

해양심층수의 cytochrome P450 1A1, aromatase 및 MMP-9 활성 억제 효과

손윤희^{1,2} · 김미경¹ · 남경수^{1,3*}

¹동국대학교 지역연고산업진흥사업단, ²난치병한양방치료연구소, ³의과대학 약리학교실

Received February 20, 2008 / Accepted March 19, 2008

Effect of Deep Sea Water on Cytochrome P450 1A1, Aromatase and MMP-9. Yun-Hee Shon^{1,2}, Mee-Kyung Kim¹ and Kyung-Soo Nam^{1,3*}. ¹Regional Innovation System, ²Intractable Disease Research Center and ³Department of Pharmacology, College of Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea. - Deep sea water from the East sea was tested for breast cancer chemoprevention and metastasis by measuring the activities of cytochrome P450 1A1 and aromatase, invasiveness, and activity and expression of matrix metalloproteinase (MMP)-9 in breast MDA-MB-231 cancer cell. The *in vitro* incubation of rat liver microsome with deep sea water (a hardness range of 100~1,000) showed a hardness-dependent inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced cytochrome P450 1A1 activity. Deep sea water showed 27.1, 45.4 and 51.9% inhibition of microsomal aromatase activity at the hardness of 600, 800 and 1,000, respectively. In addition deep sea water inhibited not only the invasiveness of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-treated MDA-MB-231 cells through matrigel-coated membrane in a hardness-dependent manner but also the activity and expression of MMP-9 in MDA-MB-231 cell.

Key words : Deep sea water, cytochrome P450 1A1, aromatase, matrix metalloproteinase, breast cancer chemoprevention

서 론

유방암은 전 세계적으로 매년 약 100만명의 새로운 환자가 발생하며, 우리나라에서도 식생활의 서구화, 출산율과 모유수유 감소 및 환경의 변화 등으로 인해 유방암 환자가 수년 동안 지속적으로 증가하여 2002년에는 새로 발생한 암환자 중에서 증가율 1위를 차지하였다. 또한 우리나라의 유방암 발병연령은 40~50대로 서구여성의 60~70대에 비해 낮은 추세를 보이고 있다[13]. 이에 최근 유방암연구는 암의 치료보다는 예방법의 개발에 중점을 두고 있으며, 유방암예방 효과와 관련된 물질탐색에 많은 노력을 기울이고 있다[8].

Cytochrome P450 약물대사 효소계는 생체 내외의 각종 유해물질, 발암이나 돌연변이 등을 유발시키는 여러 화학물질의 체내 활성화를 유도하여 암의 개시(initiation)를 유발시키는 것으로 알려져 있으며[5], 이 효소들 중에서 사람의 유선상피세포에서 활성이 검정된 것은 cytochrome P450 1A1, 2B6 및 2E1이다[6]. Aromatase는 aromatase cytochrome P450 효소복합체로서 유방암세포의 증식을 위해 필수요인이 되는 estrogen 합성의 핵심적인 효소이다. Aromatase 발현 및 활성 증가가 유방종양에서 나타나며 종양증식에 중요한 역할을 하는 것으로 증명되었으며[2] Aromatase 활성 억제제 개발을 통한 유방암 예방 및 치료제 개발에 관심이 모아

지고 있다.

암은 초기에는 비교적 치료가 가능하지만 전이(metastasis)가 일단 진행되면, 치료가 어려워 사망하게 된다[26]. 그러므로 암의 치료에 있어서 암 발생을 막는 것뿐만 아니라 암의 진행단계를 차단시켜 전이를 예방하는 것도 중요하다. 암의 전이는 암세포가 1차 조직으로부터 다른 부위나 장기로 이동하면서 일어나는 세포 진행의 형태로서[20], cell adhesion과 세포외기질을 분해하는 것을 특징으로 한다[1]. 따라서 암세포가 침윤(invasion) 및 전이를 위해서는 세포외기질 또는 기저막의 파괴가 이루어져야 하며, 특히 기저막의 주성분을 이루는 type IV collagen의 분해가 필수적이다. Matrix metalloproteinases (MMPs)는 세포외기질과 기저막을 분해하는 아연 의존적 효소군으로서 종양의 침윤과 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[10]. MMPs는 세포 내에서 불활성의 proenzyme의 형태로 합성되지만 세포 밖으로 분비된 후 스스로 혹은 조직 내의 특정한 효소에 의해 또는 아연과 칼슘이온에 의해 활성을 나타내며, embryonic development, normal tissue remodeling, growth, wound healing과 관련이 있다[25]. MMPs가 과다발현되면 생리적 조절이 정상적으로 되지 못하며, 암세포의 증식, 침윤, 전이, 종양 등을 활성화시킨다[4]. 그 중에서도 기저막의 주요성분인 type IV collagen을 분해하는 MMP-9이 암 전이에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다[12].

