한국농화학회지 제 40권 제 4호(1997)
Agricultural Chemistry and Biotechnology
Vol. 40, No. 4, pp. 307~312(1997)

유색미 쌀겨추출물의 *in vitro*의 발암 억제효과

남석현* · 강미영[1]

아주대학교 자연과학대학 기초과학부, [1]경북대학교 사범대학 가정교육과

초록 : 유색미의 항암활성을 *in vivo*에서 조사하기 위한 기초실험으로서, 유색미 겨의 유기용매 추출물에 의한 DNA strand scission 및 발암 promotion의 억제효과를 조사하였다. 실험에는 유색미로 상해향혈나와 수원415호의 두 품종과 함께 대조구로 추청을 사용하였다. 품종별 변이원 억제활성은 70% 에탄올추출물 및 모든 유기용매 분획물에서 추청<상해향혈나< 수원415호의 순서로 증가하였다. 그러나 DNA strand scission에 대한 억제활성은 70% 에탄올 추출물에서 상해향혈나<추청<수원415호의 순서로 증가하였다. 클로로포름 분획물에 대하여 조사한 결과, 상해향혈나에는 거의 DNA strand scission을 억제하는 활성이 없었으며, 예상과는 달리 추청은 오히려 상해향혈나보다 약간 활성이 높았다. 그리고 수원415호의 클로로포름분획물은 70%에탄올 추출물의 경우와 비슷한 수준의 강한 억제활성을 보였다(약 50% 억제). 발암 promotor에 의하여 유도된 Epstein-Barr 바이러스의 early diffusible antigen의 발현수준을 지표로 하여 70% 에탄올 추출물의 발암 promotion의 억제효과를 측정한 결과, 추청<상해향혈나< 수원415호의 순서로 억제활성이 높아짐을 알 수 있었다. 세 품종 모두의 클로로포름분획물에서 발암 promotion을 완전히 차단하는 효과가 발견되었지만, 세포독성이 동반되지 않은 promotion에 대한 억제효과는 수원415호에서만 유일하게 관찰되었다.(1997년 1월 30일 접수, 1997년 5월 19일 수리)

서 론

화학인자에 의한 정상세포의 암발생기작에 대해서는 initiation과 promotion의 상이한 2단계 과정으로 설명되는 발암 2단계설이 현재까지 가장 유력한 모델로서 알려져 있다.[1)] Initiation이 발암물질을 포함한 돌연변이 유발물질인 initiator에 의하여 정상세포의 DNA가 손상을 받아 잠재적 형질전환세포로 변화하는 과정을 가리키는 반면, promotion이란 유전자의 손상이 성립된 잠재적 형질전환세포로부터 종양화과정을 유도하여 암으로 발전시키는 단계로서, 이것을 촉진하는 인자를 특히 발암 promotor라고 한다.[2)] 따라서 암의 예방과 치료를 위해서는 initiation과 promotion의 두 과정이나 적어도 어느 한 과정을 차단할 수 있는 물질의 개발과 함께, 일상적으로는 세포가 유전독성에 노출되는것을 되도록 피하고 동시에 유전독성을 직,간접적으로 무력화시키는 물질을 자연스럽게 섭취함으로써 단계별 발암경로를 피할 수 있는 식습관을 생활화하는것이 중요하다고 하겠다. 식품성분 가운데 initiation단계를 억제하는 물질로서 식이섬유, peroxidase, polyphenol중합물 등의 고분자 물질과 더불어 vitamin A, C, E 및 각종 phenol성 화합물등이 알려져 있고, promotion단계의 억제에는 각종 녹황색 야채에 함유된 물질들이 유효한 것으로 알려져 있으며 이에 대한 연구가 수행되고 있다.[3-10)] 그러나 우리나라에서 주식으로 소비하는 쌀의 항암효과 및 그 작용기작에 대한 연구는 거의 수행되어 있지 않다. 우리는 품종별 쌀의 유기용매 추출분획에 대한 변이원 억제활성 및 작용기작에 대한 연구를 통하여 유색미의 높은 변이원 억제활성은 세포밖에서 변이원을 blocking하는 desmutagen으로서 작용한 결과일 가능성을 이미 보고한 바 있다.[11)] 그러나 변이원을 흡착하는 작용이외에도 세포내에서 DNA의 손상을 억제할 가능성을 배제할 수 없을 뿐 아니라, 다단계의 경로를 통하여 일어나는 암발생과정의 특성상, 항변이효과가 반드시 항암효과로 연결되지 않기 때문에 유색미의 항변이활성이 궁극적으로 항암활성과 연결될 수 있는지의 여부를 밝혀야 한다. 실험동물을 사용한 *in vivo*의 검정계에서 항암활성을 측정하는것이 이상적이지만 실험에 장시간을 요하기 때문에 항암효과의 보유여부를 *in vitro*에서 신속 간편하게 측정할 필요가 있다. 따라서 본 실험에서는 2종의 유색미을 대상으로 유색미의 항암효과를 알아보기 위하여 발암 initiation과 발암 promotion의 각 단계에 대한 억제활성을 *in vitro*에서 조사하였다.

