

培養癌細胞の増殖および表現型に対する ginsenosides の作用

太田 隆英,*^{a)} 松田 健志,^{a)} 宗 志平,^{a)} 小田島 肅夫,^{a)} 西川 克三^{b)}
阿部 博子,^{c)} 有地 滋,^{c)} 北川 勲^{d)}

^{a)}金沢医科大学第一病理学教室, ^{b)}金沢医科大学第二生化学教室

^{c)}近畿大学東洋医学研究所, ^{d)}大阪大学薬学部生薬学教室

Effects of ginsenosides on the growth and phenotype of tumor cells in culture

Takahide OTA,*^{a)} Takeshi MATSUDA,^{a)} Zhi-ping ZONG,^{a)} Shizuo ODASHIMA^{a)}
Katsuzo NISHIKAWA,^{b)} Hiroko ABE,^{c)} Shigeru ARICHI^{c)} and Isao KITAGAWA^{d)}

^{a)}Department of Pathology, Kanazawa Medical University

^{b)}Department of Biochemistry, Kanazawa Medical University

^{c)}Research Institute of Oriental Medicine, Kinki University

^{d)}Faculty of Pharmaceutical Science, Osaka University

(Received March 3, 1986. Accepted March 17, 1986.)

Abstract

Ginsenoside Rh₂ inhibited the growth of Meth-A, B16 melanoma, 3LL, and HeLa cells at concentration of 5-15 μM. In B16 melanoma cells, Rh₂ inhibited the transition from G₁ to S phase of the cell cycle, while Rh₂ induced the morphological alteration and enhanced the melanin production. Stimulation of DNA synthesis by DSF and EGF were suppressed by Rh₂ in BALB/c 3T3 cells, but the suppression was not competitive. Rh₂ changed the membrane lipid fluidity and was detected in the isolated crude cell membranes. These observations suggests that Rh₂ affects the growth and functions of the cells through the modification of cell membranes.

Key words ginsenosides, B16 melanoma, melanogenesis, cell cycle, cell membranes, membrane fluidity, membrane lipids

Abbreviations DPH ; 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, DSF ; DNA synthesis factor, EDTA ; ethylenediamine tetraacetic acid, EGF ; epidermal growth factor, PBS ; phosphate buffered saline, TCA ; trichloroacetic acid, TLC ; thin-layer chromatography

緒 言

過去数十年間における生薬中の有効成分を検索する過程で多数の薬理・生理活性物質が分離され構造式が明らかにされてきた。それらの多くは配糖体であり、柴胡由来のサイコサポニンには、抗炎症作用、

中枢抑制作用^{1,2)}および肝蛋白合成促進作用³⁾などが見い出されており、薬用人参由来のニンジンサポニンでは、蛋白質や核酸の合成促進作用⁴⁾、糖質・脂質代謝の調整作用⁵⁻⁷⁾および中枢興奮・抑制作用⁸⁾が報告されている。最近ではサイコサポニンの肝細胞保護作用^{9,10)}や免疫機構の修飾作用^{11,12)}など、また、ニンジンサポニンの新しい作用として、培養

*〒920-02 石川県河北郡内灘町大学 1-1
Uchinada, Ishikawa 920-02, Japan

Morris 肝癌細胞に対する再分化誘導作用¹³⁾なども報告されている。

このような多彩な作用をもつ植物性配糖体の作用機序は不明であるが、疎水性部分として親水性部分を併せもつ分子構造から推察して、細胞膜が第一の target として考えられている。実際に、サイコサニンが種々の細胞膜修飾作用をもつことが報告されている。¹⁴⁻¹⁶⁾

本報告では *P. ginseng* の根部より単離精製された植物性配糖体の一つである ginsenoside Rh₂ の細胞の増殖、形態及び分化形質発現に対する作用を検討し、さらに、Rh₂ の細胞膜に対する親和性を中心に、その多様な薬理作用の機構についても考慮したい。