해양심층수는 태양광이 도달하지 않는 수심 200 m 이상에 있는 저온수로서 해양식물의 생장에 필수적인 영양염류가 풍부하고 장기간 숙성된 해수자원[9]으로 그 응용 폭이 점

*Corresponding author

Tel : +82-54-770-2412, Fax : +82-54-770-2477

E-mail : namks@dongguk.ac.kr

차 증가되고 있다. 해양심층수의 난치질환에의 응용 및 의학 적 효능 규명을 목적으로 본 실험에서는 동해안 해양심층수 의 지방암 예방 및 전이 억제효과를 살펴보기 위해 cytochrome P450 1A1, aromatase 및 MMP-9 활성화에 미치는 효 과를 측정하였다.

재료 및 방법

시 약

RPMI 1640 medium, antibiotics, NADPH, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), potassium phosphate buffer, ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), glucose-6-phosphate dehydrogenase, ethoxyresorufin, resveratrol, Triton X-100, Tris-HCl, EGCG, bicinchoninic acid protein kit는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서, 1β - ^3H (N)]androst-4-ene-3,17-dione은 PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA, USA)에서, matrigel 과 coomassie brilliant blue는 BD Biosciences (Bedford, MA, USA)에서, 4-nitro blue tetrazolium chloride와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate substrate는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 웰진 사 (Daegu, Korea)제품을 사용하였다. MMP-9 antibody (mouse monoclonal IgG₁)는 NeoMarker (Bedford, CA, USA) 에서, biotin-rabbit-anti-mouse IgGAM는 Zymed (San Francisco, CA, USA)에서 구입하였고, transwell cell culture chamber는 Costar (Corning, NY, USA)에서 구입하였으며, 기 타 시약은 특급시약을 사용하였다.

시 료

본 실험에 사용된 해양심층수는 동해의 해저 1,100 m에서 취수하여 역삼투압 시스템으로 탈염과 농축을 하였으며, 탈 염된 해양심층수(경도 0)와 여기에 미네랄을 첨가하여 경도 4,000[11]으로 조절된 해양심층수를 (주)워터비스(Seoul, Korea)로부터 제공받아 회석하여 실험에 사용하였다.

세포배양

계대 보존 중인 사람의 지방암 세포인 MDA-MB-231 세포 는 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640을 배양액으 로 하여 CO₂ 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 배양하였고, 배양액 은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 이들 세포는 액체질 소에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹 여서 실험에 사용하였으며, 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

태반의 aromatase 준비

사람의 태반조직은 1% KCl과 potassium phosphate buf fer로 세척한 후, sucrose, potassium phosphate buffer, di-

thiothreitol과 NADPH가 포함된 용액에서 균질화시킨 후 원 심분리하였다(800× g, 15분). 그리고 상층액은 10,000× g에서 15분간 다시 원심분리한 후, 그 상층액은 단백질 정량 후 -70°C에 보관하였다.

Cytochrome P450 1A1 활성

7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA, 30 mg/마리)를 처리한 흰쥐의 간조직으로부터 마이크로솜의 분리는 Phol과 Fouts의 방법[16]을 이용하였다. Cytochrome P450 1A1은 ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 활성으로 측정하였다 [18]. 즉, 흰쥐(SD계 rat)로부터 분리한 microsomal protein (2 mg/ml) 200 μl에 640 μl의 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5), 100 μl의 BSA (10 mg/ml in Tris-HCl buffer), 20 μl의 0.25 M MgCl₂, 40 μl의 cofactor solution, 2.5 units의 glu cose-6-phosphate dehydrogenase, 10 μl의 기질(1 mg of ethoxyresorufin in 10 ml of methanol)과 10 μl의 해양심층 수를 경도별로 첨가하였다. 모든 시약들을 잘 섞은 후 37°C 에서 4분간 반응시키고, 2 ml의 methanol로 반응을 종결시 켜다. 2,000× g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하 고, 분광형광광도계(RF-5301PC, Shimadzu, Japan)로 측정 (550 nm excitation and 585 nm emission) 하였다. 양성대조 군은 resveratrol을 사용하였고, 음성대조군으로는 증류수를 사용하였다. 이 실험은 3회 반복 실험으로 수행하였으며, 각 각의 결과는 control에 대한 각 시료들의 저해도 정도를 %로 나타내었다.

