

In vitro에서의 텁싸리하고초의 유방암 예방효소 활성에 미치는 영향

손윤희 · 김미경 · 박선동¹ · 남경수^{1*}

동국대학교 난치병한양방치료연구센터,

1: 심혈관계질환 천연물개발연구센터 및 의과대학 약리학교실

Effect of *Thesium Chinense* Turczaninow on Breast Cancer Chemopreventive enzyme activity in *In vitro*

Yun Hee Shon, Mee Kyung Kim, Sun Dong Park¹, Kyung Soo Nam^{1*}

Intractable Diseases Research Center,

1: Cardiovascular Medical Research Center and Department of Pharmacology, College of Medicine, Dongguk University

The effect of water extract from *Thesium chinense* Turczaninow (TCTW) on proliferation of human breast cancer cells, nitric oxide production, nitric oxide synthase expression, and ornithine decarboxylase activity was tested. TCTW inhibited the growth of both estrogen-independent MDA-MB-231 and estrogen-dependent MCF-7 human breast cancer cells. Lipopolysaccharide-induced nitric oxide (NO) production was significantly reduced by TCTW at the concentrations of 1.0 ($p<0.05$) and 5.0 mg/ml ($p<0.005$). Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) was also suppressed with the treatment of TCTW in Western blot analysis. TCTW inhibited induction of ornithine decarboxylase by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), a key enzyme of polyamine biosynthesis, which is enhanced in tumor promotion. Therefore, TCTW is worth further investigation with respect to breast cancer chemoprevention or therapy.

Key words : *Thesium chinense* Turczaninow, nitric oxide, nitric oxide synthase, ornithine decarboxylase, breast cancer chemoprevention

서 론

유방암은 전 세계적으로 매년 약 100만명의 새로운 환자가 발생하며 서구 여러 나라에서 가장 빈번한 여성 사망의 원인질환 중 하나이다. 우리나라로도 식생활의 서구화, 출산율 및 모유수유 감소와 암환자의 조기발견 증가 등으로 유방암 환자가 수년 동안 지속적으로 증가하고 있고 여성암 중에서 자궁암, 위암 다음으로 많은 비중을 차지하고 있다¹⁾. 이에 암예방연구에서는 유방암의 발병률과 사망률을 줄이기 위한 유방암 예방법의 개발에 중점을 두고 있다. Tamoxifen 같은 호르몬 조절제가 유방암 고위험군 여성의 침입성 및 비침입성 유방암의 발병을 감소시켰지만²⁾, 이러한 의약품제재는 부작용이 있으므로 근래에는 천연물을 이용한 유방암 예방 및 치료제 개발이 매우 활발히 진행되고

* 교신저자 : 남경수, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 의과대학

· E-mail : namks@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2412

· 접수 : 2006/02/14 · 수정 : 2006/05/25 · 채택 : 2006/06/13

있다.

Nitric oxide (NO)는 혈관확장, 신경전달체제, 항균물질 및 면역조절 등의 생체내 작용에 관여하는 물질로서 세포 기능을 변화시켜 세포사멸, 세포변성 또는 종양 성장과 전이로 발전시키는 것으로 알려져 있다³⁾. 특히 최근에는 암 발병과의 연관성에 대한 연구결과가 많이 보고되고 있다^{4,5)}.

NO는 nitric oxide synthases (NOS)에 의해 아미노산 L-arginine \rightarrow L-citrulline으로 전환되는 과정에서 생성된다. 3 종류의 isoform을 갖는 NOS에는 칼슘 의존적으로 내피세포 (endothelial cells)에서 발견되는 eNOS와 신경조직 (neuronal tissue)에서 발견되는 nNOS가 있다. 그리고 유도성으로 칼슘 비 의존적인 iNOS가 있다. iNOS는 적절한 자극에 의하여 대식세포, 호중구, 내피와 외피에서 발현되는 효소로서⁶⁾ 침윤성 유방암 조직에서 높은 활성을 나타내는 것으로 보고되었다⁷⁾.

Polyamine (putrescine, spermidine \rightarrow spermine)은 종양형성 시 비정상적으로 생합성되며 발암과정에 밀접한 관계가 있다.