材料と方法

(1) 細胞培養：マウス由来のリンパ肉腫細胞 (Meth-A)、黒色腫細胞 (B16メラノーマ)、肺癌細胞 (3LL)、およびヒト由来の子宮癌細胞 (HeLa) は、Ham's F-10 : L-15 (3 : 7) の混合培地に牛胎児血清10%、ペニシリン50U/ml、ストレプトマイシン50 µg/mlを加えた培養液で継代された。マウス胎児繊維芽細胞 (BALB/c 3T3) は DME 培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) に牛胎児血清10%、ペニシリン100 U/ml、ストレプトマイシン100 µg/mlを加えた培養液で継代された。実験に際しては、増殖抑制作用および促進作用ともに検出可能とするため、10%牛胎児血清での培養と比較して50%増殖性が得られる2%牛胎児血清を含む培養液を用いた。培養はすべて炭酸ガス培養器中で、5%CO₂ 95%空気相下で、37℃で行った。

(2) 増殖抑制の効果の測定：各種細胞の増殖速度に応じて、3×10⁴個 (Meth-A, HeLa)、1×10⁵個 (B16メラノーマ)、1×10⁴個 (3LL) の細胞を培養液5mlを含むプラスチックシャーレ (φ60mm falcon社) にそれぞれ播種し、ついで ginsenosides のエタノール溶液 (5 mg/ml 又は 10 mM) を目的の濃度となるように添加し、3日間培養後、細胞数をコールターカウンターで測定した。

(3) 細胞周期の解析：B16メラノーマ細胞5×10⁵個 (対照用) または1×10⁶個 (Rh₂ 処理用) を、培養液10mlを含むφ100mmプラスチックシャーレに播種し15時間後に Rh₂ 12.5µM 添加し、更に48時間培養の後、細胞当たりのDNA量を以下に述べるフローサイトメトリー法により測定した。細胞を0.125%トリプシン・0.01%EDTAで分散浮

遊化し、PBS (Phosphate buffered saline) で洗浄後、25%メタノールで固定した。これらの細胞を0.25%RNaseで37℃、30分処理し、Propidium iodide (50 µg/ml) で染色し、Cytofluorograf (Ortho社, system 50-H) で測定した。G₁、S、G₂+M各期細胞の割合は藤川らの方法¹⁷⁾により算出した。

(4) 各種増殖因子によるDNA合成促進に対する作用の解析：3T3細胞1×10⁵個を仔牛血清3%の培養液5mlを含むφ60mmプラスチックシャーレに播種し5時間培養後、仔牛血清0.2%の培養液に交換しさらに24時間培養を続け細胞をG₁期に停止させ、ついで、増殖因子のみ、または増殖因子とRh₂を添加し16時間培養後³H-Thymidine (20µCi/ml, 2×10⁻⁵M, 50µl) を加え3時間培養後、氷冷したPBSで2回、10%TCAで3回シャーレを洗い0.5N NaOH 1mlを加え、0.5mlを液体シンチレーション・カウンター測定用とし、DNAへの³H-Thymidineの取り込みを測定した。

(5) メラニンの測定：B16メラノーマ細胞を2×10⁵個 (対照用) または5×10⁵個 (Rh₂処理用) をφ35mmシャーレに播種し、24時間後にRh₂ 12.5µMを加え24時間毎に0.125%トリプシン、0.01%EDTAで細胞を剥離後、1N NaOH、10% DMSOに溶解し470nmの吸光度を測定した。¹⁸⁾

(6) 細胞膜脂質流動性の測定：細胞膜脂質流動性はDPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) をプローブとする蛍光偏光解消法により測定した。¹⁹⁾ Meth-A細胞をPBSで3回洗浄後1×10⁶/mlの細胞浮遊液とし、同容積のラベル液 (2×10⁻³MのDPHテトラヒドロフラン溶液をPBSで1000倍希釈したもの) を加えて37℃で30-40分インキュベートしPBSで3回洗浄後、各種 ginsenosides 15µMを加え、25℃におけるDPH polarizationを30分毎に測定した。測定にはElscent Mv-1aを用いた。

