

유방암 세포주에서 Genistein에 의한 Cyclooxygenase-2 발현 억제

건양대학교병원 외과학교실 및 ¹명곡임상의학 연구소

송 혁 · 구태영 · 박지훈 · 송기학¹ · 김성태¹
최인석 · 최원준 · 목우균 · 민현식 · 윤대성

Inhibition of Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Expression by Genistein in Breast Cancer Cell-line

서 론

Hyuck Song, Tae Young Koo, Ji Hoon Park, Ki Hak Song¹, Sung Tae Kim¹, In Seok Choi, Won Joon Choi, Woo Kyun Mok, Hyun Sik Min and Dae Sung Yoon

Department of Surgery and ¹Konyang Medical Research Center, Konyang University School of Medicine, Daejeon, Korea

Purpose: The isoflavones in soy are likely to contribute to the historically low incidence of breast cancer among Asian women that consume traditional diets. A possible role of isoflavones in controlling the expression of cyclooxygenase-2 (Cox-2) has not previously been explored. In this study, the ability of the isoflavone, genistein, to regulate the expression of Cox-2 in breast cancer cells was evaluated.

Methods: The effects of genistein and NS-398, a Cox-2 inhibitor, were examined on the expression of Cox-2 at the mRNA level using the MDA-MB 231, and MCF-7 breast cancer cell-lines.

Results: In the MCF-7 cells, the Cox-2 mRNA could not be detected using RT-PCR. In the MDA-MB-231 cells, NS-398 and genistein were found to inhibit the Cox-2 mRNA expressions by 50 and 35~40%, respectively.

Conclusion: These studies suggest that dietary isoflavonoids may contribute to the prevention or inhibition of breast cancer by inhibiting the Cox-2 expression. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2003;6:277-282)

Key Words: Breast carcinoma, Cox-2inhibitor, Genistein
중심 단어: 유방암, Cox-2억제제, Genistein

책임저자 : 윤대성, 대전시 서구 가수원동 685번지
☎ 302-718, 건양대학교병원 외과학교실
Tel: 042-600-9140, Fax: 042-542-0133
E-mail: dsyoonmd@kyuh.co.kr

접수일 : 2003년 10월 21일, 게재승인일 : 2003년 12월 18일
본 논문은 2003년 춘계 한국 유방암학회에서 구연되었음.

2001년 보건복지부 암등록 보고에 의하면 유방암은 우리나라 여성암 중에서 첫 번째로 발생빈도가 높은 암으로 점차 발생빈도가 증가추세를 보이고 있어 유방암의 조기 발견과 예방 및 치료에 많은 연구가 필요하다.(1) 최근에 cyclooxygenase (이하 Cox) 효소의 발현이 악성조직의 병태생리와 연관이 있는 것으로 보고되고 있으며, Aspirin과 같은 non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)를 사용하여 Cox의 발현을 억제함으로써 암 발생 빈도를 감소시킬 수 있다고 보고되고 있다. Cox는 Cox-1과 Cox-2의 두 가지의 isoenzyme의 형태가 존재하며 60%의 동일한 염기 배열을 갖고 있다.(2-4) Cox-1은 체내에서 정상적으로 발현되어 생리학적인 반응을 조절하는 역할을 하는 데 비해 Cox-2는 proinflammatory agent 등에 의해 발현이 증가되어 체내의 병리학적인 반응에 관여한다. Cox-2는 growth factor, inflammatory cytokine, endotoxin 등에 의해 종양세포에서 발현이 유발되며, 특히 vascular endothelial growth factor (VEGF)와 함께 종양세포에서 과다 발현되어 종양발생기전에 깊은 관계가 있다고 알려지고 있다. 대장암,(5) 폐암,(6) 위암,(7) 전립선암,(8) 췌장암(9) 등에서 Cox-2의 발현증가가 보고되었고, 저자들의 선행 연구에서 Cox-2의 발현이 양성조직(섬유선종, 유관 내 유두종, 여성형 유방, 섬유 낭종성 변성)보다 유방암 조직에서 현저하게 증가되었음을 보고한 바 있다.(10) 이는 Cox-2의 과발현이 유방암 발생 과정에서 하나의 관련 인자로서 역할을 담당하고 있음을 알 수 있다.

