

해조류 중의 anti-tumor initiator 및 promoter의 해석-3 : 곰피 추출물중의 발암 promotion 억제 인자

박영범 · 김인수* · 유승재 · 안중관 · 이태기 · 박덕천 · 김선봉
부경대학교 식품공학과, *경상대학교 식품과학과 · 해양산업연구소

Elucidation of Anti-tumor Initiator and Promoter Derived from Seaweed-3 : Anti-tumor Promoters of *Ecklonia stolonifera* Extracts

Yeung-Beom PARK, In-Soo KIM*, Sung-Jae YOO, Jong-Khan AHN,
Tae-Gee LEE, Douck-Choun PARK and Seon-Bong KIM

Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Department of Food Science and Institute of Marine Industry, Gyeongsang National
University, Tongyeong 650-160, Korea

To elucidate anti-tumor promoter from seaweed, the anti-tumor promoting activity of *Ecklonia stolonifera*, *Undaria pinnatifida* and *Laminaria japonica* extracts were determined by Epstein-Barr virus (EBV)-early antigen (EA) induction caused by a tumor promoter, teleocidin B-4. The methanol extracts of seaweed were subsequently fractionated with diethyl ether, distilled water, chloroform and ethyl acetate. Among the solvent fractions tested, chloroform and ethyl acetate fraction of *E. stolonifera* showed a high anti-tumor promoting activity at the levels of 88.0 and 85.9% by the addition of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. To characterize anti-tumor promoters from solvent fractions of *E. stolonifera*, the effects of phenols, chlorophyll derivatives and carotenoids on the anti-tumor promoting activity were investigated. Phenols, such as bromophenol and phloroglucinol showed anti-tumor promoting activity of 57~66% at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pigments, such as chlorophylls and carotenoids exerted high anti-tumor promoting activities. Chlorophyll a and pheophorbide a exhibited the activity of 77.4% and 66.6% at 5 $\mu\text{M}/\text{mL}$, respectively. The active compounds of carotenoids were tentatively identified as lutein and α -cryptoxanthin from the profiles of visible spectra and R_f value of their authentic compounds, and showed anti-tumor promoting activities of 76.9% and 84.4% at dose of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

Key words: anti-tumor promoter, Epstein-Barr virus, *Ecklonia stolonifera*, lutein, α -cryptoxanthin

서 론

발암은 단일의 단계로 진행되기 보다는 initiation, promotion 및 progression 등의 다단계를 거쳐 진행된다는 것이 알려지고 있다 (Berenblum, 1941). 발암 promotion에 관여하는 발암 promoter는 발암성을 가지고 있지는 않으나, 그 작용이 세포막상의 receptor를 매개로 하여 잠재적 종양세포의 유전자를 발현, 분화하는데 관여하므로 발암 initiation과 promotion의 단계는 발암 기구상 각기 독립적으로 존재하는 것으로 알려져 있다. (Nishizuka, 1988, Wang et al., 1995) 특히, 발암 initiation단계는 발암 진행과정상 단기간에 걸쳐 비가역적으로 진행되는 데 비하여, 발암 promotion단계는 장기간에 걸쳐 가역적인 진행 특성을 나타내므로, 발암 억제 및 예방을 위해서는 발암 promotion단계를 억제하는

것이 더욱 효과적인 것으로 인식되고 있다 (Berenblum, 1941).

발암 promotion의 억제에 관한 연구는 셀러리, 양배추 등의 야채와 녹차 추출물 등, 식물을 이용한 연구가 대부분을 차지하고 있다. 지금까지 보고되고 있는 발암 promotion 억제인자를 보면, 식물계에 널리 존재하는 anthraquinone류 및 녹황색 야채로부터 carotene이 알려져 있고 (Konoshima and Kozuka, 1989 ; Nishino, 1993), 녹차 추출물로부터는 catechin이 널리 알려져 있다 (Yoshizawa, 1989). 그리고, 약용식물로부터는 flavonoid, chalcon류, 1'-acetoxychavicol acetate, cardamonin 및 curcumin 등이 분리 동정되고 있다 (Murakami et al., 1992a, 1992b ; Kondo et al., 1993 ; Liu et al., 1993).