Polyamine 생합성과정에서 중요한 효소는 putrescine의 생성에 관여하는 ornithine decarboxylase (ODC)이며 정상세포와 종양 세포의 증식에 필수적이다. 또한 ODC의 유도는 암촉진단계 (promotion)에도 중요한 기능을 담당하고 있어 생쥐의 여러 조직을 이용한 암촉진 실험에서 ODC활성 유도와 백암물질의 암촉진 능력간의 밀접한 관계가 보고되었다⁸⁾. 특히 유선조직에서 estradiol이나 peptide growth factor (insuline like growth factor 와 epidermal growth factor)에 의하여 ODC 활성이 증가되고, 세포외에서의 polyamine 이동에 의하여 세포내 polyamine의 증가가 관찰되었다⁹⁾.

댐싸리하고초 (*Thensium chinense* Turczaninow)는 단향과 (Santalaceae)에 속한 다년생 제비꽃의 전초를 건조한 것으로, 주성분은 kaemferol, astragallin, kaemferol-3-rhamnoglucoside, succinic acid, mannoside, Na, Ca, Mg, Al 및 Fe 등이며, 보간(補肝), 화농성유선염, 유방암, 이뇨, 진해지혈, 정신불안, 명목(明目) 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다^{10,11)}.

본 논문에서는 댐싸리하고초(*Thesium chinense* Turczaninow)의 열수추출물이 estrogen-비의존성 유방암세포 (MDA-MB-231) 와 estrogen-의존성의 유방암세포 (MCF-7)의 증식에 미치는 영향, NO의 생성과 iNOS의 단백질 발현 및 ODC 활성에 미치는 영향을 측정하여 댐싸리하고초의 유방암 발생 억제효능을 측정하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약 및 배지

RPMI 1640, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), trypan blue, lipopolysaccharide (LPS, *E. Coli*), sulfanilamide, N-naphthylethylenediamine, phosphoric acid, methanol, Tris, glycine, non-fat dry milk, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), difluoromethylornithine (DFMO), dithiothreitol, pyridoxal phosphate, 3,4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), unlabelled L-ornithine, bicinchoninic acid protein assay kit는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 Jeil Bio-Innovation (JBI)사 (Daegu, Korea), L-[1-¹⁴C]ornithine은 Amersham Pharmacia Biosciences (Arlington Heights, IL, USA) 사 제품을 사용하였다. iNOS (N-20) 항체 (rabbit polyclonal IgG)는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 goat anti-rabbit IgG는 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)에서 구입하였으며, 기타 시약은 세포 배양용 및 분석용 특급시약을 사용하였다.

2. 시료제조

댐싸리하고초는 동국대학교 부속한방병원에서 구입하였고, 댐싸리하고초 (no. 00T-36)의 voucher specimen은 동국대학교 난치병한양방치료연구소에 보관되어 있다. 댐싸리하고초의 열수 추출물은 생약 60 g을 분쇄하여 3차 증류수 400 ml 가한 뒤

rotary evaporator (BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 ml을 감압농축하여 pH 7.4로 적정하였다. 그리고 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μm, Whatman, Germany)로 여과하고, 여과된 열수추출액을 freezer dryer를 이용하여 완전 건조시킨 후 건조중량 (3.2 g)을 측정하였다. 그리고 실험 조건에 사용되는 배지 및 증류수에 희석시켜 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

계대 보존중인 MDA-MB-231과 MCF-7 세포는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하고, Raw 264.7 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM을 배양액으로 배양하였으며, Mouse epidermal cells, line 308을 불필수아미노산 (1×), 5% dialyzed FBS와 0.05 mM Ca²⁺이 포함된 S-MEM 배지에서 배양하였다. 세포는 액체질소에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 사용하였으며, 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

4. 유방암세포 증식에 미치는 영향

Estrogen-비의존성인 MDA-MB-231과 estrogen-의존성인 MCF-7 세포를 96-well plate의 well당 0.5×10⁴ cells을 접종시키고 24시간 후에 농도별 시료를 처리하여 2, 4, 6일 동안 배양하였다. 그리고 세포 성장은 MTT assay로 측정하였다.