Aromatase 활성

Aromatase 활성은 Thompson과 Siiteri의 방법[24]을 변형 하여 실시하였다. 즉, 기질[1β - ^3H (N)]androst-4-ene-3,17-d-ione (specific activity 24.7 Ci/mmol, 100 nM), 태반 마이크 로솜(40 μg), progesterone (10 μM), bovine serum albumin (0.1%), potassium phosphate buffer (67 mM, pH 7.4)와 시 료를 포함한 반응액 500 μl를 상온에서 10분간 반응시켰다. 그리고 12 mM NADPH를 반응액에 넣고 37°C에서 10분간 다시 반응시킨 후 5% TCA로 반응을 중단시켰다. 1,000× g에 서 10분간 원심분리 후 동량의 chloroform으로 반응시킨 후 그 상층액은 dextran-charcoal 혼합액에 옮긴 후 원심분리하 고 상층액의 radioactivity를 측정하였다.

세포의 침윤성

세포의 침윤성은 Platet 등[15]의 방법을 변형하였으며, transwell cell culture chamber를 이용하여 분석하였다. 8 μm 의 구멍크기를 가진 polycarbonate 필터에 1:10의 비율로 회 석한 matrigel을 넣고 37°C에서 24시간 동안 건조시켰다. MDA-MB-231 cells (1×10^4 cells/well)은 matrigel로 코팅된 insert chamber에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한

후 위층 chamber에는 경도별 해양심층수를 포함한 무혈청 RPMI 1640 배지를, 아래 chamber에는 경도별 해양심층수와 세포유도물질로서 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지를 각각 500 μ l씩을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 위층 chamber내의 배지를 제거하고, 100% methanol에 침지하여 membrane 아래표면을 고정시킨 다음 haematoxylin과 eosin Y로 염색하였다. 염색된 membrane은 멸균수로 세척하고 matrigel이 도포된 면을 면봉으로 깨끗이 닦아낸 다음 핀셋으로 membrane을 떼어내어 유리판에 고정하여 현미경으로 관찰하고 침윤을 보이는 세포 수를 측정하였다.

Gelatin zymography

MMP-9의 활성을 알아보기 위하여 Huang 등[7]의 방법을 참고로하여 gelatin zymography를 실시하였다. 세포는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 배양액으로 사용하여 5×10^5 cells/well로 6-well에 분주하였다. 24시간 배양한 후, 무혈청 RPMI 1640 배지로 3번 씻어낸 뒤 150 nM TPA와 해양심층수를 경도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그리고 상층액을 회수하여 계측한 세포수로 그 용량을 표준화하여 MMP-9 (gelatinase)의 활성을 측정하였다. 즉, 상층액을 10 \times nonreducing sample buffer [120 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 28.8 mM 2-mercaptoethanol 0.2% (w/v) bromophenol blue]와 섞어 0.1% (w/v) gelatin이 포함된 10% SDS-PAGE gel에 전기영동하였다. 그 후 gel을 2.5% (v/v) Triton X-100에서 1 시간 동안 shaking하면서 SDS를 제거한 후, 3차 증류수로 Triton X-100을 씻어내었다. 그리고 gel을 developing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl₂, 0.01% NaN₃)에 넣어 37°C에서 18시간 동안 shaking하면서 반응시키고 stain solution (0.05% coomassie brilliant blue, 45% methanol과 10% acetic acid)으로 30분 이상 염색시킨 후 destain solution (10% methanol과 10% acetic acid)으로 투명 밴드가 나타날 때까지 탈색시켰다.

Western blot (MMP-9)

HT-29 세포에서 MMP-9의 단백질 발현을 관찰하기 위하여 Western blot을 시행하였다. 세포(5×10^5 cells/well)를 6 well plate의 각 well에 24시간 부착시킨 후에 해양심층수를 경도별로 처리하여 37°C CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 모아 centrifugal filter devices (30 kDa, Millipore, Bedford, USA)로 10배 농축한 액의 단백질은 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 하였다. 전기영동 후 PVDF 막으로 이동시켜 ponceau 용액으로 이동유무를 확인한 후, 5% non-fat dry milk 용액으로 30분간 실온에서 반응하여 차단하였다. 그리고 차단용 완충액으로 희석한 1차 항체 MMP-9

(mouse monoclonal IgG₁)와 막을 2시간 이상 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Tris-Tween buffered saline (TTBS)을 사용하여 5분 간격으로 3회 세척하였다. 계속하여 2차 항체 biotin-rabbit-anti-mouse IgGAM으로 반응시키고 다시 한번 TTBS로 3회 세척하였다. 세척이 끝나면 alkaline phosphate-conjugated streptavidin으로 반응시킨 후 4-nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate substrate로 band를 가시화하였다. 가시화되어 나타난 band의 두께를 비교하여 단백질 발현 유무 및 그 차이를 확인하였다.