재료 및 방법

공시재료 및 시약

실험에 사용한 미곡의 품종은 일반미로서 추청벼, 그리고 유색미로서는 상해향혈나와 수원415호로서 모두 농촌진흥청 작물시험장에서 분양받았다. 각 품종의 쌀겨에 대한 유기용매 추출분획의 제조방법은 이미 前報에 소개한 개요에 의거, 70% 에탄올 추출물을 회수한 다음, 유기용매가 보유한 유전률의 기울기에 따라 클로로포름, 에틸아세테이트, 50% 에탄올의 순서로 분획물을 제조하였다.[11)] Mitomycin

찾는말 : colored rice, DNA strand scission, Epstein-Barr virus, antipromotion
*연락저자

C, sodium borohydrate, $CuCl_2$, 및 TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)는 Sigma의 제품을 사용하였고 ΦX174RF DNA는 Gibco-BRL로부터 구입하였다. Epstein-Barr virus(EBV) early antigen에 대한 monoclonal antibody는 Novocastra Laboratories의 제품을 사용하였으며 western blot용의 ECL kit는 Amersham에서 구입하여 사용하였다.

변이원 억제활성 및 항산화활성의 측정

화학적 변이원 mitomycin C에 대한 쌀겨 추출물의 변이원성 억제효과 및 linoleic acid 모델계를 이용한 항산화력의 측정은 前報에서 이미 확립한 방법에 따라 측정하였다.[11,12] 각 시료가 보이는 항산화활성은 시료를 첨가하지 않은 반응액의 지질과산화물을 500 nm의 흡광도에서 측정하여 흡광도가 0.3에 도달하는 일수를 대조구로 상대적으로 평가하여 결정하였다.[13]

DNA strand scisson에 대한 억제효과의 측정

쌀겨 추출물에 의한 DNA strand scisson의 억제효과는 mitomycin C에 의하여 double strand supercoil DNA의 한쪽 strand에 nicking의 발생이 시료의 첨가로 인하여 억제되는 정도를 측정하는 Ueda 등의 방법[14]에 따라 수행하였다. 즉 0.2 μg의 ΦX174 RF DNA를 100 mM의 mitomycin C와 0.5 mM의 sodium borohydrate 및 0.1 mM의 $CuCl_2$의 조건하에서 10 mg/ml의 시료를 첨가한 다음, 37℃ 1시간동안 반응 후, 반응정지액(50% glycerol, 0.1M EDTA, 0.1% bromophenol blue)을 첨가하여 1XTAE buffer로 완충시킨 1% agarose gel에서 전기영동을 수행하였다. 쌀겨 추출물의 성분이 전기영동을 방해할 경우는 반응액중의 DNA를 Qiagen사의 DNA extraction kit로 정제한 다음, 전기영동에 사용하였다. 전기영동이 끝난 gel을 ethidium bromide로 염색한 다음, UV transilluminator로 super coiled DNA(RFI)와 nicking이 발생한 open circled DNA(RFII)을 확인하고 각 DNA band의 intensity를 Image analyzer(Bio Image 50S Series, B.I. system Corp., USA)로 측정하여 RFI에서 RFII로 전환한 비율을 계산하였다.