5. Nitric oxide 생성

5×10⁵ cells/ml로 조정된 Raw 264.7 세포를 12 well plate의 각 well에 24시간 부착시킨 후 시료를 각 농도별로 처리하였다. 37°C CO₂ incubator에서 다시 1시간 배양시킨 후 200 ng/ml의 LPS (*E. Coli*)를 가하여 iNOS (NOS2, inducible isoforms of nitric oxide synthase)를 유도하였다. 이를 24시간 동안 배양한 후 기울여 배양 상층액을 회수하고, 세포는 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후 lysis buffer를 처리하여 단백질을 회수하여 Western blot 분석에 사용하였다. 회수한 상층액으로 생성된 NO의 량은 Griess시약 (1% sulfanilamide, 0.1% N-naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid)을 사용하여 570 nm에서 그 양을 측정하였다.

6. Western blot 분석

전기영동으로 분리한 단백질은 20% 메탄올, 25 mM Tris와 192 mM glycine이 포함된 완충액을 사용하여 nitrocellulose 막으로 이동시켰다. 비특이적 결합은 5% non-fat dry milk 용액으로 1시간 실온에서 반응하여 차단하였다. 그리고 차단용 완충액으로 희석한 1차 iNOS (N-20) 항체 (rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 막을 2시간 이상 반응하였다. 반응이 끝난 후 Tris-Tween buffered saline (TTBS)을 사용하여 5분 간격으로 3회 세척하였다. 계속하여 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체 (goat anti-rabbit IgG,

Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA)와 반응시키고 다시 한번 TTBS로 3회 세척하였다. 세척이 끝나면 증류수로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL)용액으로 2분간 반응하고 Kodac 필름에 감광하여 나타난 band의 두께를 비교하고 단백질 발현 유무 및 그 차이를 확인하였다.

7. Ornithine decarboxylase (ODC) assay

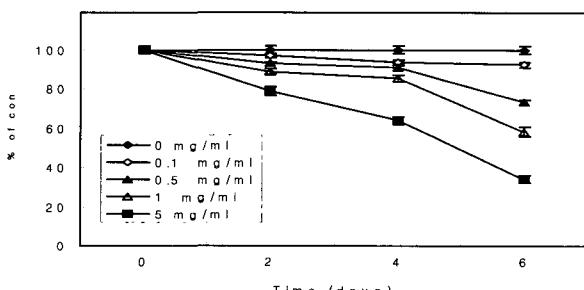
Mouse epidermal cell, line 308을 24-well tissue culture plate의 well 당 2×10^5 cells/ml 세포를 접종시키고, 18시간 후에 TPA와 시료 또는 양성대조군 (0.01 mM DFMO)을 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 세포를 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free PBS (pH 7.4)로 두 번 세척한 후 freeze-thaw cycle을 실시하여 용해시키고 cell extract의 ODC 활성은 L-[1-¹⁴C]ornithine에서 [¹⁴C]CO₂ 방출에 의하여 측정하였다. 즉, L-[1-¹⁴C]ornithine (200 nCi), 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.2), 12.5 mM EDTA, 50 mM dithiothreitol, 5 mM pyridoxal phosphate와 unlabelled L-ornithine을 포함한 200 μl 반응액을 각 well에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시키며, 방출되는 CO₂ 가스를 paper disk로 모아서 radioactivity를 liquid scintillation counter로 측정하였다. ODC 활성 측정을 위한 단백질 함량은 bicinchoninic acid protein assay kit를 사용하여 측정하였다. ODC specific activity는 pmol ¹⁴CO₂ / h / mg protein 으로 나타내며, ODC 활성 억제는 TPA만 처리한 조절군에 대한 각 시료들의 저해도 정도를 percentage로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 유방암세포의 증식에 미치는 영향

맵싸리하고초 열수추출물이 estrogen-비의존성 유방암세포 (MDA-MB-231)와 estrogen-의존성의 유방암세포 (MCF-7)의 증식에 미치는 영향을 살펴본 결과, 맵싸리하고초의 열수추출물 농도 0.1~5.0 mg/ml에 의하여 estrogen-비의존성인 MDA-MB-231 세포의 증식이 억제되었으며 (Fig. 1A), 또한 estrogen-의존성의 유방암세포 MCF-7의 증식도 억제되었다 (Fig. 1B). 맵싸리하고초가 estrogen-비의존성과 estrogen-의존성의 유방암세포 모두에 증식 억제효과가 있으므로 맵싸리하고초의 열수추출물은 estrogen receptor를 이용한 유방암세포 증식억제가 아닌 것으로 보인다.

