大韓獸醫學會誌(2001) 第41卷 第4號
Korean J Vet Res(2001) 41(4) : 549~555

Indole-3-carbinol(I3C) 투여에 의한 7,12-Dimethylbenz(a) anthracene(DMBA) 유발 랫드 유선발암 억제

강진석* · 안병우 · 남기택 · 최미나 · 김지영 · 김대중[1] · 장동덕 · 양기화

식품의약품안전청 국립독성연구소
[1]충북대학교 수의과대학 암예방연구실 및 동물의학연구소

(2001년 10월 20일 게재접수)

Pre-initiation treatment of indole-3-carbinol (I3C) inhibits 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary carcinogenesis

Jin Seok Kang, Byeongwoo Ahn, Ki Taek Nam, Mina Choi, Ji Young Kim, Dae Joong Kim[1], Dong Deuk Jang and Ki-Hwa Yang

National Institute of Toxicology Research, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-dong, Eunpyung-ku, Seoul 122-704, Korea

[1]Structural Bioinformatics & Cancer Prevention Laboratory, College of Veterinary Medicine & Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, 48 Gaeshin-dong, Heungduk-gu, Cheongju 361-763, Korea

(Accepted October 20, 2001)

Abstracts : Indole-3-carbinol (I3C), one component of cruciferous vegetables (the Family of *Cruciferae*), has been shown to exert its chemopreventive effect in liver, colon and mammary tissue before or concurrent exposure of carcinogen, but there have been several evidences that consumption of I3C induced tumor promotion in some tissues. Our studies were investigated to examine the modifying effects of I3C in the 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced rat mammary gland tumor model. Fifty-two female Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups. Animals of the group 1 were given the diet containing 100ppm I3C and animals of the groups 2 and 4 were given the diet containing 300ppm I3C from 6 weeks of age. At 7 weeks of age, the animals of the groups 1, 2 and 3 were intubated with DMBA. All animals were killed at 20 weeks after carcinogen treatment. There were significant increases of food consumption in I3C feeding groups compared with those of basal diet feeding groups. The incidences of the mammary tumors in the group 1, 2 and 3 were 75.0% (9/12), 56.3% (9/16) and 93.8% (15/16), respectively and the average number of tumors of group 1 (DMBA+I3C 100ppm: 2.08 ± 0.61) and 2 (DMBA+I3C 300ppm: 1.19 ± 0.32) were significantly lower than that of group 3 (DMBA alone: 4.63 ± 0.72) at the value of $P<0.05$ and $P<0.001$, respectively. In the pathological examination of appearing tumors, most of them were adenocarcinoma. Many epithelial cells of tumors showed strong estrogen receptor (ER) α expression but there were slight difference of ER α expression among the type of tumors. We suggest that pre-initiation treatment of I3C has an inhibitory effects on mammary carcinogenesis induced by DMBA.

Key words : Mammary gland tumor, 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), Chemoprevention, Indole-3-carbinol (I3C), Estrogen receptor (ER) α

*Corresponding author : Dr. Jin Seok Kang, National Institute of Toxicology Research, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-dong, Eunpyung-ku, Seoul 122-704, Korea Tel : (02)380-1822, Fax : (02)388-6451, E-mail : kangjins@kfda.go.kr