이상과 같이, 발암을 억제하기 위하여 식물을 중심

으로 많은 연구가 이루어져 왔으나, 우리나라의 경우, 해조류의 이용이 많음에도 불구하고 발암 promotion의 억제에 대한 체계적인 연구가 적은 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 해조류 중의 발암 promotion 억제 인자를 해석하기 위하여 진보 (Park et al., 1996)에서의 발암 promotion 억제 작용 검색의 결과를 바탕으로 하여 갈조류인 곰피 중의 발암 promotion 억제 인자에 대하여 살펴보았다.

재료 및 방법

재 료

실험에 사용된 곰피 (*Ecklonia stolonifera*), 미역 (*Undaria pinnatifida*) 및 다시마 (*Laminaria japonica*)는 부산광역시 시장에서 각각 구입하였다. 발암 promotion 억제 시험에 사용한 CCL-86 Raji 세포는 ATCC에서 분양 받았고, 세포 배양용 성분은 RPMI1640 (GIBCO), fetal bovine serum (GIBCO), HEPES buffer (GIBCO) 및 penicillin-streptomycin (Sigma)를 사용하였고, 발암 promoter인 teleocidin B-4는 일본 경도대학에서 제공받아 사용하였다. Epstein-Barr (EB) virus의 항원·항체 반응을 위해 사용한 상후두암 환자유래 serum는 경도대학에서 제공받았고, 형광표식인자는 IgG-FITC (DAKO)를 사용하였다. 그리고 이밖에 사용한 모든 시약은 시약용 특급품을 사용하였다.

시료추출물의 조제

건조한 곰피, 미역 및 다시마 분말에 methanol (3 ℓ/kg)을 첨가하여 48시간 2회 추출하여 농축한 것을 메탄올 추출물로 하였다. 여기에 diethyl ether, 증류수, chloroform 및 ethyl acetate를 순차적으로 일정량 가하여 추출한 후, 농축하여 각 용매 추출물로 사용하였다.

Phenol 화합물의 추출

Phenol 화합물의 추출은 우 (1984)의 방법에 준하여 실험을 행하였다. 즉, 건조 곰피 분말에 2N HCl를 가하고 30분동안 120°C에서 가열한 후 이들 반응용액에 chloroform을 가해 phenol 화합물을 추출하였으며, 물로서 수회 수세하여 진공회전농축기로 농축하여 이를 곰피의 phenol 화합물로 하였다.

Chlorophyll의 추출 및 그 유도체의 제조

Chlorophyll a의 제조는 우 (1984)의 방법을 사용하였다. 즉 곰피를 액체질소 중에서 동결마쇄하고, 여기에 석

유 ether과 benzene의 혼합용액 (9:1)을 메탄올과 3:1의 비율로 가하여 1시간 동안 방치하여 여과한 후, 소량의 증류수를 가해 메탄올층을 제거하였다. 이를 alumina, CaCO₃ 및 sucrose를 아래에서부터 순서대로 충전시킨 column에 주입하고 석유 ether 및 benzene (4:1) 혼합용액으로 전개시켜 chlorophyll이 흡착된 sucrose층만을 diethyl ether로 추출하였다. Chlorophyll은 다시 sucrose로 충전한 column에 주입하고 sucrose의 하층으로부터 chlorophyll a를 분리하였다. Chlorophyll의 유도체는 Isaksen (1991)의 방법으로 제조하였다. 즉, chlorophyll a (Sigma사, USA)를 diethyl ether에 녹이고, chlorophyll a를 녹인 diethyl ether와 9.5M HCl의 비율을 1:2로 혼합하여 실온에서 10분동안 교반하여 chlorophyll a로부터 pheophorbide를 제조하였다.