발암 promoter 활성에 대한 억제효과의 측정

EB바이러스에 의하여 transformation된 marmot B lymphoblast cell line인 B95-8 cell을 10%의 우태아혈청(GIBCO-BRL)이 포함된 RPMI1640배지(GIBCO-BRL)에서 37℃, 5%의 CO_2의 조건에서 배양하였다. 시료에 의한 발암 promoter의 활성 억제효과는 Ito 등이 개발한 방법[15]을 약간 변형하여 수행하였다. 간단히 설명하면, 2×10^6의 세포를 60 ng의 TPA와 400 μg의 쌀겨 추출분획과 함께 36시간 배양한 다음, RIPA buffer(50 mM Tris Cl pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Sodium deoxychorate, 0.1% SDS, 1% Trasylol, 1 mM DTT, 2 mM PMSF)에 세포를 용해시켜서 세포의 총단백질분획을 제조하였다. Bradford법[16]으로 정량한 세포단백질중 10 μg을 SDS-PAGE로 분획한 후, TPA에 의하여 유도된 EBV early diffusible antigen의 발현이 억제되는 정도를 western blot으로 측정하였다.[17] Western blot의 면역반응에 있어서 EBV early diffuse antigen에 대한 단클론항체를 일차항체로, 그리고 peroxidase가 결합된 항마우스IgG 항체를 이차항체로 사용하였으며 모든 반응은 Amersham사가 제시한 ECL western blot 설명서에 의거하여 수행하였다. 항원의 발현정도는 X-ray film에 감광된 antigen band를 Image analyzer(Bio Image 50S Series, B.I. System Corp., USA)로 scanning하여 intensity를 측정하였다.

결과 및 고찰

유색미 쌀겨 추출물의 변이원 억제활성

SOS chromotest를 이용한 항변이 활성단위 측정법을 사용하여 유색미 쌀겨의 유기용매 추출분획별 변이원 억제활성을 측정하였다. 공시시료로서는 유색미인 상해향혈나와 수원415호, 그리고 대조구로 일반미인 추청의 세품종을 선택하였다. 실험 결과, 70% 에탄올을 이용한 전체 추출물 에서 유색미의 변이원 억제활성이 일반미인 추청보다 높았으며, 70% 에탄올 추출물을 다시 유전률이 높은 순서로 유기용매를 이용, 재차 추출한 분획물에서도 마찬가지로 유색미의 변이원 억제활성이 일반미보다 높았다(Table 1). 일반미인 추청을 기준으로 하여 유색미로부터의 각 유기용매 분획물의 억제활성을 단위중량당 활성으로 평가했을 때, 모든 유기용매 분획물에서 유색미의 활성이 추청에 비하여 월등히 높을 뿐 아니라, 유색미중에서도 수원415호의 활성이 상해향혈나보다 우수하다는 사실을 알았다. 특히 에틸아세테이트 분획물에서 유색미의 변이원에 대한 억제활성이 추청에 비하여 상해향혈나가 6배, 수원415호가 9배까지 검출되는것으로 보아 변이원 억제활성을 가진 일부의 물질이 에틸아세테이트 분획에 효과적으로 농축된다는 사실을 시사하였다. 그러나 추출 및 분획화과정에서의 회수율을 매우 낮았다. 유색미의 50% 에탄올 분획물에서 추청에 대한 상대적인 변이원 억제활성이 높은 것은 항산화활성이 보고된 유색미의 색소성분의 영향으로 생각할 수 있으나,[18] 수용성 분획물에 포함된 다른 물질들 때문일 가능성도 배제할 수 없다. 그러나 특정 색소의 혼입이 상대적으로 적은 클로로포름 분획에서도 여전히 유색미의 억제활성이 추청에 비하여 높은것을 볼때, 유색미에는 일반미보다 동정되지 않은 색소이외의 변이원성 억제물질이 다량 함유되어 있을 것으로 생각된다.

