

## 2-[(4-Cyanophenyl)amino]-3-chloro-1,4-naphthalenedione (NQ-Y15)의 돌연변이원성

김봉희, 정기화<sup>1</sup>, 유충규<sup>2</sup>, 창동신, 이기선  
전선덕, 소동수, 채상호, 문창규<sup>3</sup>

충남대학교 약학대학, <sup>1</sup>덕성여자대학교 약학대학,  
<sup>2</sup>이화여자대학교 약학대학, <sup>3</sup>서울대학교 약학대학

## Mutagenicity of 2-[(4-Cyanophenyl)amino]-3-chloro- 1,4-naphthalenedione (NQ-Y15)

Bong-Hee Kim, Ki-Wha Jung<sup>1</sup>, Chung-Kyu Ryu<sup>2</sup>,  
Dong-Shin Zhang, Kiseon Lee, Sun-Duck Jeon, Dhong-Soo So,  
Sang-Ho Chae and Chang-Kiu Moon<sup>3</sup>

College of Pharmacy, Chungnam National University, TaeJeon, 305-764, Korea

<sup>1</sup>College of Pharmacy Duksung women's University, Seoul, 132-030, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Ewha women's University, Seoul, 120-750, Korea

<sup>3</sup>College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

### ABSTRACT

2-[(4-Cyanophenyl)amino]-3-chloro-1,4-naphthalenedione (NQ-Y15) was assayed for its genotoxic potential by using *Salmonella typhimurium* reversion assay and in vitro chromosome aberration test on Chinese hamster lung cells. In the Ames test, NQ-Y15 induced his<sup>+</sup> revertants of *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA1537, reaching levels twice the negative control values. But, NQ-Y15 induced only his<sup>+</sup> revertants of *Salmonella typhimurium* TA1537 more than twice the control values under the condition with metabolic activation system. In the cytogenetic test on chinese hamster lung cells, NQ-Y15 showed significant chromosomal aberrations, but the incidence was significantly reduced in the presence of metabolic activation.

**Key words** : 2-[(4-Cyanophenyl)amino]-3-chloro-1,4-naphthalenedione (NQ-Y15), mutagenicity, Ames test, chromosomal aberration test

### 서 론

2-[(4-Cyanophenyl)amino]-3-chloro-1,4-naphthalenedione (NQ-Y15)는 강력한 혈소판 응고 저해제로서, 혈소판이 thrombin이나 collagen과 같은 자극물질에 의해 활성화되는 과정에서 thromboxane의 생성을 억제하고, thromboxane과 혈소판

에 존재하는 thromboxane 수용체와의 상호작용을 방해하여 혈소판의 응집을 저해한다.<sup>1)</sup> 당뇨병이나 고혈압 등 성인성 질환을 가진 사람들에게서 혈소판의 응집이 과도하게 일어남이 보고되고 있으며, 이러한 혈소판의 과잉반응이 혈액순환장애 등의 합병증의 중요한 원인이 되는 것으로 알려지고 있다. NQ-Y15는 저자 등에 의해 혈소판 응집

억제 작용을 갖는 것으로 보고된 바 있으며, 이전의 연구를 통해, 목표장기인 혈소판과 적혈구 등에 대해 약효를 보이는 농도에서 세포독성이 없는 것으로 확인되었다. 그러나, 구조적으로 유사성을 갖는 1,4-naphthoquinone과 그 구조유사체들이 세포독성을 가지고 있고, 일부는 항진균력이 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>2)</sup> 또다른 구조 유사체인 anthralin과 그 유도체들은 human keratinocytes의 분열을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup> 따라서, NQ-Y15가 혈소판 이외의 유핵세포에서 DNA의 전사나 효소발현, DNA의 복제 등에 문제를 유발할 가능성을 배제할 수 없다. 이와같은 관점에서 본 연구에서는 NQ-Y15의 유전독성 발현여부를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 시험물질 및 대조물질

시험 물질인 NQ-Y15는 분자량이 308.72인 오렌지색 분말시료로서 이화여자대학교 약학대학 유충규 박사가 직접 합성하였다. NQ-Y15는 DMSO에 녹여 사용하였으며, 포유동물세포에 가하여 배양할 때는 DMSO의 농도가 0.5%가 넘지 않도록 하였다. 양성대조물질로는 복귀돌연변이시험에서는 sodium azide, 2-aminofluorene, 9-aminoacridine, 2-aminoanthracene, 2-nitrofluorene (Sigma)을, 염색체이상시험의 경우는 대사활성조건하에서는 cyclophosphamide (Sigma), 비대사활성조건 하에서는 mitomycin C (Sigma)를 증류수에 용해하여 사용하였다. 음성대조물질로는 증류수와 glycine phosphate buffer를 사용하였다.