(7) 粗細胞膜の分離：細胞分画は、Hogeboomらの原法²⁰⁾を培養細胞に適用した²¹⁾すなわち、0.02%EDTA処理により剥離浮遊化したB16メラノーマ細胞 (1×10⁸個) を、2mM MgCl₂を含む氷冷の10mM Tris-HCl (pH 7.5) 2ml中に分散し、5分間静置後、Potter-Elvehjemホモジナイザーでホモジナイズし、600×g、5分間遠心した。上清を9000×g、10分間遠心した後、その上清をさらに105000×g、60分間遠心し、得られた沈渣を粗細胞膜として用いた。

(8) 脂質の分離：PBS 1mlに細胞または粗細胞膜を懸濁し、クロロホルム：メタノール (1 : 2) を

3.75 ml 加え室温で90分間抽出後, 3000rpm, 5 分間遠心した。沈渣を同じ方法で処理し再度脂質を抽出し, 2 回分の抽出上清を合わせ, クロロホルム 2 ml, 蒸留水 2 ml を順次加え十分に攪拌後, 遠心し分取した下層を窒素気流下で濃縮した。

(9) **TLC分析**: 1 次元目クロロホルム: メタノール: 酢酸: 水 (250: 74: 19: 3), 2 次元目クロロホルム: メタノール: 7 M アンモニア (230: 90: 15) の展開溶媒を用いた 2 次元 TLC により脂質を分離した²²⁾ 展開後, 10% H₂SO₄ を噴霧し, 加熱, 発色させた。

結 果

1. 細胞の増殖および形質発現に対する Rh₂ の作用

a) 細胞増殖抑制作用: ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁, Rh₁ および Rh₂ について, Meth-A 細胞に対する増殖抑制作用を検討した。Fig. 1 にみられるように, Rh₂ 添加群で顕著な増殖抑制作用が認め

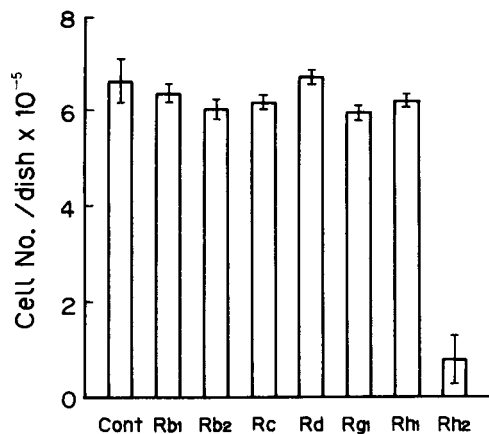


Fig. 1 Effects of ginsenosides on growth of Meth-A cells.
Mean ± S.D. of three samples.

められたが, その他の ginsenosides ではこのような増殖抑制作用は認められなかった。次に, 各種癌細胞, Meth-A, B16 メラノーマ, 3LL および Hela 細胞を用いて, Rh₂ による増殖抑制作用の濃度依存性を検討した (Fig. 2)。いずれの細胞に対しても 5–15 μM で増殖が抑制されたが, その抑制作用の

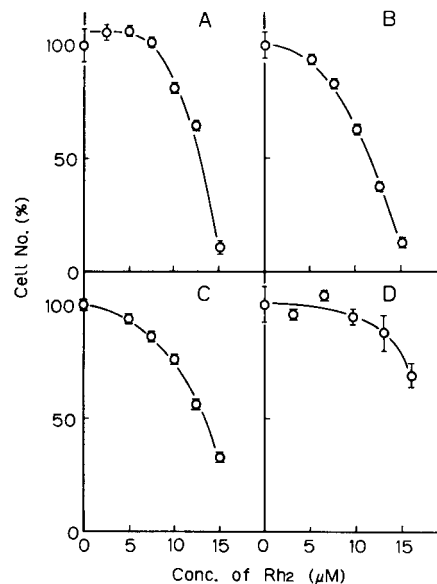


Fig. 2 Growth inhibition by Rh₂ in Meth-A(A), B16 melanoma(B), 3LL(C), and HeLa(D) cells.
Mean ± S.D. of three samples.