저자들은 유방암에서 Cox-2가 과발현하는 것에 기초하여 selective Cox-2 inhibitor (NS-398)와 genistein의 유방암 세포 주에서의 Cox-2 mRNA 발현에 미치는 효과를 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 이용하여 비교하였다. 본 연구의 궁극적인 목적은 유방암 발생 빈도가 상대적으로 낮은 한국인의 전통식이 중 콩에 함유된 isoflavone phytoestrogen (genistein)이 Cox-2 억제를 통해 유방암 발생을 억제할 수 있다는 가설을 증명하고자 하였다.

방 법

1) 실험대상

Cox-2 mRNA 발현 억제 정도를 보기 위해 유방암 세포주 MCF-7, MDA-MB-231을 한국세포주은행에서 구입하였고, 정상 유방 상피 세포는 38세 여자에서 시행한 mam-moplasty 수술 시 얻은 조직으로부터 일차 배양하여 사용하였다.

2) 세포배양 및 약물처리

정상 유방상피세포에서의 Cox-2 mRNA 발현을 측정하기 위하여 mam-moplasty 수술 시 얻은 정상 유방 조직 1 cm³를 collagenase를 함유한 digestion buffer 10 ml에 넣은 후 CO₂ 배양기에서 16시간 동안 방치하였다. 조직 부유물을 제거 후 1,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액을 제거하고 침전된 세포를 10 ml HBSS로 부유한 후 다시 1,000 rpm하에 원심 분리한 후 MEM (Mammary epithelial basal media, Clonetics[®])으로 부유시킨 후 배양하였다. 배양 5일째 fibroblast 및 myoepithelial cell을 제거하기 위해 trypsin으로 1차 세척하였으며, 충분한 mammary epithelial cells의 확보를 위해 10일간 배양을 지속하였으며 5일마다 MEM으로 배양액을 교환하였다. 10⁵개의 MCF-7과 MDA-MB-231 유방암 세포를 각각 12개의 60 mm 배양접시에 분주한 후 12시간 배양하였다. 세포의 착상을 확인한 후 준비된 배양접시에 NS-398과 genistein을 각각 다른 농도(control, 1 μ m, 10 μ m, 50 μ m)로, NS-398과 genistein을 혼합하여 각각 다른 농도(control, 0.5 μ m, 5 μ m, 25 μ m) 처리된 배양액으로 5일간 배양하였고 3일째 새 배양액으로 교환하고 5일째 HBSS로 2회 세척 후 RNA를 추출하였다.

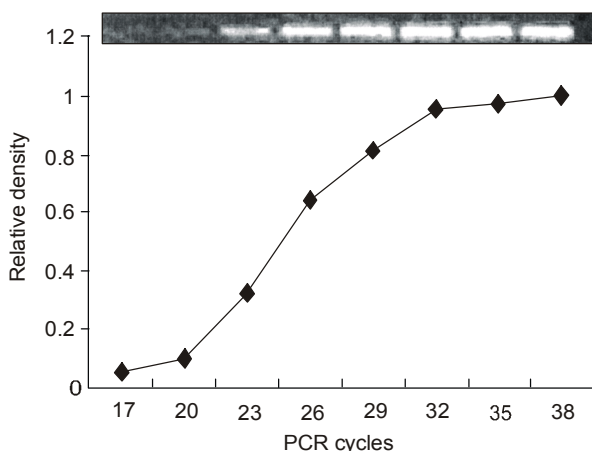


Fig. 1. Optimization of RT-PCR of Cox-2 mRNA with regard to the amplification cycles in MD MBA-231 breast cancer cells.

배양액으로 MCF-7은 RPMI 1,640 (with L-glutamine and NaHCO₃, R8758, Sigma[®], 10% fetal bovine serum)으로 MDA-MB-231은 DMEM (with 1000 mg glucose/L, pyridoxine-HCl and NaHCO₃, D5546, Sigma[®], 10% fetal bovine serum)을 사용하였으며, 각각의 약물은 DMSO에 녹여 사용하였다. 배양조건은 36.5°C, 5% CO₂로 하였다.