#### 1) NQ-Y15의 살모넬라균을 이용한 복귀돌연변이 실험

##### (1) 시험균주

시험에는 histidine 영양 요구성의 *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535, TA1537 등 네 가지 균주를 이용했다. 각 시험균주는 한국화학연구소에서 분양받아 70°C에 동결보존한 것으로 histidine 영양 요구성, 자외선 감수성, 막변화 rfa 특성, 약제내성인자(R-factor plasmid)의 유무 및 자연복귀변이의 정도 등의 형질을 확인한 다음 시험에 사용하였다.

##### (2) 배지

시험균주의 전배양은 2.5% nutrient broth No. 2 (Oxoid)를 이용하였다. 최소 glucose 한천평판배지 (minimal glucose agar plate)는 bacto-agar (Difco) 1.5%에 Vogel-Bonner medium E (50X)와 glucose (40%)를 각각 2% 및 5%되게 첨가한 것으로 plate 당 20ml씩 분주하여 사용하였다. Top agar는 bacto-agar 0.6%, NaCl 0.5% 용액에 0.5 mM L-histidine · HCl/0.5 mM D-biotin 수용액을 10:1의 비율(v/v)로 첨가하여 사용하였고, 그의 본 시험에서 필요한 배지는 Maron과 Ames (1983)의 방법에 준하여 제조하여 사용하였다.<sup>4)</sup>

##### (3) S9 Mix

S9 분획은 8~10 주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫드에서 Aroclor 1254를 효소 유도체로 사용하여 Ames 등(1975)의 방법에 따라 조제하여 시판하는 rat liver S-9 products (Organon Teknika corporation)를 구입하여 사용하였다.<sup>5)</sup> S9 mix는 cofactor를 9ml의 증류수에 용해한 후 S9 분획 1ml을 사용직전에 혼합하여 조제하였다.

##### (4) 시험균액

시험균액은 해동한 동결보존균액 0.1 ml를 취해 25 ml의 Nutrient broth 배지에 접종하여 차광된 배양기내에서 37°C, 120 rpm의 조건으로 약 16시간 진탕배양한 후 시험에 사용하였다.

##### (5) 초기독성시험 (용량설정근거)

본 시험의 용량설정을 위하여 예비 용량설정시험을 *S. typhimurium* TA100을 용하여 실시하였다. 시험물질인 NQ-Y15를 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 5,000 µg/plate를 최고용량으로 하고 이하 1,000, 200, 40, 8, 0 µg/plate 용량으로 시험을 실시하여, 균주에 대한 세포독성발현 전후 농도를 최고농도로 하였다.

##### (6) 돌연변이원성의 측정

돌연변이원성의 시험은 대사활성계를 적용한 경우와 대사활성계를 적용하지 않은 2가지 경우에 대하여 평판법 (direct incorporation method)으로 실시하였다. 즉, 시험물질용액 0.1 ml, S9 mix (비대사활성계의 경우 D.W.) 0.5 ml, 균 배양액 0.1 ml 및 top agar 2 ml을 45°C로 예열한 멸균 tube에 혼합하고 즉시 vortex mix로 2~3초간 진탕한 후 minimal glucose agar plate에 중층하였다. 음성대조군은 glycine phosphate buffer 혹은 증류수(무처리

대조군) 0.1 ml을, 양성대조군은 각각의 양성대조물질 용액 0.1 ml을 시험물질 대신 가하여 동일한 방법으로 실시하였다. 중층한 top agar가 굳은 후 37°C에서 48시간 배양한 다음 출현한 복귀변이 colony수를 계측하고 생육저해 및 시험물질의 침전여부를 관찰하였다. 시험물질은 Table 1, 2에서 표시된 용량에서 시험하였다. 각 용량군 당 2개의 plate를 이용하였으며 복귀변이 colony수의 평균치가 용매대조군에 비하여 용량의존적으로 증가하고 그 수가 음성대조군의 2배 이상 이거나 통계학적 유의성을 나타날 때 양성으로 판정했다.