程度は細胞によって異なり, 50% 増殖抑制濃度は, Meth-A, 3LL では 13 μM, B16 メラノーマでは 11 μM, Hela では 15 μM 以上であった。

b) Rh₂ による増殖抑制の動態: B16 メラノーマ細胞を Rh₂ 12.5 μM 存在下で 48 時間培養後, フローサイトメトリー法により細胞周期の解析を行った (Fig. 3)。対照群では G₁ 期の細胞が 52% であったの

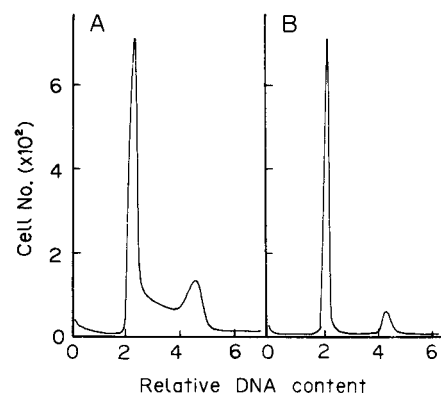


Fig. 3 DNA histograms of B16 melanoma cells in control(A) and Rh₂ treated(B) cultures.

に対して、Rh₂処理群では70%と増加しており、とくにS期細胞の減少が著明であり、Rh₂はG₁期からS期への移行を阻害していることは明らかであった。また、Rh₂処理群において、G₂+M期の細胞が残存する傾向が認められたが、この傾向は細胞の種類により異なり、また同一細胞種から得たクローンによっても異なっていた。

c) 各種増殖因子によるDNA合成促進に対する作用：低血清濃度処理によりG₁期に停止させた3T3細胞は、増殖因子であるDSF (DNA synthesis factor)²³⁾ およびEGF (Epidermal growth factor) などによりDNA合成が促進されることが知られている。これら増殖因子によるDNA合成促進に対するRh₂の作用を検討した。Fig. 4は低血清濃度で24時間培養しG₁期に停止させた3T3細胞に増殖因子とRh₂を同時に作用させた場合のDNA合成促進を検討したものである。Rh₂はDSFおよびEGFによるDNA合成促進を3-8μMで抑制した。次に、このDSFに対するRh₂の抑制作用についてさらに詳しく検討したところ、DSFによる濃度依存的なDNA合成の促進をRh₂ (4.8μM) は明らかに抑制したが (Fig. 5A), Lineweaver-Burkプロットにならい縦軸を³H-Thymidine 取り込み量の逆数、横軸をDSF濃度の逆数としプロットした場合に (Fig. 5B) 対照群とRh₂処理群では縦軸との

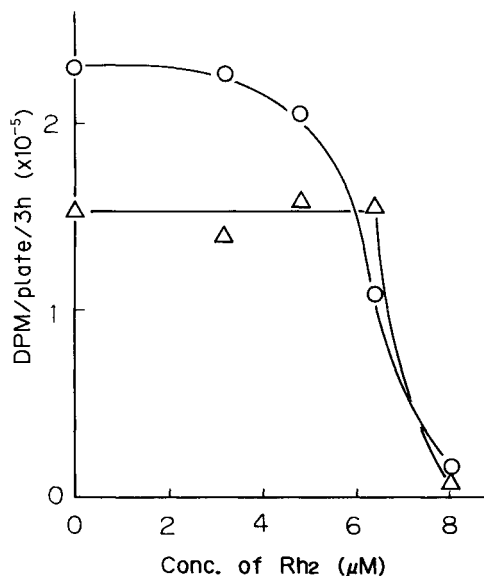


Fig. 4 Effects of Rh₂ on DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells stimulated by DSF (○) and EGF (△).

Mean of two samples.