3) 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)

(1) RNA 추출: 배양된 세포로부터의 RNA 추출은 TRIzol reagent (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 시행되었다. 배양된 세포를 PBS (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)로 3회 세척 후 1.0 ml의 TRIzol reagent를 처리한 후 chloroform을 추가하여 DNA와 단백질을 분리하여 전체 RNA를 추출한 후 isopropanol을 이용하여 침강시켰다. 침강된 RNA를 75% ethanol로 2회 세척하고 건조시킨 후 diethylpycarbonate (DEPC)-treated distilled water로 재희석시켰다. 추출된 RNA의 순도와 정량은 전기영동과 분광흡광계(Amersham Pharmacia Biotech Ltd, Cambridge, UK)를 이용하였다.

(2) PCR 반응의 최적 반응주기 확인: Cox-2의 PCR과정에서 최적의 반응주기를 확인하기 위해 MD MBA-231 cell에서 추출한 전체 RNA로 RT 과정을 통해 얻어진 cDNA로 다양한 반응주기로 PCR을 수행하였다. 반응주기는 20회부터 3회 간격으로 41회까지 수행하였다. 그 결과 30회를 최적의 반응주기로 결정하였다(Fig. 1).

(3) RNA 역전사(RT, Reverse Transcription): Takara RNA PCR kit (Takara Shuzo Co., Ltd. Shiga, Japan)를 이용하여 19 μ l RT-master mix [5 mM MgCl₂, 1 \times RNA PCR buffer, 1 mM of each deoxy-NTP, 0.125 M oligo (deoxythymidine) primer, 1 unit/ μ l ribonuclease inhibitor, 0.25 unit/ μ l AMV reverse transcriptase]와 1 μ g 전체 RNA (diluted in DEPC-treated D.W.)를 혼합하여 전체 부피가 20 μ l가 되도록 하여 thin wall PCR tube (Applied Scientific, South San Francisco, CA, USA)에 넣어 RT 때까지 얼음에서 냉각시켰다. RT는 Thermal Mastercycler (Eppendorf, Germany)를 이용하였으며, 반응 program은 42°C에서 30분, 99°C에서 5

Table 1. Sequences of oligonucleotide primer

Gene	Sequences	Size (bp)
Cox-2	Forward 5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3'	305 bp
	Reverse 5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'	
β -actin	Forward 5'-AGCACAGAGCCTCGCCTTT3'	697 bp
	Reverse 5'-CTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	

분 그리고 4°C까지 냉각 후 각각의 sample을 PCR 때까지 -20°C에서 보관하였다.

(4) 중합효소연쇄반응(PCR, Polymerase Chain Reaction): 본 연구에서 사용한 Cox-2와 β -actin에 대한 oligonucleotide primer의 염기서열(Table 1)은 GenBank를 통하여 얻었으며 Bioneer사(Seoul, Korea)에 주문 의뢰하였다. β -actin mRNA 발현은 내부 양성 대조군 및 RNA 추출물의 성실도를 비교하기 위해 사용하였다. PCR은 PCR kit 제조사(Takara Shuzo Co., Ltd. Shiga, Japan)의 지침에 따라 시행하였고, 전체 20 μ l PCR mixture는 2.5 mM $MgCl_2$, 1 \times RNA PCR buffer, 20 pmol gene-specific primers, 0.5 U TaKaRa Taq와 4 μ l의 RT product로 조성되었다. 반응은 95°C에서 3분간의 initial denaturation step 후 95°C에서 30초의 과정을 30회 반응시키고, 64.6°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초, 72°C에서 5분 동안 반응시킨 후 4°C에서 마무리했다. 최종 반응산물을 2% agarose gel (Q-BIOgene, USA, 0.5 \times TBE)을 이용하여 100 V로 전기영동 한 뒤 자외선 램프하에서 Cox-2 : 305 bp, β -actin: 697 bp의 band를 확인하였다.

(5) Densitometry: PCR products의 band를 Densitometry를 이용하여 수치화하였으며, 결과를 Bio-ID (VilberLourmat, France)를 이용하여 분석하였다. 본 연구는 총 4회 반복실험을 실시하였으며, one-way ANOVA를 이용하여 통계 처리하여 $P < 0.05$ 일 때를 유의한 결과로 인정하였다.