A.



B.

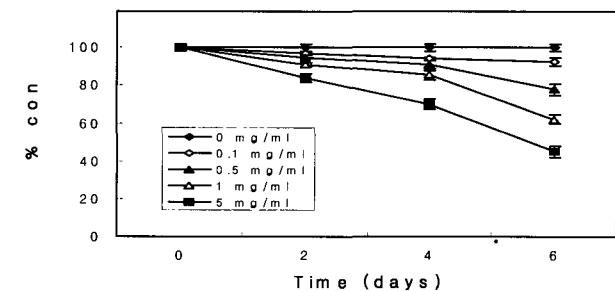
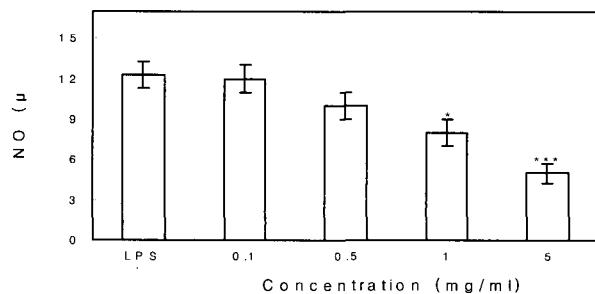


Fig. 1. Effect of water extract of *Thensium chinense* Turczaninow on proliferation of estrogen-independent MDA-MB-231 (A) and estrogen-dependent MCF-7 (B) human breast cancer cells. Experimental details are described in Material and Methods. The values are mean \pm SD ($n=3$).

2. Nitric oxide 생성에 미치는 영향

Raw 264.7 세포에 맵싸리하고초의 열수추출물을 처리하여 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 측정한 결과 농도의존적으로 NO의 생성을 억제하였다. 특히 1.0 ($p<0.05$)과 5 mg/ml ($p<0.005$) 농도에서는 통계적으로 유의성 있는 억제효과를 나타내었다 (Fig. 2A). NO가 조직치유와 관련된 angiogenesis에 중요한 역할을 하고, 혈관형성 (vascularization)은 종양성장에 필수적이며 종양전이와 관계가 있으므로 NO는 종양진전에 관여하는 것으로 알려져 있다^[12]. 세포에서의 NO는 직접 DNA를 변화시키든지 또는 G:T mismatch를 수선하는 thymine-DNA glycosylases의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다^[13]. 또한 iNOS에 의해 생성된 NO는 발암과정중 p53 돌연변이에 관여하고 tyrosine nitration에 의해 p53의 기능을 변화시킨다^[14]. 그러므로 맵싸리하고초의 열수추출물은 NO 생성에 높은 억제효과가 있으므로 종양형성 촉진을 억제하고, NO나 NO 대사물에 의한 유전자 독성을 억제하여 암억제효과가 있을 것으로 기대된다.

A.



B.



Fig. 2. Inhibition of LPS-induced NO production (A) and iNOS (B) expression by water extract of *Thensium chinense* Turczaninow (TCTW) in Raw 264.7 macrophage. Experimental details are described in Material and Methods. (A) The values are mean \pm SD ($n=3$). The value of each group statistically significant as compared with control (* $p<0.05$, *** $p<0.005$). (B) Lane 1, no treatment; Lane 2, 200 ng/ml LPS treatment; Lane 3, LPS and 0.1 mg/ml TCTW treatment; Lane 4, LPS and 0.5 mg/ml TCTW; Lane 5, LPS and 1 mg/ml TCTW; Lane 6, LPS and 5 mg/ml TCTW.

3. iNOS 발현에 미치는 영향

Raw 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 iNOS의 발현에 미치는 땅싸리하고초 열수추출물의 영향을 Western blot 분석으로 살펴본 결과, 땅싸리하고초의 열수추출물이 iNOS 단백질의 발현을 억제하였다 (Fig. 2B). iNOS는 대식세포나 종성구, 내피세포, 간세포, 심근세포, 연골세포 등에 존재하여 사이토카인의 자극을 받아 칼슘 비의존성 경로를 통해 고농도의 NO를 대량 생산한다. NO 생성을 위한 iNOS 발현과 활성이 여러 종류의 인체 암에서 관찰되었으며^{6,15,16}, 특히 iNOS의 활성이 침입성 유방암 조직에서 증명되었으므로 유방암 발병에서 iNOS가 종양 촉진에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁷. iNOS 발현 증가는 유방암의 전암성과 암성종양 손상과 연관이 있으며, iNOS의 발현이 유방의 apocrine metaplasia의 종양세포에서도 발견되었다¹⁷. 그러므로 iNOS의 발현을 억제하는 땅싸리하고초 열수추출물은 유방암 발생과정의 촉진을 억제하는 효과가 있을 것이다.