서 론

최근 암의 일차적 예방의 중요성에 대한 인식이 증대됨에 따라 식생활을 통하여 일상적으로 섭취하는 식품성분으로부터 암예방 물질을 찾으려는 노력이 활발히 진행되고 있다. 이런 식품성분을 암예방 물질로 이용하면 안전성 확보와 임상적용측면에 있어서 유리한 점이 있다. Indole-3-carbinol (I3C)은 배추, 양배추, 모란채, 콜리플라워, 싹눈양배추, 케일, 콜라드, 루터바가와 같은 십자화과 채소에 존재하는 대표적인 성분으로 절단, 분쇄, 저작과 같은 분해과정 혹은 조리과정 및 생체내 효소로 인해 I3C을 포함한 다양한 인돌류 (indole compounds) 물질이 생성된다고 알려져 있다[1]. 90개의 암예방 후보물질을 6가지 생화학적 지표로 스크리닝한 결과 I3C을 비롯한 8개의 물질이 *in vitro*에서 암예방 효과가 있다는 가능성이 제기되었고[2], 여러 *in vivo* 발암모델을 사용한 실험에서도 발암물질 투여 전에 혹은 투여와 동시에 적용하면 간장[3,4], 대장[5,6], 자궁[7,8] 등의 장기에 있어서 암예방 효과가 나타난다고 보고되었다. 하지만 발암물질 노출 후에 I3C의 섭취는 간장[9,10], 대장[11], 갑상선[4] 등의 장기에서 종양발생을 오히려 촉진하는 것으로 나타났다. 이런 상반된 현상으로 미루어 보아 I3C의 작용이 발암물질과 표적장기와 투여시점에 따라 다르다고 볼 수 있기 때문에 작용양상에 대한 보다 많은 연구가 필요한 시점으로 생각된다[12,13]. 유선종양 유발에는 보통 Sprague-Dawley 랫드를 사용하며, 발암물질인 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 혹은 *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU)를 투여하고 8-12주 정도 경과하면 유선종양이 발생하기 시작한다. 발생한 유선종양은 에스트로젠 수용체 (estrogen receptor: ER) 양성을 나타내며[14] 이 에스트로젠 수용체 함량은 유방암 치료에 있어서 호르몬처치에 대한 반응을 예견하는데 중요한 지표로 사용된다[15,16]. 본 연구에서는 6주령부터 I3C을 사료에 섞어 급여하고 7주령 때에 DMBA를 투여하여 유선종양을 유발하여 발암물질 투여 전에 I3C급여가 유선종양발생에 미치는 영향과 종양내의 에스트로젠 수용체 발현양상을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물, 발암물질 투여와 사료급여

실험동물은 4주령의 특정병원체부재 암컷 Sprague-Dawley계 랫드 52마리를 국립독성연구소 실험동물자원실로부터 분양 받아 온도와 상대습도가 각각 23±1℃, 55±5%로 유지되는 방에서 랫드용 케이지에 사육하였고, 인공조명 (12시간 점등, 12시간 소등)하에 음수와 사료는 자유로이 섭취하도록 하였다. Fig 1에 제시된 바와 같이 랫드를 다섯 군으로 나눈 다음 6주령 부터 CRF-1 기본사료 (Charles River Japan, Tokyo, Japan)에 I3C을 혼합하여 1군은 I3C이 100ppm, 2군과 4군은 I3C이 300ppm 농도로 함유된 사료를 급여하였다. 제조된 사료는 냉장 보관하여 실험동물에 급여하였다. 나머지 3군과 5군은 I3C이 없는 CRF-1 기본사료를 급여하였다. 랫드가 7주령이 되었을 때 1, 2, 3군은 sesame oil에 녹인 DMBA (D3254, Sigma Chemical Co. USA)를 1회 경구투여 (10mg/rat)하여 유선종양을 유발하였다. 4군과 5군은 용매대조군으로 sesame oil만을 투여하였다.

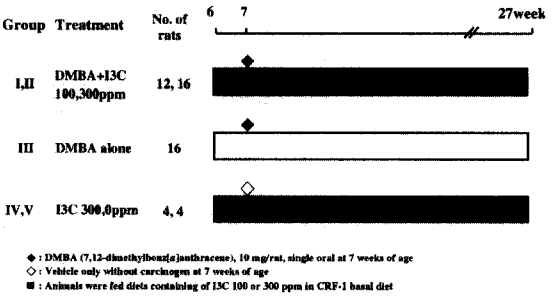

Fig. 1. Experimental design for modifying effect of I3C in rat mammary carinogenesis

2. 체중과 사료소모량 측정

실험동물은 6주령부터 2주 단위로 27주령 까지 체중을 측정하였고 사료소비량은 2주마다 주 2회 측정하였다.

3. 종양발생률 (tumor incidence)과 종양발생개수 (tumor multiplicity)의 측정 및 병리조직학적 검사

발암물질 투여 후 매 2주마다 유선을 촉진하여 육안적으로 촉진되는 종괴의 위치와 크기를 기록하였다. 27주령이 되었을 때 모든 동물을 이산화탄소 마취로 희생한 다음 부검을 실시하여 유선종양발생률과 종양발생개수를 산출하였다. 종양조직은 10% 중성포르말린에 고정한 후 조직처리과정을 거쳐 병리조직학적 검사를 실시하였다. 종양의 형태학적 특성은 Russo 등이 보고한 기준[17]과 SSNDC (Standardized System of Nomenclature and Diagnostic Criteria) 자료[18]를 참조하여 종양을 분류하였다.