Carotenoid의 추출 및 분획

Carotenoid의 추출은 Shim et al. (1994) 및 우 (1984)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 즉, 곰피의 chloroform 획분을 acetone (3 ℓ/kg)으로 3회 추출하고, 35°C에서 감압 농축한 후, 이를 diethyl ether와 다량의 물로써 추출하여 carotenoid를 diethyl ether층에 이행시켰다. Diethyl ether 추출물은 질소기류 중에서 감압 증발시킨 다음, 10% KOH/ethanol을 첨가하여 하룻밤 동안 실온의 암실에서 방치, 검화하였다. 이 반응액을 물로 수세하고, diethyl ether로 추출한 후 Na₂SO₄로 수분을 제거하였다. Crude carotenoid 추출물은 질소 기류하에서 건조 후, petroleum ether와 동량의 90% 메탄올을 가해 crude xanthophyll은 메탄올층에, crude carotene은 petroleum ether에 각각 이행시켰다. 이 중 crude xanthophyll은 benzene으로 평형화시킨 silica gel column (2.5×40 cm)에 주입하고, benzene과 ethyl acetate의 농도를 10:0부터 0:10까지 변화시키면서 용출 분획한 compound A 및 B를 petroleum ether/acetone (8/2)로 TLC (silica gel 60 F254 precoated)를 행하였으며 동일한 조건하에서 TLC를 행한 표품 lutein (Sigma Co)과 비교하였다.

Crude xanthophyll에서 분리한 compound A, B 및 crude carotene를 petroleum ether에 녹여 흡광 스펙트럼을 측정하고, 동일조건하에서 측정한 표품 β -carotene 및 lutein의 흡광 스펙트럼과 비교하였다.

발암 promotion 억제시험

발암 promotion 억제작용은 EB virus 활성화 억제시험법 (Ito et al., 1981)을 이용한 것으로 이 방법은 EB virus가 phorbol ester와 같은 발암 promoter에 의해

활성화되어 조기 항원을 유도한다는 사실에 기인한 방법으로 발암 promoter의 단기 검출법으로도 이용되고 있으며 EB virus 활성화 억제작용과 발암 promoter 억제작용과는 서로 높은 상관성이 있는 것으로 알려져 있다. (Murakami et al., 1991, 1992b).

24 well plate에 소정농도의 시료 5 μ l, EB virus genome을 함유한 Raji세포 ($5 \times 10^5/\text{ml}$) 1 ml, n-butyric acid (3mM) 6 μ l 및 발암 promoter인 teleocidin B-4 (50 mM) 5 μ l를 가하고 5% CO₂ 하에서 48시간동안 배양한 이들 배양 세포를 1,500 rpm에서 5분동안 원심분리하여 세포를 집적시킨 후, slide glass에 도말하고 여기에 상후 두암 환자유래 항체를 반응시키고 37°C에서 40분 배양시킨 후, 다시 형광표식 인자로 IgG-FITC와 반응시키고, 37°C에서 40분 배양시켰다. 이때 생성된 조기항원 세포를 간접 형광현미경법을 이용하여 n-butyric acid만을 가한 대조구와 비교하여 발암 promotion 억제효과를 나타내었다.

결과 및 고찰

갈조류 용매 분획물의 발암 promotion 억제작용

곰피, 미역 및 다시마의 메탄올 추출물로부터 용매 분획한 각 획분의 발암 promotion 억제효과를 Table 1에 나타내었다. 곰피, 미역 및 다시마의 diethyl ether, chloroform 및 ethyl acetate 획분은 50.5~88.0%로 그 억제효과가 비교적 높게 나타났으나, 수용성 획분의 경우는 시료 모두에서 그 억제효과가 24%이하로 낮게 나타났다. 갈조류의 종류별로 유기용매 분획물의 발암 promotion 억제작용을 비교하여 보면, 미역 및 다시마는 diethyl ether 획분에서 각각 85.0% 및 84.9%로 우수하였고, 곰피는 chloroform 및 ethyl acetate 획분에서 각각 88.0% 및 85.9%로 우수한 억제효과를 나타내었다. 이와같이 해조류의 발암 promotion 억제작용은 어느 특정의 용매 획분에서 나타나지 않는 것으로 미루어 보아 단일 화합물이 아닌 여러 화합물이 복합적으로 작용하여 그 효과를 나타내는 것으로 생각된다. 따라서, 곰피 중에 함유되어 있는 용매 가용성의 phenol, chlorophyll 및 carotenoid 화합물의 영향을 살펴보았다.

