

## Omega 3계열 불포화 지방산의 암세포주에 대한 성장 억제효과

한두석 · 최형규 · 강정일\* · 최화정\*\* · 백승화\*\*\*,#

원광대학교 치과대학 구강해부학교실, \*대불대학교 물리치료학과,

\*\*생명공학연구원 천연의학연구센터, \*\*\*원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

(Received April 3, 2008; Revised June 23, 2008)

### Growth Inhibitory Effects of Omega-3 Unsaturated Fatty Acid against Cancer Cell Lines

Du Seok Han, Hyoung Gyu Choi, Jeong Il Kang\*, Hwa Jung Choi\*\* and Seung Hwa Baek\*\*\*,#

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

\*Department of Physical Therapy, Daebul University Youngam 526-702, Korea

\*\*Natural Medicines Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-333, Korea

\*\*\*Department of Herbal Resources, Professional School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

**Abstract** — The inhibitory effect of omega-3 such as linolenic acid (LNA), docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) on the growth of normal cell lines and cancer cell lines was evaluated by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and 2,3-bis-2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide (XTT) methods. LNA was found to decrease the cell viability of human oral epithelial carcinoma cells (KB) in the MTT assay, whereas EPA appeared to inhibit the cell adhesion activity of human skin melanoma cells (SK-MEL-3) in the XTT assay analysis. DPPH radical scavenging activity was examined on LNA, DHA and EPA at the concentration of 100  $\mu$ M, where they showed about 53% scavenging activity. These results suggest that omega-3 unsaturated fatty acid has a potential anti-cancer activity.

**Keywords** □ unsaturated fatty acid, cell viability, cell adhesion activity, cytotoxicity, omega-3, DPPH radical scavenging activity

지방산(fatty acid)은 생체내에서 Acetyl-COA, Malonyl-COA을 생합성하여 지방산 에스테르형태로 존재하는 생리활성물질이 밝혀지고 있다. 지방산 중 이들 오메가-3 불포화 지방산은 이미 혈청의 중성지방이나 콜레스테롤의 농도를 낮추며 혈소판의 응집력을 억제하여 혈액응고를 방지하고, 염증 mediator인 프로스타글란딘, 트롬복산, 류코트리엔 등의 생합성을 저해함으로써 관상동맥질환, 중풍, 협심증, 심근경색증, 뇌 영양공급 및 순환기장애 개선, 치매예방, 혈전생성억제, 혈압, 혈류조절, 항노화, 류마티스 관절염이나 기타 알리지성 질환을 치료할 수 있는 가능성이 대두되고 역학조사에서 입증되고 있으며 그 기능성 식품의 특허가 추진되어 왔다.<sup>1,2)</sup> 이러한 배경에 근거하여 오메가-3 불포화 지방산인 LNA(linolenic acid), DHA(docosahexaenoic acid), EPA

(eicosapentaenoic acid)의 항암 특히 암의 화학적 예방 가능성을 분자 생화학적 기전을 통하여 제시되고 있어, 이는 암의 특성상 항 혈관신생 기전과 함께 매우 중요한 것으로 생각되지만, 암의 예방기전에 대한 연구와 분석이 필요한 시점이다.<sup>2)</sup> Liu 등<sup>3)</sup>의 오메가-3 불포화 지방산은 암 발생 위험을 낮추는 반면, n-6 불포화 지방산은 암 발생 위험을 증가시킨다는 보고와, Horrobin<sup>4)</sup>의 체내의 n-6 불포화 지방산인 AA(arachidonic acid)가 많고, 오메가-3 불포화 지방산인 EPA가 결핍되면, 심장질환, 면역작용 저하, 암 발병 및 당뇨병과 같은 성인병이 증가한다는 보고와, Wifalt 등<sup>5)</sup>의 폐경기 이후 유방암 발병은 n-6 불포화 지방산의 섭취와 관련이 있다는 보고 등이 있다. Lima 등<sup>6)</sup>의 보고에 의하면 불포화 지방산을 인체 백혈병 세포(human Leukemic cell)에 처리하면, 농도 의존적으로 세포독성이 나타나는 데, 그 원인은 세포고사(apoptosis)에 의한 것이며, 농도를 높히면 세포괴사(necrosis)가 일어난다. 불포화 지방산의 세포독성은 DHA=EPA=AA=gamma LNA로 현저한 차이는 없었으며, 포화 지방

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 063-850-6225 (팩스) 063-841-4893  
(E-mail) shbaek@wonkwang.ac.kr

산에 비하여 불포화 지방산이 정상세포에 나타내는 세포독성이 낮은 것은 탄소사슬의 길이와 이중결합의 수에 의하여 결정된다고 보고하였다. 반면에 Motaung 등<sup>7)</sup>은 불포화 지방산을 인체 전립선암 세포주에 처리하면, EPA와 ALA(alpha-linolenic acid)는 생리적 농도에서 세포고사가 관찰되었다고 보고하였다.

최근에도 Bougnoax와 Menantean<sup>8)</sup>는 유방암 발생을 위한 동물모델인 쥐에서 LA(linoleic acid)와 같은 n-6 불포화 지방산은 일반적으로 암세포의 성장을 자극하나, 오메가-3 불포화 지방산과 OA(oleic acid)는 대장암 발생의 모든 단계에서 암세포의 성장을 억제한다고 보고 하였으며, Cario-Andre 등<sup>9)</sup>은 n-6 불포화 지방산은 세포고사 없이 색소세포에서 산화적 손상을 일으킬 수 있으며, 그 결과 피부암인 흑색종(melanoma)의 위험을 증가시킨다고 보고하였으며, Ghosh<sup>10)</sup>는 n-6 불포화 지방산인 AA가 인체 전립선 암의 발병을 촉진한다는 보고와, Jones 등<sup>11)</sup>의 AA의 빠른 대사는 phospholipase의 활성을 증가시키고, 대장암세포에서 cyclooxygen-ase(COX)와 lipoxygenase(LOX)의 수치를 증가시켜 결장암의 발병을 촉진하다는 보고 등이 있다.

이에 본 연구는 오메가 3계열의 불포화 지방산이 나타내는 세포독성은 세포에 따라 다른 것으로 밝혀지고 있어, LNA, DHA 및 EPA가 피부와 구강암 세포주에 나타내는 세포독성을 확인할 목적으로, 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포주와 암세포인 인체 피부흑색종 세포주 및 인체 구강유상피암종 세포주에 LNA, DHA 및 EPA를 농도별로 처리하고 48시간이 경과한 후, 세포 생존율을 알아보기 위하여 MTT 정량분석법을, 세포 부착능을 알아보기 위하여 XTT 정량분석법을 실시하고, DPPH의 항산화능을 측정하였으며, 실험과정의 모든 세포의 광학 현미경적 관찰을 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험 방법

### 시약

세포 배양에 사용한 Minimum Essential Medium(MEM)과 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM) 및 fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, fungizone 시약은 Gibco/BRL(Grand Island, NY, USA)사에서 구입하였으며, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 정량과 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide(XTT) 정량에 사용한 시약 및 linolenic acid(LNA), docosahexaenoic acid(DHA), eicosapentaenoic acid(EPA)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

### 실험기기

세포의 배양은 CO<sub>2</sub> incubator(Vision Scientific Co., Bucheon,

Korea)를 사용하였으며, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기(Marienfeld Co., Mergentheim, Germany)를 이용하였다. MTT 정량에는 ELISA reader(Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, U.S.A.)를 사용하였다.