결과 및 고찰

Cytochrome P450 1A1의 활성 저해 효과

해양심층수가 유방암 유발의 대표적인 발암물질인 DMBA에 의해 유도된 cytochrome P450 1A1 효소활성 억제율을 측정 한 결과, 해양심층수를 경도별(100~1,000)로 처리했을 때 cytochrome P450 1A1 효소 활성 저해율은 1.2~18.0%를 나타내었다(Fig. 1).

에스트로젠은 유방상피세포의 분열능을 증가시켜 발암의 위험성을 증가시키며, 에스트로젠 대사물이 DNA adduct를 형성하여 돌연변이를 일으킴이 증명되었다[14]. 특히 에스트로젠은 cytochrome P450에 의해 산화되며 C-4나 C-16에서의 산화에 의하여 돌연변이물질로 변성된다. Tamoxifen이 cytochrome P450 효소 활성억제효과가 있으며 이것이 tamoxifen의 암예방효과의 중요한 기작이라는 보고가 있었다[22]. 그러므로 본 논문의 실험결과에 의하면 해양심층수가 cytochrome P450 1A1 효소활성을 억제시키고 이러한 활성은 유선조직에서 발암물질의 활성을 억제시킬 가능성이 있을 것이다.

Aromatase 활성 저해 효과

사람의 태반에서 분리한 aromatase의 활성에 해양심층수

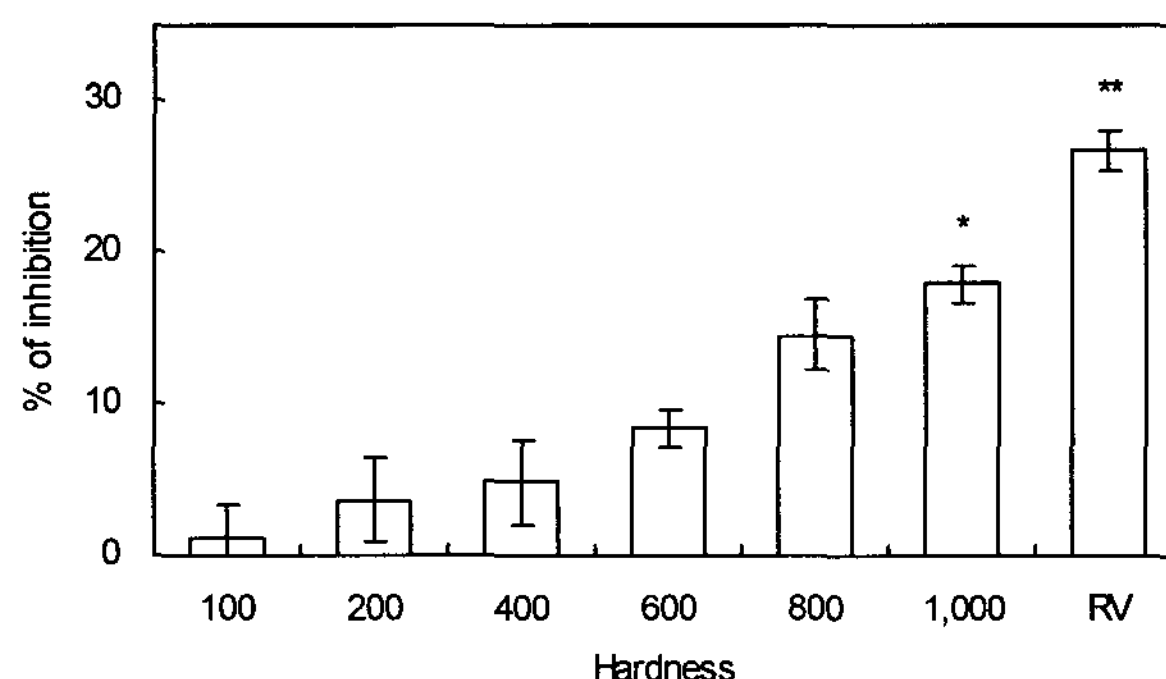


Fig. 1. Effect of deep sea water on DMBA-induced cytochrome P450 1A1 activity. RV, 0.05 nM resveratrol. Indicated values represent mean \pm SD (n=3). **p*<0.05 and ***p*<0.01 compared with the control.