쌀겨 추출물의 항산화활성

쌀겨 추출물이 보여준 변이원성에 대한 억제효과의 원인으로서는 이미 前報에서 제시한 바와 같이 우선 유색미 쌀겨 추출물에 의한 화학적 변이원의 물리적 흡착에 기인한다는 사실을 부인할 수 없지만[11] 쌀겨 추출물이 가지는 항산화작용에 의한 효과일 가능성도 생각해 볼 수 있다. 실제

Table 1. Inhibitory effect of solvent extracts of rice bran on mitomycin C-induced mutagenicity

Solvent	Cultivar	Recovery(%)[2]	Inhibition Units(IU)	
			IU/mg extract	Total units
70% Ethyl alcohol extract	Chuchung	8.9	0.12	1068
	Sanghaehyanghyulla	8.1	0.39	3159
	Suwon 415	14	0.48	6720
Chloroform fraction	Chuchung	1.6	0.34	544
	Sanghaehyanghyulla	1.3	0.56	728
	Suwon 415	0.99	0.65	644
Ethyl acetate fraction	Chuchung	0.33	0.27	8.91
	Sanghaehyanghyulla	0.11	1.65	18.2
	Suwon 415	0.14	2.50	35.0
50% Ethyl alcohol fraction	Chuchung	6.4	0.09	576
	Sanghaehyanghyulla	1.2	0.29	348
	Suwon 415	1.1	0.75	825

[1]Results are averages of duplicate experiments. [2]per 100 g dry weight from each brown rice

로 각종 변이원에 의한 유전물질의 손상결과 나타나는 유전독성의 발현에 자유라디칼이 관여한다는 연구보고가 다수 발표되어 있는것으로 보아, 항산화작용을 통한 변이원 활성의 억제가 생체내 발암 initiation의 개시단계를 차단하는데 매우 중요한 역할을 담당할 것으로 생각된다.[21] 따라서 항변이원 활성을 조사한 유색미의 70% 에탄올 추출물 및 각종 유기용매 분획물의 항산화활성을 대조구인 추청의 추출분획과 함께 측정하였다. Linoleic acid의 자동산화 씨스템을 이용하여 항산화활성의 측정 결과, 모든 품종의 유기용매별 추출분획에서 항산화활성이 검출되었으나 기대와는 달리 유색미가 일반미에 비하여 항산화활성이 오히려 낮은 경향을 보였으며, 상해향혈나<수원415호<추청의 순서로 활성이 증가함을 알았다(Fig. 1). 이 씨스템을 이용한 항산화활성의 측정법을 통하여 품종별, 또는 분획물별의 항산화활성을 비교하는것은 다소 무리가 있으나, 실험상 재현성을 가진 경향을 나타내기 때문에 항산화활성은 오히려 추청이 유색미보다 높은것으로 보인다. 또한 측정한 항산화활성과 Table 1에 나타낸 시료의 항변이원 활성을 비교해 보면, 항산화활성과 항변이원 활성은 일치된 경향을 보이지 않는다는 사실을 알 수 있다. 특히 50% 에탄올 분획물의 경우, 시료중량당 항변이원 활성에 있어서는 수원415호가 추청보다 월등히 높지만 항산화활성은 오히려 추청이 높은 경향을 나타내고 있었다.

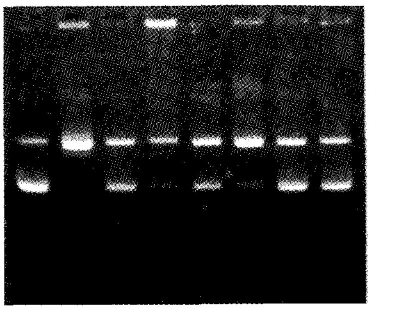

Fig. 1. Agarose gel electrophoretic analysis of the effects of added solvent extracts from rice brans on DNA strand scission induced by mitomycin C. 1, drug-free control; 2, drug treated control; 3, 70% ethanolic extract of Chuchung; 4, Chloroform fraction of Chuchung; 5, 70% ethanolic extract of Sanghaehyanghyulla; 6, Chloroform fraction of Sanghaehyanghyulla; 7, 70% ethanolic extract of Suwon 415; 8, Chloroform fraction of Suwon 415.

