

## DMBA로 유발한 햄스터 협낭암에 대한 클로로필린의 억제 효과

연세대학교 치과대학 구강생물학교실

이종민 · 정원윤 · 박광균

### The Inhibition of DMBA-Induced Carcinogenesis by CHL in Hamster Buccal Pouch

Jong-Min Lee, Won-Yoon Chung and Kwang-Kyun Park

Department of Oral Biology and Oral Cancer Research Institute,  
Yonsei University College of Dentistry

Chlorophyllin (CHL), a water-soluble derivative of chlorophyll, has been used for the treatment of several abnormal human conditions without apparent toxicity. Recent studies have revealed that CHL is antimutagenic and anticarcinogenic against various carcinogens *in vitro* and *in vivo*. In the present study, CHL exhibited dose-related inhibition of *His*<sup>+</sup> reversion in *Salmonella typhimurium* TA98 induced by 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA). Formation of DNA adducts from DMBA was also attenuated in the presence of CHL. Topical application of CHL prior to the topical application of DMBA resulted in significant reduction in both incidence and multiplicity of tumors in hamster buccal pouch. These results suggest that CHL may act as a potential chemopreventive agent against oral cancer.

**Key Words:** Chlorophyllin, DNA adduct, Antimutagenic activity, Anticarcinogenic activity

#### 서 론

사람들이 섭취하는 식품 속에는 여러 가지 발암물질이나 발암촉진제들이 함유되어 있으나,<sup>1-4)</sup> 화학적 발암물질에 의한 암발생을 억제하는 화합물 또한 많이 포함되어 있다.<sup>5,6)</sup> 따라서 과일이나 채소를 많이 함유하는 식사를 하는 경우 종양발생율이 감소되었으며,<sup>1,3)</sup> 식물에서 순수하게 분리된 화합물들이 실험동물에서 암발생을 억제하는 것으로 관찰되었다.<sup>5-8)</sup> 대부분의

암예방효과를 보이는 phytochemical들이 자연에 소량으로 존재하는 반면 클로로필(chlorophyll)은 시금치와 같은 녹색채소에 풍부하게 함유되어 있다.<sup>9)</sup> 클로로필이 자연에 풍부하게 존재함에도 불구하고 수용액에 녹지 않는 성질 때문에 많은 연구가 진행되지 못하고 주로 유전독성에 대한 연구들이 진행되었다. 클로로필은 시험관 내에서 benzo[*a*]pyrene을 비롯한 담배 농축물,<sup>9)</sup> heterocyclic amine인 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole,<sup>10)</sup> 방향성 nitro 화합물<sup>11-13)</sup> 등의

화학적 발암물질에 대하여 항돌연변이 활성을 보였다. 생체 조건에서는 *Drosophila*에 대한 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole의 돌연변이 활성을 억제하였으며,<sup>10,13)</sup> rainbow trout의 간에서 dibenzo[*a,f*]pyrene에 의한 DNA adduct 형성을 억제하였다.<sup>14)</sup> 그러나 척추동물을 사용하여 항유전독성 및 항암 활성에 대한 클로로필의 억제효과를 조사한 보고는 거의 없다.

클로로필의 phytol side chain을 제거한, 수용성 유도체인 클로로필린(Fig. 1)에 대하여는 보다 활발한 연구가 진행되었다. 클로로필린은 heterocyclic amines,<sup>15-17)</sup> aflatoxin B<sub>1</sub>,<sup>15,18)</sup> polycyclic aromatic hydrocarbons,<sup>19,20)</sup> aromatic nitro 화합물,<sup>11)</sup> alkylating agents,<sup>21,22)</sup> 무기 화합물,<sup>23,24)</sup> 식품이나 환경에 존재하는 복합물질,<sup>25,26)</sup> 항암제,<sup>27)</sup> ionizing radiation<sup>28,29)</sup> 등에 의한 돌연변이 활성을 억제하였으며, 생체 조건에서는 발암물질과 같이 투여하였을 때 발암물질이 DNA에 결합하는 것을 억제하였다.<sup>15,30)</sup> 또한 최근의 연구들은 클로로필린이 항돌연변이 활성 뿐만 아니라 암예방효과가 있음을 입증하고 있다. 클로로필린을 섭취하였을 때 rainbow trout에서 aflatoxin B<sub>1</sub>으로 유발한 간종양의 생성이 억제되었고,<sup>31)</sup> 랫트에서는 물과 함께 클로로필린을 공급하였을 때 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-*f*]quinoline(IQ)에 의한 DNA adduct 형성<sup>16)</sup> 및 암발생이 억제되었으며,<sup>32)</sup> 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine(PhIP)으