가 미치는 효과를 측정하였다. 그리고 aromatase 저해제의 양성대조군으로는 1 μM aminoglutethimide를 사용하였다. 그 결과, 해양심층수는 경도의존적으로 aromatase 활성을 저해하였으며, 그 저해율은 5.6~51.9% 정도로 나타났다 (Fig. 2).

호르몬 의존성 유방암은 에스트로젠이 세포분열을 증가시키는 물질로 알려져 있으며, 특히, 폐경이후 에스트로젠 과다생성이 유방암 발병과정에 중요한 생물학적 요인으로 증명되었다[2]. 에스트로젠은 androgen이 aromatase에 의한 수산화 반응 후에 생성되며 유방암 발생에 중요한 영향을 미친다. 유방암 세포에서 에스트로젠 합성에 관여하는 aromatase의 활성 증가는 유방암의 진행에 중요한 요인이다. Aromatase 활성은 유방조직에서도 증명되었으며 종양자체에서의 aromatase 활성 증가와 estrogen 생성이 증명되었다 [19]. 그러므로 aromatase 활성저해는 인체내 에스트로젠의 함량을 감소시켜 유방암의 유발을 억제할 수 있는 가능성을 가지고 있으므로 해양심층수는 aromatase 활성 감소효과에 의하여 유방암 유발을 억제할 수 있을 것으로 보인다.

세포의 침윤성

해양심층수 처리로 인한 MDA-MB-231 세포의 침윤성 변화를 관찰하기 위해 생체 기저막 단백질 matrigel로 코팅된 막을 통과하는 세포수를 측정 한 결과, 해양심층수의 경도 200~1,000을 처리하였을 때 세포의 침윤성이 73.7~29.4%로 경도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3). 침윤성은 암 전이에 중요한 단계로 기저막과 기질단백의 변성이 일어나며 단백질 분해 효소에 의해 진행된다[23]. 따라서 해양심층수는 유방암세포의 침윤성을 감소시켜 유방암 전이과정을 저해할 수 있을 것이다.

MMP-9 활성 및 단백질 발현 억제 효과

해양심층수를 경도별로 처리하였을 때 MDA-MB-231 세

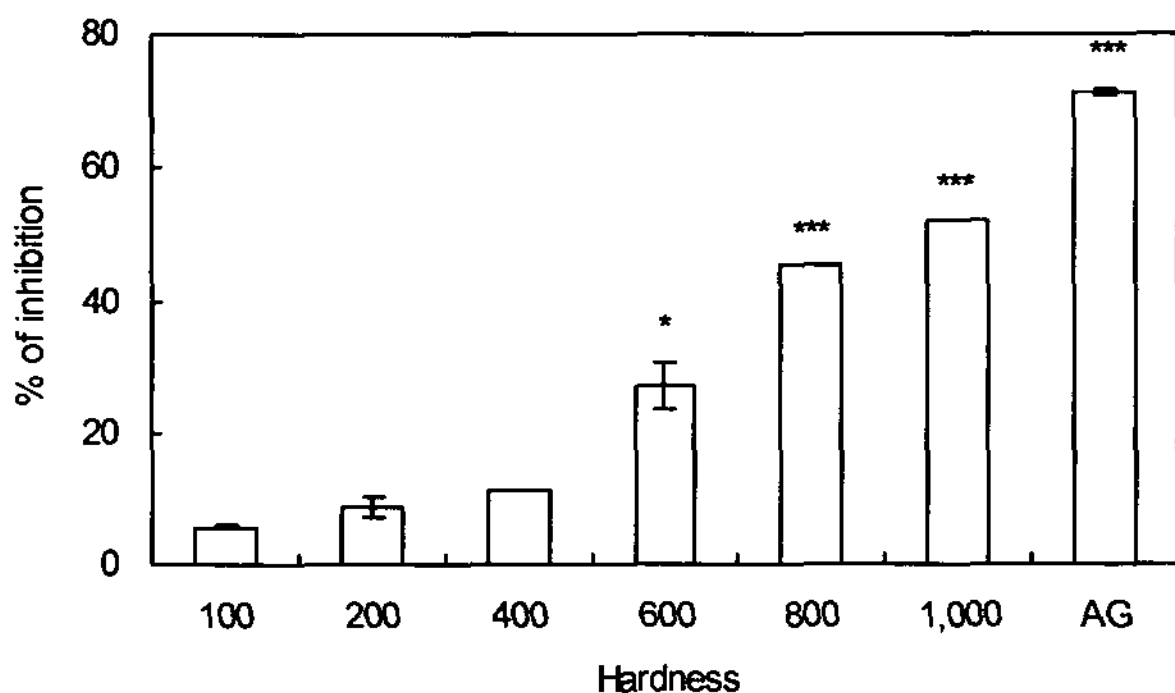


Fig. 2. Inhibition of human placental aromatase activity by deep sea water. AG, 1 μM aminoglutethimide. Indicated values represent mean±SD (n=3). *p<0.05 and ***p<0.005 compared with the control.

