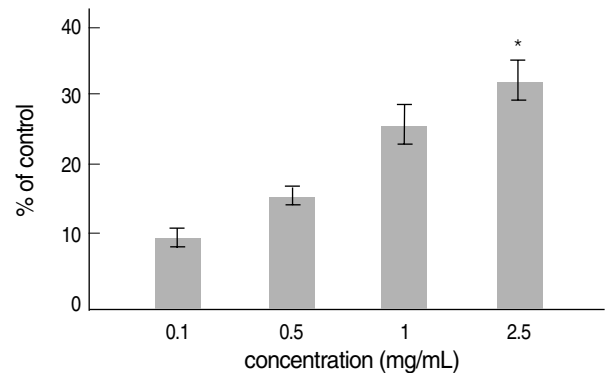


Fig. 4. Effect of XPW on free radical formation in TPA-induced HL-60 cells. Experimental details are described in Material and Methods. Values represent mean \pm SD (n=3). * p <.01 compared with the control.

3. 자유기 소거효과

창이자 열수추출물이 TPA에 의해서 유도된 자유기(free radical)를 소거시키는 효과를 측정할 결과, 창이자 열수추출물은 2.5 mg/mL 농도에서 32%의 소거효과가 있었다(Fig. 4). 그러므로 창이자 열수추출물은 발암물질에 의해 형성된 자유기를 효과적으로 억제시키는 효과가 있는 것으로 보인다.

논 의

현재 인류에게 있어서 가장 위험성이 큰 전신성 질환으로 인식하고 있는 악성종양을 치료하기 위해 새로운 천연물에서 안전성이 있는 약물개발이 절실히 요구되고 있다(Song et al., 1999). 암에 관련된 제재 개발연구는 발병된 암을 치료할 수 있는 항암제 개발과 암의 진행과정을 저지할 수 있거나

암 발병을 예방할 수 있는 물질 개발 차원에서 이루어지고 있다. 특히 근래에는 항암제의 독성에 의한 부작용으로 암이 발병하기 전에 막을 수 있는 암발생 억제물질(chemopreventive agents)의 개발이 중점적으로 이루어지고 있으며 (Sheela et al., 1994) 이에 본 논문에서는 악혈, 장기육, 풍양, 폐위, 두창, 옹종, 여양, 음퇴, 요혈종통, 간열, 나역, 골절, 악창 등의 효능이 있다(이시진, 1992)고 알려져 있는 국화과에 속하는 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L.) 열매인 창이자(*Xanthium sibiricum* Patr.) 열수추출물을 준비하여 사람의 암세포에의 독성효과, 발암물질과 DNA 결합 억제 및 자유기 소거효과를 측정하여 창이자의 암 발생 억제 효과에 대해 증명하고자 하였다.

창이자 열수추출물을 암세포(HeLa, A549)에 처리하여 살펴본 결과 열수추출물의 농도가 높을수록 암세포 독성효과가

증가하였으며, A549 세포에서 HeLa 세포보다 더 높은 성장 억제 효과가 있었다. 이와 같이 창이자 열수추출물은 농도가 높을수록 암세포 독성효과가 증가하였으며, HeLa 세포와 A549 세포를 비교하면 A549 세포에서 더 높은 세포 성장 억제효과가 있었다.

또한 대부분의 외부 발암물질은 cytochrome p-450-dependent monooxygenase system에 의해 대사되어 전자친화적 물질(electrophilic product), epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질이 된다. 이러한 발암물질의 친전자적 성질로 인하여 세포의 정보 전달물질인 DNA에 구조적 손상을 주어 돌연변이를 유발하는 과정은 비가역적으로 진행되는 것으로 알려져 있다. 일단 손상된 DNA가 수복되지 않으면 돌연변이를 일으킨 DNA의 세포분화 과정에서 복제되어 세포가 암세포로 전환하게 되는 것이다. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)은 B[a]P와 같이 잘 알려진 발암물질을 포함한 화학물질로 직업적으로나, 흡연, 숯불에 그을린 음식 등에 의해 사람들은 이러한 화학물질에 노출된다(Perera et al., 1982). 많은 포유동물 세포는 carcinogen-metabolizing enzymes에 의해 polycyclic aromatic hydrocarbons을 polycyclic phenols, dihydrools, epoxides, quinones, 그리고 water-soluble conjugates로 대사시킨다. 이러한 반응성이 높은 중간대사물은 DNA, RNA와 결합하고 이 결합의 강도는 hydrocarbons의 발암의 유효성과 관계가 있다(Arnould et al., 1997; Lim et al., 1994 Santella et al., 1990; Sims & Grover, 1974). B[a]P-DNA adducts는 폐암환자의 폐조직에서 발견되었으며 음식물에 포함된 여러 식물 phenols 성분이 발암과정을 억제하는 것으로 알려져 있고 대표적인 carcinogen-DNA 결합 억제물질로 ellagic acid가 있으며, 암예방 물질은 무독화효소 유도 혹은 활성효소 억제에 의해 carcinogen-DNA 결합을 억제하게 된다 (Teel et al., 1986). 본 연구결과에 의하면 창이자 열수추출물은 carcinogen-DNA 결합 억제효과를 측정할 결과 유의성 있는 결과를 얻었을 수 있었다.