Phenol 화합물의 영향

곰피 중에 존재하는 phenol 화합물의 발암 promotion 억제효과를 Table 2에 나타내었다. 곰피 중의 crude phenol은 20 μ g첨가시 42% 정도로 억제효과가 낮게 나타났으나, bromophenol 및 phloroglucinol은 20 μ g 첨가시

Table 1. Anti-tumor promoting activity¹ of solvent extract of seaweed

Seaweed	Extracts	EBV-EA ² inhibition (%)	Viability (%)
<i>E. stolonifera</i>	Diethyl ether	50.0	73.1
	Chloroform	88.0	63.1
	Ethyl acetate	85.9	74.6
	Water	13.8	80.7
<i>U. pinnatifida</i>	Diethyl ether	85.0	73.8
	Ethyl acetate	79.9	81.4
	Water	23.4	85.1
<i>L. japonica</i>	Diethyl ether	84.9	73.4
	Ethyl acetate	61.4	76.5
	Water	21.8	81.0

¹20 μ g of each solvent was added.

²EBV-EA ; Epstein-Barr virus early antigen.

Table 2. Anti-tumor promoting activity of phenols extracted from *E. stolonifera*¹

Phenols	Concentration (μ g)	EBV-EA ² inhibition (%)	Viability (%)
Crude phenols	10	17.7	57.1
	20	41.5	40.0
Bromophenol	10	56.4	77.1
	20	66.3	75.6
Phloroglucinol	10	50.1	75.3
	20	57.3	75.2

¹*E. stolonifera* was hydrolysed with 2N HCl at 120°C for 30 min and crude phenols were transferred to diethyl ether by adding water followed by repeated washings with distilled water until neutrality.

²EBV-EA ; Epstein-Barr virus early antigen.

이 보다 다소 높은 66.3%와 57.3%의 억제효과를 나타냈다. 전반적으로 곰피 중에 함유되어 있는 phenol 화합물의 발암 promotion 억제효과는 낮았으며, 세포 독성은 crude phenol에서 다소 높게 나타났다.

상당수의 발암 promotion 억제인자는 phenol 화합물에 의한 것으로 알려져 있으며, 발암 promotion 억제활성이 높은 phenol 물질은 hydroxyl 및 acyl기의 위치에 따라 그 억제효과에 차이가 있으나 이들의 관능기가 발암 promotion억제에 크게 관여함을 나타내고 있다 (Konoshima and Kozuka, 1989 ; Kondo et al. 1993 ; Ferriola, 1989). 또한 tannin관련 phenol화합물이 발암 promotion의 억제효과를 나타냄을 보고하고 있어 (Okuda, 1995), 갈조의 해조중에는 phloroglucinol 관련 화합물로서 phlorotannins 등이 존재함을 고려해 볼 때 (Glombitza and Knoss, 1992 ; Knoss and Glombitza, 1993), 본 결과에서와 같이 곰피의 phenol 화합

물에 의한 발암 promotion 억제작용에는 phloroglucinol 관련 화합물이 발암 promotion 억제작용에 관여하는 것으로 추측된다.

Chlorophyll 화합물의 영향

해조중에 함유된 비극성 색소화합물 중에는 porphyrin계 색소인 chlorophyll a가 녹조류, 갈조류 및 홍조류에 공통적으로 함유되어 있으므로, 곰피로부터 chlorophyll a를 추출하여 이들 유도체를 제조하여 발암 promotion 억제효과를 Table 3에 나타내었다.