4. ODC 활성

땅싸리하고초의 열수추출물에 의한 ODC 활성 억제를 살펴본 결과, 0.5, 1.0과 5.0 mg/ml 농도에서 각각 무처리한 세포의 ODC 활성의 20.5, 37.8와 55.1%의 억제효과가 있었다 (Fig. 3). 증가한 ODC 단백질 발현과 polyamine 함량이 유방암조직에서 관찰되었고¹⁸, 매우 빨리 증식하는 유방종양에서도 높은 ODC 발현과 polyamine 함량이 측정되었으므로¹⁹, ODC 활성이 유방암 발생과 관계가 있음이 증명되었다. DFMO (ODC 저해제)는 estrogen-비의존적과 estrogen-의존적 종양형성을 위한 생물학적 진행과정을 방해하고²⁰, 동물모델에서의 발암물질이나 임의적으로 유도된 유선암 발생을 감소시키는 효과가 있었다^{21,22}. 따라서 땅싸리하고초 열수추출물 5 mg/ml 농도에서는 DFMO보다 높은 억제효과가 측정되었으므로 땅싸리하고초는 발암과정의 promotion 단계 억제에 의한 암예방 효과가 있으며 발암물질이나 임의적으로 유도된 유방암 발생을 억제하는 효과가 있을 것으로 기대된다.

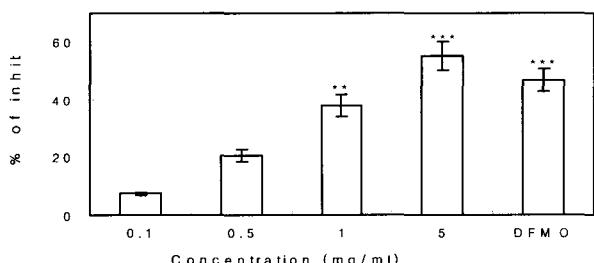


Fig. 3. Effect of water extract of *Thesium chinense* Turczaninow on TPA-induced ODC activity in mouse epidermal cells, line 308. The ODC activity of control is 301 ± 29 pmol $^{14}\text{CO}_2$ / h / mg protein. DFMO, 0.01 mM difluoromethylornithine. The values are mean \pm SD ($n=3$). The value of each group statistically significant as compared with control (** p<0.01, *** p<0.005).

결 론

땅싸리하고초의 열수추출물을 조제하여 유방암 유발 억제효과를 측정한 결과, 땅싸리하고초의 열수추출물은 estrogen-비의

존성의 유방암세포 (MDA-MB-231)와 estrogen-의존성 유방암세포 (MCF-7)의 증식을 농도의존적으로 억제하는 효과가 있었으며, 유선세포의 유전자 독성을 유발하는 NO의 생성을 저해하고 고농도의 NO 생성을 위한 iNOS의 발현도 억제하였다. 또한 유방암발생의 촉진단계에 주요한 기능을 가진 ODC 활성도 억제하였으므로 땅싸리하고초 열수추출물은 유방암 발생을 저해할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초의과학연구센터육성사업의 지원 (R13-2005-013-01003-0)을 받아 수행된 연구과제이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ries, L., Wingo, P.A., Miller, S.S., Howe, H., Weir, H.K., Rosenberg, H.M., Vernon, S.W., Cronin, K., Edwards, B.K. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer* 88, 2398-2424, 2000.
- Fisher, B., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Kavanah, M., Cronin, W.M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., Wolmaik, N. other National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Investigators. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 18, 1371-1388, 1998.
- Kroncke, K.D., Fehsel, K., Suschek, C., Kolb-Bachofen, V. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int. Immunopharmacol.* 1, 1407-1420, 2001.
- Tamir, S., Tannenbaum, S.R. The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochim. Biophys. Acta* 1288, F31-F36, 1996.
- Ambs, S., Hussain, S.P., Harris, C.C. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *FASEB J.* 11, 443-448, 1997.
- Knowles, R.G., Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298, 249-258, 1994.
- Thomsen, L.L., Miles, D.W., Happerfield, L., Bobrow, L.G., Knowles, R.G., Moncada, S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br. J. Cancer* 72, 41-44, 1995.
- Li, L., Carol, T., Susan, K.G. Inhibition of ornithine decarboxylase (ODC) decreases tumor vascularization and reverse spontaneous tumors in ODC/Ras transgenic mice.

