

Anti-proliferative and Apoptosis Inducing Effect of Momordin I on Oral Carcinoma (KB) Cells

Kyeong-Seong Seo¹, Jeong Hee Kim^{2*}, and Yeo Gab Kim¹

¹Dept. of Oral Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Kyung Hee University

²Dept. of Oral Biochemistry, School of Dentistry and Institute of Oral Biology, KyungHee University

(Received July 3, 2007 ; Accepted July 30, 2007)

Treatment of oral cancers with chemotherapeutic agents become evaluated as an effective method to reduce cancer cell proliferation. Anti-proliferative and anti-oral cancer activities of momordin I on oral cancer cells were evaluated in this study. Momordin I was originally purified from a natural product, *Ampelopsis radix* and showed the anti-proliferative activity against oral carcinoma, KB cells. Obtained IC₅₀ value was approximately 10.4 µg/ml. Time- and dose-dependent chromosomal DNA fragmentations were observed in momordin I-treated KB cells. Flow cytometry analysis showed time-dependent apoptotic cell appearance after treatment of momordin I. Approximately 18.6% apoptotic cells were observed at 72 hours after 20 µg/ml of momordin I treatment. These observation were consistent with the results obtained in DNA fragmentation analysis. These data suggest that momordin I has anti-proliferative effect and induces cell death in KB cells through apoptosis.

Key words: Momordin I, apoptosis, oral carcinoma

서 론

구강암은 다른 부위의 암종에 비하여 그 발현빈도는 낮으나 악성도가 높고 현저한 기능적, 심미적 손상과 이에 따른 사회심리학적 장애로 보다 적극적이고 효과적인 치료법의 요구가 절실하다(Lee et al., 2000). 구강암의 치료방법으로 외과적 수술, 방사선 치료, 화학요법 등이

있으며 이중 전신적 요법으로의 화학요법은 구강암의 치료를 위한 효과적인 방법으로 평가받고 있다(Lee and Kim, 1998a). 화학요법제는 암세포의 각종 대사경로에 개입하여 주로 DNA와 직접 작용하여 DNA의 복제, 전사, 번역과정을 차단하거나 핵산 전구체의 합성을 방해하고 세포분열을 저해함으로써 암세포에 대한 세포독성을 나타내게 된다(Lee and Kim, 1998). 그러나 골수기능저하, 소화기계 합병증, 신독성 같은 부작용 등이 아직 풀어야 할 과제로 남아 있다. 최근 들어 상대적으로 부작용이 적으며 항암 효과가 있다고 알려진 천연의 약용식물 중에서 임상에 적용 가능한 화학요법제를 찾는 연구들이 있어왔다(Lee et al., 2000; Konkimalla et al., 2007).

임상에서 구강암 치료제로 사용되기 위해서 우선 고려해야 할 사항은 암세포에 따른 각종 항암제에 대한 감수성의 차이가 있기 때문에(Kim et al., 1999), 효율적인 치료를 위하여 적절한 항암제를 선택하고 선택된 항암제의 임상적 기초 지식을 제시하기 위해서 치료하고자 하는 암종의 화학요법에 대한 감수성 검사는 필수적이다(Lee et al., 2000; Lee and Kim, 1998; Kim et al., 1999; Park et al., 1991). 최근들어 구강암에 대한 천연 약제의 감수성에 대하여 여러 연구들이 진행되고 있으며 Lee et al.(1998)등은 인삼사포닌을 이용하여 구강암에 대한 항암활성에 대하여 보고하였으며(Lee et al., 1998a), 동결건조된 black raspberry(Mallery et al., 2007) 및 *Coptidis rhizoma* 추출물(Lee et al., 2006)등의 구강암에서의 화학요법제로의 가능성에 대하여 보고하였다. 이러한 보고들을 포함하여, 천연약제를 이용하여 구강암등 여러 암종에 대하여 항암활성을 가지는 물질을 찾고 감수성에 대하여 검사하는 등의 노력들이 활발히 진행 중에 있다(Bosmer et al., 1996; Oh et al., 1996; Kim et

*Corresponding author: Jeong Hee Kim, Tel.: +82-2-961-0915, Fax.: +82-2-960-1457, e-mail: jhkimh@khu.ac.kr. Yeo Gab Kim, Tel.: +82-2-958-9365, Fax.: +82-2-966-4572, e-mail: kyukab@khu.ac.kr

al., 2005; Manoharan *et al.*, 2006).

