생물활성정보수가 종양 유래 동물세포 성장에 미치는 영향에 관한 고찰

장무영¹ · 이경석² · 신정욱^{1,3} · 문치웅^{1,3}

¹인제대학교 의용공학과, ²리뷰 코리아, ³인제대학교 FIRST/UHRC 연구소

A study on the Effects of Organism Vigor Information Solution to the Growth of Tumor-Derived Animal Cell

M.Y. Jang¹, K.S. Lee², J.W. Shin^{1,3} and C.W. Mun^{1,3}

¹Department of Biomedical Engineering, Inje University, Gimhae, Gyeongnam 621-749, Korea

²Review Co. Ltd, 966 DeokYi-Dong Ilsan-Gu, Goyang, Gyeonggi, Korea

³FIRST/HURC, Inje University, Gimhae, Gyeongnam 621-749, Korea

(Received January 19, 2011. Accepted May 3, 2011)

Abstract: The purpose of this study is to investigate the influence of organism vigor information solution(OVIS) on the animal cell growth and to set up a condition for cell culture. We investigated the reactions on the MG-63 and MCF-7 cell line in mixture culture media with various amount of REVIEW solution, which is an example among various OVIS. DMEM-HG was used as basic media. The concentration range of the mixture was limited from 0% to 15%. MTT assay is used for cell viability test. The cell was incubated for 14days and the MTT assay was performed on day 1, 3, 7, 10 and 14 throughout the experiment. We used the ELISA reader to measure the Optical Density(O.D) at 595 nm wavelength filter. MCF-7 was linearly proliferated according to culture time and concentrations of OVIS. On the other hand, MG-63 cells were measured the highest O.D value at 12%. The growth rates of both cells cultured in mixed culture media with OVIS are much higher than those in only basic media, DMEM-HG, after 14days. It was confirmed that cell cultured at OVIS grows rapidly at certain period although cells showed a negative effect in initial stage.

Key words: Animal cell, Organism vigor information solution(OVIS), cell culture, MTT assay, MG-63, MCF-7

I. 서 론

세포 배양(Cell culture)이란 물질 대사 활동을 하는 생물체의 본체로부터 추출한 조직에서 세포를 정제하여 외부 환경에서 일정한 조건을 유지시키며 증식시키는 것을 뜻한다[1-3]. 오늘 날의 세포 배양은 식물, 효모, 미생물, 동물에 이르기까지 다양한 종에 대하여 활용되고 있으며 특히, 동물

세포 배양이 가능해지게 됨으로써 인간에 대한 생물학적 연구가 큰 발전을 이룰 수 있게 되었다[4]. 동물 세포 배양은 1907년 Harrison 박사가 개구리의 신경조직을 이용하여 최초로 성공하였고[5], 1912년 Carrel 박사가 닭의 섬유모세포를 이용하여 계대배양에 성공함으로써 기술적 측면의 진보를 가져왔다[6]. 그 후로, 1952년에 사람의 자궁 경부 암으로부터 Hela cell과 같은 세포주(Cell line)를 수립하였으며, 무한증식성을 갖는 세포주의 개발로 인해 본격적으로 세포 단위의 배양이 가능하게 되었다[7]. 한편, 1950년 후반에 Eagle에 의해 세포 배양용 기본배지가 개발되면서 체외 세포 배양은 본격적으로 그 기틀이 마련되었다[8]. 그와 함께 여러 실험을 통해 배양된 세포가 주변 환경과 영양분 조절을 통해 체외 환경에서 성장할 수 있다는 것이 증명되었다[9].

Corresponding Author : 문치웅
(621-749) 경남 김해시 어방동 607 인제대학교 의용공학과
TEL: +82-55-320-3297 / FAX: +82-55-327-3292
E-mail: mcw@inje.ac.kr

본 연구는 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행하였습니다(No. 2009-0081195).