로 유발한 암발생도 클로로필린에 의해 억제되었다.<sup>33,34)</sup> 이러한 실험결과들을 바탕으로 중국에서 aflatoxin에 노출된 사람들을 대상으로 클로로필린의 암예방효과를 조사하고 있다. 본 실험실에서는 앞선 연구에서 마우스 피부암 모델을 사용하여 클로로필린의 암예방효과를 조사하여, 클로로필린이 benzo[*a*]pyrene과 benzo[*a*]pyrene의 대사산물인 benzo[*a*]pyrene 7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide,<sup>35-37)</sup> vinyl carbamate epoxide 및 2-(4-nitrophenoxy)oxirane<sup>38)</sup>에 의한 DNA adduct 형성 및 돌연변이를 억제하며 위장관 투여시 마우스 피부암을 억제하는 것을 보고하였다. 최근의 연구에서는 다단계 마우스 피부암 모델을 사용하여 각 암발생단계에 대한 클로로필린의 억제효과를 조사한 결과 클로로필린이 암개시단계 및 암촉진 단계를 각각 억제할 뿐만 아니라 암발생이 어느 정도 진행된 후에 클로로필린을 처리하였을 때 암의 진행을 억제한다는 사실을 확인하였다.<sup>39)</sup>

본 실험에서는 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA)로 유도한 돌연변이 및 DNA adduct 형성에 대한 클로로필린의 억제효과를 조사하였으며 DMBA로 유발한 햄스터 협낭암에 대한 클로로필린의 억제효과를 조사하였다.

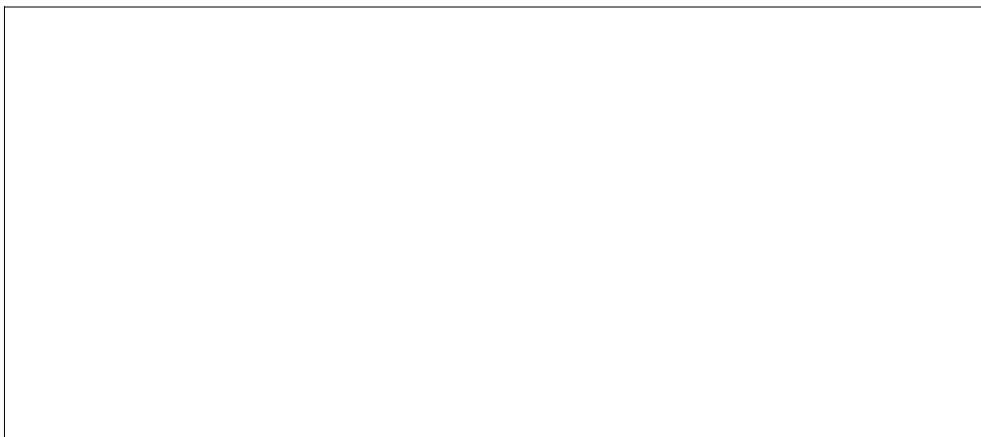


Fig. 1. Structures of chlorophyll and chlorophyllin, a water soluble derivative of chlorophyll.

## 재료 및 방법

### 1) 실험재료

DMBA, NADP, histidine, biotin, mineral oil, NADPH, calf thymus DNA는 미국의 Sigma Chemical Co.으로부터 구입하였고 클로로필린은 미국의 Aldrich Chemical Co.으로부터 구입하여 사용하였다 (Fig. 1). S9는 미국의 ICN Pharmaceuticals, Inc.로부터 구입하였으며, [<sup>3</sup>H]DMBA (specific activity 60.0 Ci/mmol)는 영국의 Amersham으로부터 구입하여 사용하였다.

### 2) 실험동물

실험동물은 Chinese hamster (4주령, 자성)을 사용하였으며, 2주간 실험 동물실에서 적응시킨 후 6주된 것을 실험에 사용하였다. 물과 사료는 자유로이 섭취하도록 하였고 사육실내의 온도는 22±2°C, 습도는 50~60%로 조절하고 조명은 12시간 명/암 주기가 되도록 하였다.

### 3) 돌연변이 유발 억제 효과

*Salmonella typhimurium* TA98 균주를 사용하여 DMBA로 유발한 돌연변이성에 대한 클로로필린의 억제효과를 Ames 등의 방법으로 조사하였다.<sup>40)</sup> Oxoid nutrient broth No. 2 배지(Unipath Ltd., Hampshire, England)에서 11시간동안 *Salmonella typhimurium* TA98 균주를 배양하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 DMBA (20 µmol/plate), 증류수에 녹인 클로로필린(0, 1, 3, 5 µmol), 10% S9 mix (500 µl), 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4), 증류수를 포함한 반응액 (600 µl)에 균주배양액 100 µl (1-2×10<sup>9</sup> cells/ml)를 가하였다. 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 45°C의 0.5 mM histidine과 biotin을 포함한 top agar를 2 ml씩 각 시험관에 가하고 vortexing 하여 minimal glucose agar plate에 도말하였다. 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 *His*<sup>+</sup> revertants의 수를 계산하였다.