Momordin I은 전사유전자 단백질인 Jun/Fos의 AP-1 부위 결합을 저해하는 활성을 가지는 물질을 검색하여 백렴(*Ampelopsis radix*)에서부터 분리된 물질이며 세포증식 억제효과가 있음이 보고되었다(Lee *et al.*, 1998b). 따라서 본 연구에서는 momordin I의 구강암에서의 세포독성효과를 확인하고 그 작용기전을 밝히고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용된 재료로는 백렴(*Ampelopsis radix*)을 분리, 정제하여 얻은 Momordin I을 Dr. D. K. Lee로부터 제공받아 사용하였다. 그 구조는 Fig. 1과 같다.

세포주 및 세포 배양

본 실험에서 사용된 세포주는 구강 상피세포암 세포주인 KB(human oral carcinoma cells, ATCC CCL-17), 세포주를 사용하였으며, 배양 배지로는 10% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 Eagle's Minimum Essential Medium 배지(MEM, GibcoBRL, USA)를 사용하였으며, 항생제로 streptomycin 100 µg/ml 및 penicillin 100 units/ml과 2 mM L-glutamine을 첨가하였다. 세포 배양은 5% CO₂, 95% 공기, 37°C에서 통법에 따라 시행하였다.

세포독성측정

KB 세포를 96 well plate에 심은 후 하룻밤 동안 배양하고 다시 48 시간 동안 배양하였을 때 얻어지는 흡광도가 약 0.7~0.9 정도 되는 적정 세포수를 결정하였다. 결정된 적정수의 KB 세포를 96 well plate에 심은 후 하룻밤 동안 배양하고 다양한 농도의 momordin I를 가하여 48 시간 동안 배양하였다. MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, USA)는 PBS에 5 µg/ml로 녹여서 0.2 µm 여과지로 거른

뒤 -20°C에 분주하여 보관하였고 필요시 녹여 사용하였다. MTT를 10 µl를 가하고 4시간 동안 배양 후 각 well의 배양액을 제거하고 형성된 formazan 결정은 0.04 N HCl이 함유된 isopropanol 100 µl을 첨가하여 가볍게 진탕하여 완전히 용해시킨 후, 이를 ELISA multiplate reader (Biorad Co., USA)로 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

DNA fragmentation assay

Confluence가 약 40~50% 되게 배양된 KB 세포에 최종농도가 20 µg/ml이 되게 시료를 처리한 후 원심분리(4°C에서 5분간 750×g)로 수확하였다. 그 후의 방법은 Hyun *et al.*, (1997)에 기술한 방법을 따랐다. 간략히 설명하면 다음과 같다. 수확한 세포를 cold PBS로 세척하고 TE buffer(10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 부유시킨 다음 lysis buffer(0.5% SDS, 25 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7.5)로 세포 용해액을 만들었다. 단백질은 proteinase K를 사용하여 제거한 후 phenol과 chloroform(1:1)으로 추출 제거하였다. 여기에 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 cold ethanol을 첨가하고 -20°C에서 DNA를 침전시킨 후 수확하였다. 수확된 DNA는 Speed Vac.(Savant, Holbrook, NY)을 이용하여 건조시킨 후 TE buffer(pH = 8)에 용해 시켰다. RNA는 DNase free RNase를 사용하여 제거하였다. 분리된 DNA를 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide와 UV를 이용하여 가시화하였다.