근래에 이르러서는 신약 및 각종 백신 개발을 위해서 임상 시험에 들어가기 전 단계에 동물 세포를 이용하여 독성 및 효과를 검증하고 있다[10,11]. 뿐만 아니라 손상된 신체의 일부를 실제 장기로 대체하거나 재생시키는 재생의학(Regenerative medicine)과 조직 공학(Tissue Engineering)과 같은 분야에 대한 관심이 증가하면서 동물 세포를 손쉽게 대량으로 배양할 수 있는 기술이 필요해지고 있다[12-14]. 그러나 동물 세포는 미생물에 비하여 고등한 물체이기 때문에 배양 조건이 까다로우며, 그 성장 속도가 다른 세포 중에 비하여 느리고 박테리아나 곰팡이로 인하여 쉽게 오염될 수 있다는 한계점 때문에 손쉽게 대량으로 생산하기에는 어려운 실정이다[1]. 한편, 1980년대 일본의 히가 테루오 교수가 “Effective microorganism”이라는 미생물군을 개발하여 식물 세포에 적용한 사례가 있다. 그 결과, 식물 세포의 성장률이 향상된 것을 확인하였고, 곡류 및 일반 식물의 대량 수확을 이룰 수 있게 되었다[15]. 그 밖에도 여러 가지 생물활성 물질들이 개발되어 전 세계적으로 농업 및 화초 재배 분야 등에 다양하게 사용되고 있다.

대부분의 생물활성 물질들은 농업 및 화초 재배 산업에 집중되어 있는 반면, 본 연구에서 쓰인 생물활성정보수(Organism vigor information solution; OVSI)는 동물의 비료에 일정한 비율로 혼합하여 사육하는 방법을 제시하고 있었으며, 그 결과 악취 해결 및 동물의 면역력을 향상시켰다는 보고가 있었다[25]. 이에 의거하여 생물활성정보수가 동물 세포의 생명 활동에 영향을 줄 수 있다는 가능성을 세포 단위에서 확인하고자 하였다.

본 연구에서는 식물의 성장에 도움을 주는 것으로 알려진 생물활성 물질 중의 하나인 리부용액(리부 코리아)이 동물 세포의 성장에도 긍정적인 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있는지 확인하고 그 조건을 확립하여 동물 세포의 대량 생산에 이바지할 수 있는 방안을 찾고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

Dulbecco's Modified Eagle Medium High glucose (DMEM-HG, Gibco, Invitrogen Co., USA)를 기본 배지로 사용하였다. 추천 배양 프로토콜로 세포를 배양하기 위하여 MG-63은 10% FBS(Fatal Bovine Serum), 1% antibiotics가 첨가된 DMEM-HG에서만 배양하였고, MCF-7에는 Insulin(Sigma-Aldrich Co., USA)을 성장인자로 적용하였다[16]. MTT assay kit(Roche Ltd., Switzerland)를 사용하여 세포 활성 능력을 측정하였다. 실험 조건을 조절하기 위하여 본 연구에서 쓰인 생물활성정보수(REVIEW Korea)는 Na, Ca, Fe, Cu 등의 원소 외에도 다양한 미네랄이 포함

된 pH 7.4의 생물활성 물질이다.

2. 세포 배양

생물활성정보수에 대한 동물 세포의 증식 효과를 알아보기 위한 대상으로 MG-63(Human osteosarcoma cell line)과 MCF-7(Human breast cancer cell line)의 2가지 종류를 사용하였으며 각각의 세포는 뼈와 유방 조직에서 유래되었다[16,17]. 세포 형태학적으로 MG-63은 섬유아세포(Fibroblast)이며 MCF-7은 상피세포(Epithelial cell)이다. MG-63은 10% FBS, 1% antibiotics가 첨가된 DMEM-HG를 기본으로 생물활성정보수를 혼합한 배지에서 실험조건에 따라 배양하였고, MCF-7은 같은 조건으로 Insulin이 10 μ g/ml만큼 첨가된 배지에서 배양되었다. 세포는 Cell growth area가 1.9 cm²인 24-well plate에 한 well당 2×10^4 의 밀도로 파종(seeding)하였고, 37°C, 5%CO₂ 배양기에서 14일간 배양하였다. 세포에 지속적으로 영양 공급을 해주기 위해 모든 well의 배지를 3일마다 교체하였다.