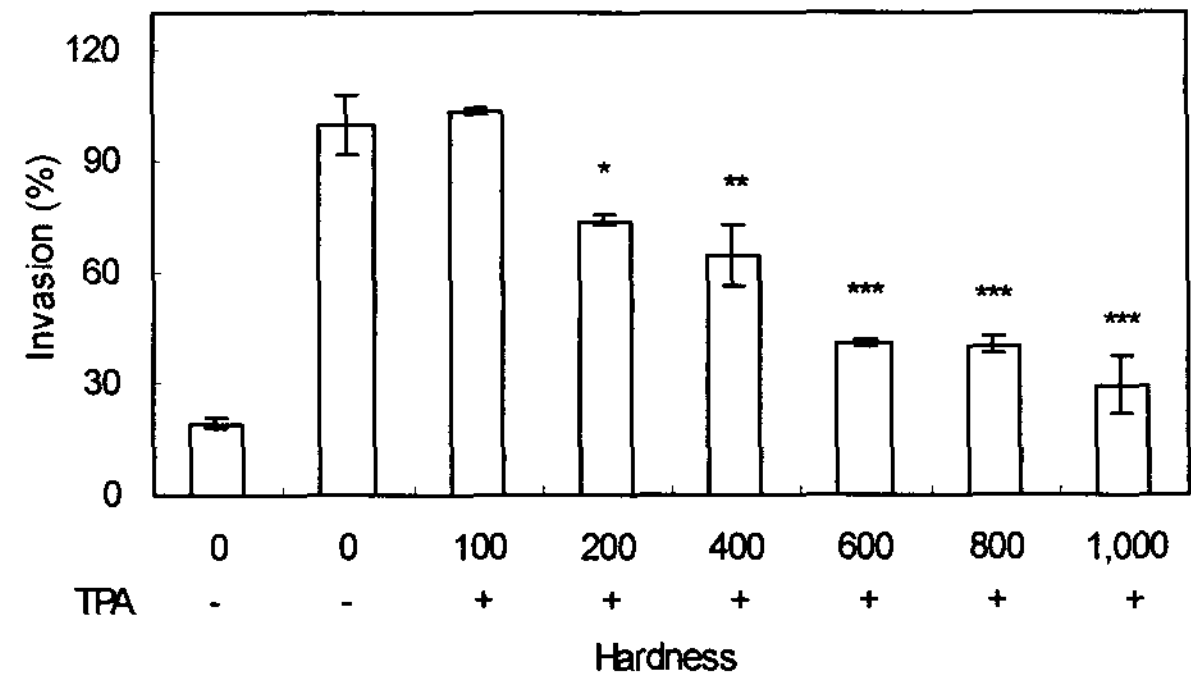


Fig. 3. Effect of deep sea water on TPA-induced invasiveness of MDA-MB-231 human breast cancer cells. Indicated values represent mean±SD (n=3). *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.005 compared with the control.

포의 침윤성이 경도의존적으로 감소함을 보였으므로 세포의 침윤 시 작용하는 단백질 분해 효소인 MMP-9의 활성과 단백질 발현에 해양심층수가 미치는 영향을 살펴보기 위해 zymography로 MMP-9의 활성을, Western blot으로 MMP-9의 단백질 발현을 측정하였다. 그 결과 해양심층수를 처리하였을 때 경도 0에 TPA를 처리한 대조군에 비해 MMP-9 활성 및 단백질 발현 모두가 억제되었으며 경도의존적으로 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 4).

암세포의 침윤(invasion)과 전이(metastasis)는 세포 부착성, 단백질 분해효소에 의한 세포외기질의 분해 그리고 세포 전이에 영향을 미치는 이동성 요인들을 수반하는 복잡한 다단계 과정이다[20]. Matrix metalloproteinases (MMPs)는 20종의 단백질 분해 효소군으로서 세포외기질 분해에 중요한 작용을 한다[4]. MMP 생성은 전이가능성이 더 높은 암세포의 지표가 되고 MMP 활성의 촉진은 유방암에서 발견되어졌다[3,21]. 이와 같이 MMP-9는 세포의 기질분해와 신생혈관 생성에 관여하여 암세포의 침윤을 진행시키므로[17] MMP-9의 활성 및 발현 정도가 해양심층수 처리에 의해 감소되었다는 것은 기저막 분해 감소로 이어져 침윤과정이 감소될 것으로 사려된다.