Flow cytometry analysis

배양된 KB 세포에 momordin I을 처리한 후 4°C에서 5분간 750×g로 원심분리하여 수확하였다. Flow cytometry는 Piao *et al.*(2001)에 기술 바와 같이 수행하였으며 간략히 설명하면 다음과 같다. 수확한 세포를 PBS와 McIlvains buffer(0.2 M Na₂HPO₄, 0.1 M Citric acid, pH 7.5)를 1:1의 비율로 혼합한 용액에 현탁시킨 후 70% ethanol 2 ml를 첨가하고 4°C에서 60분간 유지시켜 세포를 고정하였다. 고정된 세포를 4°C에서 5분간 750×g로 원심분리하고 PBS으로 두 번 씻어낸 후 염색시료(10 µg/ml propidium iodide, 100 µg/ml DNase free-RNase in PBS) 2 ml로 현탁시켰다. 그 후 시료를 차광시키고 37°C에서 2시간동안 RNA를 제거하였다. 시료는 FACS Callibur (Becton Dickinson, U.S.A.)를 이용하여 세포로부터 발산된 형광도를 측정하여 분석하였다.

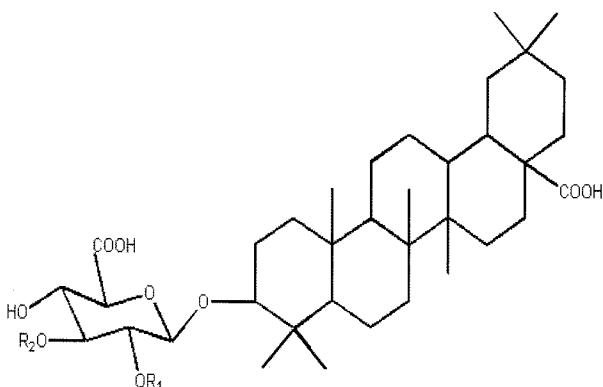


Fig. 1. Structure of momordin I. R1 = R2 = H.

실험 결과

Momordin I의 구강암에 대한 세포독성

구강암 세포주 KB에 momordin I(Fig. 1)을 0, 5, 10, 20,

및 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 48시간동안 처리한 후의 세포 성장을 측정결과는 Fig. 2와 같다. Momordin I을 처리하지 않은 대조군의 세포활성을 100%으로 보았을 때 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 76%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 55%의 세포활성을 보였으며, 20 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 3~5%의 세포활

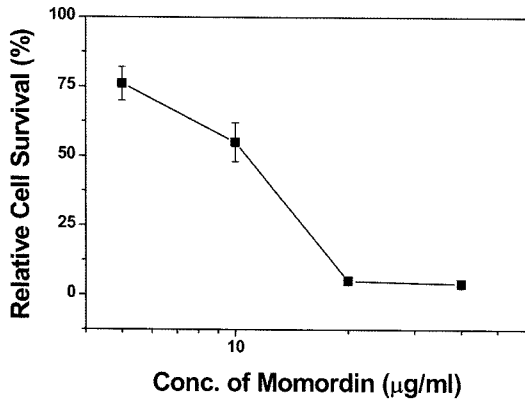


Fig. 2. Relative cell survival of oral carcinoma (KB) cells after treatment of momordin I. Cells were treated with 0, 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ of momordin I for 48 hrs and cell survival was measured by MTT assay.