결 과

Semiquantitative RT-PCR을 이용한 Cox-2 mRNA 발현 비

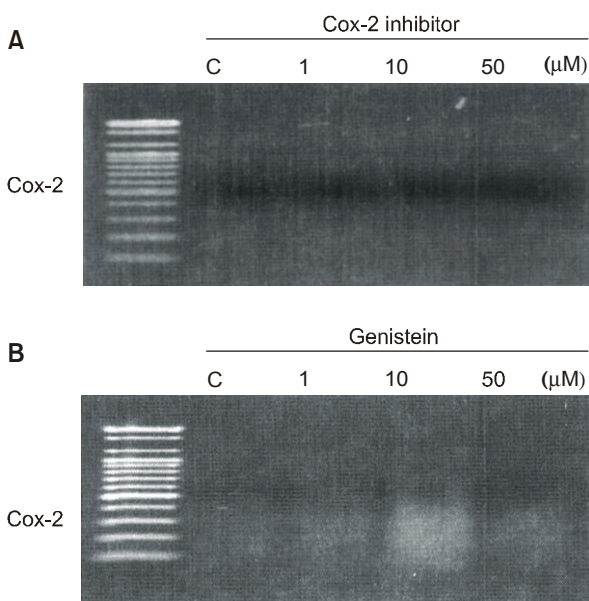


Fig. 2. Cox-2 mRNA expression in MCF-7 cell line.

교 MCF-7 유방암 세포주에서는 β -actin의 발현은 확인되었으나 Cox-2 mRNA의 발현은 확인되지 않아 NS-398 및 genistein에 대한 cox-2 mRNA 억제비교는 할 수 없었다

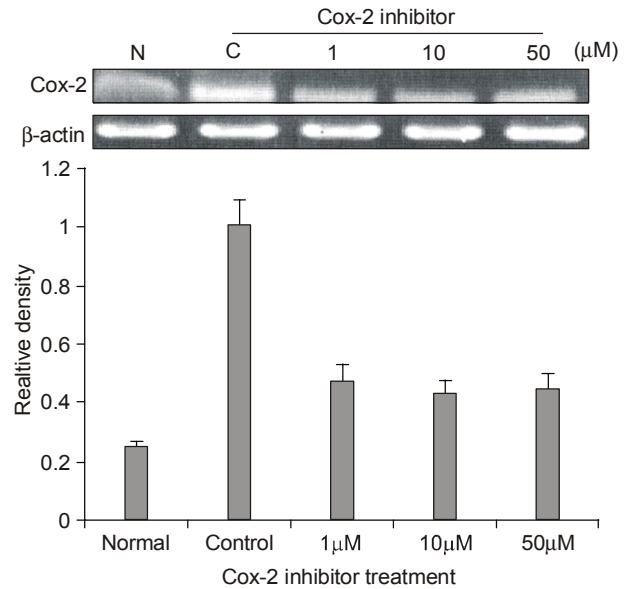


Fig. 3. Cox-2 inhibitor treated group. Semiquantitative RT-PCR of Cox-2 in MDA-MB-231 cell lines and relative density of RT-PCR product of Cox-2 transcripts versus internal control β -actin. N, normal mammarial epithelial cell; C, untreated control. Error bars represent the SD (n=4).