### 세포배양

LNA, DHA 및 EPA의 정상세포에 대한 세포독성과 암세포에 대한 세포독성을 측정하기 위하여, 원광대학교 의과대학 해부학교실에서 분양받은 NIH3T3 섬유모 세포(NIH3T3)는 MEM 배지에, 서울대학교 암연구소에서 분양받은 인체 피부흑색종 세포(SK-MEL-3)와 인체 구강유상피암 세포(KB)는 RPMI 1640 배지에 10% fetal bovine serum, penicillin(25 unit/ml) 및 fungizone을 첨가하여 사용하였다. 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산ガ스 농도 5%의 배양기(CO<sub>2</sub> incubator, Vision Scientific Co., Buchean, Korea.)를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 분리한 후, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 5×10<sup>4</sup> cells/ml가 되도록 세포 부유액을 만들었다.

### MTT 정량분석법

Mosmann의 방법<sup>12)</sup>에 의하여, NIH3T3 섬유모 세포와 인체 피부흑색종 세포 및 인체 구강유상피암 세포를 각 배양용기에 5×10<sup>4</sup> cells/ml 세포수를 넣고 24시간 배양 후, LNA, DHA 및 EPA의 세포독성을 측정하기 위하여, LNA, DHA 및 EPA를 각각 농도별(1, 25, 50 및 100 μM)로 첨가하고 48시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT(Sigma Chemical Co.) 50 μg/ml가 포함된 배양액을 첨가하고 3시간 배양 후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온에 방치하여 MTT formazan을 용해하고, 흡광도는 ELISA reader로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

### XTT 정량분석법

Laminin-coated plate는 laminin 1 mg을 PBS 2 ml에 용해하여 냉장고에 보관하면서 필요시에 laminin의 농도(20 mg/ml)를 결정하여, 찬 PBS 용액으로 희석하고 이 용액을 24 well plate의 각 well에 200 μl씩 분주하여 하룻밤동안 건조시킨 뒤, PBS로 두 번 세척하여 3% Bovine Serum Albumin(BSA)를 각 well에 200 μl씩 첨가해 잘 흔들어 준 다음 제거하고 PBS로 두 번 정도 세척하였다.

배양된 NIH3T3 섬유모 세포와 인체 피부흑색종 세포 및 인체 구강유상피암 세포 5×10<sup>4</sup> cells/ml 세포수를 laminin으로 coating한 배양용기에 넣고 24시간 배양한 후, MTT 정량분석법과 같은 방법으로, LNA, DHA 및 EPA를 넣고, 다시 48시간 배양한 후, 배지는 조심스럽게 제거하고 PBS로 두 번 세척하였다.

여기에서 XTT(2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2*H*-tetrazolium-5'-carboxanilide)와 혼합하여, 각 well에 200  $\mu$ l씩 주입하고, 4~6시간 동안 배양한 후 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

### 항산화능

DPPH에 의한 항산화능은 Hatano 등의 방법<sup>13)</sup>에 의하여, 각 fraction을 25, 50, 100, 200, 500 ppm(99.5% ethanol)의 5가지 농도로 조제한 용액 0.1 ml(control: 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH 용액(99.5% ethanol) 1.9 ml를 가하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후, 37°C에서 30분 동안 incubation시켰다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조 약물로는 L-ascorbic acid를 25, 50, 100, 200 ppm (99.5% ethanol)의 4가지 농도로 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 DPPH에 대한 전자공여능(Electron donating ability, EDA%)<sup>14)</sup>과 IC<sub>50</sub>(DPPH radical 형성을 50% 억제하는데 필요한  $\mu$ l 농도)로 나타내었다.

$$\text{EDA (\%)} = \frac{\text{Control O.D.} - \text{Sample P.D.}}{\text{Control O.D.}} \times 100$$

Sample O.D. : 시료를 가한 시험액의 흡광도

Control O.D. : 시료 대신 ethanol을 가한 시험액의 흡광도

### IC<sub>50</sub> 결정

LNA, DHA 및 EPA의 IC<sub>50</sub> 결정은 배양중인 NIH3T3 섬유모 세포와 인체 피부흑색종 세포 및 인체 구강유상피암 세포를 각 배양용기 당  $5 \times 10^4$  cells/ml씩 넣고 24시간 배양 후, 1, 25, 50, 100  $\mu$ M의 LNA, DHA 및 EPA를 첨가하여 48시간 배양한 후, MTT 정량을 하여 이들 각각에 대한 50% 억제농도인 IC<sub>50</sub>을 회귀 직선식<sup>15)</sup>에 의해 구하였다.

### 세포의 광학 현미경적 관찰

세포의 광학 현미경적 관찰을 위하여, NIH3T3 섬유모 세포와 인체 피부 흑색종 세포 및 인체 구강유상피암 세포는 각각 세포분주 후, LNA, DHA 및 EPA를 처리하여 MTT를 처리하기 전에, 도립 현미경(Inverted Microscope, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

### 통계처리

실험결과의 통계처리는 Students' t-test에 준하였으며, 유의성 검정은 one way ANOVA t-test와 비교하였으며, p-value가 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

### 실험결과

Bougnoax와 Menantean<sup>8)</sup>는 유방암 발생을 위한 동물모델인

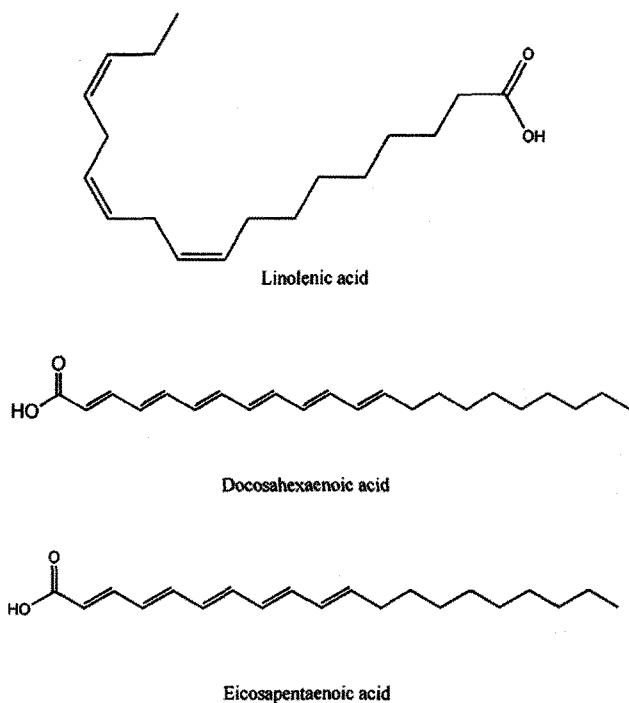


Fig. 1 – Molecular structures of linolenic acid, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid.