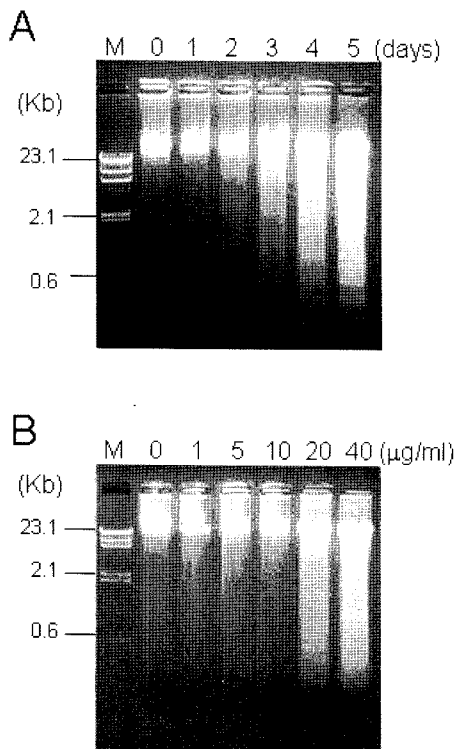


Fig. 3. Time-dependent (A) and dose-dependent (B) nucleosomal DNA fragmentation of KB cells after momordin I treatment. KB cells were treated with momordin I as indicated amount of time at 20 $\mu\text{g/ml}$ or as indicated concentration for 72 hrs. Chromosomal DNA was extracted and subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gels followed by ethidium bromide staining.

성을 나타내었다. 세포 성장을 50% 저해하는 농도인 IC_{50} 값은 약 10.4 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났으며 이를 볼 때 momordin I은 KB 세포에 대하여 우수한 성장 저해 효과 및 구강암 세포주에 대한 세포독성이 있음을 알 수 있었다.

Momordin I의 apoptosis 유도 효과

Momordin I에 의한 세포 성장 저해 및 항암 효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 알아보기 위하여 구강암 세포주 KB에 momordin I (20 $\mu\text{g/ml}$)을 처리하고 시간 변화에 따른 핵 내 chromosomal DNA 분절화 양상을 관찰하였다(Fig. 3). 대조군과 시료 처리 1일 후에는 DNA 분절화 양상이 관찰되지 않았지만 시료 처리 2일 후부터 DNA 분절화 양상이 관찰되기 시작하였다. 또한 시료 처리 시간이 경과할수록 시간의존적인 DNA 분절화 양상이 관찰되었다(Fig. 3A). Momordin I 농도변화에 따른 DNA 분절화 양상을 관찰한 결과는 Fig. 3B와 같다. 대조군과 1, 5 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 momordin I을 처리한 경우에는 DNA 분절화가 관찰되지 않았으나 20 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 DNA 분절화가 관찰되었다(Fig. 3B). 또한 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 높은 농도에서는 더욱 많은 DNA 분절화가 관찰되었다. 종합하여 볼 때 momordin I은 KB 세포에서 apoptosis를 통한 세포사멸 중 활성화 되는 nucleosomal endonuclease활성에 의한 DNA 분절화를 유도하였으며 이는 momordin I을 처리한 시간 및 처리 농도에 비례하는 양상을 보였다.

Momordin I에 의한 세포 주기 영향

Momordin I에 의한 항암효과가 세포주기와 어떤 상관성이 있는지 알아보기 위하여 구강암세포주 KB cell에 확실한 성장저해를 보이는 농도인 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 momordin I을 처리하고 시간에 따른 세포주기의 분포양상을 관찰 분석한 결과는 Fig. 4A와 같다. Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석결과 정상적인 KB 세포의 세포 주기 분포는 염색체 복제 준비기인 G1기는 47%, 염색체 복제기인 S기는 8%, 분열준비 및 분열기인 G2/M기는 20%, 그리고 sub G1의 분포는 2%이었다. 그러나 momordin I 처리 후의 1, 2, 3, 4, 및 5 일 후에 세포주기의 상대적인 분포 양은 G1기가 각각 44, 45, 44, 35, 및 12%, S기는 각각 8, 6, 6, 3, 및 6%, G2/M기는 각각 23, 24, 20, 15, 및 4%이었다 (Fig. 4B). 또한 sub-G1의 분포 양은 시간이 지남에 따라 각각 3, 5, 19, 38, 및 75%로 관찰되었다. 이를 종합하여 볼 때 G1, S, 및 G2/M기의 분포가 시간이 가면서 sub-G1의 증가에 따라 단순히 감소하는 경향을 보였다. 이는 momordin I을 처리하지 않은 세포와 비교하여 보았을 때 momordin I에 의한 세포 증식 억제 효과가 G1 혹은 G2 arrest, 세포질 분열 억제 등의 세포주기 방해로 일으킴으로 나타나는 것이 아니라 apoptosis를 유도하기 때문이라는 것을 보여 준다.