- Cancer Res. 60, 5696-5730, 2000.
- 9. Huber, M., Poulin, R. Permissive role of polyamines in the cooperative action of estrogens and insulin or insulin-like growth factor I on human breast cancer cell growth. J. Clin. Endocrinol. Metab. 81, 113-123, 1996.
 - 10. 康秉秀. 本草學. 永林社. 서울, p 169, 1991.
 - 11. 김동일. 鄉藥集成方. 여강출판사. 서울, p 152, 1991.
 - 12. Macchiarini, P., Fontanini, G., Hardin, M.J., Squartini, F., Angeletti, C.A. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. Lancet 340, 145-146, 1992.
 - 13. Wink, D.A., Hanbauer, I., Grisham, M.B., Laval, F., Nims, R.W., Laval, J., Cook, J., Pacelli, R., Liebmann, J., Krishna, M., Ford, P.C., Mitchell, J.B. Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. Curr. Top. Cell Regul. 34, 159-187, 1996.
 - 14. Ambs, S., Bennett, W.P., Merriam, W.G., Ogunfusika, M.O., Oser, S.M., Harrington, A.M., Shields, P.G., Felley-Bosco, E., Hussain, S.P., Harris, C.C. Relationship between p53 mutations and inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer. J. Natl. Cancer Inst. 91, 86-88, 1999.
 - 15. Vakkala, M., Kahlos, K., Lakari, E., Paakko, P., Kinnula, V., Soini, Y. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in situ and invasive breast carcinomas. Clin. Cancer Res. 6, 2408-2416, 2000.
 - 16. Robbins, R.A., Barnes, P.J., Springall, D.R., Warren, J.B., Kwon, O.J., Butterly, L.D., Wilson, A.J., Geller, D.A., Polak, J.M. Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 203, 209-218, 1994.
 - 17. Tschugguel, W., Knogler, W., Czerwenka, K., Mildner, M., Weninger, W., Zeillinger, R., Huber, J.C. Presence of endothelial calcium-dependent nitric oxide synthase in breast apocrine metaplasia. Br. J. Cancer 74, 1423-1426, 1996.
 - 18. Manni, A., Astrow, S.H., Gammon, S., Thompson, J., Mauger, D., Washington, S. Immunohistochemical detection of ornithine-decarboxylase in primary and metastatic human breast cancer specimens. Breast Cancer Res. Treat. 67, 147-156, 2001.
 - 19. Glikman, P., Vegh, J., Pollina, M.A., Mosto, A.H., Levy, C.M. Ornithine decarboxylase activity, prolactin blood levels, and estradiol and progesterone receptors in human breast cancer. Cancer (Phila) 60, 2237-2243, 1987.
 - 20. Suh, N., Glasebrook, A.L., Palkowitz, A.D., Bryant, H.U., Burris, L.L., Starling, J.J., Pearce, H.L., Williams, C., Peer, C., Wang Y., Sporn, M.B. Arzoxifene, a new selective estrogen receptor modulator for chemoprevention of experimental breast cancer. Cancer Res. 61, 8412-8415, 2001.
 - 21. Marton, L.J., Pegg, A.E. Polyamines as targets for therapeutic intervention. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35, 55-91, 1995.
 - 22. Green, J.E., Shibata, M.A., Shibata, E., Moon, R.C., Anver, M.R., Kelloff, G., Lubet, R. 2-Difluoromethylornithine and dehydroepiandrosterone inhibit mammary tumor progression but not mammary or prostate tumor initiation in C3(1)/SV40 T/t-antigen transgenic mice. Cancer Res. 61, 7449-7455, 2001.