Chlorophyll a는 5 μ M 첨가시 77.4%의 발암 promotion 억제효과를 나타내었고, 세포독성도 낮게 나타났다. 반면에 chlorophyll a의 유도체인 pheophorbide a 역시 5 μ M 첨가시 66.6%의 발암 promotion 억제효과를 나타내었으나, 세포독성이 강하였다.

Chlorophyll 및 그 분해산물에 의한 발암 억제작용은 주로 돌연변이원의 억제에 대해 알려져 왔으나 (Guo and Dashwood, 1994 ; Negishi et al., 1989), 본 연구의 결과에서와 같이 chlorophyll 및 그 분해산물인 pheophorbide 역시 발암 promotion 억제효과를 나타내어 산성조건 및 chlorophyllase의 작용에 의해 마그네슘 및 phytol기의 제거에 의해 생성되는 주요한 분해산물인 pheophorbide와 chlorophyll은 발암 initiation 뿐만 아니라 발암 promotion 억제에도 크게 기여할 것으로 생각된다.

Carotenoid 화합물의 영향

곰피중의 carotenoid 화합물의 발암 promotion 억제효과를 살펴보기 위해 곰피로부터 crude carotene 및 crude xanthophyll을 추출하여 발암 promotion 억제효과를 Table 4에 나타내었다. Crude carotene 및 crude xanthophyll을 20 μ g 첨가하였을 때, 각각 60.1% 및 81.4%의 발암 promotion 억제효과를 나타내어 crude xanthophyll이 crude carotene 보다 뛰어난 억제효과를 나타내었다.

Table 3. Anti-tumor promoting activity¹ of chlorophyll a and pheophorbide a

Pigments	EBV-EA ² inhibition (%)	Viability (%)
Chlorophyll a	77.4	75.9
Pheophorbide a	66.6	46.8

¹5 μ M of sample were added.

²EBV-EA ; Epstein-Barr virus early antigen.

발암 promotion 억제효과가 뛰어난 crude xanthophyll 중의 carotenoid 화합물을 알아보기 위하여 TLC를 행한 결과 (Fig. 1), 이들 획분 중에는 R_f값이 0.74, 0.65, 0.48 및 0.14인 4종류 화합물의 존재가 확인되었다. 이 중에서 R_f값이 0.74인 화합물 (compound A)은 흡광 스펙트럼 (Fig. 2) 및 TLC의 결과, authentic lutein과 동일한 422, 447 및 476 nm에서의 흡수파장 및 R_f 값을 나타내는 것으로 보아 lutein으로 확인되었다. 한편, R_f값이 0.65인 화합물 (compound B)은 Fig. 3에서와 같이 425.0, 446.5

Table 4. Anti-tumor promoting activity¹ of crude carotene and xanthophyll extracted from *E. stolonifera*

Pigments	EBV-EA ² inhibition (%)	Viability (%)
Crude carotene	60.1	73.3
Crude xanthophyll	81.4	76.3

¹20 μ g of sample were added.

²EBV-EA ; Epstein-Barr virus early antigen.

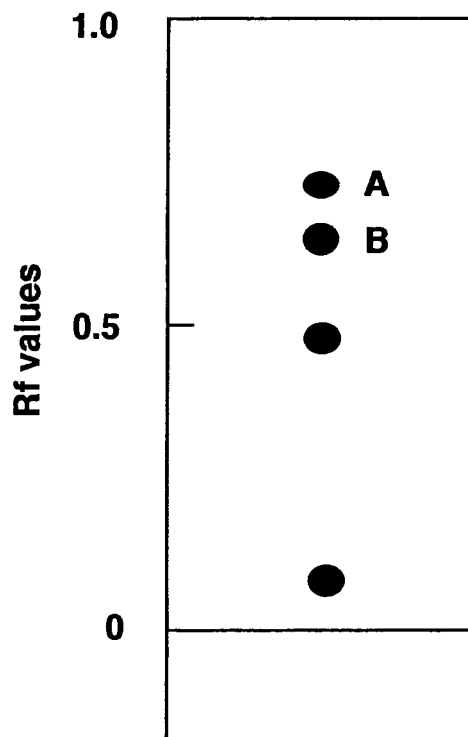


Fig. 1. Thin layer chromatogram of crude xanthophyll extracted from *E. stolonifera*. Developing solvent : petroleum ether/acetone (6/4, V/V)