쌀겨 추출물에 의한 DNA 손상 억제효과

본 실험에서 제조한 각 쌀겨 추출물 및 분획물의 항산화활성과 변이원에 대한 억제활성이 일치된 경향을 보이지 않는것에 대해서는 여러가지 원인을 생각할 수 있으나, linoleic acid의 자동산화계를 이용하여 측정된 항산화효과가 반드시 산화작용에 의한 생체 유전물질의 손상을 시료가 억제하는 효과를 반영한다고는 볼 수 없기 때문에, 유전물질인 DNA의 손상을 쌀겨 추출물이 억제하는 효과를 직접 측정하는 실험방법을 도입할 필요성이 있다. 만약 유색미의 쌀겨 추출물에 이와같은 억제활성이 특히 높게 측정된다면 유색미가 암발생의 첫단계인 initiation과정의 억제에 효과적으로 이용될 수 있음을 의미한다. 본 실험에서 화학적 변이원으로 사용한 mitomycin C는 이중쇄 DNA에 strand cross link를 형성할 수 있을 뿐 아니라, 분자중의 quinon부위가 공기나 기타에 의하여 화학적으로 환원됨으로써 생성된 superoxide anion이나 hydrogen peroxide가 주변에 존재하는 DNA에 strand scission을 일으켜 생체 유전물질의 손상을 유도하는것으로 알려져 있다.[19,20] 따라서 변이원에 의하여 유발되는 DNA의 손상을 쌀겨 추출물이 억제할 수 있는가를 조사하였다. Ueda 등이 개발한 방법에 따라 bacteriophage ΦX174의 supercoil형태 double strand DNA인 RFI이 mitomycin C가 유도한 strand scission으로 open circle형태의 DNA인 RFII로 전환되는 것을 쌀겨 추출물이 저해하는 정도로서 DNA에 대한 손상 억제활성을 검정하였다.[14] Fig. 2에서 보는 것 같이 70% 에탄올

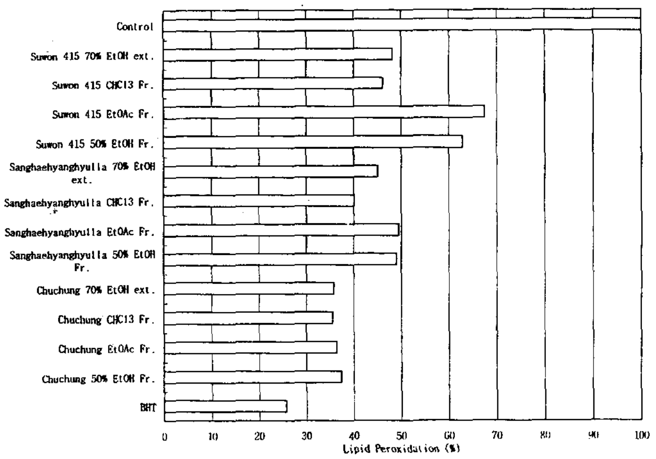

Fig. 2. Antioxidative activities of solvent extracts from the rice brans in the linoleic acid system.

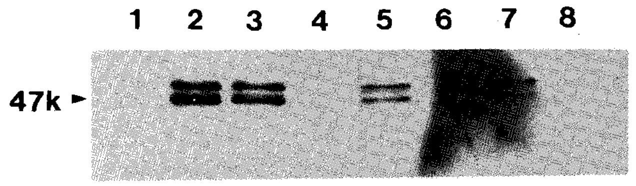

Fig. 3. Immunoblotting analysis of the effect of added solvent extracts from rice brans on expression of EBV early diffusible antigen by TPA treatment. 1, TPA-free control; 2, TPA treated control; 3, 70% ethanolic extract of Chuchung; 4, Chloroform fraction of Chuchung; 5, 70% ethanolic extract of Sanghaehyanghyulla; 6, Chloroform fraction of Sanghaehyanghyulla; 7, 70% ethanolic extract of Suwon 415; 8, Chloroform fraction of Suwon 415.