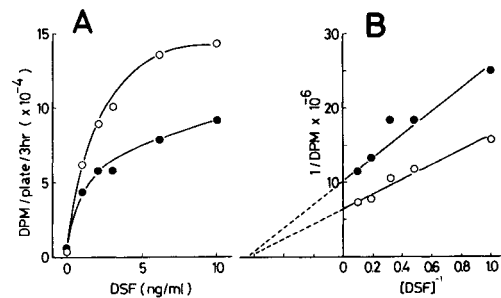


Fig. 5 Effects of Rh₂ on DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells stimulated by DSF.

B is the reciprocal plot of A.

Mean of two samples. (○), control; (●), Rh₂

交点が一致せず、DSFによる増殖促進に対するRh₂の抑制作用は拮抗的なものではないことが示された。

d) 細胞形態に対するRh₂の作用：Fig. 6に示すように、Rh₂ 12.5μM 依存下で4日間培養したB16メラノーマ細胞は対照細胞と比較して、配向性が顕著で、細胞間の重なり合いも著しく減少し、癌細胞の特徴である piling up もほとんどみられなかった。

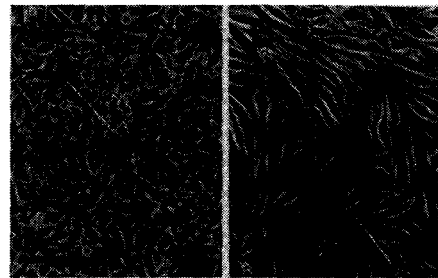


Fig. 6 Effects of Rh₂ on morphology of B16 melanoma cells.

A, control; B, Rh₂ treated.

Bar indicates 100μm.

e) メラニン産生に対するRh₂の作用：一般にメラノーマ細胞においてメラニン産生は培養密度依存性があること、また、対数増殖期にある細胞はメラニンを産生せず confluent 期の細胞がメラニンを産生することが報告されている。²⁴⁾ これまでにも述べたように、Rh₂は増殖抑制効果をもつため、こ

これらの現象を考慮し、メラニン測定時に対照細胞とRh₂処理細胞で培養密度が等しくなるように実験条件を設定し、メラニン産生に対するRh₂の作用を検討した。Fig. 7に示すように、対照細胞ではconfluent期に入ってから3日以上経過してもメラニン産生は起こらなかったのに対して、Rh₂処理細胞ではconfluent期に入ってから約2日後に急激なメラニン産生の開始が観察された。

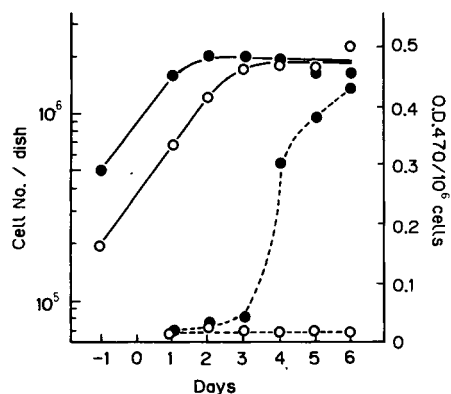


Fig. 7 Enhancement of melanin synthesis by Rh₂ in B16 melanoma cells.

Solid lines represent cell number and dashed lines represent melanin production in control (○) and Rh₂ treated (●) cultures.

Mean of two samples. Similar results were obtained from three independent experiments.

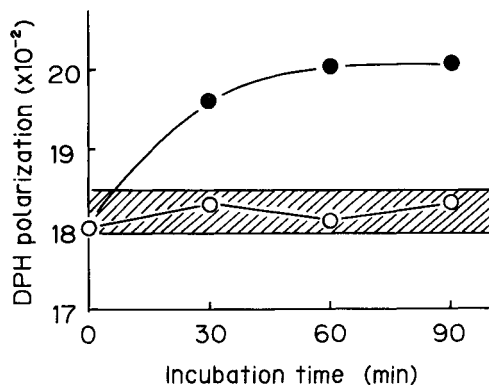


Fig. 8 Effects of ginsenosides on DPH polarization of Meth-A cells.