### 4) DNA adduct 형성 억제 효과

#### (1) DNA adduct 형성에 대한 DMBA 및 NADPH의 영향

시험관 내에서 DMBA와 NADPH의 양을 변화시키면서 형성된 DMBA-DNA adduct를 정량하였다. Tris buffer (50 mM, pH 7.3), [<sup>3</sup>H]DMBA (0.6 Ci/mmol, 1~25 nmol) 또는 NADPH (25~250 µM), calf thymus DNA (1 mg), S9 (1 mg), MgCl<sub>2</sub> (3 mM)를 포함한 반응액의 총 부피를 1 ml로 하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1), chloroform을 사용하여 DNA를 추출하고 에탄올로 침전시켜서 DNA를 회수하였다. 회수된 DNA를 분광광도계를 이용하여 정량하고 DNA의 방사능을 측정하였다. DNA adduct는 mg DNA당 [<sup>3</sup>H] DMBA의 pmol로 표시하였다.

#### (2) DNA adduct 형성에 대한 클로로필린의 억제 효과

DMBA 5 nmol, NADPH 100 µM을 사용하여 위와 동일한 방법으로 클로로필린(12.5~100 µM)의 DNA adduct 형성 억제 효과를 조사하였다.

### 5) 햄스터 협낭암에 대한 클로로필린의 억제 효과

각 실험군은 30마리로 하고 1) 아무런 처치도 하지 않은 정상 대조군, 2) 발암물질을 녹이는 용매(mineral oil)만을 처리한 실험 대조군, 3) 클로로필린만을 처리한 군, 4) 발암물질인 DMBA를 도포한 종양유발군, 4) DMBA 처치 10분전에 클로로필린을 처리한 군으로 나누었다.

Mineral oil에 녹인 0.5% DMBA 용액을 면봉을 사용하여 일주일에 두 번씩 22주 동안 햄스터의 협낭에 도포하였다. 2주간격으로 종양발생률(tumor yield: 각 실험군의 총 햄스터 종 종양이 생긴 햄스터의 비율)과 종양생성률(tumor multiplicity: 각 실험군에서 햄스터당 생성된 종양 수의 평균값)을 조사하였다. 증류수에 녹인 0.1% 클로로필린은 면봉을 사용하여 DMBA를 바르기 10분전에 햄스터의 협낭에 도포하였다.

**Table 1.** Antimutagenic activity of CHL against DMBA in *Salmonella typhimurium* TA98<sup>a</sup>

CHL ( $\mu\text{mol}/\text{plate}$ )	<i>His</i> <sup>+</sup> revertants/plate <sup>b</sup>	% inhibition <sup>c</sup>
0	317 $\pm$ 32	
1	239 $\pm$ 27	26
3	154 $\pm$ 31	52
5	58 $\pm$ 11	82

<sup>a</sup>Assay was performed with 20  $\mu\text{mol}$  DMBA in the presence of S9.

<sup>b</sup>Data was given as mean $\pm$ SD from the results of triplicate plates at each dose.

<sup>c</sup>Inhibition (%) =

$$100 - \frac{\text{Induced revertants/plate with CHL}}{\text{Induced revertants/plate without CHL}} \times 100$$

## 결 과

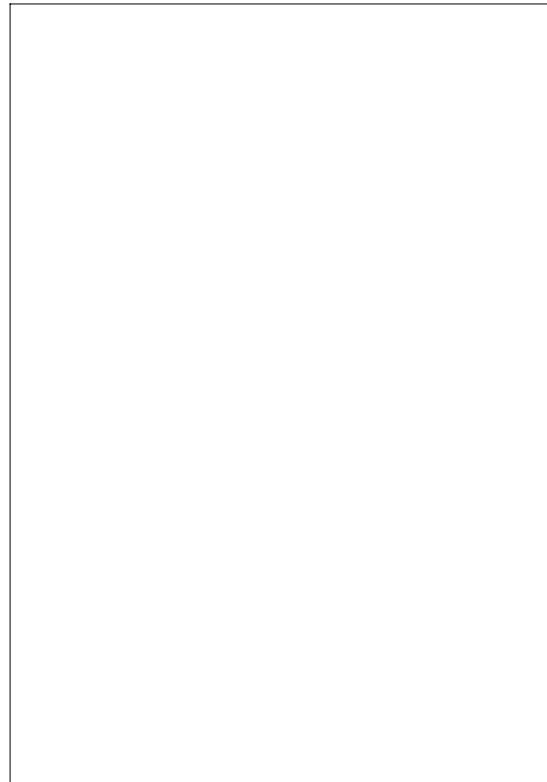
### 1) 클로로필린의 돌연변이 억제효과

*Salmonella typhimurium* TA98 균주로 클로로필린의 DMBA로 유발한 돌연변이성에 대한 억제효과를 조사하여 Table 1의 결과를 얻었다. 클로로필린은 DMBA에 의한 돌연변이를 용량의존적으로 억제하였으며, plate당 5  $\mu\text{mol}$ 의 클로로필린을 가하였을 때 돌연변이를 82%까지 억제하였다.