쥐에서 LA와 같은 n-6 불포화 지방산은 일반적으로 암세포의 성장을 자극하나, 오메가 3계열의 불포화 지방산과 OA는 대장암 발생의 모든 단계에서 암세포의 성장을 억제한다고 보고 하였다. 이러한 연구결과에 근거하여, 불포화 지방산 중 탄소사슬이 길고, 이중결합이 많은 오메가 3계열인 LNA, DHA 및 EPA를 선정하여, 정상 세포주인 NIH3T3 섬유모 세포에 세포 생존율을 MTT 정량분석법으로 측정한 결과에 의하면, 오메가 3계열의 LNA, DHA 및 EPA 불포화 지방산은 농도 의존적으로 세포독성이 증가하였다.

오메가 3계열 불포화 지방산 중에 LNA는 다른 불포화 지방

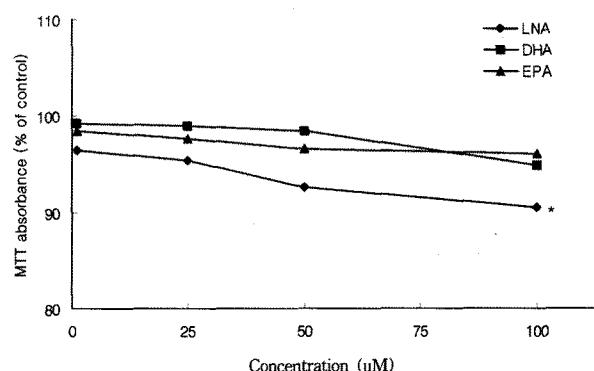


Fig. 2 – The cytotoxic activity of LNA, DHA, EPA by the MTT method on NIH3T3 fibroblasts. Significantly different from the control value: \* $p < 0.05$  (Students' t-test).

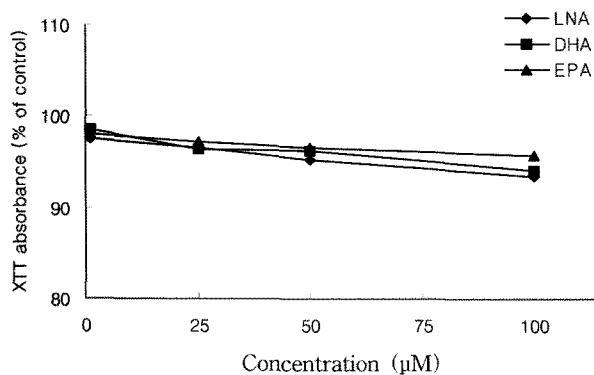


Fig. 3 – The cytotoxic activity of LNA, DHA, EPA by the XTT method on NIH3T3 fibroblasts.

산(DHA 및 EPA)보다 농도가 증가함에 따라, NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 세포 생존율은 약간 더 감소하였으며, 100 μM LNA 농도에서 통계적으로 유의성도 관찰되었다( $p<0.05$ ). LNA의 최소억제 농도(504.5 μM)는 DHA의 최소억제 농도(855.8 μM)의 1.7배 활성이 관찰되었으며, EPA의 최소억제 농도(1,138.3 μM)에 비하여 2.3배로 활성이 높게 관찰되었다. 이와 같은 세포 생존율의 감소가 증가하는 것은 LNA의 NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 세포독성이 높은 원인에 기인한다고 생각된다. NIH3T3 섬유모 세포주는 세포독성에 대한 민감성이 EPA>DHA>LNA 순서로 감소되어 관찰되었다(Fig. 2).

불포화 지방산 LNA, DHA 및 EPA의 NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 세포 부착능의 검색결과에 의하면, 세포 생존율의 농도 의존성같이 불포화 지방산에서 세포 부착능의 활성의 경향은 그림 2와 유사한 농도 의존적 감소하였다. 불포화 지방산의 세포 부착능의 활성은 거의 비슷하게 감소하였으며, 1~100 μM 범위의 농도에서 LNA, DHA 및 EPA 불포화 지방산은 통계적으로 유의성이 관찰되지 않았다. LNA의 최소억제 농도(755.4 μM)는 DHA의 최소억제 농도(833.4 μM)의 1.1배 활성이 관찰되었으며, EPA의 최소억제 농도(1,068.8 μM)에 비하여 1.4배로 활성이 높게 관찰되었다. 세포 부착능의 활성은 세포 생존율의 활성과 같이 LNA의 NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 유사한 생물검색이 관찰되었다. NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 세포 부착능의 민감성은 EPA>DHA>LNA의 순서로 감소되어 관찰되었다(Fig. 3).

#### 인체 피부흑색종 세포주에 대한 세포독성

불포화 지방산 LNA, DHA 및 EPA의 인체 피부흑색종 세포에 대한 세포 생존율은 NIH3T3 섬유모 세포와는 달리, 농도에 대한 의존성이 크게 관찰되었다. 인체 피부흑색종 세포에 대한 최소억제 농도의 결과에 의하면, EPA(216.1 μM)에서 가장 강한 세포독성이 나타났다. EPA의 세포 생존율은 LNA(249.2 μM)보

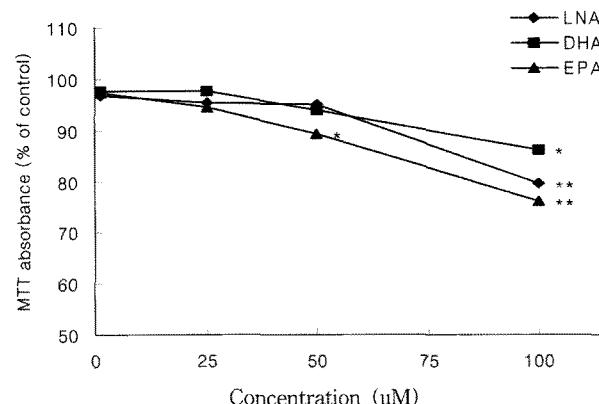


Fig. 4 – The cytotoxic activity of LNA, DHA, EPA by the MTT method on SK-MEL-3. Significantly different from the control value: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  (Students' t-test).

다 1.2배의 강한 세포독성이 관찰되었으며, DHA(361.8 μM)의 세포 생존율보다는 1.7배의 강한 세포독성이 측정되었다. 세포 생존율에 의하면, 100 μM LNA 농도에서 통계적으로 높은 유의성이 있었으며( $p<0.01$ ), 100 μM DHA 농도에서 통계적으로 유의성이 관찰되었다( $p<0.05$ ). 최소억제 농도가 높은 EPA는 50 μM 와 100 μM 농도에서 통계적으로 유의성이 있었다( $p<0.01$ ). 인체 피부흑색종 세포에 대한 세포 독성의 민감성은 DHA>LNA>EPA의 순서로 감소되어 관찰되었다(Fig. 4).<sup>8,16</sup>

불포화 지방산 LNA, DHA 및 EPA의 인체 피부흑색종 세포에 대한 세포 부착능을 XTT 정량분석법으로 측정한 결과에 의하면, 불포화 지방산은 농도 의존적으로 감소하였다. 인체 피부 흑색종 세포의 세포 부착능은 NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 세포 부착능보다 농도 의존성이 크게 관찰되었다. EPA의 최소억제 농도(234.2 μM)는 LNA의 최소억제 농도(398.1 μM)의 1.7배

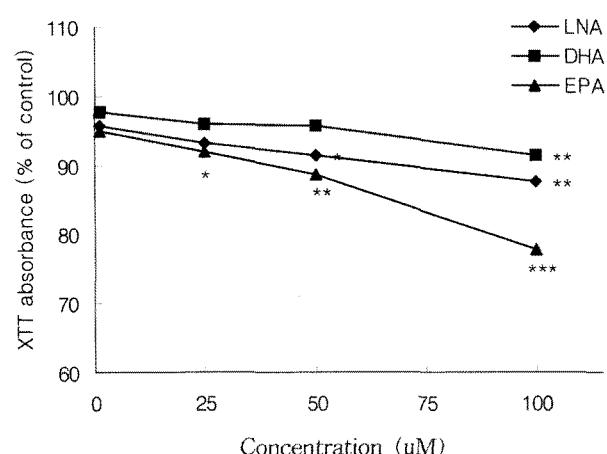


Fig. 5 – The cytotoxic activity of LNA, DHA, EPA by the XTT method on SK-MEL-3. Significantly different from the control value: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  (Students' t-test).