Polarization values of Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁, and Rh₁ treated cells were in the shaded area. (○), control; (●), Rh₂ treated. Similar results were obtained from three independent experiments.

2. Rh₂の細胞膜に対する作用

a) 細胞膜脂質流動性に対する作用：DPHでラベルしたMeth-A細胞に各種ginsenosidesを15 μM加え経時的にDPH polarizationを測定した (Fig. 8)。Rh₂ 15 μM添加により30分以内にDPH polarizationが上昇し、膜脂質流動性の低下が観察されたが、その他のginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁およびRh₁ではいずれもDPH polarizationに変化は認められなかった。また、Rh₂による膜脂質流動性の低下はB16メラノーマ細胞においても同様に観察された。

b) 細胞膜脂質に対するRh₂の親和性：B16メラノーマ細胞をRh₂ 12.5 μM存在下で4日間培養後、whole cellより抽出した脂質分画を2次元TLCにより分析したところ、Fig. 9に示すようにRh₂が明

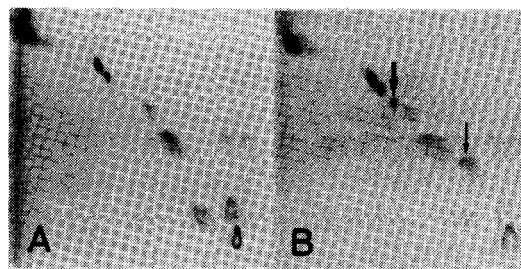


Fig. 9 TLC analysis of lipid extracts from B16 melanoma cells.

A, control; B, Rh₂ treated. Thick arrow indicates Rh₂ and thin arrow indicates unknown spot.

瞭に検出された。この細胞より分離した粗細胞膜においても同じように脂質分画中にRh₂が検出された。1時間Rh₂処理した細胞においてもRh₂は検出されたが、その量は4日間処理の細胞に比較して少なかった。

Rh₂処理細胞のTLCパターンにおいて、比較的Rf値の低い位置に認められたスポット (図中細矢印) に関しては、現在のところその物質の同定はできていない。

考察と結論

Ginsenoside Rh₂は種々の癌細胞の増殖を抑制するが、B16メラノーマ細胞をモデルとした細胞周期の解析から、この増殖抑制はG₁期からS期への移行阻害によることが明らかとなった。また、G₂期

からM期への移行も阻害する傾向が認められたが、その程度は細胞の種類によってかなり異なり、さらに、同一細胞のクローンの間でも差がみられ、現在詳しく検討を進めている。

一方、3T3細胞においてG₁期からS期への移行を促進するDSFおよびEGFの作用をRh₂は抑制した。しかし、DSFに対するRh₂の抑制作用は非拮抗的であり、DSFとRh₂の作用部位は異なることが示唆された。また、B16メラノーマ細胞にはEGFに対する感受性がないことが知られており、Rh₂がEGFの作用を直接阻害しないことも明らかである。さらに、Rh₂は、増殖因子のひとつであるインシュリンの作用とも直接には関係しないことを示す結果も得ている。これらの事実は、Rh₂による増殖抑制が増殖因子とそのリセプターの結合阻害などを介したものであることを示している。

Rh₂はB16メラノーマ細胞の増殖を抑制するとともにメラニン産生を促進した。メラニン産生はメラノーマ細胞の分化形質の一つであり、Rh₂が分化形質の発現に関与していると考えられる。形態学的にも、Rh₂はB16メラノーマ細胞に対して細胞間の重なり合いやpiling upの減少、配向性の出現などの癌細胞の正常化作用のあることが認められた。私どもは既に粗 ginsenosides が培養 Morris 肝癌細胞の再分化を誘導することを報告しており、¹³⁾今回の実験結果は少なくとも ginsenoside Rh₂は再分化誘導作用をもつことを示している。