### 2) 클로로필린에 의한 DNA adduct 형성 억제

시험관 내에서 DNA adduct가 형성되는 최적의 반응 조건을 찾아내기 위하여, S9를 가하지 않은 DMBA (5 nmol), 다른 양의 DMBA (1, 5, 25 nmol)에 각각 S9를 가한 다음 형성된 DNA adduct 양을 조사하였다. Fig. 2에 나타난 것처럼 DMBA는 S9에 의해 활성화된 후 DNA와 adduct를 형성하며, S9 존재 하에서는 DMBA의 양을 증가시키기에 따라 DNA adduct도 많이 형성하였다. 또한 adduct 형성 반응의 cofactor로 사용되는 NADPH의 농도를 변화시키면서 형성된 DNA adduct 양을 조사한 결과 NADPH 농도를 50, 250  $\mu\text{M}$ 로 증가시켰을 때 DMBA-DNA adduct의 형성이 현저히 증가하는 것을 관찰하였다.

위의 실험결과를 토대로 5 nmol의 DMBA를 S9으로 활성화시키고 NADPH의 농도는 100  $\mu\text{M}$ 로 하여 클로로

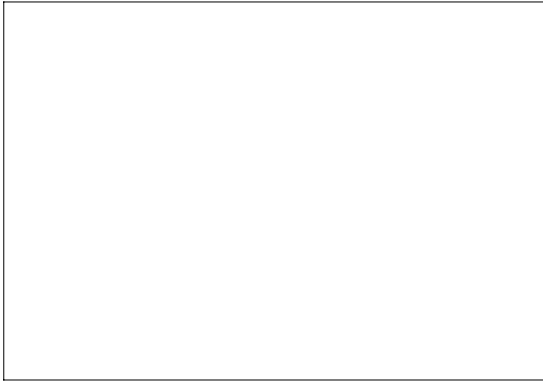


**Fig. 2.** The effect of DMBA (A) and NADPH (B) on the formation of [<sup>3</sup>H]DMBA-DNA adduct. (A) Calf thymus DNA was incubated with 1, 5, and 25 nmol [<sup>3</sup>H]DMBA in the presence of S9, respectively and 5 nmol [<sup>3</sup>H]DMBA in the absence of S9. (B) The formation of DNA adduct was observed when the concentration of NADPH was higher than 50  $\mu\text{M}$ .

필린의 DNA adduct 형성 억제효과를 조사한 결과, Fig. 3의 결과를 얻었다. 클로로필린을 가하지 않은 대조군에서는 3.6 pmol/mg의 DNA adduct가 형성되었으며, 클로로필린을 가하였을 때는 DNA adduct의 양이 클로로필린의 양을 증가시키기에 따라 용량의존적으로 감소하여 클로로필린의 농도를 100  $\mu\text{M}$ 로 하였을 때는 DNA adduct의 양이 0.9 pmol/mg DNA로 현저히 감소하였다.

### 3) 햄스터 협낭암 생성에 대한 클로로필린의 억제효과

발암물질인 0.5% DMBA를 일주일에 두 번씩 햄스터의 협낭에 도포하면서 종양의 생성을 조사한 결과(Fig. 4), 22주 후에 종양발생률은 86%, 종양생성률은



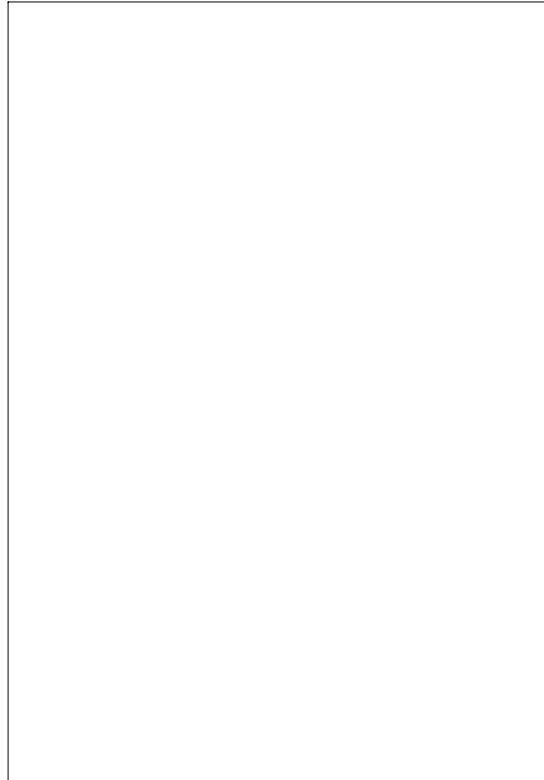
**Fig. 3.** Inhibition of [<sup>3</sup>H]DMBA-DNA adduct by CHL. [<sup>3</sup>H]DMBA was incubated with calf thymus DNA in the absence and presence of CHL. After incubation, DNA was extracted by phenolic extraction method. Radioactivity of [<sup>3</sup>H]DMBA-DNA adduct was counted.\*P < 0.05, \*\*P < 0.005.