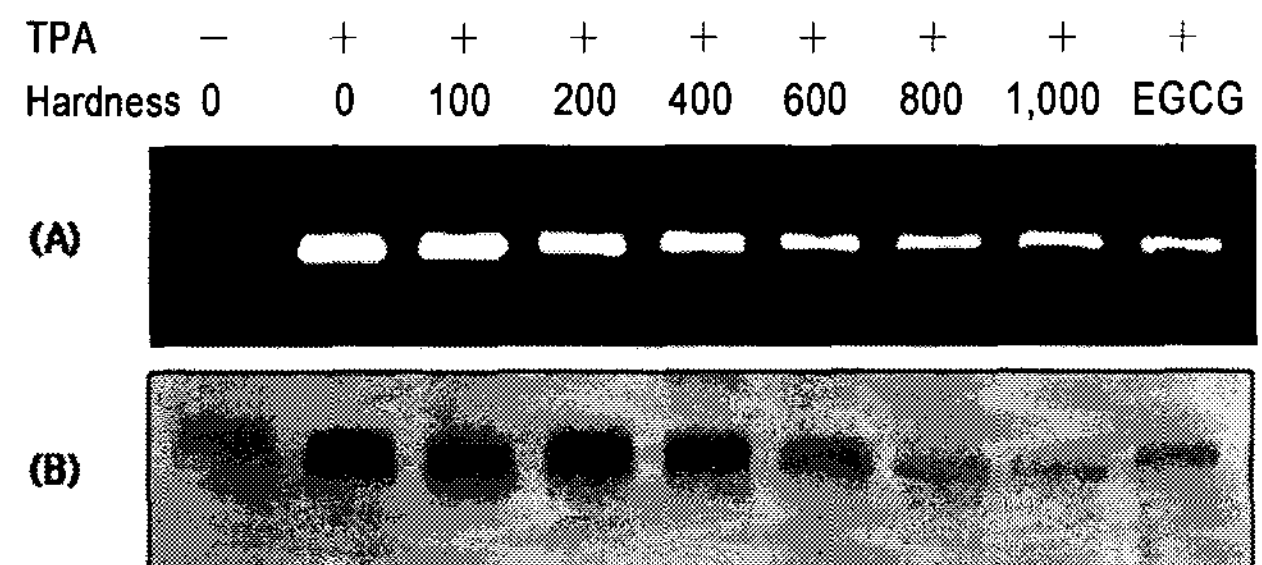


Fig. 4. Effect of deep sea water on activity (A) and expression (B) of MMP-9 in MDA-MB-231 human breast cancer cells. EGCG, 20 μM epigallocatechin gallate from green tea.

요 약

동해 해양심층수의 유방암예방 효능과 전이에 미치는 영향을 알아보기 위해 cytochrome P450 1A1 활성과 aromatase 활성 및 유방암세포의 침윤성, 이와 관련된 MMP-9의 활성과 그 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 해양심층수는 체내외의 여러 화학물질을 체내에서 활성화시켜 발암이나 돌연변이 등을 유발시키는 것으로 알려진 cytochrome P450 1A1을 경도의존적으로 저해시켰다. 또한 호르몬 의존성 유방암의 진행에 관여하는 aromatase의 활성도 경도의존적으로 저해시켰다(5.6~51.9%). 해양심층수 처리에 의해 사람유방암세포인 MDA-MB-231 세포의 침윤성은 73.7~29.4%로 감소하였으며, 세포의 침윤시 작용하는 단백질 분해 효소인 MMP-9의 활성과 단백질 발현도 경도의존적으로 억제되었다. 따라서 해양심층수는 유방암 예방과 전이관련의 더 많은 연구에 의해 유방암 예방과 전이 억제작용을 증명할 수 있을 것으로 보인다.