4. 면역조직학적 염색에 의한 에스트로젠 수용체 α의 발현

유선종양조직에 존재하는 에스트로젠 수용체 α에 대한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 파라핀 포매된 조직을 4 μm 두께로 삭정하여 절편을 poly-L-lysine이 코팅된 슬라이드 위에 얹고 탈파라핀과 함수과정을 거친 후 과산화수소 (3% v/v)에 처리하였다. 절편을 증류수에 세정하여 0.01 M

citrate buffer (pH 6.0)에 담근 후 microwave oven에 넣어 10분간 750 watts에서 끓여서 항원을 노출시켰다. 조직절편을 식힌 후 비특이 반응을 줄이기 위하여 염소혈청으로 1시간 동안 처치하고, 에스트로젠 수용체 α에 대한 항체 (sc-7207, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)를 0.1% bovine serum albumin (BSA; B2518, Sigma Chemical Co., USA)에 1:400으로 희석하여 일차항체로 사용하였다. 이차항체와 발색에는 ABC Staining System (sc-2018, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)과 3,3'-diaminobenzidine tertrahydrochloride (00-2014, Zymed Laboratories Inc., USA)를 사용하였고, 핵염색에는 Mayer's hematoxylin을 사용하였다. 에스트로젠 수용체 α 항체에 대한 염색특이성을 확인하기 위하여 일차항체를 포함하지 않는 0.1% BSA만을 처리하여 염색성이 소실됨을 확인하였다.

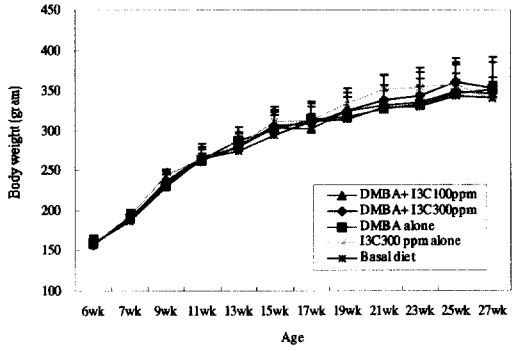

Fig. 2. Change of Body Weight of Rats

5. 자료의 통계학적 분석

주령별 체중 및 사료소비량은 ANOVA로 분석하여 유의성이 인정된 경우에 Duncan's multiple range test를 실시하였으며 유의수준은 0.05를 채택하였다. 종양의 발생률은 Mantel-Haenszel Chi-Square test를 이용하여 비교하였다. 종양발생개수는 ANOVA로 분석한 후 unpaired t-test로 유의수준을 확인하였다.

결 과

1. 군별 체중 및 사료소모량

체중측정결과 시험기간 동안 군간의 유의적인 체중 차이는 관찰되지 않았다 (Fig 2). 사료소비량측정결과 I3C을 투여한 군의 사료소모량은 CRF-1 기본사료만을 급여한 군에 비해 대부분의 측정시점에서 유의적인 증가를 나타내었다 (Fig 3).

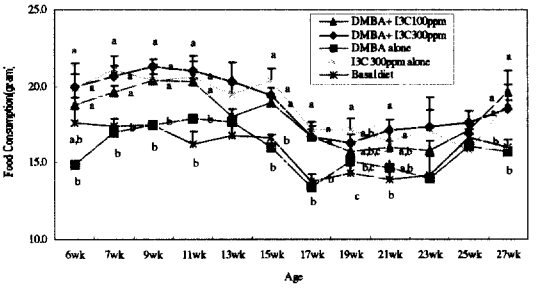

Fig. 3. Change of Food Consumption of Rats. Different superscript in the same age means different value significantly at P<0.05 by Duncans multiple range test.