3.7±0.6이었다. 0.1% 클로로필린을 협낭에 바르고 10분 후에 DMBA로 처리한 실험군에서는 종양발생률은 62.5%였으며 종양생성률은 1.4±0.3으로 종양발생률과 종양생성률이 감소하였다. 정상 대조군, mineral oil만을 처리한 대조군, 클로로필린만을 처리한 대조군에서는 종양이 관찰되지 않았다.

고 찰

암은 세계적으로 수백만명의 사망원인이 되는 질병으로서 나라마다 암 발생빈도에 현저한 차이를 보인다. 간암은 B형 또는 C형 간염 바이러스에 의한 감염이 많거나 aflatoxin에 노출될 기회가 많은 중국이나 아프리카에서 주로 발생하는 반면 영국에서는 드물게 발생한다. 일본에서는 위암이 비교적 흔하지만 서구에서는 많이 발생하지 않는다. 그러나 일본인이 미국으로 이민하였을 경우 이민 2세나 3세에서는 일본인의 발암양상을 따르지 않고 미국인의 발암양상을 따라 위암은 감소하고 결장암이나 유방암이 증가한다고 한다. 이러한 역학조사로부터 유전적인 요소보다 환경적인 요소가 암의 발생에 더 중요한 역할을 하는 것으로 생각하게 되었고 Doll등은 기존의 지식을 응용하여 모든 암의 50% 이상을 예방할 수 있다고 공언하였다.<sup>41,42)</sup>

의학 및 기타 생명과학 여러분야의 급속한 발전으로 발암과정의 기전을 분자 수준에서 이해하게 되는데 많은 진전이 있었으나 암을 정복할 수 있는 획기적인 치



**Fig. 4.** Effects of CHL on DMBA-induced carcinogenesis in hamster buccal pouch. Female Chinese hamsters (4 weeks old, 30 per group) were treated with 0.1% CHL prior to a single topical application of 0.5% DMBA twice weekly for 22 weeks. \*P < 0.05.

료법이 아직까지 개발되지 못하고 있을 뿐 아니라 전체적으로 암의 발병률이나 치사율은 오히려 증가하고 있다. 이에 따라 암정복을 위한 새로운 대안으로서 암 예방에 관심을 갖게 되었으며, 화학물질을 사용하여 암 발생을 억제하거나 지연시키는 암의 화학적 암예방 (cancer chemoprevention)<sup>43 ~ 45)</sup>에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 최근에는 발암 및 돌연변이 과정을 억제할 수 있는 물질로서 식품에 함유되어 있는 phytochemicals에 대한 관심이 높아지고 있다.<sup>46 ~ 48)</sup> Lai등은 초기 연구에서, 녹색 채소의 추출물이 benzo[a]pyrene 및 3-methylcholanthrene으로 유발한 *Salmonella typhimurium* TA100의 돌연변이를 억제하였으며 돌연변이 억제효과가 클로로필 함량과 밀접한 관련이 있다고 보고하였다.<sup>49)</sup> 또한 클로로필의 수용성 유도체인 클로로필린도 클로로필처럼 돌연변이

억제 효과를 나타낸다고 보고하였다.<sup>50)</sup> 그후 시험관내 및 생체 조건에서 여러 종류의 발암물질에 대한 클로로필린의 유전독성 억제와 발암 억제 효과가 관찰되었다.<sup>15-38)</sup>

본 실험에서는 *Salmonella typhimurium* TA98에 DMBA로 유발한 돌연변이에 대한 클로로필린의 억제 효과를 조사하여 클로로필린의 양을 증가시키기에 따라 돌연변이가 현저히 억제되는 것을 관찰하였다.

여러 돌연변이원에 대하여 클로로필린이 억제 효과를 나타내는 메카니즘으로 1) 원 돌연변이원이나 활성화된 중간체와 클로로필린이 단단하게 복합체를 형성하거나,<sup>10,31,33,50)</sup> 2) 라디칼 및 활성 산소종의 소거,<sup>51)</sup> 3) 돌연변이원의 대사 활성화 억제<sup>52,53)</sup> 등이 제안되고 있다. 또한 클로로필린은 암발생과정의 초기에 나타나는 발암물질로 인한 DNA 손상을 억제하였다.<sup>54,55)</sup> 화학물질과 DNA간 상호작용으로 생성된 산물, 즉 DNA adduct는 돌연변이의 전암병소이다. DNA가 합성되는 동안 DNA adduct가 생성된 부위나 여기에 가까운 부위에서 골격구조 이동, 삭제 혹은 염기치환과 같은 돌연변이가 일어날 수 있다.<sup>56)</sup> 유전독성 물질에 노출되어 DNA sequence에 변화가 생기면 유전자의 발현, 비정상적인 단백질의 발현 및 세포주기 조절에 변화가 생겨 세포 내에 커다란 변화가 생길 수 있다. 최근의 연구결과에서 유전자에 돌연변이가 일어나면 genetic instability가 초래된다고 하였다. 예를 들어 DNA-repair enzyme을 발현하는 유전자에서 돌연변이가 일어나 repair가 제대로 되지 못하면 새로운 돌연변이가 연쇄적으로 일어나 더 큰 cell dysregulation과 dysfunction을 초래하게 된다고 하였다.<sup>57)</sup> 따라서 발암물질과 DNA간에 adduct가 형성되는 것을 차단하여 DNA 손상을 억제하면 암발생을 예방할 수 있다.