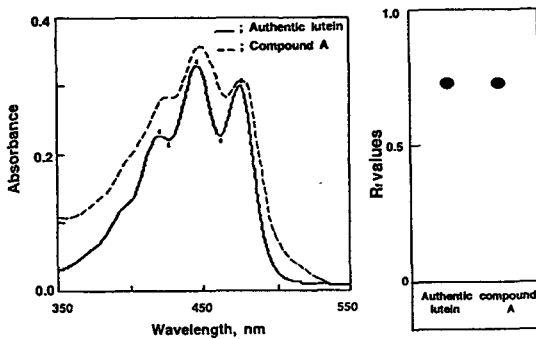


Fig. 2. Visible spectra and thin layer chromatogram of authentic lutein and compound A isolated from crude xanthophyll.

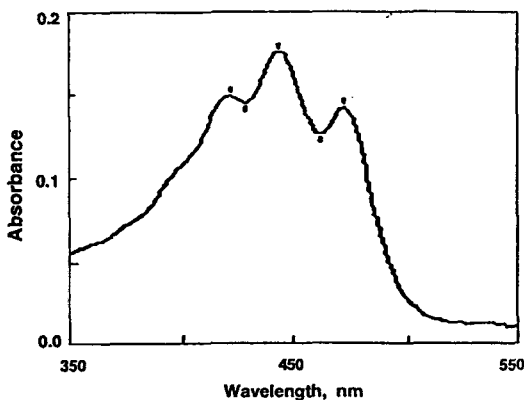


Fig. 3. Visible spectrum of compound B isolated from crude xanthophyll.

및 474.5 nm에서 흡수파장을 나타내어 Nakabayashi et al. (1979)이 보고한 α -cryptoxanthin과 동일한 화합물로 추정된다.

분리된 lutein과 α -cryptoxanthin의 발암 promotion 억제작용을 Table 5에 나타내었다. 실험의 결과, lutein과 α -cryptoxanthin의 발암 promotion 억제작용은 20 μ g 첨가에 의해 각각 76.9% 및 84.4%의 우수한 억제효과를 나타내었으며 세포 생존을 또한 높은 것으로 나타났다.

그리고, crude carotene 중의 억제인자는 Fig. 4에서와 같이 표준품 β -carotene과 동일한 447.5 및 477nm에서 흡수파장을 나타내어 β -carotene으로 추측된다.

Tsushima et al. (1995)은 carotenoid 화합물의 발암 promotion 억제효과를 검색하여 lactucaxanthin 등에 그 억제효과가 강하다고 하였으며, 이들 화합물은 β -carotene에는 없는 3-hydroxyl- ϵ -ene기가 발암 promotion 억제 작용에 크게 관여한다고 한다. 또한 Schwartz et al. (1986)은 α 및 β -carotene은 macrophage 및 T세포와 같은 면역세포를 활성화하여 종양세포를 사멸시키는 등

Table 5. Anti-tumor promoting activity¹ of lutein and α -cryptoxanthin isolated from crude xanthophyll of *E. stolonifera*

Pigments	EBV-EA ² inhibition (%)	Viability (%)
Lutein	76.9	72.9
α -Cryptoxanthin	84.4	73.4

¹20 μ g of sample were added.

²EBV-EA ; Epstein-Barr virus early antigen.