2) 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

(1) 세포 및 배지

시험에는 Chinese hamster lung (CHL) 세포를 이

용했다. 세포의 배양은 Eagle's MEM (Gibco) 배지에 FCS (Fetal calf serum, Gibco)를 10% (V/V)되게 첨가한 배지를 사용하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 포화수증기 상태의 항온배양기에서 배양했다.

(2) S9 mix

S9 분획은 8~10 수컷 Spargue-Dawley 랫드에서 Aroclor 1254를 효소 유도제로 사용하여 Ames 등(1975)의 방법에 따라 조제하여 시판하는 rat liver S-9 products (Organon Teknika corporation)를 구입하여 사용하였다.<sup>5)</sup> S9 mix는 cofactor를 7 ml의 증류수에 용해한 후 S9 분획 3 ml을 사용직전에 혼합하여 조제하였다.

(3) 세포독성시험 (용량설정시험)

본 시험에 적용하기 위한 50% 세포 증식억제 농도 (IC<sub>50</sub>)는 MTT assay를 이용하여 구하였다. 세

Table 1. Microbial reversion assay of NQ-Y15 using *Salmonella typhimurium* (TA98 and TA100)

Strain	chemical	Dose (µg/plate)	Number of revertant colony/plate					
			-S9			+S9		
			A) <sup>a)</sup>	(B)	Mean	(A)	(B)	Mean
TA98	NQ-T15	0	23	24	24	32	33	33
		0.39	17	22	20			
		0.78	24	28	26			
		1.56	50	55	53			
		3.13	19	22	21	25	33	29
		6.25	9	13	11	29	43	36
		12.5				15	25	20
		25				57	60	59
		50				2	5	4
TA100	NQ-Y15	0	105	130	118	115	116	116
		0.39	103	103	103			
		0.78	110	110	110			
		1.56	196	222	209			
		3,013	178	191	185	113	113	113
		6.25	80	91	86	118	130	124
		12.5				110	124	117
		25				150	172	161
		50				16	41	29
Positive control								
TA98	AF-2	0.1	510	540	525			
TA100	SA	1	900	940	920			
TA98	2-AA	0.5				988	1,116	1,052
TA100	2-AA	0.5				1,308	2,020	1,664

<sup>a)</sup> (A) and (B) indicate duplicate plates.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide

SA : Sodium azide

2-AA : 2-Aminoanthracene

포를 96 well microplate에 10,000 cells/well 이 되도록 파종하여 24시간 동안 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후, 배지를 버리고 한 농도당 8개의 well을 할당하여 시험 물질을 배양액으로 희석하여 5 mg/ml을 최고농도로 하여 10 단계까지 농도를 공비 2로 감소시키며 처리하였다. 마지막 well은 용매 대조군으로 하였다. NQ-Y15는 DMSO에 녹인 후 배지에 희석하였으며, DMSO의 최종농도는 0.5% (v/v)이 넘지 않도록 하였다. 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 다시 배양한 후 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide, Sigma)를 0.1 mg/well 이 되도록 처리하였다. 4시간 더 배양한 후 배지를 제거하고 DMSO를 넣어 생성된 결정을 녹인 다음 ELISA plate reader (UVmax, U.S.A)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 용매 대조군의 optical density를 100%로 보고, 50%에 해당하는 흡광도를 보이는 농도를 희귀식을 이용하여 산출하였다. 이상과 같은 방법으로 얻어진 약 50% 세포 증식억제 농도를 기준으로 공비 2로 3단계의 농도를 설정하여 본 실험을 수행하였다.

#### (4) 염색체이상 시험방법

염색체이상 시험은 비대사활성화법 (직접법)과 대사활성계를 적용한 대사활성화법 2가지로 실시하였다. 예비독성시험에서 결정된 50% 세포증식억제 (IC<sub>50</sub>) 농도를 최고 농도로 하고 공비 2로 3단계의 농도를 설정하여 염색체 이상 시험을 수행하였다. 또한 용매대조군과 양성대조군을 두었으며 양성대조군으로는 대사활성부재 (S9 분획을 포함하지 않는 조건)시 mitomycin C와 대사활성 존재 (S9분획을 포함하는 조건)시 cyclophosphamide를 사용하여 대사활성 존재 및 부재 시로 양분하여 시험하였다.