一方、同じようにメラノーマ細胞の増殖を抑制し、メラニン産性を促進する物質として、レチノイン酸、²⁵⁾グルココルチコイド、²⁶⁾ビタミンE¹⁸⁾などが知られているが、その作用機構は明らかではない。しかし、レチノイン酸に関してはS91メラノーマ細胞の細胞表面の糖タンパク質や糖脂質を変化させることが報告されている²⁷⁾。また、ビタミンEはヒト血小板の膜脂質流動性を変化させることが報告されている。²⁸⁾今回、私どもはRh₂が30分以内に膜脂質流動性を変化させること、また、TLCによる分析で実際に細胞膜脂質に存在していることを明らかにした。これらの結果はRh₂の一次的な作用部位が細胞膜であることを示している。細胞膜におけるRh₂の存在状態や作用機構は明らかではないが、疎水部と親水部を併せもつRh₂の分子構造から、単に細胞膜上に存在するのではなく、膜脂質内に挿入していると推測される。細胞膜は細胞の増殖や機能に対して調節的な役割を担っていること、また、細胞膜脂質の性質は膜タンパク質の機能や可動性、露出状態などに影響を及ぼすことから、²⁹⁾膜脂質に挿入したRh₂

が種々の細胞膜の機能を変化させ、細胞の増殖や形質発現に影響を及ぼすことは容易に想像される。ginsenoside Rh₂以外の植物性配糖体に関してもそれらの多彩な薬理作用が細胞機能の修飾によって生じている可能性が高い。

Rh₂はステロイド類似のダンマラン骨格をアグリコンとする植物性配糖体であるが、ステロイドホルモンの作用機序としてリセプターを介した作用機構の他に、細胞膜を介した作用機構の存在も示唆されており、³⁰⁾Rh₂の膜作用との関連には、植物性配糖体の多彩な薬理作用を解析するうえで興味もたれる。

謝 辞

本研究は日本私学研究振興財団より援助をうけた。

文 献

- 1) 柴田 丸：サイコの薬理作用。代謝 **10**, 687-694, 1973
- 2) 山本昌弘：サイコの生化学と作用機序。代謝 **10**, 695-701, 1973
- 3) 山本昌弘：サイコサポニンの抗炎症作用及び代謝作用。Proc. Symp. WAKAN-YAKU **4**, 41-47, 1970
- 4) 大浦彦吉, 日合 奨：ニンジンの生理化学(1) 肝・腎に対する生理化学作用—とくに物質代謝を中心として。代謝 **10**, 564-580, 1973
- 5) Yokozawa, T., Kitahara, T., Okuda, S. and Oura, H.: Effect of ginseng principle on pyruvate kinase activity in rat liver. Chem. Pharm. Bull. **27**, 419-423, 1979
- 6) Yokozawa, T. and Oura, H.: Effect of ginseng saponin on serine dehydratase activity in rat liver. Chem. Pharm. Bull. **27**, 2494-2497, 1979
- 7) Yokozawa, T. and Oura, H.: Effect of ginseng extract on lipid and sugar metabolism. II. Nutritional states in rats. Chem. Pharm. Bull. **24**, 987-990, 1976
- 8) 斉藤 洋：ニンジンの薬理作用。代謝 **10**, 556-563, 1973
- 9) Abe, H., Sakaguchi, M., Yamada, M., Arichi, S. and Odashima, S.: Pharmacological actions of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. 1. Effects of saikosaponins on liver function. Planta Medica **40**, 366-372, 1980
- 10) Abe, H., Sakaguchi, M., Odashima, S. and Arichi, S.: Protective effect of saikosaponin d isolated from *Bupleurum falcatum* L. on CCl₄-induced liver injury in rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **320**, 266-267, 1981
- 11) 溝口靖紘, 沢井寛子, 筒井ひろ子, 池本吉博, 新井考之, 宮島慶治, 坂上吉秀, 東森俊博, 間奈丈之, 山本祐夫, 森沢成司：免疫学的肝細胞障害に対するサイコサポニン