References

- Benaud, C., R. B. Dickson and E. W. Thompson. 1998. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **50**, 97-116.
- Brodie, A., Q. Lu and J. Nakamura. 1997. Aromatase in the normal breast and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **61**, 281-286.
- Brown, P., R. Bioxidge, E. Anderson and A. R. Howlett. 1993. Expression of activated gelatinase in human breast carcinoma. *Clin. Exp. Metast.* **11**, 183-189.
- Chang, C. and Z. Werb. 2001. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* **11**, s37-s43.
- Firozi, P. F., M. L. Bondy, A. A. Sahin, P. Chang, F. Lukmanji, E. S. Singletary, M. M. Hassan and D. Li. 2002. Aromatic DNA adducts and polymorphisms of CYP 1A1, NAT2, and GSTM1 in breast cancer. *Carcinogenesis* **23**, 301-306.
- Forrester, L. M., J. D. Hayes, R. Millis, D. Barnes, A. L. Harris, J. J. Schlager, G. Powis and C. R. Wolf. 1990. Expression of glutathione S-transferases and cytochrome P450 in normal and tumor breast tissue. *Carcinogenesis* **11**, 2163-2170.
- Huang, Q., H. M. Shen and C. N. Ong. 2004. Inhibitory effect of emodin on tumor invasion through suppression of activator protein-1 and nuclear factor-kappaB. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 361-371.
- Jiang, J., V. Slivova and D. Sliva. 2006. Ganoderma lucidum inhibits proliferation of human breast cancer cells by down-regulation of estrogen receptor and NF-kappaB signaling. *Int. J. Oncol.* **29**, 695-703.
- Jung, D. H., H. J. Kim and H. I. Park. 2004. A study on the behavior of flexible riser for upwelling deep ocean water by a numerical method. *J. Korean Ocean Engineers* **18**, 15-22.
- Kermorgant, S., T. Aparicio, V. Dessirier, M. J. Lewin and T. Lehy. 2001. Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhancer motility and protease overproduction. Evidence for PI3 kinase and PKC involvement. *Carcinogenesis* **22**, 1035-1042.
- Miyamura, M., S. Yoshioka, A. Hamada, D. Takuma, J. Yokota, M. Kusunose, S. Kyotani, H. Kawakita, K. Odani, Y. Tsutsui and Y. Nishioka. 2004. Difference between deep seawater and surface seawater in the preventive effect of atherosclerosis. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1784-1787.
- Nangia-Makker, P., T. Raz, L. Tait, V. Hogan, R. Fridman and A. Raz. 2007. Galectin-3 cleavage: a novel surrogate marker for matrix metalloproteinase activity in growing breast cancers. *Cancer Res.* **67**, 11760-11768.
- National Cancer Center. 2007. *Annual report of the Korean central cancer registry program*. pp. 17, Ministry of Health and Welfare, Seoul.
- Pike, M. C., D. V. Spicer, L. Dahmouh and M. F. Press. 1993. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol. Rev.* **15**, 17-35.
- Platet, N., C. Prevostel, D. Derocq, D. Joubert, H. Rochefort and M. Garcia. 1998. Breast cancer invasiveness: correlation with protein kinase C activity and differential regulation by phorbol ester in estrogen receptor-positive and -negative cells. *Int. J. Cancer* **75**, 750-756.
- Pohl, R. J. and J. R. Fouts. 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal. Biochem.* **107**, 150-155.
- Riedel, F., K. Gotte, J. Schwalb, W. Bergler and K. Hormann. 2000. Expression of 92-kDa type IV collagenase correlate with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **17**, 1099-1105.
- Rodrigues, A. D. and R. A. Prough. 1991. Induction of cytochromes P450 1A1 and P450 1A2 and measurement of catalytic activities. *Methods Enzymol.* **206**, 423-431.
- Simpson, E. R., M. S. Mahendroo, G. D. Means, M. W. Kilgore, M. M. Hinshelwood, S. Graham-Lorence, B. Amarnah, Y. Ito, C. R. Fisher and M. D. Michael. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* **15**, 342-355.
- Song, I. H. 2004. Cancer metastasis and metastasis suppressors. *Korean J. Gastroenterology* **43**, 1-7.
- Sreenath, T., L. M. Matrisian, W. Stetler-Stevenson, S. Gattoni-Celli and R. O. Pozzatti. 1992. Expression of matrix metalloproteinases genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. *Cancer Res.* **52**, 4942-4947.
- Sridar, C., U. M. Kent, L. M. Notley, E. M. Gillam and P. F. Hollenberg. 2002. Effect of tamoxifen on the enzymatic activity of human cytochrome CYP2B6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 945-952.

23. Stetler-Stevenson, W. G. 1990. Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **9**, 289-303.
24. Thompson, E. A. Jr. and P. K. Siiteri. 1974. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J. Biol. Chem.* **249**, 5364-5372.
25. Woessner, J. F. Jr. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB. J.* **5**, 2145-2154.
26. Yoon, H. S., S. H. Hong, H. J. Kang, X. Xu and S. H. Ahn. 2003. Survival analysis and its prognostic factors after distant relapse in breast cancer patients. *J. Korean Surg. Soc.* **64**, 101-108.