의 세포 부착능의 활성이 관찰되었으며, DHA의 최소억제 농도 ( $310.0 \mu\text{M}$ )에 비하여 1.3배로 세포 부착능의 활성이 높게 관찰되었다. 인체 피부흑색종 세포에 대한 세포 부착능의 활성은 NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 세포 부착능보다 높은 활성이 관찰되었다. LNA는  $50 \mu\text{M}$  농도와  $100 \mu\text{M}$  농도에서 통계적으로 유의성이 관찰되었으며 ( $p<0.01$ ),  $100 \mu\text{M}$  DHA 농도에서 통계적으로 유의성이 있었으며 ( $p<0.01$ ),  $25 \mu\text{M}$  EPA 농도에서부터 통계적으로 유의성이 관찰되기 시작하였다. 인체 피부흑색종 세포에 대한 세포 부착능의 민감성은 LNA>DHA>EPA의 순서로 감소되어 관찰되었다(Fig. 5).<sup>16)</sup>

#### 인체 구강유상피암종 세포주에 대한 세포독성

불포화 지방산 LNA, DHA 및 EPA의 인체 구강유상피암종 세포주에 대한 세포 독성은 NIH3T3 섬유모 세포와는 달리, 세포 독성이 높게 관찰되었으며, 특히 LNA의 세포독성은 인체 피부암 세포의 세포독성보다 강하게 측정되었으며, 인체 구강유상피암종 세포의 세포 생존율도 다른 세포처럼 농도 의존적으로 감소하였다. 인체 구강유상피암종 세포에 대한 최소억제 농도의 결과에 의하면, LNA( $112.1 \mu\text{M}$ )에서 가장 강한 세포독성이 나타났다. LNA의 세포 생존율은 DHA( $442.9 \mu\text{M}$ )보다 DIR 4배의 강한 세포독성이 관찰되었으며, EPA( $331.3 \mu\text{M}$ )의 세포 생존율보다는 약 3배의 강한 세포독성이 측정되었다. 세포 생존율에 의하면, DHA는  $50 \mu\text{M}$  농도와  $100 \mu\text{M}$  농도에서 통계적으로 유의성이 있었으나,  $25 \mu\text{M}$  EPA 농도에서부터 통계적으로 유의성이 관찰되었다( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ). 그렇지만 다른 불포화 지방산에서는 관찰되지 않은 세포독성이  $25 \mu\text{M}$  LNA에서 특이하게 강하게 나타나기 시작하였다. 인체 구강유상피암종 세포에 대한 세포독성의 민감성은 DHA>EPA>LNA의 순서로 감소되어 관찰되었다(Fig. 6).<sup>8,16)</sup>

불포화 지방산 LNA, DHA 및 EPA의 인체 구강유상피암종 세

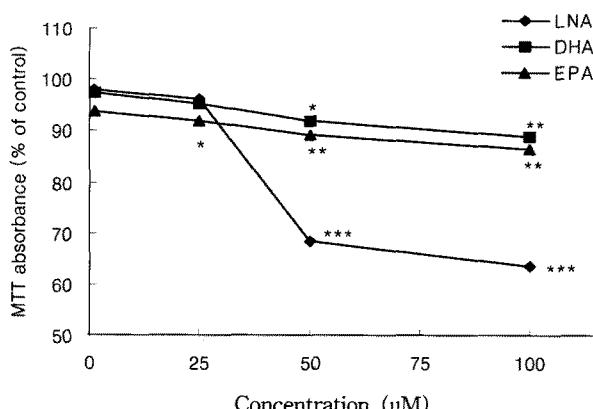


Fig. 6 – The cytotoxic activity of LNA, DHA, EPA by the MTT method on KB. Significantly different from the control value: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  (Students' t-test).

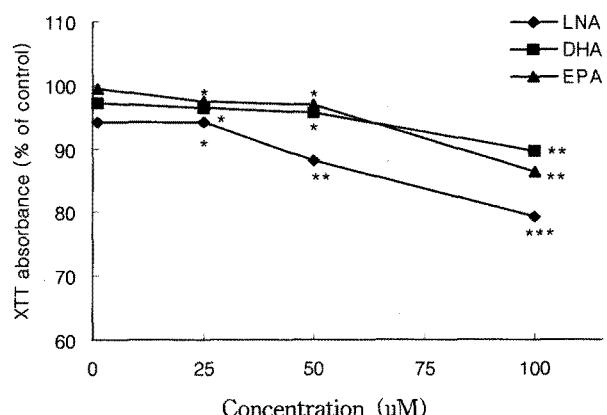


Fig. 7 – The cytotoxic activity of LNA, DHA, EPA by the XTT method on KB. Significantly different from the control value: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  (Students' t-test).

포주에 대한 세포 부착능을 XTT 정량분석법으로 측정한 결과에 의하면, 인체 피부흑색종 세포의 경우처럼, 농도 의존적으로 감소하였으며, NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 세포 부착능보다 농도 의존성이 크게 관찰되었다. 세포 부착능의 활성은 LNA의 경우에는,  $25 \mu\text{M}$  LNA 농도에서부터 통계적으로 유의성이 있었으며, 농도가 증가할수록 통계적인 유의성도 높게 관찰되었다 ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ).  $25 \mu\text{M}$  DHA와  $25 \mu\text{M}$  EPA 농도에서부터 통계적으로 유의성이 있었으나,  $50 \mu\text{M}$  DHA와  $100 \mu\text{M}$  EPA 농도에서는 LNA보다 세포 부착능의 활성이 높게 관찰되었다. LNA의 최소억제 농도( $245.4 \mu\text{M}$ )는 DHA의 최소억제 농도( $487.6 \mu\text{M}$ )보다 약 2배의 강한 활성이 관찰되었으며, EPA의 최소억제 농도( $362.2 \mu\text{M}$ )에 비하면 약 1.5배의 세포 부착능의 활성 차이에 대한 생물활성이 관찰되었다. 인체 구강유상피암 세포에 대한 세포 부착능의 민감성은 DHA>EPA>LNA의 순서로 감소되어 관찰되었다(Fig. 7).<sup>16)</sup>

#### 비색분석법에 의한 LNA, DHA 및 EPA의 세포독성

불포화 지방산 LNA, DHA 및 EPA의 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포주와 암세포인 인체 피부흑색종 세포주 및 인체 구강유상피암종 세포주에 대한 세포독성을 비교하면, Table I에서 보

Table I – The cytotoxic activity of LNA, DHA and EPA by the colorimetric method<sup>a</sup>

Cell line	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>					
	MTT			XTT		
	LNA	DHA	EPA	LNA	DHA	EPA
NIH3T3	504.5	855.8	1138.3	755.4	833.4	1068.8
SK-MEL-3	249.2	361.8	216.1	398.1	310.0	234.2
KB	112.1	442.9	331.3	245.4	487.6	362.2

<sup>a</sup>LNA, DHA and EPA was examined in four concentrations in triplicate experiments. <sup>b</sup>IC<sub>50</sub> represents the concentration of a LNA, DHA and EPA required for 50% inhibition of cell growth.