추출물의 억제활성을 조사한 결과, 세품종 모두에서 비슷한 수준의 억제활성이 관찰되었는데, 그중에서 수원415호의 활성이 나머지 품종에 비하여 다소 높은것을 알 수 있었다 (Fig. 2, lane 3,5,7). 그러나 클로로포름 분획물에서 수원 415호의 경우는 70% 에탄올 추출물과 거의 비슷한 수준의 활성을 보인 반면(Fig. 2, lane 8), 추청과 상해향혈나의 억제활성은 매우 낮았고, 특히 상해향혈나는 DNA의 strand scission을 억제하는 효과가 거의 관찰되지 않았다(Fig. 2, lane 4,6). 유색미중에서도 수원415호의 쌀겨 추출물이 보여준 DNA strand scission에 대한 우수한 억제효과는 쌀겨 추출물에 함유된 성분이 세포내에서 생체내에서 변이원에 의한 DNA의 손상을 억제함으로써 생체 암발생과정 중 발암 initiation단계의 억제인자로 작용할 가능성을 시사해 주고 있다. 특히 DNA의 손상을 억제하는 인자가 수용성 및 지용성분획에 모두 존재한다는 사실은 유색미 겨에 함유된 억제인자를 다양한 목적에 맞게 산업적으로 활용할 수 있는 가능성을 보여주고 있다. 에틸아세테이트 분획물과 50% 에탄올 분획물의 DNA 손상 억제효과에 대해서는, 회수된 분획물의 양적인 문제점(에틸아세테이트 분획물)과 시료와의 반응이 끝난 표적 DNA를 정제하는 과정에서 발생하는 실험상의 문제점(50% 에탄올 분획물)으로 인하여 정상적인 전기영동상을 얻을 수 없었기 때문에 이들 분획물이 가지는 DNA의 손상 억제활성을 평가하는것이 불가능하였다. 이 문제점을 해결하기 위해서는 다량 추출에 의한 유기용매 분획물의 충분한 확보와 함께, 반응이 종료된 DNA에 더 이상의 strand scission이 일어나지 않는 상태에서 시료만을 완전히 제거하는 방법이 개발될 필요가 있기 때문에 현재 이에 대한 실험방법을 확립중에 있다.

쌀겨 추출물에 의한 발암 promotion의 억제

평균수명이 긴 인간의 경우, 장기간에 걸쳐 지속적으로 유해한 환경인자에 대한 노출로 인하여 성인의 대부분이 세포의 유전물질이 변형된 잠재적 종양세포를 갖게 되는것으로 보여지므로 이와같은 잠재적 종양세포가 증식하여 암으로 발전되는것을 저해하는 방법 및 물질의 개발이 암의 예방에 중요하다고 하겠다. 발암억제에 있어서도 특히 발암 promotion의 억제에 주목하는것은 비가역적과정인 initiation에 비하여 promotion은 가역적과정이기 때문에 promotion을 저해함으로써 체내에 자연발생한 잠재적종양세포가 암으로 발전할 가능성을 차단시킬 수 있기 때문이다.[1] 따라서 발암 promotor을 억제하는 물질의 쌀겨 추출물내 함유여부는 일상적 식생활을 통한 암예방의 측면에서 조사할 만한 가치가 있다고 본다. 본 실험에서는 Epstein-Barr virus(EBV)를 사용한 promoter 단기검출법으로 쌀겨의 품종별 유기용매 추출분획이 보유한 발암 promotion 억제활성을 조사하였다.[15,22] 즉 EBV에 의하여 형질전환된 B lymphoblast cell을 발암 promoter인 TPA로 처리했을 때 바이러스의 복제개시의 지표로서 나타나는 EBV early diffusible antigen의 발현이 배양액에 첨가한 쌀겨 추출물에 의하여 억제되는 정도로 발암 promotion에 대한 억제활성을 평가하였다. 실제로 배양세포를 TPA로 처리하면 47 kDa 정도의 분자량을 가진 단백질이 EBV early diffusible antigen에 대한 단클론항체에 의하여 western blot으로 검출되었다(Fig.3, lane 2). 47 kDa의 단백질은 이미 보고된 바이러스 genome의 BamHI-M rightward reading frame 1(BMRF1)유래의 단백질과 분자량이 일치하기 때문에 early diffusible antigen임을 확인할 수 있었다. 반면에 47 kDa보다 약간 큰 분자량의 단백질은 동일한 단클론항체와 반응하는것으로 보아, 같은 분자이지만 TPA처리로 인한 단백질 인산화현상 때문에 SDS-PAGE에서 전기영동도에 차이를 보이는것으로 추정하였다.[23] 상해향혈나와 수원 415호의 70% 에탄올 추출물에서 다소간의 promotion 억제활성이 관찰되었으나 추청의 70% 에탄올 추출물에서는 거의 활성이 보이지 않았다(Fig. 3, lane 3,5,7). 그러나 클로로포름 분획물의 경우에 세품종 모두에서 거의 완전히 promotion을 억제하는 활성이 관찰되었다(Fig. 3, lane 4,6, 8). 그러나 수원415호를 제외하고는 클로로포름 분획물들이 강한 세포독성을 나타내는 경향이 있기 때문에, 앞으로 정상 지속배양세포와 암세포를 대상으로 시료가 세포의 증식에 미치는 효과를 정확하게 조사할 필요가 있다고 본다 (미발표결과). 이상의 실험결과를 보면, 유색미중에서도 수원415호의 쌀겨는 발암 initiation 개시의 지표인 DNA의 손상 유발과정에 대한 억제활성과 함께 발암 promotion을 억