2. 종양발생률 (tumor incidence)과 종양발생개수 (tumor multiplicity)의 측정 및 병리조직학적 검사

DMBA를 투여한 1군 (DMBA+I3C 100ppm), 2군 (DMBA+I3C 300ppm)과 3군 (DMBA alone)의 종양발생률은 각각 75.0%, 56.3%, 93.8%이었고, 종양발생개수는 각각 2.08±0.61, 1.19±0.32, 4.63±0.72로서 I3C 투여용량 의존적으로 유의성 있게 감소됨 (1군, 2군 각각 P<0.05, P<0.001)을 확인하였다 (Table 1). 주령별 종양발생 양상을 보면 3군에서 15주령에 종양이 처음 발생하였으며, I3C 급여에 의해 종양발

Table 1. Incidences and Multiplicities of Mammary Gland Tumors of Rats

Treatments	No. of rats	Total No. of tumors	No. of tumor bearing rats (Percent Incidence)	Tumor multiplicity
DMBA+I3C 100ppm	12	25	9 (75.0)	2.08±0.61[a]*
DMBA+I3C 300ppm	16	19	9 (56.3)	1.19±0.32**
DMBA alone	16	74	15 (93.8)	4.63±0.72
I3C 300ppm alone	4	0	0 (0)	0
Basal diet	4	0	0 (0)	0

Values in parenthesis are percentages
[a]Mean±S.E.
*Significantly different from the value of the DMBA alone group (P < 0.05)
**Significantly different from the value of the DMBA alone group (P < 0.001)

Table 2. Incidences and Multiplicities of Mammary Gland Tumors by Histopathological Finding

Treatments	No. of rats	Total No. of tumors	Incidences		Multiplicity	
			Adenoma	Adenocarcinoma	Adenoma	Adenocarcinoma
DMBA+I3C 100ppm	12	25	1/25 (4.0)	24/25 (96.0)	0.09±0.10[a]	2.09±0.66
DMBA+I3C 300ppm	16	19	2/19 (10.5)	17/19 (89.5)	0.13±0.14	1.07±0.34
DMBA alone	16	74	8/74 (10.8)	66/74 (89.2)	0.53±0.22	4.00±0.62

Values in parenthesis are percentages
[a]Mean±SE

Table 3. Classification of Mammary Gland Tumors by Histopathological Examination

Treatments	No. of rats	Total No. of tumors	Benign Tumor		Malignant Tumor		
			Adenoma	Fibroadenoma	Papillary carcinoma	Tubular carcinoma	Cribriform carcinoma
DMBA+I3C 100ppm	12	25	1	0	14	5	5
DMBA+I3C 300ppm	16	19	1	1	13	2	2
DMBA alone	16	74	6	2	53	7	6
Total	44	118	8	3	80	14	13

생이 지속적으로 억제되었다 (Fig 4). 발생한 종양은 총 118예이며, 종양의 병리조직학적 진단결과 양성은 11예 (9.3%), 악성은 107예 (90.7%)로 나타났다 (Table 2). 양성종양에서는 선종이 8예, 섬유선종이 3예로 나타났으며, 악성종양에서는 유두형 암종이 80예로 가장 높은 빈도를 보이며 (Fig 5), 관상형 암종이 14예, 사상형 암종이 13예가 나타났다. 1, 2, 3군 사이의 종양의 조직학적 형태에 따른 분포양상은 비슷하게 나타났다 (Table 3).

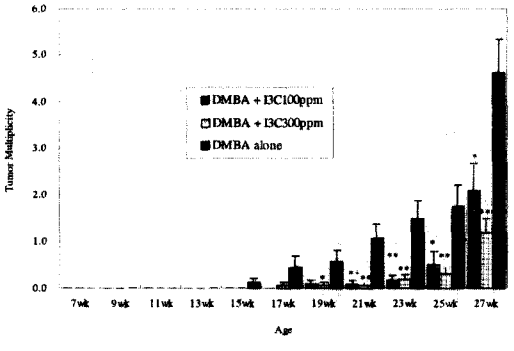

Fig 4. Multiplicity of Mammary Gland Tumors of Rats
* Significantly different from the values of the DMBA alone group (P<0.05)
** Significantly different from the values of the DMBA alone group (P<0.01)
*** Significantly different from the values of the DMBA alone group (P<0.001)

Fig 5. Mammary Gland Tumor of Rat. Note papillary growth of neoplastic cells. H&E, x200.