##### ① 비대사활성화법 (직접법)

직경 60 mm의 petri-dish (배양액 5 ml)에 4.0 × 10<sup>4</sup>개의 세포를 파종하여 3일간 배양하여 단층세포 (monolayer cell)를 만든 후, 각 용량군의 시험물질로 처리하여 6시간 배양하였다. 6시간 경과후 보통의 배양액으로 교환하여 16시간이 경과하면 세포를 수거하여 염색체 표본을 제작하였다. 이때 세포 수거 2시간 전에 colcemid (Gibco)를 최종농도 0.2 µg/ml이 되게 첨가하여 세포분열을 정지시

Table 2. Microbial reversion assay of NQ-Y15 using *Salmonella typhimurium* (TA1535 and TA1537)

Strain	chemical	Number of revertant colony/plate							
		-S9				+S9			
		(µg/plate)	(A) <sup>a)</sup>	(B)	Mean	(µg/plate)	(A)	(B)	Mean
TA1535	NQ-Y15	0	12	12	12	0	9	4	12
		0.25	10	13	12	0.5	11	15	13
		0.74	10	14	12	1.5	8	10	9
		2.22	2	7	5	4.4	7	14	11
		6.67	0	0	0	13.3	6	6	6
		20	0	0	0	40	0	0	0
TA1537	NQ-Y15	0	8	14	11	0	11	15	13
		0.25	10	12	11	0.5	10	14	12
		0.74	26	27	27	1.5	12	13	13
		2.22	4	6	5	4.4	14	15	15
		6.67	3	5	4	13.3	23	28	26
		20	0	0	0	40	0	0	0
TA1535	SA	1	752	780	766				
TA1537	9-AA	50	318	334	326				
TA1535	2-AA					2	830	920	875
TA1537	2-AA					2	285	385	335

<sup>a)</sup> (A) and (B) indicate duplicate plates.

SA : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine

2-AA : 2-Aminoanthracene

켰다.

② 대사활성화법

비대사활성화법과 동일하게 배양한 단층세포에 S9 mi × 1 ml과 각 용량군의 시험물질이 혼합된 배양액 4 ml로 처리하여 6시간 배양한 다음, 정상 배지로 교환하여 16시간 배양한 후 24시간에 세포를 수거, 염색체 표본을 제작하였다. 이때, 세포수거 2시간 전에 직접법에서와 동일하게 colcemid를 처리하였다.

③ 염색체표본의 제작 및 표본의 관찰

시험물질 처리가 종료된 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 분산 수거한 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 모았다. 이 세포에 저장액인 0.075 M KCl을 가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 고정액 (methanol : acetic acid = 3 : 1, v/v)으로 고정시켜 원심분리하였다. 수거된 세포에 다시 냉각 고정액을 가하여 원심분리하는 동일한 조작을 3회 반복하여 세포를 완전히 고정시키고 최종적으로 적당한 밀도의 세포부유액을 만든 다음, 고정된 세포부유액을 slide glass 위에 1방울씩 떨어뜨려 상온에서 완전히 건조시켰다. 건조된 슬라이드는 5% Giemsa 액

에서 10분간 염색하여 수세 후 1,000배 배율의 광학현미경 (Leitz, Diaplan)으로 관찰하였다.

④ 결과판정

슬라이드 당 200개의 분열중기상 염색체를 관찰하여, 처리군에 대한 구조 이상의 총 출현 빈도를 JEMS-MMS 분류법에 따라 구하고 Fisher's exact test with Dunnett's adjustment (Altman, 1993)에 의해 통계처리하여 용매대조군에 비해 통계학적 유의성을 나타내고, 용량 의존성인 증가반응을 나타내는 것을 양성으로 판정하였다.<sup>6)</sup> Gap은 breakage의 간격이 염색체의 폭보다 작은 경우로 본 실험에서는 염색체 이상으로 간주하지 않았다.