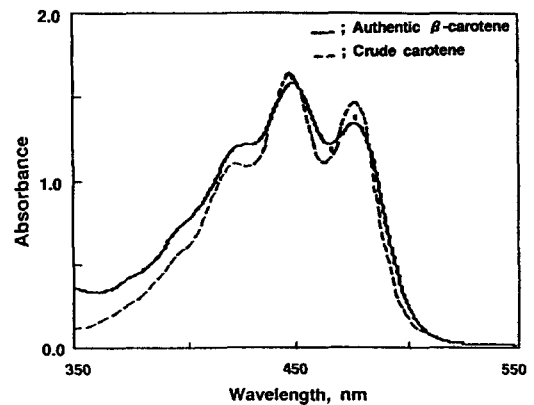


Fig. 4. Visible spectra of authentic β -carotene and crude carotene extracted from *E. stolonifera*.

체내의 면역활성을 증가시키므로서 간접적으로 발암을 억제하는 것으로 보고하고 있다. 따라서, 곰피중의 carotenoid 화합물에 의한 발암 promotion 억제작용은 lutein, α -cryptoxanthin 및 β -carotene 등의 carotenoid 화합물이 상승적으로 작용하여 억제작용을 나타내는 것으로 생각된다.

이상에서와 같이 곰피 추출물이 나타내는 발암 promotion 억제효과는 phenol 화합물, chlorophyll 유도체와 lutein, α -cryptoxanthin 및 β -carotene 등의 carotenoid 화합물에 기인한다고 생각된다.

요 약

갈조류중의 발암 promotion 억제인자를 밝히기 위하여 곰피, 미역 및 다시마의 용매추출물을 이용하여 발암 promotion 억제효과를 조사한 결과, 곰피, 미역 및 다시마의 수용성 추출물을 제외한 유기용매 분획물에서 우수한 억제효과를 나타내었다. 이 중에서 억제효과가 강한 곰피를 이용하여 발암 promotion 억제인자를 살펴본 결과, 곰피중의 bromophenol, phloroglucinol 등의 phenol 을 비롯하여 chlorophyll 및 carotenoid 화합물에서 억제 효과가 높게 나타났다. 곰피의 chloro-