는 바와 같이, 각 불포화 지방산의  $IC_{50}$ 은 암세포주보다 정상세포에서 높아 세포독성이 약한 것으로 관찰되었다. 암세포주에 나타내는 세포독성은 불포화 지방산에 따라 다르게 나타나, LNA의 세포 생존율에 대한 인체 구강유상피암종 세포주에 대한 최소억제 농도( $112.1 \mu\text{M}$ )는 인체 피부흑색종 세포의 최소억제 농도( $249.2 \mu\text{M}$ ) 보다 2.2배의 강한 세포독성을 나타냈으며, NIH3T3 섬유모 세포주에 최소억제 농도( $504.5 \mu\text{M}$ )보다 약 4.5의 강한 세포독성이 관찰되었으며, 다른 불포화 지방산보다 세포 생존율이 가장 낮은 연구결과를 얻게 되었다. LNA의 세포 부착능의 검색결과에 의하면, 인체 구강유상피암종 세포주에 대한 최소억제 농도( $245.4 \mu\text{M}$ )는 인체 피부흑색종 세포의 최소억제 농도( $398.1 \mu\text{M}$ ) 보다 1.6배의 강한 세포 부착능을 나타냈으며, NIH3T3 섬유모 세포주에 최소억제 농도( $755.4 \mu\text{M}$ )보다 약 3.1의 강한 세포 부착능이 관찰되었다. LNA의 세포의 활성검색에 의하면, 인체 구강유상피암종 세포주가 세포독성이 강하며, 인체 피부흑색종 세포와 NIH3T3 섬유모 세포주의 순서로 세포독성에 감소하는 현상이 관찰되었다. DHA의 세포 생존율에 대한 인체 구강유상피암종 세포주에 대한 최소억제 농도( $442.9 \mu\text{M}$ )는 인체 피부흑색종 세포의 최소억제 농도( $361.8 \mu\text{M}$ ) 보다 1.2배의 약한 세포독성을 나타냈으며, NIH3T3 섬유모 세포주에 최소억제 농도( $855.8 \mu\text{M}$ )보다 약 1.9의 강한 세포독성이 관찰되었다. DHA의 세포 부착능의 검색결과에 의하면, 인체 구강유상피암종 세포주에 대한 최소억제 농도( $487.6 \mu\text{M}$ )는 인체 피부흑색종 세포의 최소억제 농도( $310.1 \mu\text{M}$ ) 보다 1.6배의 약한 세포 부착능을 나타냈으며, NIH3T3 섬유모 세포주에 최소억제 농도( $833.4 \mu\text{M}$ )보다 약 1.7의 강한 세포 부착능이 관찰되었다. DHA의 세포의 활성검색에 의하면, NIH3T3 섬유모 세포주와는 다르게, 인체 피부흑색종 세포주가 세포독성이 강하며, 인체 구강유상피암종 세포주와 NIH3T3 섬유모 세포주의 순서로 세포독성에 감소하는 현상이 관찰되었다. EPA의 세포의 활성검색에 의하면, DHA의 세포독성처럼 인체 피부흑색종 세포주의 세포독성이 강하며, 인체 구강유상피종 세포와 NIH3T3 섬유모 세포주의 순서로 세포독성에 감소하는 현상이 관찰되었다. EPA의 세포 생존율에 대한 인체 구강유상피암종 세포주에 대한 최소억제 농도( $331.3 \mu\text{M}$ )는 인체 피부흑색종 세포의 최소억제 농도( $216.1 \mu\text{M}$ ) 보다 1.5배의 약한 세포독성을 나타냈으며, NIH3T3 섬유모 세포주에 최소억제 농도( $1138.3 \mu\text{M}$ )보다 약 3.4의 강한 세포독성이 관찰되었다. NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 세포 생존율과 세포 부착능의 민감성은 EPA>DHA>LNA 순서로 감소되어 관찰되었으며, 인체 피부흑색종 세포에 대한 세포 생존율과 세포 부착능의 민감성은 DHA>LNA>EPA의 순서로 감소되었으며, 인체 구강유상피암종 세포에 대한 세포 생존율과 세포 부착능의 민감성은 DHA>EPA>LNA의 순서로 감소되어 관찰되었다. 탄소수와 이중결합수가 가장 낮은 LNA의 세포에 대한 활성검색은 세포 생

존율과 세포 부착능의 민감성으로 측정한 결과에 의하면, 1.6~4.5배의 효능이 검색되어, 다른 불포화 지방산보다 비교적으로 높은 활성효과가 관찰되었다. 그러나 EPA의 세포활성에 대한 연구결과를 검토하여보면, NIH3T3 섬유모 세포주에 대하여, 다른 불포화 지방산의 세포활성보다 세포독성이 낮으나, 암세포주에 대한 세포독성은 비교적으로 높게 관찰되었으며, 세포 부착능의 검색에서도 다른 불포화 지방산에 비하여 높은 활성이 관찰되었다(Table I). 불포화 지방산은 세포주에 따라 세포 생존율과 세포 부착능의 민감성에 차이가 있으므로, 앞으로 불포화 지방산과 세포주에 따른 생리활성 검색이 분자구조에 어떤 영향을 연구할 필요가 있다.<sup>8,16)</sup>

### DPPH 라디칼 소거능

항산화 작용이 있는 불포화 지방산이 암세포주에 대한 세포독성 효과에 대한 연구결과에 따라,<sup>17)</sup> LNA, DHA 및 EPA의 DPPH 라디칼 소거능에 의한 항산화 효과를 측정한 결과, Table II과 Fig. 8에서 보는 바와 같이, LNA, DHA와 EPA의 자유기 라디칼 소거능은 농도에 따라 의존성이 미약하게 관찰됨을 알 수가 있었다. LNA가 다른 불포화 지방산보다 세포독성이 강하게 관찰되었으나, 자유기 라디칼의 소거능은 비교적으로 낮은 라디칼 소거능이 측정되었으며, 불포화 지방산의 자유기 라디칼의 소거능은 46.1~54.8% 범위에서 관찰되었다(Fig. 8).