마지막으로 세포의 대사 부산물로 생성된 자유기(free radical)는 지질과산화물을 유발하여 세포의 손상을 일으키며, 자유기를 생성하는 효소계는 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 등이 알려져 있다. 정상적인 경우에는 생체 내에서 병적 상태가 진행되나 과잉의 단백질 분해효소에 의한 가수분해를 받을 경우에는 oxidase형으로 형전환이 일어나는 것으로 알려져 있다(Tubaro et al., 1980). 내부 및 외부의 요인에 의해 과도한 자유기 체인의 작용과 그 대사과정에서 생성

되는 세포 내의 활성 산소종은 DNA 손상, 노화와 관련된 세포의 퇴화 및 암의 발생을 일으키게 된다(Cerutti, 1985). 자유기와 관련한 활성 산소들은 산소의 대사 동안 생화학적 반응에 의해 생성되며, tumor promotion에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Kennedy et al., 1984). 나아가 tumor promotion을 억제하는 것으로 알려진 protease inhibitors가 자유기 형성을 억제할 수 있고, vitamin A 유도체가 tumor promotion을 억제하고 여러 retinoid 화합물은 phagocyte O₂-생성의 억제제이다(Troll et al., 1970). 그러므로 자유기 scavengers의 섭취에 의해 자유기에 의한 손상에서 정상조직을 보호할 수 있을 것이다. TPA에 의해 유도된 자유기가 창이자 열수추출물을 처리하였을 때, 소거 효과가 나타났다.

이상의 연구 결과 생약 창이자는 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 사료되나, 이 결과를 토대로 창이자추출물의 항암제로서의 개발을 위해 더 심도있는 연구가 앞으로 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결론 및 제언

창이자 열수추출물의 암세포에의 독성, carcinogen-DNA 결합 억제 및 자유기 소거효과를 측정하였다. 그 결과 창이자 열수추출물은 사람의 자궁경부암 HeLa 세포와 사람의 폐암 세포주 A549 세포에 농도의존적 독성효과를 나타내었다. B[a]P 대사물과 DNA의 adduct 형성 억제효과를 측정할 결과 창이자 열수추출물은 발암물질과 DNA의 결합을 유의성 있게 억제하였다. 또한 추출물은 TPA에 의해서 유도된 자유기(free radical)를 소거시키는 효과가 있었다. 그러므로 생약 창이자는 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 사료된다.

참고문헌

이시진 (1992). 본초강목, 북경 인민위생출판. 1102-1104.
 Arnould, J. P., Verhoest, P., Bach, V., Libert, J. P., Belegaud, J. (1997). Detection of benzo[a]pyrene-DNA adducts in human placenta and umbilical cord blood. *Human Experimental Toxicology*, 16, 716-721.
 Cerutti, P. A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 227(4685), 357-381.
 Davis, R. W., Thomas, M., Cameron, J., St. John, T. P., Scherer, S.,

- Padgett, R. A., et al. (1980). Rapid DNA isolations for enzymatic and hybridization analysis. *Methods in Enzymology*, 65, 404-411.
- Kennedy, A. R., Troll, W., Little, J. B. (1984). Role of free radicals in the initiation and promotion of radiation transformation *in vitro*. *Carcinogenesis*, 5, 1213-1218.
- Lim, C. K., Yuan, Z. X., Lamb, J. H., White, I. N., De Matteis, F., Smith L. L. et al. (1994). A comparative study of tamoxifen metabolism in female rat, mouse and human liver and human liver microsome. *Carcinogenesis*, 15, 589-593.
- Perera, F. P., Poirier, M. C., Yuspa, S. H., Nakayama, J., Jaretzki, A., Curnen, M. M., Knowies, D. M., Weinstein, I. B., et al. (1982). A pilot project in molecular cancer epidemiology: determination of benzo[a]pyrene-DNA adducts in animal and human tissues by immunoassays. *Carcinogenesis (Lond.)*, 3, 1405-1410.
- Santella, R. M., Yang, X. Y., Hsieh, L. L., Young T. L. (1990). Immunologic methods for the detection of carcinogen adducts in humans. *Progress in Clinical Biology Research*, 340(C), 247-257.
- Sharma, S., Stutzman, J. D., Kelloff, G. J., Steele, V. E. (1994). Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Research*, 54, 5848-5855.
- Sims, P., & Grover, P. L. (1974). Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. *Advanced Cancer Research*, 20, 165-274.
- Song, L. L., Kosmeder, J. W., Lee, S. K., Gerhauser, C., Lantvit, D., Moon, R. C., et al. (1999). Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. *Cancer Research*, 59, 578-585.
- Teel, R. W., Babcock, M. S., Dixit, R., Stoner, G. D. (1986). Ellagic acid toxicity and interaction with benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol in human bronchial epithelial cells. *Cell. Biology and Toxicology*, 2, 53-62.
- Troll, W., Klassen, A., Janoff, A. (1970). Tumorigenesis in mouse skin: inhibition by synthetic inhibitors of proteases. *Science (Washington DC)*, 169, 1211-1213.
- Tubaro, E., Lotti, B., Croce, C., Caballo, G., Borelli, G. (1980). Liver xanthine oxidase increase in mice in three pathological models. A possible defence mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 29, 1939-1943.