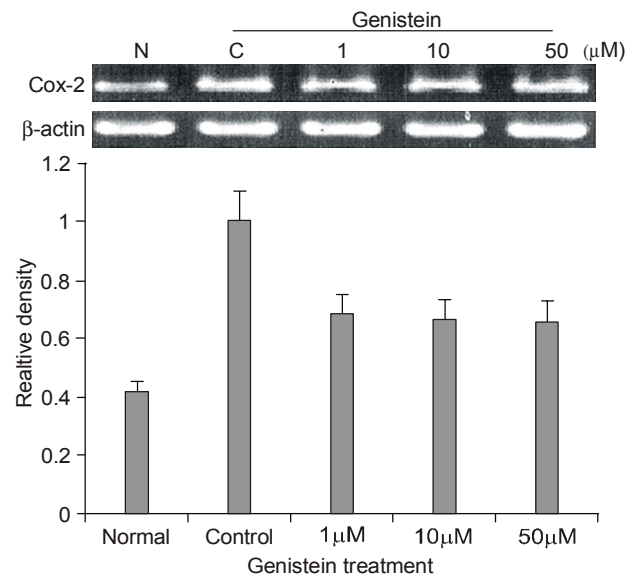


Fig. 4. Genistein treated group. Semiquantitative RT-PCR of Cox-2 in MDA-MB-231 cell lines and relative density of RT-PCR product of Cox-2 transcripts versus internal control β -actin. N, normal mammarial epithelial cell; C, untreated control. Error bars represent the SD (n=4).

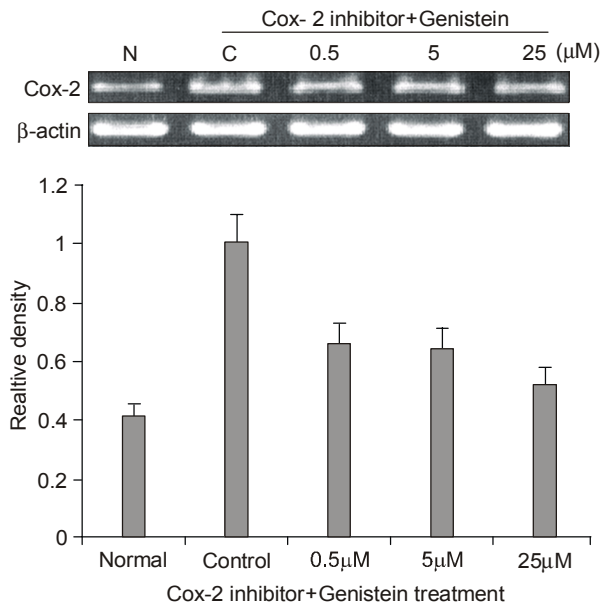


Fig. 5. (Cox-2 inhibitor+Genistein) treated group, Semiquantitative RT-PCR of Cox-2 in MDA-MB-231 cell lines and relative density of RT-PCR product of Cox-2 transcripts versus internal control β -actin. N, normal mammary epithelial cell; C, untreated control. Error bars represent the SD (n=4).

(Fig. 2). MDA-MB-231 유방암 세포주의 Cox-2 mRNA 발현비교에서 약물을 추가하지 않은 대조군을 1로 하여 약물별, 농도별로 비교하였으며 정상 유방상피세포에서의 Cox-2 mRNA와도 비교하였다.

(1) NS-398로 처리한 유방암 세포주에서의 Cox-2 발현은 대조군에 비해 50%의 억제 효과를 보였으며, NS-398의 농도의 증가에 따라 Cox-2 발현 억제는 유의한 차이가 보이지 않았다(Fig. 3).

(2) Genistein으로 처리한 유방암 세포주에서의 Cox-2 발현은 대조군에 비해 35~40%의 억제 효과를 보였으며, genistein의 농도의 증가에 따라 Cox-2 발현 억제의 차이는 보이지 않았다(Fig. 4).

(3) NS-398과 genistein을 각각 1/2 농도로 처리한 유방암 세포 주에서의 Cox-2의 발현은 38~45%의 억제 효과를 보였으며, 혼합 약물의 25 μ M 농도에서 정상 유방상피에서의 발현에 근접하는 억제효과를 보였다. NS-398과 genistein 각각 단독처리한 군과의 비교에서 혼합약물의 상승효과는 보이지 않았으며, 각각 25 μ M 농도로 혼합약물을 처리한 군과 각각 10 μ M 농도로 단독으로 처리한 군과의 비교에서 차이를 보이지 않았다(Fig. 5).