발암물질로 사용한 DMBA는 tumor initiator 및 promotor로 작용하는 complete carcinogen으로서 암개시단계에서 중요한 역할을 하는 DNA adduct를 형성하는 것으로 알려져 있는데<sup>58)</sup> 본 실험에서도 S9로 활성화된 후 DNA와 adduct를 형성하였고, 형성된 adduct의 양은 DMBA의 양에 용량의존적으로 증가하였다. 이러한 DNA adduct 형성은 클로로필린에 의해 현저히 감소되는 것을 관찰하였다. 포르피린 고리를 가진 클로로필린이 DMBA와 complex를 형성하거나, DMBA를 활성화시키는 효소의 활성부위에 DMBA가 결합하지 못하도록 competitive inhibition하여 DMBA가

활성화되는 것을 방해함으로써 DNA adduct 형성을 억제하는 것으로 생각된다.

최근까지 클로로필린의 암예방 효과가 다양한 장기에서 실험, 보고되었으나<sup>30-39)</sup> 아직까지 구강암 영역에서는 조사된 바가 없다. 본 실험에서는 구강암을 비롯한 epithelial carcinogenesis를 연구하는데 있어서 유용한 햄스터 협낭암 모델<sup>59,60)</sup>을 사용하여 클로로필린의 구강암 억제 효과를 조사하였다. 햄스터의 협낭암 DMBA를 도포하기 전에 클로로필린으로 미리 처리한 군에서 종양발생률과 종양생성률이 억제되었다.

이들 실험결과로부터 클로로필린이 DMBA로 유발한 돌연변이성 및 DNA adduct 형성을 억제하며 구강암에 대해서도 암예방효과를 나타내는 것을 알 수 있다. 계속하여 본 실험결과를 바탕으로 클로로필린이 DMBA로 유발한 햄스터 협낭암에 대하여 암예방효과를 나타내는 메카니즘을 밝히는 연구를 수행하고 있다. 또한 구강암이 다단계 발암과정을 거치는 것으로 알려져 있는 만큼 DMBA-TPA로 햄스터 협낭암에 다단계 발암을 유발하여 클로로필린의 구강암 각 발암단계에 대한 암예방효과를 조사하고자 한다.

## 결 론

클로로필린은 *Salmonella typhimurium* TA98에 DMBA로 유발한 돌연변이 및 활성화된 DMBA와 DNA간의 adduct 형성을 용량의존적으로 억제하였다. 또한 햄스터 협낭암 모델을 사용하여 클로로필린의 구강암 억제 효과를 조사한 결과 클로로필린에 의해 종양발생률과 종양생성률이 억제되었다. 따라서 클로로필린은 tumor initiation에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 DNA adduct 형성을 차단함으로써 돌연변이를 억제하여 햄스터 협낭암의 발생을 억제할 것으로 생각된다. 지금까지의 연구결과들을 토대로 생각해 볼 때 클로로필린이 협낭암의 tumor promotion도 억제할 것으로 생각된다. 따라서 다단계 발암 모델을 사용하여 클로로필린의 협낭암 발생과정 중 tumor promotion도 억제하는지에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 연세대학교 치과대학 연구비와 한국과학