2. 면역조직화학적 염색에 의한 에스트로젠 수용체 α의 발현

유선종양에 있는 에스트로젠 수용체 α의 면역조직화학적 염색을 한 결과 다수의 상피세포와 일부 간질세포의 핵내에서 에스트로젠 수용체 α의 염색성이 나타났다. 상피세포는 대부분 강하게 발현되었으나 간질세포에는 약하게 발현되었다. 일부 세포에서는 세포질내에도 염색성이 나타났다. 종양의 조직학적 형태에 따른 에스트로젠 수용체 α 발현의 차이가 다소 존재하였다. 종양주변에 나타나는 정상 유선상피세포도 에스트로젠 수용체 α염색성을 보였으나 종양세포보다는 발현 정도가 약하게 관찰되었다 (Fig 6).

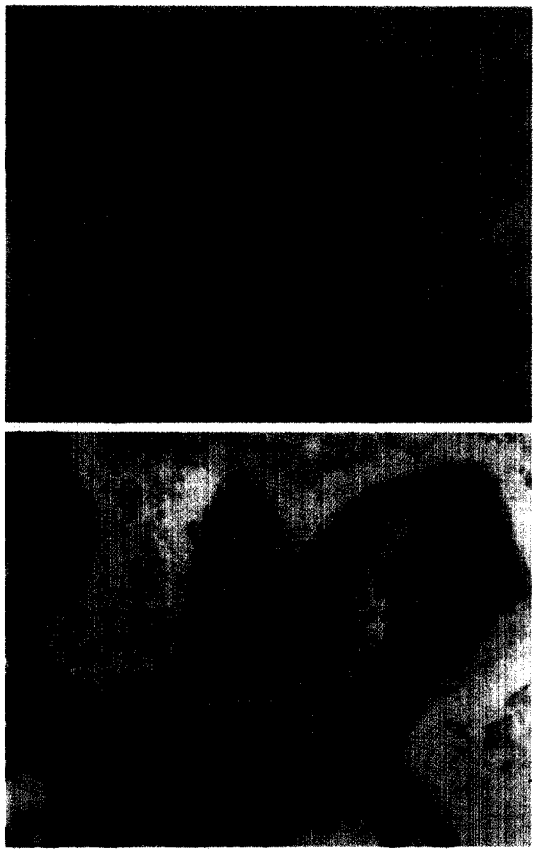

Fig. 6. Immunohistochemical Localization of ER α in Normal Mammary Gland and Mammary Gland Tumor of Rat. Some normal mammary gland epithelial cells showed weak to moderate immunoreactivities to ER α. Tumor cells as well as stromal cells were moderately to strongly positive for ER α. A: normal mammary gland, B: mammary gland tumor, ABC, x400.

고 찰

유선종양 유발물질로 사용한 DMBA는 간장에서 대사를 거쳐 활성화되고 활성화된 형태가 DNA와 결합하여 DNA 부가체를 형성하여 종양을 유발한다고 알려져 있다[19]. I3C은 생체내 조직에서 제일상 반응효소 활성화와 제이상 반응효소 활성화[20-24]를 촉진하여 발암물질을 효과적으로 제거하고, 에스트로젠의 2-hydroxylation을 촉진하여 에스트로젠의 생체내 활성을 감소시켜 발암억제 작용을 나타낼 것으로 기대되었다[25-27]. 본 실험에서는 DMBA 투여 일주일 전에 I3C을 사료에 섞어 섭취시켜 뚜렷한 유선종양 억제효과를 확인하였다. I3C을 경구로 투여한 경우에도 유선종양 억제양상이 관찰되었는데[28], 본 실험에서는 경구로 투여한 경우보다 투여용량이 약 25배 정도 낮은 용량이며 사료에 혼합하여 급여하였다. I3C을 기본사료에 섞어 최종농도 100 혹은 300ppm이 되도록 하였는데, 용량에 관계없이 I3C을 급여한 군의 사료소모량이 기본사료만 급여한 군의 사료소모량 보다 약 5g 정도 높게 나타났으며, 이러한 현상은 시험종료까지 지속되었다. 식이증가에 따른 랫드 유선종양 증가[29,30]와 제한식이에 의한 유선종양 감소[31]가 보고된 것으로 보아 사료섭취량 증가가 유선종양 발생에 적지 않은 상관관계가 있는 것으로 생각되기는 하지만 발암개시전 급여된 I3C에 의한 체내효소 활성화로 DNA 부가체가 효과적으로 배출된 경우에서는 유선종양 형성에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 하지만 최근 보고에 의하면 DMBA 투여 후에 I3C을 투여한 결과 유선종양 억제효과가 나타나지 않았고[32], MNU를 투여하고 I3C을 처치한 경우에도 억제효과가 소실되어[33] I3C의 작용시점에 따라 종양수식양상이 달라지는 것으로 나타났다. 또한 랫드에 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)를 처치하기 전에 I3C을 투여하면 DNA adduct가 감소되지만 PhIP 투여 후에 I3C를 적용하면 PhIP-DNA adduct 제거에 효과가 없는 것[34]으로 보아 발암물질 투여 후에는 I3C 투여에 의한 유선종양억제 효과를 기대하기 힘들 것으로 생각되며 발암물질을 초기에 제거하는 것이 중요한 것으로 보인다. 또 이런 I3C의 종양억제작용의 소실되는 것은 체내에서 형성된 I3C 대사체 중 몇몇이 에스트로젠 활성을 갖는 것과 일부 대사체가 aryl hydrocarbon receptor (AhR)에 대한 리간드로 작용하여 AhR 의존성 대사경로의 지속적 활성화를 유도하기 때문인 것으로 추측되고 있다[35,36].