- の防禦作用, 肝臓 **25**, 40-46, 1984
- 12) Yamaguchi, Y., Kohono, H., Tawara, M., Odashima, S. and Abe, H. : Effect of saikosaponin derivatives upon the immune response T-dependent and independent antigens in mice. *Int. J. Immunopharm.* **7**, 827-832, 1985
 - 13) Odashima, S., Nakayabu, Y., Honjo, N., Abe, H. and Arichi, S. : Induction of phenotypic reverse transformation by ginsenosides in cultured Morris hepatoma cells. *Eur. J. Cancer* **15**, 885-892, 1979
 - 14) Abe, H., Sakaguchi, M., Konishi, H., Tani, T. and Arichi, S. : The effects of saikosaponins on biological membranes. 1. The relationship between the structures of saikosaponins and hemolytic activity. *Planta Medica* **34**, 160-166, 1978
 - 15) Abe, H., Odashima, S. and Arichi, S. : The effects of saikosaponins on biological membranes. 2. Changes in electron spin resonance spectra from spin-labelled erythrocyte and erythrocyte ghost membranes. *Planta Medica* **34**, 287-290, 1978
 - 16) Abe, H., Konishi, H., Komiya, H. and Arichi, S. : The effects of saikosaponins on biological membranes. 3. Ultrastructural studies on the effects of saikosaponins on the cell surface. *Planta Medica* **42**, 356-363, 1981
 - 17) Fujikawa-Yamamoto, K., Murakami, E. and Odashima, S. : An improved method of cell cycle analysis by microcomputer and the examination utilizing anti-BrdU monoclonal antibody. *J. Kanazawa. Med. Univ.* **10**, 12-17, 1985
 - 18) Prasad, K.N. and E.-Prasad, J. : Effect of tocopherol (vitamin E) acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture. *Cancer Res.* **42**, 550-555, 1982
 - 19) Shinitzky, M. and Inbar, M. : Difference in microviscosity induced by different cholesterol levels in the surface membrane lipid layer of normal and malignant lymphoma cells. *J. Mol. Biol.* **85**, 603-615, 1974
 - 20) Hogeboom, G.H., Schneider, W. C. and Palade, G.E. : Cytochemical studies of mammalian tissues. 1. Isolation of intact mitochondria from rat liver ; Some biological properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.* **172**, 619-635, 1948
 - 21) 日本組織培養学会編 : “組織培養の技術,” 朝倉書店, p 46-48, 1982
 - 22) Abramson, D. and Blecher, M. : Quantitative two-dimensional thin-layer chromatography of naturally occurring phospholipids. *J. Lipid. Res.* **5**, 628-631, 1964
 - 23) Nishikawa, K. : Intracellular DNA synthesis factor from rat Rhodamine fibrosarcoma. *Biochem. Intl.* **4**, 169-175, 1982
 - 24) Laskin, J. D., Piccinini, L., Engelhard, D. L. and Weinstein, I. B. : Control of melanin synthesis and secretion by B16/C3 melanoma cells. *J. Cell. Physiol.* **113**, 481-486, 1982
 - 25) Lotan, R. and Lotan, D. : Enhancement of melanotic expression in cultured mouse melaoma cells by retinoids. *J. Cell. Physiol.* **106**, 179-189, 1981
 - 26) Disorbo, D. M., Harris, N. A. and Nathanson, L. : Effect of triamcinolone acetonide on tyrosinase activity in a human melanoma cell line. *Cancer Res.* **44**, 1752-1755, 1984
 - 27) Lotan, R., Neuman, G. and Deutsch, V. : Identification and characterization of specific changes induced by retinoic acid in cell surface glycoconjugates of S91 murine melanoma cells. *Cancer Res.* **43**, 303-312, 1983
 - 28) Steiner, M. : Vitamin E changes the membrane fluidity of human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **640**, 100-105, 1981
 - 29) Devaux, P.F and Seigneuret, M. : Specificity of lipid-protein interactions as determined by spectroscopic technique. *Biochim. Biophys. Acta* **822**, 63-125, 1985
 - 30) Duval, D., Durant, S. and Delarche, F. : Non-genomic effects of steroids. Interaction of steroid molecules with membrane structures and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **737**, 409-442, 1983