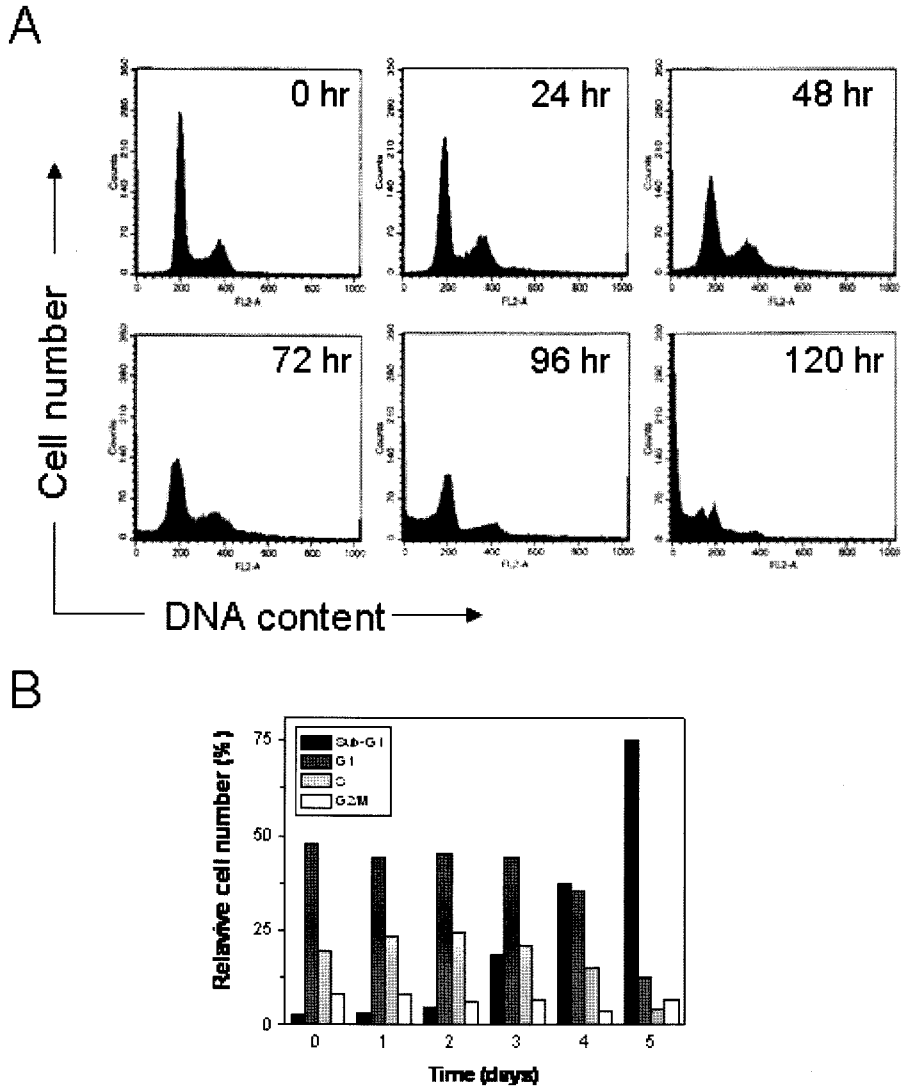


Fig. 4. Flow cytometry analysis (A) and quantitative cell cycle distribution (B) of momordin I-treated KB cells. Concentration of momordin I was 20 µg/ml.

고 찰

구강암은 전체 암 발생율의 5% 정도를 차지하는 것으로 알려져 있다. 높지 않은 발생비율에도 불구하고 불량한 예후, 항암제에 대한 다양한 감수성, 심각한 기능과 심미적 장애, 근치의 어려움 등으로 구강암에 대한 다양한 진단 및 치료법들이 개발되고 있다(Konkimalla *et al.*, 2007). 또한 최근 구강암 특이 유전자 발현에 관심을 갖는 등 구강암에 대한 관심이 높아지고 있다(Lo Muzio *et al.*, 2006; Ziober *et al.*, 2006).