발생한 종양 가운데 유두형 암종이 가장 높은 빈도를 나타내었으며, 군간의 종양의 조직학적 형태에 따른 분포양상은 비슷하게 관찰되어 I3C 급여에 따른 종양 형태의 차이는 관찰되지 않았다. 또 에스트로젠 수용체 α에 대한 면역조직화학적 염색에 있어서 정상유선보다 유선종양에서 에스트로젠 수용체 α의 발현이 증가되었으나 종양형태간의 발현의 차이가 다소 관찰되었다. 에스트로젠 수용체는 nuclear receptor superfamily의 한 종류이며, 에스트로젠과 결합하면 에스트로젠 수용체는 입체형태변화가 생겨 표적유전자에 결합할 수 있게 된다[37,38]. 에스트로젠 수용체는 1986년에 처음 클로닝되었고, 그 당시는 에스트로젠은 하나의 에스트로젠 수용체를 통해 매개되는 것으로 생각되어 졌다[39,40]. 하지만 1996년에 새로운 에스트로젠 수용체 (ER β)가 랫드 전립선 cDNA library로부터 클로닝되었으며[41], 이 ER β는 기존의 알려진 에스트로젠 수용체 (ER α)와 상당히 상동성이 높으나 몇몇 합성 또는 자연에 존재하는 리간드는 ER α와 ER β에 대해 다른 상대적 친화도를 갖으며 특히 식물성 에스트로젠 (phytoestrogen)의 일부는 ER β에 대한 강한 친화도를 갖는 것으로 보고되었다[42]. 여러 식물성 에스트로젠들이 ER β 발현에 미치는 영향에 대한 관심이

최근에 주목받고 있으며 이에 대한 연구가 호르몬 질환분야를 중심으로 활발히 진행되고 있다.

이와 같은 결과를 종합하여 볼 때 발암개시 전에 I3C의 급여에 의해 DMBA 유발 유선종양발생이 유의적으로 억제되었으며, 발암물질이 노출되기 전에 I3C를 투여한 경우에는 I3C이 효과적인 암예방 작용을 하는 것으로 판단된다.

결 론

본 연구에서는 DMBA 유발 랫드 유선암 모델을 이용하여 I3C이 발암과정에서 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 6주령부터 I3C이 100ppm 혹은 300ppm 농도로 함유된 사료를 급여하고 7주령 때에 DMBA로 발암을 유발한 후 27주령이 되었을 때 부검을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