재단(KOSEF, Daejeon, Korea)의 박사후 연수지원금으로 수행하였기에 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- 1) Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1191-1308.
- 2) Farber E. Chemical carcinogenesis, a biological perspective. *Am J Pathol* 1982; 106: 271-296.
- 3) Hirayama T. Mortality in Japanese with life-style similar to Seventh-Day-Adventists' strategy for risk reduction by life-style. *Natl Cancer Inst Monogr* 1985; 69: 143-153.
- 4) Doll R. An overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer. *Proc Nutr Soc* 1990; 49: 119-131.
- 5) Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer by naturally occurring and synthetic compounds. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1990; 32: 461-463.
- 6) Hayatsu H, Arimoto S, Negishi T. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 1987; 202: 429-446.
- 7) Newmark HL. Plant phenolics as inhibitors of mutational and precarcinogenic events. *Can J Physiol Pharmacol* 1987; 65: 461-466.
- 8) Dragsted LO, Strube M, Larsen JC. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol Toxicol* 1993; 72 (Suppl. 1): 116-135.
- 9) Terwel L, van der Hoeven JC. Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo[*a*]pyrene in the Salmonella/microsome assay. *Mutat Res* 1985; 152: 1-4.
- 10) Negishi T, Arimoto S, Nishizaki C, Hayatsu H. Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole(Trp-P-2). *Carcinogenesis* 1989; 10: 145-149.
- 11) Tang X, Edenharder R. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by vitamins, porphyrins and related compounds, and vegetable and fruit juices and solvent extracts. *Food Chem Toxicol* 1997; 35: 373-378.
- 12) Gentile JM, Gentile GJ. The metabolic activation of 4-nitro-*O*-phenylenediamine by chlorophyll-containing plant extracts: the relationship between mutagenicity and antimutagenicity. *Mutat Res* 1991; 250: 79-86.
- 13) Negishi T, Rai H, Hayatsu H. Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutat Res* 1997; 376: 97-100.
- 14) Harttig U, Bailey GS. Chemoprevention by natural chlorophylls *in vivo*: inhibition of dibenzo[*a*]pyrene-DNA adducts in rainbow trout liver. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1323-1326.
- 15) Dashwood RH, Breinholt V, Bailey GS. Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)-DNA binding *in vivo* and antimutagenic activity against AFB<sub>1</sub> and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Carcinogenesis* 1991; 12: 939-942.
- 16) Dashwood R, Guo D. Inhibition of 2-amino-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* 1994; 15: 763-766.
- 17) Arimoto S, Hayatsu H. Role of hemin in the inhibition of mutagenic activity of 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole(Trp-P-2) and other aminoazaarenes. *Mutat Res* 1989; 213: 217-226.
- 18) Whong WZ, Stewart J, Brockman HE, Ong TM. Comparative antimutagenicity of chlorophyllin and five other agents against aflatoxin B<sub>1</sub>-induced reversion in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 1988; 8: 215-224.
- 19) Romert L, Curvall M, Jenssen D. Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity. *Mutat Res* 1992; 7: 349-355.
- 20) Katoh Y, Nemoto N, Tanaka M, Takayama S. Inhibition of benzo[*a*]pyrene-induced mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds. *Mutat Res* 1983; 121: 153-157.
- 21) Kimm SW, Park SC, Kang SJ. Antimutagenic activity of chlorophyll to direct- and indirect-acting mutagens and its contents in the vegetables. *Korean J Biochem* 1982; 14: 1-8.
- 22) Warner JT, Nath J, Ong TM. Antimutagenicity studies of chlorophyllin using the *Salmonella* arabinose-resistant assay system. *Mutat Res* 1991; 262: 25-30.
- 23) Sarkar D, Sharma A, Talukder G. Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlorophyllin in mouse bone marrow *in vivo*. *Mutat Res* 1993; 301: 33-38.
- 24) Olvera O, Zimmering S, Arceo C, Cruces M. The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium (VI) oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat Res* 1993; 301: 201-204.
- 25) Ong TM, Whong WZ, Stewart J, Brockman HE. Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutat Res* 1986; 173: 111-115.
- 26) Camoiano A, Balansky RM, Bennicelli C, Izzotti A, D'Agotini FD, S. De Flora, Experimental databases