생물활성정보수의 효과를 확인하기 위하여 생물활성정보수가 첨가되지 않은 배지로 배양한 세포군을 실험 대조군으로 설정하였고(0%), 생물활성정보수와 배지를 혼합한 혼합 배지의 농도는 사전 기초 실험에 의거하여 각각 3%, 6%, 9%, 12%, 15%의 범위로 설정하였다[18,19]. 세포의 성장에 대해 기본배지의 간섭을 최소화하기 위하여 기본 배지의 양은 고정하고 생물활성정보수의 양을 조절하여 혼합액의 농도를 맞추었다(표 1).

시간에 따른 세포 성장 양상을 평가하기 위하여 총 14일간 배양하였고, 세포 파종 후 1일, 3일, 7일, 10일, 14일이 되는 날에 흡광도(Optical Density, O·D)를 측정하였다.

3. 세포 증식 측정

세포의 증식 정도를 측정하기 위한 도구로 MTT assay[3-(4,

표 1. 혼합 배양액의 농도 설정

Table 1. Concentrations of mixed media

농도	DMEM-HG(ml)	생물활성정보수 (ml)
0%		0.0000
3%		0.0310
6%		0.0640
9%		0.0990
12%		0.1370
15%	1 ml 로 양을 고정함	0.1765
18%		0.2200
20%		0.2500
25%		0.3400
30%		0.4300

5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]를 선택하였다[20-22]. MTT assay는 미토콘드리아 내에서 효소 환원 작용에 의해 생성되는 MTT formazan을 측정하는 방법으로 많은 양의 시료를 객관적으로 측정할 수 있기에 세포 증식, 세포 생존력, 세포 독성을 검사하기 위한 도구로 많이 사용되고 있다[20].

MTT assay는 제공된 제품 설명서에 표시된 프로토콜에 의거하여 다음과 같은 순서로 진행되었다. 흡광도를 측정하기 전 날에 기존에 있던 배지를 모두 제거한 후, 20 μ l의 MTT 시약과 새로운 배지 200 μ l(MTT 시약의 10배)를 넣고 배양기 내에서 4시간 배양시켰다. 4시간 후, 가용화 용액을 200 μ l 첨가하고 다시 12시간을 더 배양한 후에 96 well-plate에 200 μ l씩 옮긴 후, ELISA reader(Enzyme-linked immunosorbent assay, Multiskan EX, Thermo Scientific Inc., USA)로 파장 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 흡광도 데이터 처리 시에 기준이 되는 대조군(blank)으로 세포가 배양되지 않은 새로운 배지만 있는 시편도 위의 과정과 동일하게 준비하여 함께 흡광도를 측정하였다.

4. 통계적 분석

객관성 있는 데이터 검증을 위하여 SPSS(Version 15.0 for Windows, USA)를 사용하여 통계적 분석을 수행하였다. 실험 조건 당 4개의 well에 동일하게 배양된 세포에 대한 흡광도 측정값에 기술통계를 실시하여 평균과 표준편차로

계산하였다. 각 실험군에 대한 유의성을 검증하기 위하여 one-way ANOVA test를 수행하였고 사후 검정으로 대조군에 대한 검증이 가능한 Dunnett t-검정 방법을 선택하였다.

III. 결 과

그림 1과 그림 2에 3% 혼합 배지에서 배양한 MCF-7과 MG-63의 현미경 사진을 10배의 배율로 배양 기간에 따라 나타내었다. 세포 파종 후 3일이 경과한 후부터 눈에 띄게 개체 수가 증가하였으며, 1일~3일 사이보다 3일~7일 사이에 세포 수의 개체 수가 증가하여 배양 플라스크에 95% 이상 confluent된 것을 눈으로 확인할 수 있었다.

그림 3은 14일간 시행한 MTT assay의 결과를 농도별로 나타낸 그래프이다. 그림 3의 (a)에 의하면 MG-63 같은 경우, 배양 초기에는 대조군의 흡광도 측정값이 가장 높으나, 배양 7일 때부터 대조군인 0%의 흡광도 측정값과 유사한 수치를 보이는 것을 알 수 있다. 배양 14일째에는 12%와 15%의 측정값이 3.0 이상의 수치로 나타났으며 이는 대조군보다도 높은 수치인 것을 확인하였다. 또한 배양 3일째부터 14일까지의 그래프 수치에 의하여 혼합 배지의 농도가 높을수록 더 빨리 대조군의 흡광도 값에 도달한 것을 알 수 있다. 그림 3의 (b)에 나타난 MCF-7 같은 경우, 배양 3일과 7일 사이에 크게 흡광도 값이 증가하였으며, 배양 7일째부터 흡광도 값이 0%와 유사한 값을 보이고 있다. MCF-7도 MG-