### 세포의 형태학적 관찰

정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포주와 암종세포인 인체 피부흑색종 세포주 및 인체 구강상피암종 세포주는 24 well multidish에  $5 \times 10^4$  세포수를 넣고, 24시간 배양하면 배양용기 바닥에 뚜렷한 핵을 갖는 방추형세포가 단층을 이루며, 48시간 배양하면 여러형태의 세포들이 층을 이룬다(Photos 1, 3, 5). NIH3T3 섬유모세포주에 LNA, DHA 및 EPA를 농도별로 증가하면서, 배양

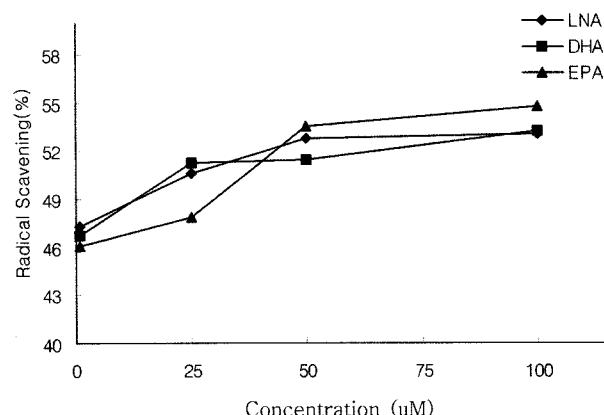
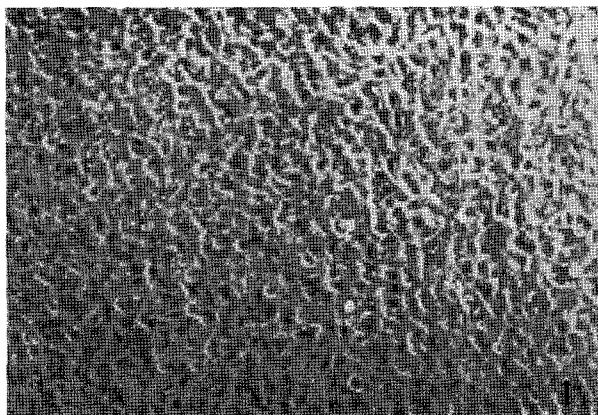
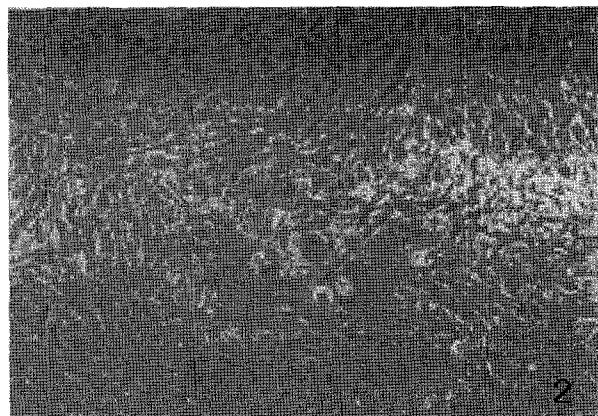


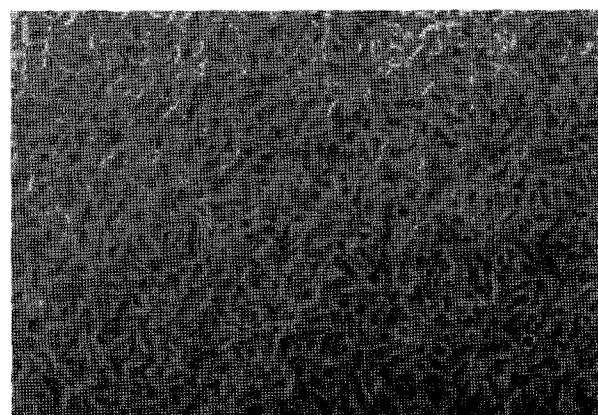
Fig. 8 – The radical scavenging activity of LNA, DHA and EPA by the DPPH method.



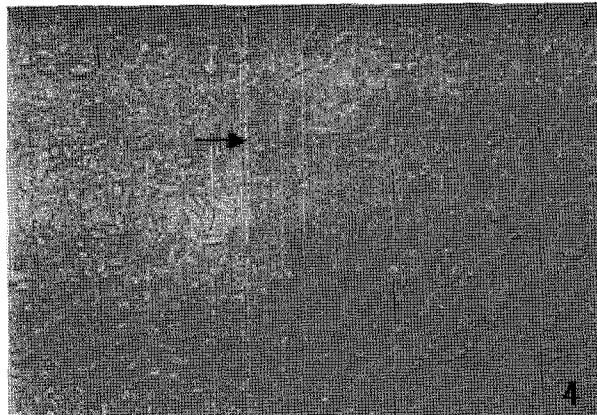
**Photo 1** – Inverted photomicrograph of NIH3T3 fibroblasts treated with MTT for additional 24 hours after incubation in unmodified medium (control) for 2 days  $\times 100$ . Most cells had abundant cytoplasm and cytoplasmic process.



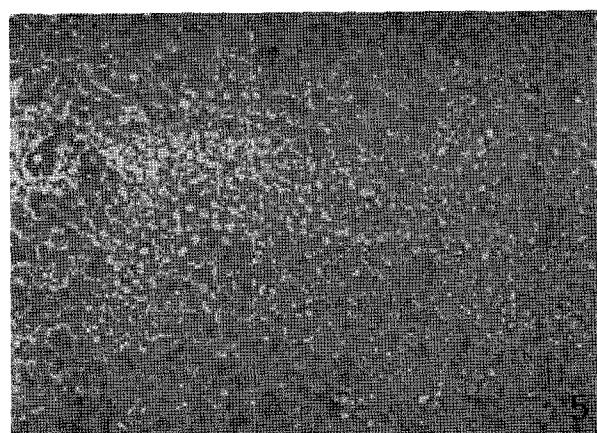
**Photo 2** – Inverted photomicrograph of NIH3T3 fibroblasts treated with MTT for additional 24 hours after incubation in 100  $\mu\text{M}$  EPA containing medium for 2 days  $\times 100$ . Most cells were formed cell cluster and number of cells were decreased.



**Photo 3** – Inverted photomicrograph of SK-MEL-3 cells treated with MTT for additional 24 hours after incubation in unmodified medium (control) for 2 days  $\times 100$ . Most cells had abundant cytoplasm and cytoplasmic process.



**Photo 4** – Inverted photomicrograph of SK-MEL-3 cells treated with MTT for additional 24 hours after incubation in 100  $\mu\text{M}$  EPA containing medium for 2 days  $\times 100$ . Most cells were formed cell cluster and number of cells were decreased (arrow: apoptotic body).

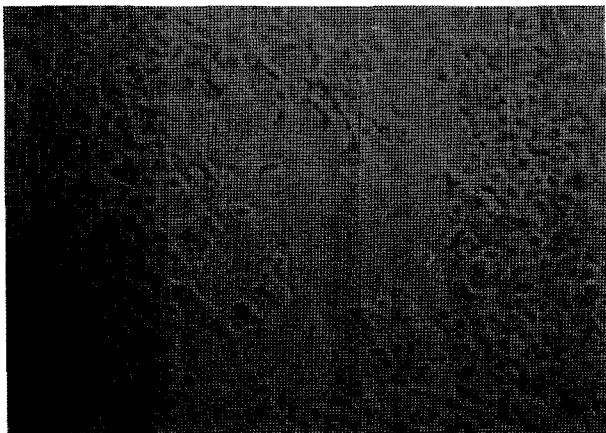


**Photo 5** – Inverted photomicrograph of KB cells treated with MTT for additional 24 hours after incubation in unmodified medium (control) for 2 days  $\times 100$ . Most cells had abundant cytoplasm and cytoplasmic process.