DMBA를 투여한 1군 (DMBA+I3C 100ppm), 2군 (DMBA+I3C 300ppm)과 3군 (DMBA alone)의 종양발생률은 각각 75.0%, 56.3%, 93.8%이었고, 평균종양발생개수는 각각 2.08±0.61, 1.19±0.32, 4.63±0.72로 나타나서 I3C 투여에 의해 종양발생이 대조군인 3군에 비해 유의적으로 감소됨을 확인하였다 (1군, 2군 각각 $P<0.05$, $P<0.001$). 발생한 종양에 대한 병리조직학적 검사 결과 발생한 종양은 대부분이 악성으로 나타났다. 종양 안에 대부분의 상피세포는 에스트로젠 수용체 α의 강한 염색성을 나타내었다. 이와 같은 결과를 종합하여 볼 때 I3C 사료내 급여는 DMBA 유발 랫드 유선암 발생을 유의적으로 감소시키며, 발암물질 노출 전에 I3C이 투여되면 효과적인 암예방 작용을 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Broadbent TA, Broadbent HS. 1-1. The chemistry and pharmacology of indole-3-carbinol (indole-3-methanol) and 3-(methoxymethyl)indole. [Part I]. *Curr Med Chem*, 5:337-352, 1998.
2. Sharma S, Stutzman JD, Kelloff GJ, *et al.* Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res*, 54:5848-5855, 1994.
3. Dashwood RH, Arbogast DN, Fong AT, *et al.* Quantitative inter-relationships between aflatoxin B_1 carcinogen dose, indole-3-carbinol anti-carcinogen dose, target organ DNA adduction and final tumor response. *Carcinogenesis*, 10:175-181, 1989.
4. Kim DJ, Lee KK, Han BS, *et al.* Biphasic modifying effect of indole-3-carbinol on diethylnitrosamine- induced preneoplastic glutathione S-transferase placental form-positive liver cell foci in Sprague-Dawley rats. *Jpn J Cancer Res*, 85:578-583, 1994.
5. Wargovich MJ, Chen CD, Jimenez A, *et al.* Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer: evaluation of potential chemopreventive agents in the rat. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5:355-360, 1996.
6. Guo D, Schut HA, Davis CD, *et al.* 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*, 16:2931-2937, 1995.
7. Kojima T, Tanaka T, Mori H. Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female Donryu rats by dietary indole-3-carbinol. *Cancer Res*, 54:1446-1449, 1994.
8. Jin L, Qi M, Chen DZ, *et al.* Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. *Cancer Res*, 59:3991-3997, 1999.
9. Dashwood RH, Fong AT, Williams DE, *et al.* Promotion of aflatoxin B_1 carcinogenesis by the natural tumor modulator indole-3-carbinol: influence of dose, duration, and intermittent exposure on indole-3-carbinol promotional potency. *Cancer Res*, 51:2362-2365, 1991.
10. Kim DJ, Han BS, Ahn B, *et al.* Enhancement by indole-3-carbinol of liver and thyroid gland neoplastic development in a rat medium-term multiorgan carcinogenesis model. *Carcinogenesis*, 18:377-381, 1997.
11. Pence BC, Buddingh F, Yang SP. Multiple dietary factors in the enhancement of dimethylhydrazine carcinogenesis: main effect of indole-3-carbinol. *J Natl Cancer Inst*, 77:269-276, 1986.
12. Dashwood RH. Indole-3-carbinol: anticarcinogen or tumor promoter in brassica vegetables? *Chem Biol Interact*, 110:1-5, 1998.
13. 강진석, 김대중, 장동덕. 십자화과 유래의 식물성분인 Indole-3-carbinol (I3C) 및 대사체의 화학발암 및 암예방 수식효과. *대한암예방학회지*, 5:199-208, 2000.
14. Russo J, Russo IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat*, 39:7-20, 1996.
15. McGuire WL. Steroid hormone receptors in breast cancer treatment strategy. *Recent Prog Horm Res*, 36:135-156, 1980.
16. Duffy MJ. Biochemical markers as prognostic indices in breast cancer. *Clin Chem*, 36:188-191, 1990.
17. Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, *et al.* Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest*, 62:244-278, 1990.
18. Mann PC, Boorman GA, Lollini LO, *et al.* Proliferative Lesions of the Mammary Gland in Rats: In Standardized System of Nomenclature and Diagnostic Criteria, AFIP,

1-11, 1996.