그림 1. 3% 혼합 배양액에서 배양된 기간에 따른 MG-63 세포의 현미경 사진 (a) 1일, (b) 3일, (c) 7일

Fig. 1. Microscopy images of MG-63 cells cultured at 3% mixed media according to the culture period of (a) 1 day, (b) 3 days, (c) 7 days

그림 2. 3% 혼합 배양액에서 배양된 기간에 따른 MCF-7 세포의 현미경 사진 (a) 1일, (b) 3일, (c) 7일

Fig. 2. Microscopy images of MCF-7 cells cultured at 3% mixed media according to the cultured period of (a) 1 day, (b) 3 days, (c) 7 days

그림 3. 배양기간에 따른 혼합 배양액 농도별 흡광도 측정 결과 (a) MG-63의 흡광도, (b) MCF-7의 흡광도

Fig. 3. Results of optical density(O.D) measurement depends on mixed media concentration according to the culture period (a) MCF-7, (b) MG-63

63과 마찬가지로 배양 초기에는 혼합 배지에서 배양된 세포 군은 더디게 증식하였으나 배양 14일에는 모든 농도에서 0%보다 큰 흡광도 값이 측정되었으며 모두 3.0이상의 수치를 기록하였다. 그림 3의 두 그래프의 14일째의 흡광도 수치를 비교하였을 때, MG-63같은 경우는 혼합 배지의 농도가 클수록 흡광도 값이 증가하였고, 가장 큰 수치는 3.066으로 12%에서 가장 크게 측정되었다. MCF-7은 MG-63과는 반대로 혼합 배지의 농도가 낮을수록 큰 흡광도 값이 나타났고, 3%에서 3.144로 가장 크게 측정되었다. 따라서, 생물활성정보수를 혼합한 배지에서 배양된 세포는 배양 일수가 늘어날수록 더 큰 비율로 증식한다는 것을 알 수 있었고 세포의 종류에 따라 생물활성정보수의 효과가 다르게 나타난다는 것을 확인하였다.

MTT assay를 통하여 측정된 흡광도 값의 유의성을 검증하기 위하여 95%의 신뢰구간에서 one-way ANOVA test를 수행하였으며 사후검정으로 Dunnett t-검정 방법을 적용하여 대조군에 대한 농도별 유의 수준을 확인하였다(그림 4).

그림 4. 배양 14일에 대한 One-way ANOVA 결과. 1일부터 누적되어 배양하였으므로 14일의 흡광도 값을 이용하여 검증하였다 (* $p < 0.05$). (a) MG-63의 one-way ANOVA 결과, (b) MCF-7의 one-way ANOVA 결과

Fig. 4. One-way ANOVA test results of 14 days. Test performed about 14days data because cell has been accumulated for 14days(* $P < 0.05$). (a) one-way ANOVA test result of MG-63, (b) one-way ANOVA test result of MCF-7

먼저 MG-63의 흡광도 수치에 대하여 통계 분석을 수행한 결과, ANOVA test의 결과는 유의 수준 0.033으로 $p < 0.05$ 의 조건을 만족하였으나, 사후 검증에서는 유의한 결과가 나타나지 않았다(그림 4(a)). MCF-7은 0.014로 MG-63보다 높은 유의 수준을 나타내었으며 사후 검증의 결과, 모든 농도에서 0%보다 흡광도 값이 크게 측정되었으나 3%와 6%만이 유의한 것으로 나타났다(그림 4(b)).