하면 농도의 증가에 따라 세포수에 변화가 거의 없었으나, 인체 피부흑색종 세포주와 인체 구강유상피암종 세포주에 LNA, DHA 및 EPA를 첨가하여, 배양하면 농도의 증가에 따라 세포의 퇴행성 변화와 세포수의 감소가 심하였다. 암세포의 퇴행성 변화와 세포수의 감소는 불포화 지방산에 따라 다르게 나타나, LNA는 KB에, DHA와 EPA는 SK-MEL-3에서 심하였다. 각 50  $\mu\text{M}$  불포화 지방산의 농도에서는 세포 사멸체(apoptotic body)가 관찰되었으며, EPA의 NIH3T3, SK-MEL-3 및 KB에 대하여 광학 현미경적으로 관찰된 사진을 제시하였다(Photos 2, 4, 6).

## 고 찰

오메가 3계열의 불포화 지방산은 대장암 특히 인체의 결장<sup>1,18)</sup>



**Photo 6** – Inverted photomicrograph of KB cells treated with MTT for additional 24 hours after incubation in 100  $\mu\text{M}$  EPA containing medium for 2 days  $\times 100$ . Most cells were formed cell cluster and number of cells were decreased.

유방암,<sup>19)</sup> 전립선암<sup>7)</sup> 세포주에 대하여 성장억제 효과가 있으나, 세포주에 따라 성장억제 효과에 차이가 있는 데, 이는 불포화 지방산의 탄소원자 수와 이중결합의 증가에 의하여 나타나는 결과로 보고<sup>6)</sup>되고 있어, 본 연구에서는 오메가3 불포화 지방산 중 탄소원자 수와 이중결합 수가 각각 다른 LNA, DHA 및 EPA를 선정하여, 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포주와 암세포인 인체 피부흑색종 세포주 및 인체 구강유상피암종 세포주에 처리한 후, 세포 생존율, 세포 부착능, 세포의 형태학적 관찰 및 항산화 작용을 측정하였다. 세포 생존율은 정상 세포주와 암세포주에서 농도 의존적으로 감소하였으나, 암세포주보다 정상 세포주에서  $IC_{50}$  가 높아 세포독성이 약하게 나타났으며, 세포 부착능에서도 세포 생존율에서와 유사한 활성검색이 나타났다. 세포의 광학 현미경적 관찰에서도 암세포주에 대하여 형태학적 변화와 세포수의 감소가 심하였으나, 정상 세포주에 대하여는 약하게 나타났다. 이는 Menendez 등<sup>20)</sup>의 오메가3 불포화 지방산이 정상세포에는 영향을 주지 않고, 인체 암세포에만 선택적으로 세포독성을 유발한다는 보고와 일치하며, GLA(gamma linolenic acid)가 암세포의 세포 부착능을 조절한다는 보고와도 일치하였다.<sup>15)</sup> 오메가3 불포화 지방산이 암세포에 대하여 선택적 세포독성을 나타내는 기전에는 지방산 합성억제와 malonyl-COA 세포독성의 억제에 의한 암세포의 세포고사에 기인한다고 보고하였으며,<sup>21)</sup> EPA는 시험판내에서 여러 종류의 암세포주의 세포고사와 세포주기를 억제하며, 이들 억제는 세포에 따라 다르며,<sup>22)</sup> EPA와 AA (arachidonic acid)는 그 분자구조에 이중결합이 있어 지방산화와 COX 활성시 생산되는 파산화물에 기인하다는 보고<sup>16,23)</sup> 등과도 일치하였다. LNA, DHA, EPA가 암세포주에 나타내는 세포독성은 Chi 등<sup>22)</sup> 보고에서와 같이 세포주에 따라 다르게 나타나, 인체 구강유상피암종 세포에 대하여는 LNA가 인체 피부흑색종

세포에 대하여는 DHA와 EPA가 강한 세포독성을 나타냈다. 세포고사를 세포의 항상성 유지와 성장의 결정적 역할을 하는 필수적인 생리학적 과정이다.<sup>24)</sup> 화학적 암예방의 목적은 특정의 자연산물이나 합성물에 의하여 신생종양의 진행을 저해하거나 차단하는 데 있다.<sup>25)</sup> 따라서 세포고사를 유도하는 경로에서 특정 성분의 화학적 암예방 물질을 이해하는 것은 암의 효과적인 예방 전략으로 이용될 수 있다.<sup>26)</sup> 세포고사가 일어나는 대표적인 경로는 두 가지가 있는 데, 하나는 미토콘드리아에 의한 과정이며, 또 하나는 death receptor와 그것의 ligand의 상호작용에 의한 과정이다. 본 연구의 결과에서, 50  $\mu\text{M}$  LNA, 50  $\mu\text{M}$  DHA 및 50  $\mu\text{M}$  EPA 농도를 처리한 실험군의 암세포에서 세포 사멸체가 관찰되었는데, 이는 세포 생존율은 세포내 미토콘드리아와 관련된 효소량을 흡광도로 측정하여 산정하므로, 미토콘드리아에 의한 과정이라고 생각할 수도 있으며, 오메가3 불포화 지방산이 COX나 LOX(lipoxygenase)에 활성에 관여하여, 세포고사를 일으키는 후자의 과정을 거치는 것도 추측할 수도 있다.<sup>17)</sup> 세포고사 기전은 여러 연구자들에 의해 암의 예방과 치료에 많은 관여를 하고 있다고 보고되고 있다.<sup>27,28)</sup> 불포화 지방산의 탄소원자의 수와 이중결합의 증가에 따라 세포 생존율 및 세포 부착능에 대한 기전은 앞으로 연구가 계속되어야 할 것이다.

## 결 론

오메가 3계열의 불포화 지방산인 LNA, DHA 및 EPA의 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포주와 암세포인 인체 피부흑색종 세포 및 인체 구강유상피암종 세포에 나타내는 세포독성과 항산화능을 알아 보기 위하여, 비색 분석법인 MTT 정량분석법과 XTT 정량분석법을 이용하여 세포독성과 DPPH법에 의한 항산화능을 측정하였으며, 세포의 형태학적 관찰을 위하여, 도립 현미경을 이용하여 광학 현미경적으로 관찰하였다. LNA, DHA 및 EPA의 NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 세포 생존율과 세포 부착능은 농도 의존적으로 감소시켰으며, 100  $\mu\text{M}$  LNA 농도에서 통계적으로 유의성이 있었다. LNA, DHA 및 EPA의 인체 피부흑색종 세포주와 인체 구강유상피암종 세포주에 대한 세포 생존율과 세포부착능은 농도 의존적으로 감소시켰으며, 50  $\mu\text{M}$  LNA 농도 이상, 100  $\mu\text{M}$  DHA 농도와 25  $\mu\text{M}$  EPA 농도에서 통계적으로 유의성이 있었다. 그러나 인체 구강유상피암종 세포주에서는 25  $\mu\text{M}$  LNA와 25  $\mu\text{M}$  DHA 농도 이상, 25  $\mu\text{M}$  EPA 농도에서 통계적으로 유의성이 있었다. 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포에 대한  $IC_{50}$  은 LNA<EPA<DHA 순이었으나, 암세포인 인체 피부흑색종 세포와 인체 구강유상피암종 세포주에 대한  $IC_{50}$  농도를 세포주에 따라 차이가 있어, 인체 피부흑색종 세포주에 대하여는 EPA<DHA<LNA 순서로 관찰되었으며, 인체 구강유상피암종 세포주에 대하여는 DHA<EPA<LNA 순서로 나타났다. 불포화