고 찰

유방암은 전 세계적으로 여성의 암 발생 중 여전히 1위

를 차지하지만, 유방암의 조기발견과 치료 및 암 발생의 예방으로 인해 과거에 비해 그 사망률은 감소하고 있다. 1980년대 후반 aspirin이나 sulindac과 같은 NSAIDs의 사용이 대장암의 사망률을 감소시킨다는 보고 이후 암 발생에서의 Cox-2의 작용기전과 NSAIDs를 이용한 Cox-2 발현억제를 통한 암 발생의 억제에 대한 관심이 높아지고 있다. Cox-2 발현의 증가는 대장암(5)뿐 아니라 폐암,(6) 위암,(7) 전립선암,(8) 췌장선암,(9) 그리고 유방암(11)에서도 보고되고 있다. 우리나라의 유방암 발생률은 최근 증가 추세를 보이나 아직은 서구에 비해 그 발생 빈도가 낮게 보고되고 있다. 최근의 유방암 증가 요인으로 경제적 향상으로 인한 검진의 확대 및 여러 환경적 요인과 서구화된 식이에 의한 영향이라고 이해할 수 있다. Genistein은 콩에 존재하는 isoflavone phytoestrogen으로 전통적으로 콩의 섭취량이 높은 민족의 경우 유방암이나 대장암 혹은 혈관 신생과 관련된 만성질환의 발생이 감소하는 것으로 알려져 있어(12) 과거의 우리나라의 유방암 발생률이 낮은 이유로 전통적인 식이의 역할이라 유추할 수 있다. 본 실험에서는 1) Cox-2 inhibitor 및 genistein에 의한 유방암 세포주(MDA-MB-231)에서의 Cox-2 mRNA 발현 억제를 비교하여, 우리나라의 전통음식인 콩에 포함된 genistein의 효과를 설명하고자 하였으며, 2) 또한 Estrogen 수용체 음성인 유방암의 경우 유방암 치료 후 Tamoxifen 등 항호르몬제 사용의 효과가 제한되어 있어 이런 Estrogen 수용체 음성인 유방암 세포주 MDA-MB231의 Cox-2 발현 억제 여부를 통해 Estrogen 수용체 음성 유방암 환자에서 전이 또는 재발의 예방적 목적으로서 Cox-2 inhibitor 및 isoflavone phytoestrogen의 사용 가능성을 제안하고자 하였다.

Cotterchio 등은 환자-대조군 연구를 통해 NSAIDs의 복용이 유방암의 발생위험을 24% 감소시킨다고 보고하였으며,(13) Harris 등은 동물실험에서 Cox-2의 발현억제로 유방암의 발생을 감소시켰다고 보고하고 있다.(14) 또한 Alshafie 등은 종괴가 촉진되는 쥐에게 사료를 통하여 선택적인 Cox-2 inhibitor를 복용시킨 경우 종괴의 부피가 감소하였다고 보고하였다.(15) Cox-2의 암 발생 기전은 혈관신생과 세포자멸사 그리고 암 세포의 전이성 조절에 관여하는 것으로 생각된다. 혈관신생 요소는 유방암의 발생과 진행에 중요한 역할을 한다. 혈관신생 요소 중 하나인 VEGF는 종양세포에서 Cox-2의 발현 증가와 밀접한 상관관계가 있는 것으로 나타났다.(16,17) 저자들의 선행 연구에서도 유방암 조직에서 Cox-2와 VEGF의 과발현은 통계학적으로 유의할 만한 상관관계를 보였다.(10) Cox-2 inhibitor의 혈관신생에 미치는 효과에 대한 실험으로, 선택적인 Cox-2 inhibitor인 celecoxib 투여로 혈관신생과 혈관내피세포들의 이동반응(migration)을 억제한다고 보고하였다.(18,19) 또한 과다 발현된 Cox-2는 proto-oncogene Bcl-2의 발현을 증가시키며, Bcl-2의 발현으로 암세포의 세포자