암치료 방법 중의 하나인 화학 요법은 눈부신 발전을 거듭하고 있으며 많은 개선과 발전이 이루어져 왔다. 항암 화학요법은 암세포의 여러 대사경로에 개입하여 작용하는데 주로 DNA와 직접 작용하여 DNA의 복제, 전사, 번역과정을 차단하거나, 핵산전구체의 합성을 방해하여

활성을 저해시키는 경우이거나, 또는 세포분열을 저해함으로써 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 약제들을 포함하며 이들은 종양에서의 약물에 민감한 세포에 작용하여 세포사멸을 유도하게 된다(Lee *et al.*, 2000; Lee and Kim, 1998; Kim *et al.*, 1999). 현재까지 알려진 바로는 cisplatin과 5-fluorouracil을 기본으로 한 복합요법이 가장 효과적이라고 알려져 있으며 60-90%까지의 반응율이 보고된 바 있다(Myung and Kim, 1999). 그러나 화학요법은 이런 높은 치료효과에도 불구하고 오심, 탈모증, 골수기능저하, 신독성 및 면역능력 저하 등 부작용의 발현으로 그 사용에 큰 제한을 받고 있기 때문에 이러한 부작용을 줄이고 치료효과를 높이기 위한 약물병용요법의 연구(Kish *et al.*, 1982)와 신약개발 분야의 연구가 활발히 진행 중에 있다. 그러나 아직도 화학요법제의 독성문제가 완전히 해결되지 않고 있으며 이에 따른 연구들이

계속되고 있다(Lee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006; Mallery *et al.*, 2007).

최근에 들어 상대적으로 부작용이 적은 것으로 알려져 있고 또한 항암효과가 입증되고 있는 전래의 천연약용식물의 성분을 추출 및 정제하여 암세포에 작용하는 항암 활성정도를 검색하고 확인하는 연구들이 보고되고 있다(Lee *et al.*, 2000; Lee and Kim, 1998; Kim *et al.*, 1999). 황련과 파두의 탈지중에서 분리, 정제된 수용성 생약제제를 CP2라고 명명하고 이들로부터 분리된 항암 성분 P2의 구조를 확인하고 P2가 항암효과를 지님을 발표되었다(Kim *et al.*, 1996). 또한 약 400여종의 식물로부터의 추출물을 인체의 전골수성 백혈병성 세포주인 HL-60세포에 적용하여 4 µg/ml이하의 농도에서 IC₅₀값을 나타내는 17종의 식물을 발견해내었으며 이들 중 일부에서 각각의 항암성분이 밝혀졌음이 보고되었다(Suh *et al.*, 1999). 소목 등의 수종의 천연물에서 구강암 세포주에 대한 유의성 있는 항암활성효과가 보고되었고 이들 천연 추출물을 cisplatin과의 병용하였을 때 구강암 세포주에 대한 항암활성의 증강효과가 보고되었다(Lee *et al.*, 2000). Blackberry의 추출물이 전악성 및 악성 구강암 세포주의 성장을 저해하며, 이들 중 활성 물질이 ferulic acid 및 β-sitosterol 임이 확인되었으며(Han *et al.*, 2005), 은행 추출물이 구강암 세포의 세포사멸을 유도함이 보고되었다(Kim *et al.*, 2005).

한편, 실제 임상에서 화학요법 시행시 신중하게 고려하여야 할 사항으로 약제독성에 대한 개별 암세포의 감수성이 중요하다. 또한 화학요법제 사용중 교차내성이 유발될 수 있다는 보고도 있어 적절한 화학요법제 선택을 위한 감수성 검사는 필수적이다(Park *et al.*, 1991). 시험관 내에서 항암제의 감수성을 판정하기 위해서 DNA 합성능을 직접 측정하는 ³H-thymidine DNA uptake 법이 정확한 것으로 알려져 왔지만 고가의 장비가 필요하고 비경제적이며 방사능 오염물질로 인한 여러 문제점을 나타낸다. MTT assay는 ³H-thymidine DNA uptake 법과 비교하여 정량적 결과를 비교적 객관적으로 단기간 내에 얻을 수 있으므로 특정 세포주에 대한 새로운 약제의 선별검사, 병용화학요법에 대한 증강효과와 검사, 생화학적 조절에 대한 방법을 모색할 때 매우 유용한 검사방법이다(Lee *et al.*, 1998; Kish *et al.*, 1982).