지방산의 항산화능은 불포화 지방산의 이중결합의 수과 탄소수에 따른 분자구조에 관련하여, 세포의 생존율이나 부착능에 큰 영향을 미치지 않았다. 불포화 지방산은 NIH3T3 섬유모세포에 대하여 형태학적 변화를 거의 유도하지 못하였으나, 인체 피부 흑색종 세포주와 인체 구강유상피암종 세포주에 대하여 형태학적 변화를 심하게 관찰되었으며, 50 μM 불포화 지방산농도에서는 세포 사멸체가 관찰 되었다. 이상의 결과에서 불포화 지방산, LNA, DHA 및 EPA는 정상세포보다 암세포에 나타내는 세포독성이 강하며, 암세포는 나타내는 세포독성이 다르게 나타났으며, 불포화 지방산의 분자구조에 따른 암세포주와 항산화능의 활성 관계를 연구할 필요가 있다고 생각된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 2008년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었습니다. 지원에 감사드립니다.

### 문 헌

- 1) Roynette, C. E., Calder, P. C., Dupertuis, Y. M. and Pichard, C. : n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin. Nutr.* **23**, 139 (2004).
- 2) Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M. and Wolk, A. : Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 935 (2004).
- 3) Liu, G., Bibus, D. M., Bode, A. M., Ma, W. Y., Holman, R. T. and Dong, Z. : Omega 3 but not omega 6 fatty acids inhibit AP-1 activity and cell transformation in JB6 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7510 (2001).
- 4) Horrobin, D. F. : Phospholipid metabolism and depression: the possible roles of phospholipase A2 and coenzyme A-independent transacylase. *Hum. Psychopharmacol.* **16**, 45 (2001).
- 5) Wirfalt, E., Mattisson, I., Gullberg, B., Johansson, U., Olsson, H. and Berglund, G. : Postmenopausal breast cancer is associated with high intakes of omega6 fatty acids (Sweden). *Cancer Causes Control* **13**, 883 (2002).
- 6) Lima, T. M., Kanunfre, C. C., Pompeia, C., Verlengia, R. and Curi, R. : Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis. *Toxicol In Vitro* **16**, 741 (2002).
- 7) Motaung, E., Prinsloo, S. E., van Aswegen, C. H., du Toit, P. J., Becker, P. J. and du Plessis, D. J. : Cytotoxicity of combined essential fatty acids on a human prostate cancer cell line. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **61**, 331 (1999).
- 8) Bougnoux, P. and Menanteau, J. : Dietary fatty acids and experimental carcinogenesis. *Bull. Cancer* **92**, 685 (2005).
- 9) Cario-Andre, M., Briganti, S., Picardo, M., Nikaido, O., de Verneuil, H. and Taieb, A. : Polyunsaturated fatty acids partially reproduce the role of melanocytes in the epidermal melanin unit. *Exp. Dermatol.* **14**, 194 (2005).
- 10) Ghosh, J. : Rapid induction of apoptosis in prostate cancer cells by selenium: reversal by metabolites of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 624 (2004).
- 11) Jones, R., Adel-Alvarez, L. A., Alvarez, O. R., Broaddus, R. and Das, S. : Arachidonic acid and colorectal carcinogenesis. *Mol. Cell Biochem.* **253**, 141 (2003).
- 12) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).
- 13) Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. and Okuda, T. : Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. IV. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2016 (1989).
- 14) Umamaheswari, M., Asokkumar, F., Rathidevi, R., Sivashanmugam, A. T., Subhadradevi, V. and Ravi, T. K. : Antiulcer and *in vitro* antioxidant activities of *Jasminum grandiflorum* L. *J. Ethnopharmacol.* **110**, 464 (2007).
- 15) Jiang, W. G., Redfern, A., Bryce, R. P. and Mansel, R. E. : Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) mediates the action of gamma linolenic acid in breast cancer cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **62**, 119 (2000).
- 16) Han, D. S., Chun, J. W., Jeon, S. W. and Baek, S. H. : The inhibitory effect of ferulic acid and related phenolic compounds against cancer cell lines. *J. Pharm. Soc. Kor.* **49**, 365 (2005).
- 17) Sravan, K. G. and Das, U. N. : Cytotoxic action of alpha-linolenic and eicosapentaenoic acids on myeloma cells *in vitro*. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **56**, 285 (1997).
- 18) Dommels, Y. E., Haring, M. M., Keestra, N. G., Alink, G. M., van Bladeren, P. J. and van Ommen, B. : The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE(2) synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* **24**, 385 (2003).
- 19) Menendez, J. A., del Mar Barbacid, M., Montero, S., Sevilla, E., Escrich, E., Solanas, M., Cortes-Funes, H. and Colomer, R. : Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer* **37**, 402 (2001).
- 20) Menendez, J. A., Lupu, R. and Colomer, R. : Exogenous supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acid

- docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) synergistically enhances taxane cytotoxicity and downregulates Her-2/neu (c-erbB-2) oncogene expression in human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer Prev.* **14**, 263 (2005).
- 21) Vecchini, A., Ceccarelli, V., Susta, F., Caligiana, P., Orvietani, P., Binaglia, L., Nocentini, G., Riccardi, C., Calviello, G., Palozza, P., Maggiano, N. and Di Nardo, P. : Dietary alpha-linolenic acid reduces COX-2 expression and induces apoptosis of hepatoma cells. *J. Lipid Res.* **45**, 308 (2004).
- 22) Chi, T. Y., Chen, G. G. and Lai, P. B. : Eicosapentaenoic acid induces Fas-mediated apoptosis through a p53-dependent pathway in hepatoma cells. *Cancer J.* **10**, 190 (2004).
- 23) Igarashi, M. and Miyazawa, T. D. : Conjugated eicosapentaenoic acid and conjugated docosahexaenoic acid induce apoptosis via lipid peroxidation in cultured human tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 649 (2000).
- 24) Zimmermann, K. C., Bonzon, C. and Green, D. R. : The machinery of programmed cell death. *Pharmacol.* **92**, 57 (2001).
- 25) Jo, E. H., Hong, H. D., Ahn, N. C., Jung, J. W., Yang, S. R., Park, J. S., Kim, S. H., Lee, Y. and Kang, K. S. : Modulations of the Bcl-2/Bax family were involved in the chemopreventive effects of licorice root (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) in MCF-7 human breast cancer cell. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1715 (2004).
- 26) Sun, S. Y. : Apoptosis induction by chemopreventive agents. *Drug News Perspect* **14**, 75 (2001).
- 27) Li, J. Q., Chen, R. C., Cai, K. X. and Ye, Z. Y. : Apoptosis of human gastric cancer cell induced by photochemical riboflavin. *Ai Zheng* **22**, 253 (2003).
- 28) Takahira, K., Sano, M., Arai, H. and Hanai, H. : Apoptosis of gastric cancer cell line MKN45 by photodynamic treatment with photofrin. *Lasers, Med. Sci.* **19**, 89 (2004).