phyll a 및 pheophorbide a에서 5 μ M 첨가시 77.4% 및 66.6%의 억제효과가 나타났으며, 곰피의 carotenoid 화합물 중에서는 lutein, α -cryptoxanthin 및 β -carotene이 주요 억제인자로 밝혀졌다. Lutein 및 α -cryptoxanthin의 발암 promotion 억제효과는 20 μ g 첨가에 의해 각각 76.9% 및 84.4%로 우수하였고, 세포 생존율도 높게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Berenblum, I. 1941. The mechanism of cocarcinogenesis ; A study of the significance of cocarcinogenic action and related phenomena. *Cancer Res.*, 1, 807~814
- Ferriola, P.C. 1989. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids, Kinetic mechanisms and structure-activity relationship. *Biochem. Pharm.*, 38, 1617~1623.
- Glombitza, K.W. and W. Knoss. 1992. Sulphated phlorotannins from the brown alga *Pleurophycus gardneri*. *Phytochemistry*, 31 (1), 279~281.
- Guo, D. and R. Dashwood. 1994. Inhibition of 2-methyl-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-DNA binding in rats given chlorophyllin ; Dose-response and time-course studies in the liver and colon. *Carcinogenesis*, 15 (4), 763~766.
- Isaksen, M. 1991. "Chromatographic science". Vol. 55, *Handbook of thin-layer chromatography* (Edited by J. Sherma and B. Fried). *Natural pigments*. pp. 625~662, Marcel Dekker, INC., New York.
- Ito, Y., S. Yanase, J. Fujita, T. Harayama, M. Takashima and H. Imanaka. 1981. A short-term in vitro assay for promoter substances using human lymphoblastoid cells latently infected with Epstein-Barr virus. *Cancer Letter*, 13, 29~37.
- Kondo, A., H. Ohigashi, A. Murakami, J. Suratwadee and K. Koshimizu. 1993. 1'-Acetoxy- chavicol acetate as a potent inhibitor of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation from *Languas galanga*, a traditional Thai condiment. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 (8), 1344~1345.
- Knoss, W. and K.W. Glombitza. 1993. A phenolsulphatase from the marine brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Phytochemistry*, 32 (5), 1119~1123.
- Konoshima, T. and M. Kozuka. 1989. Studies on inhibitors of skin tumor promotion ; Inhibitory effects of quinoxaline on Epstein-Barr virus activation. *J. Natural Products*, 52 (5), 987~995.
- Liu, J.U., S.J. Lin and J.K. Lin. 1993. Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells. *Carcinogenesis*, 14 (5), 857~861.
- Murakami, A., H. Ohigashi, M. Jisaka, M. Hirota, R. Irie and K. Koshimizu. 1991. : Inhibitory effect of new types of biflavonoid related polyphenols; Lophirone A and lophiraic acid, on some tumor promoter-induced biological responses in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 58, 101~106.
- Murakami, A., S. Tanaka, H. Ohigashi, M. Hirota, R. Irie, N. Takeda, A. Tatematsu and K. Koshimizu. 1992a. Possible anti-tumor promoters ; Bi- and tetraflavonoids from *Lophira alata*. *Phytochemistry*, 31 (8), 2689~2693.
- Murakami, A., H. Ohigashi, H. Nozaki, T. Tada, M. Kaji and K. Koshimizu. 1992b. Chalcone tetramers, lophirachalcone and alatachalcone from *Lophira alata* as possible anti-tumor promoters. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (5), 769~772.
- Nakabayashi, T., S. Kimura, and H. Kato. 1979. Discoloration of food and its chemistry. pp.116~221, Koujushouing LTD, Tokyo (in Japanese).
- Negishi, T., S. Arimoto, C. Nishizaki and H. Hayatsu. 1989. Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2). *Carcinogenesis*, 10, 145~149.
- Nishino, H. 1993. Anti-carcinogenic activity of carotenoids in foodstuffs. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 67 (1), 39~41.
- Nishizuka, Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature*, 334, 661~665.
- Okuda, T. 1995. Structure-activity relationship of antioxidant and antitumor polyphenols ; Food factors for cancer prevention. (Edited by Ohigashi, H., T. Osawa, J. Terao, S. Watanabe, T. Yoshikawa) pp. 280~285. Springer-Verlag, Tokyo.
- Park, Y.B., I.S. Kim, S.J. Yoo, J.H. Lee, D.C. Park, D.M. Yeum, T.G. Lee and S.B. Kim. 1996. Elucidation of anti-tumor initiator and promoter derived from seaweed-1 ; Anti-tumor promoting activity of seaweed extracts. *J. Korean Fish. Soc.*, 29 (6), 917~919.
- Shim, K.H., N.K. Sung, K.S. Kang, J.S. Choi and C.W. Jang. 1994. Isolation and physicochemical properties of carotenoid pigments from orange peels. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23 (1), 143~149.
- Schwartz, J., D. Suda and G. Light. 1986. Beta carotene is associated with their regression of hamster buccal pouch carcinoma and the induction of tumor necrosis factor in macrophages. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun., 136, 1130~1135.
- Tsushima, M., T. Maoka, M. Katsuyama, M. Kozuka, T. Matsuno, H. Tokuda, H. Nishino and A. Iwashima. 1995. Inhibitory effects natural carotenoids on the Epstein-Barr virus activation activity of a tumor promoter in Raji cells ; A screening study for anti-tumor promoters. Biol. Pharm. Bull., 18, 227~233.
- Wang, X.J., B.S. Warren, T. Rupp, L.M. Beltran and J.D. Giovanni. 1994. Loss of mouse epidermal protein kinase C isozyme activities following treatment with phorbol ester and non-phorbol ester tumor promoters. Carcinogenesis, 15 (12), 2795~2803.
- Yoshizawa, S. 1989. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of "Tannin" in green tea. Phytochem. Res., 1, 44~47.
- 우원식. 1984. 천연물화학연구법. pp. 16~20, 민음사, 서울.

1998년 3월 25일 접수

1998년 7월 11일 수리