본 연구에서는 백림(*Ampelopsis radix*)의 추출물인 momordin I을 구강암세포주 KB에 적용하여 MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정을 실시한 결과 IC₅₀ 값이 약 10.4 µg/ml로 얻어져 momordin I이 KB에 대하여 우수한 세포 성장 저해효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. DNA 분절화 분석과 flow cytometry를 이용한 세포주기분석 및 세포사멸체 형성 분석 결과 momordin I은 KB세포에서 apoptosis를 유도하는 것을 알 수 있었다. 최근까지 항암제의 여러 작용기전들이 밝혀지고 있는데 그 중

apoptosis를 유도함으로써 항암 작용을 나타내는 항암제들이 많이 보고되고 있다. Apoptosis는 programmed cell death라고도 불리며 이는 정상적인 발생과 암화과정(oncogenesis)에 관여하는 특정한 유전자들의 발현에 의한 것으로 알려지고 있다(Angel and Karin, 1991). 단일 세포의 암세포의 apoptosis를 선택적으로 유도할 수 있다면 이것은 좋은 항암제로서 이용될 수 있을 것이다(Kim *et al.*, 1994; Suh *et al.*, 1995). 향후 momordin I의 정상세포에 대한 독성정도를 검색하고 각각의 항암성분과 apoptosis 유도 분자적 작용기전의 확인 및 실제 임상에 사용하기 위한 임상연구를 수행하면, 기존의 화학요법제의 단점을 보완한 새로운 신약제 개발에 대한 기초적 실험으로서의 가치를 찾을 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

- Angel, P. and Karin, M.: The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta.* **1072**: 129-157, 1991.
- Bosmer, J., Madhavi, D.L., Singletary, K. and Smith, M.A.L.: In vitro anticancer activity of fruit extracts from vaccinium species. *Planta Med.* **62**: 212-216, 1996.
- Han, C., Ding, H., Casto, B. and Stoner, G.D.: D'Ambrosio SM. Inhibition of the growth of premalignant and malignant human oral cell lines by extracts and components of black raspberries. *Nutr. Cancer.* **51**:207-217, 2005.
- Hyun, S.J., Yoon, M.Y., Kim, T.H. and Kim, J.H.: Enhancement of mitogen-stimulated proliferation of low-dose radiation-adapted mouse splenocytes. *Anticancer Res.* **17**: 225-229, 1997.
- Kim, J.H., Hyun, J.W. and Kim, Y.G.: Anticancer effects of natural medicinal plant extracts on oral carcinoma cells. *J. Appl. Pharmacol.* **7**: 153-157, 1999.
- Kim, J.H., Lee, S.J., Han, Y.B. and Kim, J.B.: Identification of active component isolated from *Croton tiglium* and *Coptis japonica* aqueous mixture(CP2) and studies of its cytotoxic effect. *Yakhak Hoeji* **38**:31-37, 1994.
- Kim, K.S., Rhee, K.H., Yoon, J.H., Lee, J.G., Lee, J.H. and Yoo, J.B.: Ginkgo biloba extract (EGb 761) induces apoptosis by the activation of caspase-3 in oral cavity cancer cells. *Oral Oncol.* **41**:383-389, 2005.
- Kish, J.A., Drelichman, A. and Jacobs, J.: Clinical trial of cisplatin and 5-fluorouracil infusion as initial treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Treat. Rep.* **66**:471-474, 1982.
- Konkimalla, V.B., Suhas, V.L., Chandra, N.R., Gebhart, E. and Efferth T.: Diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* **7**:317-329, 2007.
- Lee, D.K., Kim, B.S., Lee, S.G., Gwon, H.J., Moon, E.Y., Hwang, H.S., Seong, S.K., Lee, M.S., Lim, M.J., Sung, H.J. Shin, D.H., Yoon, S.J. and Yang, C.H.: Momordins inhibit both AP-1 function and cell proliferation. *Anticancer Res.* **18**: 119-124, 1998b.