IV. 결론 및 고찰

사전 실험을 통해 세포가 성장할 수 있는 혼합 배양액의 농도가 0~30% 수준이라는 것을 점검하였으며 그 중에서도 10% 부근에서 동물 세포의 배양 가능성이 가장 큰 것을 확

인하였다. 이에 10% 농도 부근에서 세포의 성장 경향 및 세포 성장에 적절한 농도의 확정을 위하여 본 연구에서는 0%부터 3% 간격으로 농도를 조절하고 그 농도를 15%로 제한하여 배양을 실시하였다. 또한 각각의 특성이 다른 2가지 세포에 적용하여 세포의 종류에 따른 생물활성정보수의 효과를 알아보고자 하였다. 그 결과 배양기간에 따라 혼합 배지에서 배양한 세포들이 대조군인 0%에서 배양된 세포 수만큼 증식하였으며, 배양 14일 째에 일부 농도에서 대조군보다 더 많이 증식한 것을 확인하였다. MG-63은 12%, MCF-7은 3%에서 14일째에 가장 큰 흡광도 값이 측정되었으며 이를 통계분석을 통하여 검증한 결과 유의한 것으로 증명되었다. 배양 초기(< 7일)에 혼합 배양액에서 세포들이 부진한 성장을 보인 것은 DMEM-HG와 생물활성정보수 간의 성분 차이에서 기인한 것으로 보인다. 각 물질에 함유된 성분을 분석하여 보조적으로 필요한 물질을 공급하거나 더해준다면 개선이 가능할 것으로 사료된다.

이와 같은 결과를 통하여 적정량의 생물활성정보수가 혼합되는 것이 세포의 성장에 영향을 줄 수 있다는 사실을 확인하였으며 배양 초기에 생물활성정보수를 혼합한 실험군에서 나타난 증식의 부진함의 원인을 밝히고, 그 요인을 제거한다면 세포의 성장률을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 동시에 이를 상용화한다면 세포의 대량 생산 실현으로 재생의학 및 신약 개발 분야에 큰 발전을 가져올 것으로 기대된다.

MG-63과 MCF-7에 대하여 같은 농도와 같은 조건으로 실험을 수행한 결과, 생물활성정보수가 각각의 세포에 대해 다른 영향을 주는 것을 확인하였다. MG-63은 12%, MCF-7은 3%에서 가장 큰 흡광도 수치가 측정되었으며 MTT assay에 의해 측정된 흡광도 수치는 살아있는 세포의 개체 수를 반영한다고 할 수 있으므로[20-22] 세포의 종류에 따라 다른 증식 경향을 보이는 것을 알 수 있다. 따라서 세포 종류에 따라 달라지는 배양 환경에 따라 생물활성정보수가 다른 영향을 준다는 것을 확인하였고, 추가적으로 다른 종류의 세포에 대해서도 실험을 해야 할 필요성이 있다고 생각된다. 또한 무한 증식의 성질을 가지는 세포주가 아닌 정상적인 세포에도 적용하여 생물활성정보수가 동물 세포에 미치는 영향을 일반화하는 과정도 고려해야할 것으로 생각된다.

MTT assay는 비교적 실험 방법이 간단하고, 그 결과가 객관적이므로 정량화에 용이하기 때문에 세포 독성 실험 등에 널리 쓰이는 방법이다[20-22]. 그러나 MTT assay는 미토콘드리아의 활성만을 평가하는 방법이며, 지정된 시간에 정확하게 수행해야만 하는 번거로운 점이 있다[23,24]. 때문에 세포 카운팅과 같은 방법과 병행하여 사용되고 있다. 따라서 향후 연구에서는 MTT assay외에도 DNA 정량분석과 같은 방법을 병행할 필요성이 있는 것으로 사료된다.

본 연구는 일반적 세포 배양환경에서 생물활성용액이 특

정 인간세포에 미치는 단편적 현상만을 살펴본 것으로 다양한 세포에 대해 생체조직 환경에서의 영향은 알려진 바가 없다. 따라서 앞으로 수행할 연구에서는 생물활성정보수가 배양 초기에 세포의 증식을 방해한 원인을 파악하여 독성 유무를 알아보고 세포 성장률 향상에 이바지할 수 있는 최적의 조건을 파악하여 암세포와 정상세포에 대한 생물활성정보수의 다양한 효과를 검토할 것이다.