제하는 활성도 높다는 사실을 알았다. 또한 수원415호의 클로로포름 분획물은 세포독성이 낮을뿐 아니라 DNA 손상 및 발암 promotion에 대한 억제활성을 동시에 보유하고 있으므로 세포내외 또는 세포막에서 효과적인 항변이, 항암작용을 수행할 수 있다고 본다. 그러나 유색미 품종들중에는 본 연구에서 조사한 수원415호보다 발암 initiation이나 promotion과정을 보다 효과적으로 억제하는 품종이 있을것으로 생각되기 때문에, 현재 이 부분에 대한 검색을 진행중에 있다.

감사의 글

본 연구는 '93~'96년도 농촌진흥청 농업특정과제 연구비에 의하여 지원되었으며 본 과제의 수행에 도움을 주신 많은 분들에게 감사를 드린다.

참 고 문 헌

1. 千葉英雄 (1992) 食品の生體調節機能 ;食品成分による發癌プロモ-ションの抑制, 出版センタ-
2. Wattenberg, L. W. (1985) Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* **45**, 1-8.
3. Ramel, C., U. K. Alekperov, B. N. Ames, T. Kada, and L. W. Wattenberg (1986) Inhibitors of mutagenesis, and their relevance to carcinogenesis. *Mutation Res.* **168**, 47-65.
4. Zhang, Y., P. Talalay, C.G. Cho, and G.H. Posner (1992) A major inducer of anticarcinigenic protective enzyme from broccoli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 2399-2403.
5. Kahn, S. G., S. K. Katiyar, R. Agarwal, and H. Mukhta (1992) Enhancement of antioxidant, and phase II enzyme by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice ; possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res.* **52**, 4050-4052.
6. Mergens, W. J., J. J. Kamm, H. L. Newmark, W. Fiddler, and J. Pensabene (1978) In Environmental aspects of N-nitroso compounds : α-tocopherol ; uses in preventing nirosamin formation, Walker, E.A., Castegnaro, M., Griciute, L.,, and Lyle, R.E., Ed, No.16 IARC Publication, Lyon, France.
7. Namiki, M., S. Udaka, T. Osawa, K. Tsuji, and T. Kada (1980) Formation of ascorbic acid-nitrite reaction : effects of reaction conditions on biological activities. *Mutation Res.* **73**, 21-28.
8. Cook, M. G.,, and P. McNamara (1980) Effect of dietary vitamin E on dimethylhydrazine-induced colonic tumors in mice. *Cancer Res.* **40**, 1329-1331.
9. Wattenberg, L. W., J. B. Coccia, and L. K. T. Lam (1980) Inhibitory effects of phenolic compounds on benzo[a] pyren-induced neoplasia. *Cancer Res.* **40**, 2820-2823.
10. Mathews-Roth, M. (1987) Antitumor activity of beta carotene, canthaxanthin,, and phyton. *Oncology,* **39**, 33-37.
11. Kang, M. Y., Y. H. Choi, and S. H. Nam (1996) Inhibitory mechanism of colored rice bran extract against mutagenicity induced by chemical mutagen mitomycin C. *Agri. Chem. Biotech.* **39**, 424-429.
12. Kang, M. Y., Y. H. Choi, and S. H. Nam (1996) Screening of antimutagenic activities from cereals, and beans including rice. *Agri. Chem. Biotech.* **39**, 419-423.
13. Yen, G. C.,, and H.-Y. Chen (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agri. Food Chem.* **43**, 27-32.
14. Ueda, K., J. Morita, and T. Komano (1982) Action of mitomycin C reduced with sodium borohydride on bacteriophage φX 174, and its single, and double stranded DNAs. *Agri. Biol. Chem.* **46**, 1695-1677.
15. Ito, Y., S. Yanase, J. Fujita, T. Harayama, M. Takashima, and H. Imanaka (1981) A short-term *in vitro* assay for promoter substance using human lymphoblatoid cells latently infected with Epstein-Barr virus. *Cancer Lett.* **13**, 29-37.
16. Bradford, M. M. (1976) A rapid, and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
17. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure, and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
18. Tsuda, T., M. Watanabe, K. Ohshima, S. Norinobu, S. W. Choi, K. Shunro, and T. Osawa (1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D-glucoside, and cyanidin. *J. Agri. Food Chem.* **42**, 2407-2410.
19. Tomasz, M., C. M. Mercado, J. Olson, and N. Chatterjie (1974) The mode of interaction of mitomycin C with deoxynucleic acid, and other polynucleotides *in vitro*. *Biochemistry* **13**, 4878-4887.
20. Ueda, K., J. Morita, and T. Komano (1984) Sequence specificity of heat-labile sites in DNA induced by mitomycin C. *Biochemistry* **23**, 1634-1640.
21. Poli, G., E. Albano, and M. V. Dianzani (1993) In Free radicals : from basic science to medicine. Birkhauser Verleg, Basel, Switzerland.
22. Okamoto, H., D. Yoshida, and S. Mizusaki (1983) Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced induction in Epstein-Barr virus early antigen in Raji cell. *Cancer Lett.* **19**, 47-53.
23. Wong, K.-M., and A. J. Levine (1986) Identification, and mapping of Epstein-Barr virus early antigens, and demonstration of a viral gene activator that functions in trans. *J. Virol.* **60**, 149-156.

In vitro Inhibitory Effect of Colored Rice Bran Extracts Carcinogenicity

Seok Hyun Nam* and Mi Young Kang[1] (*Division of Natural Science, College of Natural Science, Ajou University, Suwon 442-749; [1]Department of Home Economics, Teacher's College, Kyungpook National University, Taegu 702-701*)

Abstract : As a preliminary experiment to investigate the antitumor activity of colored rice *in vivo*, inhibitory effect of solvent extracts from colored rice brans on DNA strand scission and tumor promotion was examined *in vitro*. Two colored rice cultivars, Sanghaehyanghyulla and Suwon 415 were compared with Chuchung as a control. The antimutagenic activity of each rice cultivars increased in order of Chuchung <Sanghaehyanghyulla<Suwon 415. However, the inhibitory activity of 70% ethanolic extracts against DNA strand scission increased in order of Sanghaehyanghyulla<Chuchung<Suwon 415. The results from the examination on the chloroform fractions demonstrated that Sanghaehyanghyulla did not show any significant inhibitory activity, and that Chuchung was unexpectedly somewhat more inhibitory than Sanghaehyanghyulla. Strong inhibition against DNA strand scission was observed in the chloroform fraction of Suwon 415, activity of which was almost same as that of the 70% ethanolic extract(about 50% inhibition). We also measured the inhibitory effect of 70% ethanolic extracts on tumor promotion by means of its actions that block the expression of Epstein-Barr virus early diffusible antigen induced by tumor promotor, indicating the increase of inhibitory activity in order of Chuchung<Sanghaehyanghyulla<Suwon 415. Although every chloroform fractions showed complete blockage of tumor promotion, Suwon 415 was found to be the only cultivar that showed the cytotoxicity-free antipromotion effect.

Key words : colored rice, DNA strand scission, Epstein-Barr virus, antipromotion

*Corresponding author