결 과

1) NQ-Y15의 살모넬라균에 대한 복귀돌연변이원성 대사 활성계 미적용시 TA98과 TA1537에서 돌연변이 콜로니의 수가 증가하였으며, TA98의 경우 1.56 µg/plate에서 음성대조군에 비해 약 2.2배, TA1537의 경우 1.56 µg/plate에서 음성대조군에 비해 약 2.5배에 달하였다. TA100의 경우 증가 경향은 있었으나, 음성대조군의 2배에 미치지 못하는

Table 3. The frequency of chromosome aberrations induced by NQ-Y15 in chinese hamster lung (CHL) fibroblasts.

Treatment		Chromosome aberrations/200 cells												
		Chromatid type		Chromosome type		Total aberration (%)	Extra aberrations							
Com.	Con. (µg/ml)	hr.	S9 mix	Br	Ex		Br	Ex		ctg	csg	poly	endo	nor
DMSO	-	6	+	3	1	0	0	2	0	0	0	0	194	
CP	10	6	+	14	45	3	0	31	6	0	0	0	132	
NQ-Y15	2.8	6	+	3	1	0	0	2	0	0	0	0	196	
	1.4	6	+	2	1	0	0	1.5	1	0	0	0	196	
	0.7	6	+	1	1	0	0	1	2	0	0	0	196	
DMSO	-	6	-	3	0	0	0	1.5	2	0	5	0	195	
MMC	0.1	6	-	18	60	0	0	34	6	2	0	0	114	
NQ-Y15	0.32	6	-	4	6	0	0	5	0	0	0	0	190	
	0.16	6	-	2	4	0	1	3.5	0	0	0	0	193	
	0.08	6	-	1	1	0	0	1	3	0	0	0	195	
DMSO	-	24	-	0	2	1	0	1.5	1	0	0	0	197	
MMC	0.1	24	-	24	81	0	0	52.5	4	3	0	0	88	
NQ-Y15	0.32	24	-	4	12	0	0	8	0	0	0	0	184	
	0.16	24	-	5	2	0	0	2.5	4	0	0	0	189	
	0.08	24	-	2	3	0	0	2.5	1	0	0	0	194	

Com. : compound, Con. : concentration, Br : breakage, Ex : exchange, ctg : chromatid gap, csg : chromosome gap, poly : polyploid, endo : endoreduplicate, nor : normal, MMC : mitomycin C, CP : cyclophosphamide

하였다 (Table 1, 2).

대사 활성계 적용시에는 TA98과 TA100의 경우 증가경향은 나타났으나 공히 음성대조군의 2배에 미치지 못하는 못하였다. TA1537의 경우는 6.67 µg/plate에서 음성대조군에 비해 약 2배에 달하였다. 대사활성계의 적용 여부에 관계없이 최고농도에서는 모든 균주에서 치사효과가 나타났다.

### 2) NQ-Y15의 CHL 세포에 대한 세포독성

MTT assay를 실시한 결과, CHL 세포의 50% 증식억제 농도값 (IC<sub>50</sub>)은 대사활성 존재 하에서는 2.8 µg/ml, 대사활성 부재 하에서는 0.32 µg/ml로 결정되었다.

### 3) NQ-Y15의 CHL 세포에 대한 염색체 이상 유발성

MTT assay의 결과에 의거하여 NQ-Y15의 염색체 이상 유발시험에서는 대상 시험농도를 2.8, 1.4, 0.7 µg/ml로 결정하였다. 대사활성존재 하에서는 모든 시험 용량에서 통계적으로 유의성있는 염색체 이상유발능을 관찰할 수 없었고, 대사활성 부재하의 6시간 처리시는 최고농도인 0.32 µg/ml에서만 통계적으로 유의성있는 염색체 이상유발능을 보였다. 또한, 대사활성 부재하의 24시간 연속처리 시에도 통계적으로 유의한 염색체 이상유발능을 보였다 (Table 3).

## 고 찰

CHL 세포를 사용한 MTT assay에서 세포에 대한 NQ-Y15의 IC<sub>50</sub>이 대사활성 존재 하에서는 2.8 µg/ml, 대사활성 부재 하에서는 0.32 µg/ml로 간 대사시 NQ-Y15의 세포에 대한 직접적 독성이 크게 감소하는 경향을 보였다 (실험결과 3). 이러한 경향은 복귀돌연변이원성 실험과 염색체 이상실험에서도 동일하게 나타났다 (Table 1, 2, 3). 따라서, NQ-Y15는 간 대사에 의해 세포독성이 낮은 물질로 대사되며, 생체에 투여시간 대사를 받는 만큼 생체독성이 감소할 것임을 예상할 수 있다.