참고문헌

- [1] C.D. Helgason, C.L. Miller. *Basic cell culture protocols*, 3 edition. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2004, pp. 1-30.
- [2] R.I. Freshney. *Culture of Animal Cells*, 5 edition. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Inc., 2005, pp. 1-8.
- [3] A.G. Bodnar, M. Quellet, M. Frolkis, S.E. Holt, C.P. Chiu, G.B. Morin, C.B. Harley, J.W. Shay, L. Lichsteiner, W.W. Wright. "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells," *Science*. vol. 279, pp. 349-352, 1998.
- [4] M.K. Jo. *Cell culture Engineering*, Seoul, Korea: YuHan Publishing Co., 2004, pp. 175-180.
- [5] R.G. Harrison. "Observations on the living developing nerve fiber," *Anatomical Record*, 1907;1:116-118, 1907.
- [6] A. Carrel, "Pure cultures of cells," *J of Experimental Medicine*; 16(2):165-168, 1912.
- [7] R. Rahbari, T. Sheahan, V. Modes, P. Collier, C. Macfarlane, R. M. Badge. "A Novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification," *Biotechniques*; 46(4):277-284, 2009.
- [8] H. Eagle, "Amino acid metabolism in mammalian cell culture," *Science*; 130:432-437, 1959.
- [9] R.W. Holley, "Control of growth of mammalian cells in cell culture," *Nature*; 258:487-490, 1975.
- [10] J.N. Jang, I.H. Kim, "Current Status and Perspectives of Cell Culture-Based Vaccine Production," *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*; 38(2):124-128, 2010.
- [11] J. Copier, S. Ward, A. Dalgleish, "Cell Based cancer vaccines," *Regulatory and commercial development. Vaccine*; 25S:B35-46, 2007.
- [12] A. Mobasheri, C. Csaki, A.L. Clutterbuck, M. Rahmanzadeh, M. Shakiabaei, "Mesenchymal stem cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: applications in cartilage repair and osteoarthritis therapy," *Histol Histopathol.*; 24(3):347-366, 2009.
- [13] S.M. Saber, "Tissue Engineering in endodontics," *J. Oral Science*; 51(4):468-507, 2009.
- [14] D.S. Misfeldt, S.T. Hamamoto, D.R. Pitelka, "Transeptithelial transport in cell culture," in *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, April. 1976, pp.1212-1216.
- [15] Higa T. "Use of microorganisms in agriculture & their positive effects on environmental safety," Tokyo, Japan: Nobunkyo 1995, pp.42-74.
- [16] J. Chappell, J. W. Leiter, S. Solomon, I. Golovchenko, M.L. Goalstone, B. Draznin, "Effect of Insulin on cell cycle progression in MCF-7 Breast Cancer Cells," *J Biol Chem*; 276(41):38023-38028, 2001.
- [17] A. Billiau, V.G. Edy, H. Heremans, J.V. Damme, J. Desmyter, J.A. Georgiades, P. De Somer, "Human interferon: mass pro-

- duction in a newly established cell line, MG-63," *Antimicrob. Agents Chemother*;12:11-15, 1977.
- [18] M.Y. Jang, S.I. Chun, C.W. Mun. "The Influence of Organism Activation Enzyme solution on cell Growth," in *Proc. 40th KOSOMBE*, Seoul, Korea, Nov. 2009, pp.256-258.
- [19] M.Y. Jang, C.W. Mun, "The investigation about optimal concentration of organism activation solution for improving the animal cell growth," in *Proc. 41th Future Neurotechnologies for Neuron, Network and Brain*, Chuncheon, Korea, May, 2010, pp.75.
- [20] J.E. Kim, M.S. Kim, C.M. Kang, J.I. Kim, H.K. Shin, C.W. Choi, Y.S. Seo, Y.H. Ji, "Use of MTT assay, In Vitro and Ex Vivo, To predict the Radiosensitivity of colorectal Cancer," *KOSTRO*; 26(3):166-172, 2008.
- [21] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays," *J. Immunol Methods*; 65(1-2): 55-63, 1983.
- [22] G.F. ohn, A. Timbrell, "In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride," *Toxicol Lett*; 160(2):171-177, 2006.
- [23] S. O'Hare, C.K. Atterwill, "In Vitro Toxicity Testing Protocols," Totowa, NJ, USA: Humana Press, 1995. pp.148.
- [24] P. Wang, S.M. Henning, D. Heber, "Limitations of Antiproliferative activity of green tea polyphenols," *Plos One*;5(4): e10202.
- [25] <http://www.re-view.net/index.php>.