- Lee, H.J., Son, D.H., Lee, S.K., Lee, J., Jun, C.D., Jeon, B.H., Lee, S.K. and Kim, E.C.: Extract of *Coptidis rhizoma* induces cytochrome-c dependent apoptosis in immortalized and malignant human oral keratinocytes. *Phytother. Res.* **20**:773-779, 2006.
- Lee, J.-H. and Kim, M.-J.: Chemosensitivity of cisplatin and 5-fluorouracil on oral squamous cell carcinoma cell lines. *KAOMS* **24**:165-171, 1998.
- Lee, J.-S. J. H. Kim and Kim, Y.-G.: Studies on the effect of ginseng saponins on oral cancer and normal cells. *Kyung Hee Dental J.* **20**:117-128, 1998a.
- Lee, Y.-H., Kim, Y.-G. and Kim, J.H.: Studies on anti-oral cancer activities of medicinal plant. *KAOMS* **26**:53-58, 2000.
- Lo Muzio, L., Santarelli, A., Emanuelli, M., Pierella, F., Sartini, D., Staibano, S., Rubini, C. and De Rosa, G.: Genetic analysis of oral squamous cell carcinoma by cDNA microarrays focused apoptotic pathway. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **19**: 675-682, 2006.
- Mallery, S. R., Stoner, G.D., Larsen, P.E., Fields, H.W., Rodrigo, K.A., Schwartz, S.J., Tian, Q., Dai, J. and Mumper, R.J.: Formulation and *in-vitro* and *in-vivo* evaluation of a mucoadhesive gel containing freeze dried black raspberries: implications for oral cancer chemoprevention. *Pharm. Res.* **24**:728-37, 2007.
- Manoharan, S., Kavitha, K., Senthil, N. and Renju GL.: Evaluation of anticarcinogenic effects of *Clerodendron inerme* on 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med. J.* **47**:1038-1043, 2006.
- Myoung, H. and Kim, M.-J.: Anti-tumor effect of TAXOL and cisplatin in oral squamous cell carcinoma and osteosarcoma cell lines. *KAOMS* **25**:236-241, 1999.
- Oh, W.-Y., Ko, S.-O., Shin, H.-K. and Kim, O.-W.: Inhibitory effect of ganoderma on the growth of human cancer cell lines. *KAOMS* **22**:437-450, 1996.
- Park, S.-O., Shin, H.-K. and Kim, O.-W.: Chemosensitivity test of human osteosarcoma and epidermoid carcinomas using MTT assay. *KAMPRS* **13**:391, 1991.
- Piao, W., Yoo, J., Lee, D.K., Hwang, H.J. and Kim, J.H.: Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by a new synthetic anticancer agent, DW2282, in promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Biochem. Pharmacol.* **62**:1439-1447, 2001.
- Sargent, J.M. and Taylor, C.G.: Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukemia. *Br. J. Cancer.* **60**(2): 206-210, 1989.
- Suh, N., Luyengi, L., Fong, H.H., Kinghorn, A.D. and Pezzuto, J.M.: Discovery of natural product chemopreventive agents utilizing HL-60 cell differentiation as a model. *Anticancer Res.* **15**:233-239, 1995.
- Ziober, A.F., Patel, K.R., Alawi, F., Gimotty, P., Weber, R.S., Feldman, M.M., Chalian, A.A., Weinstein, G.S., Hunt, J. and Ziober, B.L.: Identification of a gene signature for rapid screening of oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer. Res.* **12**:5960-5971, 2006.