- on inhibition of the bacterial mutagenicity of 4-nitroquinoline 1-oxide and cigarette smoke. *Mutat Res* 1994; 317: 89-109.
- 27) Gentile JM, Rahimi S, Zwiesler J, Gentile GJ, Ferguson LR. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. *Mutat Res* 1998; 402: 289-298.
  - 28) Abraham SK, Sharma L, Kesavan PC. Role of chlorophyllin as an *in vivo* anticlastogen: protection against gamma-radiation and chemical clastogens. *Mutat Res* 1994; 322: 209-212.
  - 29) Kumar SS, Chaubey RC, Devasagayam TP, Priyadarsini KI, Chauhan PS. Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action. *Mutat Res* 1999; 10: 71-79.
  - 30) Dashwood RH. Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ) to rat liver DNA. *Carcinogenesis* 1992; 13: 113-118.
  - 31) Breinholt V, Hendricks J, Pereira C, Arbogast D, Bailey GS. Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B<sub>1</sub> hepatocarcinogenesis in rainbow trout. *Cancer Res* 1995; 55: 57-62.
  - 32) Guo D, Horio DT, Grove JS, Dashwood RH. Inhibition by chlorophyllin of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced tumorigenesis in the male F344 rat. *Cancer Lett* 1995; 95: 161-165.
  - 33) Hasegawa R, Hirose M, Kato T, Hagiwara A, Boonyaphiphat P, Nagao M, Ito N, Shirai T. Inhibitory effect of chlorophyllin on PhIP-induced mammary carcinogenesis in female F344 rats. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2243-2246.
  - 34) Ito N, Hasegawa R, Imaida K, Tamano S, Hagiwara A, Hirose M, Shirai T. Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP) in the rat. *Mutat Res* 1997; 376: 107-114.
  - 35) Park KK, Surh YJ. Chemoprotective activity of chlorophyllin against mouse skin carcinogenesis by benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. *Cancer Lett* 1996; 102: 143-149.
  - 36) Park KK, Surh YJ, Stewart BC, Miller JA. Chemoprotective activities of chlorophyllin: inhibitions of mutagenicity and covalent binding of various ultimate carcinogens. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1994; 35: 139.
  - 37) Surh YJ. Inhibitory effects of chlorophyllin against mutagenicity and DNA binding of benzo[a]pyrene bay-region diol epoxide. *Toxicologist* 1993; 13: 814.
  - 38) Park KK, Surh YJ, Miller JA. Chemoprotective properties of chlorophyllin against vinyl carbamate, *p*-nitrophenyl vinyl ether and their electrophilic epoxides. *Cancer Lett* 1995; 94: 33-40.
  - 39) Chung WY, Lee JM, Park MY, Yook JI, Kim J, Chung AS, Surh YJ, Park KK. Inhibitory effects of chlorophyllin on 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced bacterial mutagenesis and mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett* 1999; 145: 57-64.
  - 40) Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella typhimurium*/mammalian-microsomal mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31: 347-363.
  - 41) Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *BMJ* 1994; 309: 901-911.
  - 42) Wattenberg LW. Prevention-therapy-basic science and the resolution of the cancer problem: presidential address. *Cancer Res* 1993; 53: 5890-5896.
  - 43) Wattenberg LW. Inhibition of chemical carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1978; 60: 11-18.
  - 44) Sporn MB. Carcinogenesis and cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 6215-6218.
  - 45) Greenwald P, Nixon DW, Malone WF, Kelloff GJ, Stern HR, Witkin MS, Witkin KM. Concepts in cancer chemoprevention research. *Cancer Res* 1990; 65: 1483-1490.
  - 46) Stavric B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food Chem Toxicol* 1994; 32: 79-90.
  - 47) Kitts DD. Bioactive substances in foods: identification and potential uses. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72: 423-434.
  - 48) Stavric B. Role of chemopreventers in human diets. *Clin Biochem* 1994; 27: 319-332.
  - 49) Lai CN, Butler MA, Matney TS. Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll contents. *Mutat Res* 1980; 77: 245-250.
  - 50) Tachino N, Guo D, Dashwood WM, Yamane S, Larsen R, Dashwood R. Mechanisms of the *in vitro* antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[*a*]pyrene; studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. *Mutat Res* 1994; 308: 191-203.
  - 51) Sato M, Imai K, Kimura R, Murata T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation, VI. Effect of its administration on mitochondria and microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Chem Pharm Bull* 1984; 32: 715-722.
  - 52) Singh A, Singh SP, Bamezai R. Modulatory influence of chlorophyllin on the mouse skin papillomagenesis and xenobiotic detoxication system. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1459-1463.
  - 53) Imai K, Aimoto T, Sato M, Watanabe K, Kimuta R, Mutata T. Effects of sodium metallochlorophyllins on the activity and components of the microsomal drug-



- metabolizing enzymes system in rat liver. *Chem Pharm Bull* 1986; 34: 4287-4293.
- 54) Guo D, Schut HA, Davis CD, Snyderwine EG, Bailey GS, Dashwood RH. Protection by chlorophyllin and indole-3-carbinol against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4.5-*b*]pyridine(PhIP)-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2931-2937.
  - 55) Smith WA, Arif JM, Gupta RC. Effect of cancer chemopreventive agents on microsome-mediated DNA adduction of the breast carcinogen dibenzo[*a,l*]pyrene. *Mutat Res* 1998; 412: 307-314.
  - 56) Garner RC. The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis. *Mutat Res* 1998; 402: 67-75.
  - 57) Bohr VA. DNA repair fine structure and its relation to genomic instability. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2885-2892.
  - 58) Dipple A, Pigott M, Moschel RC, Costantino N. Evidence: That binding of dimethylbenz[*a*]anthracene to DNA embryo cell culture results in extensive substitution of both adenine and guanine residues. *Cancer Res* 1983; 43: 4132-4135.
  - 59) Schwartz J, Shklar G. Regression of experimental oral carcinomas by local injection of  $\beta$ -carotene and canthaxathin. *Nutr Cancer* 1988; 11: 35-40.
  - 60) Shin DM, Gimenez IB, Lee JS, Nishioka K, Wargovich MJ, Thacher S, Lotan R, Slaga TJ, Hong WK. Expression of epidermal growth factor receptor, polyamine levels, ornithine decarboxylase activity, micro-nuclei, and transglutaminase I in a 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Cancer Res* 1990; 50: 2505-2510.