이전의 연구에서 NQ-Y15는 10 µM에서 10 µg/ml (3.09 µg/ml)의 collagen에 의한 혈소판의 응집을 완전히 억제하였고, 이 농도에서는 혈소판에서 세포독성을 보이지 않았다.<sup>1)</sup> 그러나, CHL 세포를 이용한 실험에서는 S9에 의해 대사되지 않았을 경우 같은 농도에서 세포독성을 나타냈다. 이

러한 차이는 NQ-Y15를 처리한 시간이 다른데에서 기인하는 것으로 보인다. 혈소판에 대한 세포독성 실험에서는 NQ-Y15를 처리 후 2시간 동안 세포를 배양하여 lactate dehydrogenase (LDH)의 유출을 측정할 반면, CHL 세포를 이용한 실험에서는 NQ-Y15를 처리한 후 24시간 동안 세포를 배양하여 MTT assay로 독성을 평가하였다. LDH 유출실험이 세포막의 손상에 의한 내부 효소의 유출을 측정하는 반면, MTT assay는 세포의 기본 대사능의 감소와 세포의 손상을 모두 반영한다. 따라서, NQ-Y15는 세포에 가해질 경우 세포막을 손상시키기 이전에 대사능을 저해하거나 유해신호를 생성하여 세포가 사멸하게 하는 것으로 보인다.

또한, NQ-Y15는 유핵세포에서 혈소판과는 다른 방법으로 대사되어 특이한 독성을 발현하거나, 세포분열이나 DNA 발현과 같은 유핵세포만의 대사과정에서 독성을 보일 가능성도 있다. *S. typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이원성 실험과 CHL 세포를 이용한 염색체 이상 시험에 NQ-Y15는 돌연변이원성을 가지고 있으며, 염색체 이상을 유발할 수 있는 것으로 판정되었다 (Table 1, 2, 3). 염색체 이상실험에서는 CHL 세포를 NQ-Y15에 6시간 또는 24시간 동안 노출시켰다. 6시간 노출시킨 경우 염색체 이상의 발생이 경미하였으나, 24시간 노출시킨 경우에는 현저한 염색체 이상이 발견되었다 (Table 3). 이상의 실험을 통해 유전독성 양성성이 확실히 판정되었으므로 소핵실험은 실시하지 않았다.

결론적으로, NQ-Y15는 본 실험에서 기용한 *Salmonella typhimurium*을 사용한 유전자 변이 실험과 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상 시험에서 양성반응을 나타내어 유전독성을 발현할 수 있다는 사실이 확인되었다.

## 참 고 문 헌

1. Chang T.S., H.M. Kim, K.S. Lee, L.Y. Khil, W.C. Mar, C.K. Ryu and C.K. Moon. Thromboxane A2 synthase inhibition and thromboxane A2 receptor blockade by 2-[(4-cyanophenyl)amino]-3-chloro-1,4-naphthalenedione (NQ-Y15) in rat platelets. *Biochem Pharmacol.* 1997; 54(2): 259-68.
2. Perry N.B., J.W. Blunt and M.H. Munro. A cytotoxic and

- antifungal 1,4-naphthoquinone and related compounds from a New Zealand brown algae, *Landsburgia quercifolia*. *J Nat Prod.* 1991 ; 54(4) : 978-85.
3. Muller K., H. Prinz, I. Gawlik, K. Ziereis and H.S. Huang. Simple analogues of anthralin: unusual specificity of structure and antiproliferative activity. *J Med Chem.* 1997 ; 40(23) : 3773-80.
  4. Maron D.M. and Ames B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 1983 ; 113(3-4) : 173-215.
  5. Ames B.N., J. McCann and E. Yamasaki. Proceedings: carcinogens are mutagens: a simple test system. *Mutat Res.* 1975 ; 33(1 Spec No) : 27-8.
  6. Altman D.G. and Machin D. Current statistical issues in clinical cancer research. *Br J Cancer.* 1993 ; 68(3) : 455-6.