19. Steele VE, Moon RC, Lubet RA, *et al.* Preclinical efficacy evaluation of potential chemopreventive agents in animal carcinogenesis models: methods and results from the NCI Chemoprevention Drug Development Program. *J Cell Biochem Suppl*, 20:32-54, 1994.
20. Vang O, Jensen MB, Autrup H. Induction of cytochrome P450IA1 in rat colon and liver by indole-3-carbinol and 5,6-benzoflavone. *Carcinogenesis*, 11:1259-1263, 1990.
21. Xu M, Schut HA, Bjeldanes LF, *et al.* Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-DNA adducts by indole-3-carbinol: dose-response studies in the rat colon. *Carcinogenesis*, 18:2149-2153, 1997.
22. Stresser DM, Bailey GS, Williams DE. Indole-3-carbinol and beta-naphthoflavone induction of aflatoxin B_1 metabolism and cytochromes P-450 associated with bioactivation and detoxication of aflatoxin B_1 in the rat. *Drug Metab Dispos*, 22:383-391, 1994.
23. Manson MM, Ball HW, Barrett MC, *et al.* Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver: induction of phase I and II drug metabolizing enzymes and aflatoxin B_1 metabolism. *Carcinogenesis*, 18:1729-1738, 1997.
24. Staack R, Kingston S, Wallig MA, *et al.* A comparison of the individual and collective effects of four glucosinolate breakdown products from brussels sprouts on induction of detoxification enzymes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 149:17-23, 1998.
25. Jellinck PH, Michnovicz JJ, Bradlow HL. Influence of indole-3-carbinol on the hepatic microsomal formation of catechol estrogens. *Steroids*, 56:446-450, 1991.
26. Jellinck PH, Forkert PG, Riddick DS, *et al.* Ah receptor binding properties of indole carbinols and induction of hepatic estradiol hydroxylation. *Biochem Pharmacol*, 45:1129-1136, 1993.
27. Bradlow HL, Sepkovic DW, Telang NT, *et al.* Indole-3-carbinol. A novel approach to breast cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*, 768:180-200, 1995.
28. Grubbs CJ, Steele VE, Casebolt T, *et al.* Chemoprevention of chemically-induced mammary carcinogenesis by indole-3-carbinol. *Anticancer Res*, 15:709-716, 1995.
29. Clinton SK, Alster JM, Imrey PB, *et al.* Effects of dietary protein, fat and energy intake during an initiation phase study of 7,12-dimethylbenz[a] anthracene-induced breast cancer in rats. *J Nutr*, 116:2290-2302, 1986.
30. Clinton SK, Li PS, Mulloy AL, *et al.* The combined effects of dietary fat and estrogen on survival, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced breast cancer and prolactin metabolism in rats. *J Nutr*, 125:1192-1204, 1995.
31. Mehta RS, Harris SR, Gunnett CA, *et al.* The effects of patterned calorie-restricted diets on mammary tumor incidence and plasma endothelin levels in DMBA- treated rats. *Carcinogenesis*, 14:1693-1696, 1993.
32. Malejka-Giganti D, Niehans GA, Reichert MA, *et al.* Post-initiation treatment of rats with indole-3-carbinol or β-naphthoflavone does not suppress 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary gland carcinogenesis. *Cancer Lett*, 160:209-218, 2000.
33. Kang JS, Kim DJ, Ahn B, *et al.* Post-initiation treatment of Indole-3-carbinol did not suppress *N*-methyl-*N*-nitrosourea induced mammary carcinogenesis in rats. *Cancer Lett*, 169:147-154, 2001.
34. He YH, Smale MHE, Schut HAI. Chemopreventive properties of Indole-3-carbinol (I3C): Inhibition of DNA adduct formation of the dietary carcinogen, 2-amino-1 -methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), in female F344 rats. *J of Celluar Biochem Suppl*, 27:42-51, 1997.
35. Riby JE, Feng C, Chang YC, *et al.* The major cyclic trimeric product of indole-3-carbinol is a strong agonist of the estrogen receptor signaling pathway. *Biochemistry*, 39:910-918, 2000.
36. Bjeldanes LF, Kim JY, Grose KR, *et al.* Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 88:9543-9547, 1991.
37. Murdoch FE, Gorski J. The role of ligand in estrogen receptor regulation of gene expression. *Mol Cell Endocrinol*, 78:C103-108, 1991.
38. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*, 63:451-486, 1994.
39. Green S, Walter P, Greene G, *et al.* Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem*, 24:77-83, 1986.
40. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, *et al.* Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, 231:1150-1154, 1986.
41. Kuiper GGJM, Enmark E, Pelto-Huikko M, *et al.* Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:5925-5930, 1996.
42. Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, *et al.* Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138:863-870, 1997