멸사는 억제된다고 보고하였다.(20) Cox-2의 과다발현이 암 세포의 전이를 증가시키는 기전으로, 대장암의 경우 Cox-2의 과다발현이 metalloproteinase-2를 활성화시켜 종양 세포의 전이를 증가시킨다고 보고되었다.(5) Cox-2에 의해 생성되는 prostaglandin E2는 체내의 암세포에 대한 면역력을 억제하여 종양의 성장을 촉진하게 된다.(21) Cox-2 inhibitor는 이상의 암 발생과 관련된 기전들을 억제함으로써 항암 작용과 암 예방효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다. 한국인의 전통식이 중 콩에 포함된 genistein의 항암효과와 종양증식억제 기전이 알려져 있으며 유방암 세포에서는 estrogen에 대한 경쟁억제제로 작용하여 estrogen의 종양 증식 작용을 억제하고,(22,23) protein tyrosine kinase 작용을 억제하여 mitogen에 의해 발생하는 tyrosine kinase cascade 반응을 차단하게 되어 종양증식 억제 작용을 나타낸다.(24) 혈관 상피세포에도 직접 작용하여 혈관 신생을 억제하여 항암효과와 암 전이 발생을 억제시킨다는 보고가 있다.(25) DNA와 비가역적 결합을 일으켜 topoisomerase-II의 작용을 억제하며 세포자멸사를 유발한다는 보고도 있다.(26) Cox-2 inhibitor에 의한 암 발생억제 기전에 genistein의 기여에 대한 연구는 알려진 바 없으나 이상과 같은 문헌 조사에 따르면 genistein의 신생혈관 억제, 세포자멸사 유도 등 Cox-2 inhibitor와 유사한 작용기전을 알 수 있다. 저자들은 서구에 비해 유방암의 절대적인 발생 빈도가 낮은 우리나라의 경우 전통음식재료인 콩에 다량의 isoflavone phytoestrogen이 함유되어 있고 그중 genistein의 항암 효과에 대한 많은 연구를 통해 genistein의 항암 효과로 Cox-2억제 효과가 있을 수 있음을 가설로 설정하게 되었다. 현재 암 발생에서 Cox-2의 작용기전이 알려지고 Cox-2 inhibitor의 암억제 기능이 임상적으로 시도되고 있으며, 특히 Estrogen 음성 유방암 환자의 치료에서는 외과적 수술과 보조화학요법 및 방사선 치료 후 항 Estrogen요법이 제한되어 있어 이러한 환자에게 안정적이고 효과적인 예방 및 치료제로 Cox-2 inhibitor의 적용이 필요하다고 생각된다. 본 연구에서 MCF-7 유방암 세포주에서는 Cox-2 발현을 볼 수 없었던 것처럼 Cox-2의 발현은 다양하리라 생각된다. 따라서 Cox-2 inhibitor의 임상적용이 모든 유방암 환자에게 적용이 되는지 여부와 장기복용에 따른 부작용 등이 고려되어야한다. 본 연구에서 genistein이 선택적 Cox-2 inhibitor인 NS-398보다는 Cox-2 발현 억제정도는 약하지만 현저한 Cox-2 발현 억제를 보임을 증명하였으나 유방암 환자에 대한 genistein의 임상적용과 병용 투여로 Cox-2 inhibitor의 용량을 줄일 수 있는지 여부는 추가 연구가 필요하다고 생각된다. 서구에 비해 한국의 유방암 발생 빈도가 전통식이 중 콩을 재료로 하는 음식을 통해 낮게 유지되었다고 유추할 수 있다고 생각된다.

결 론

저자들의 본 연구에서 Cyclooxygenase-2 inhibitor와 genistein은 유방암에서 항암작용을 목적으로 사용될 수 있을 것으로 생각되며, genistein의 Cyclooxygenase-2의 발현에 작용하는 작용기전에 대한 연구와 Estrogen 수용체 음성인 유방암 환자의 치료에 Cox-2 inhibitor 및 Isoflavone phytoestrogen의 적용을 위한 임상연구가 필요하다고 생각된다.

REFERENCES

- 1) Ministry of Health and Welfare. Annual Report of the Korea Central Cancer Registry 2001 (Published in 2003).
- 2) Fu JY, Mafferr J, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase in human monocytes. *J Biol Chem* 1990;265:16737-40.
- 3) Mafferr J, Zweifel BS, Seibert K, Needleman P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J Clin Invest* 1990;86:1375-9.
- 4) Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2692-6.
- 5) Tsujii M, Kawano S, Dubois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3336-40.
- 6) Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 occurs frequently in Human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998;58:3761-4.
- 7) Lim HY, Joo HJ, Choi JH, Yi JW, Yang MS, Cho DY, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:519-25.
- 8) Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* 2000;42:73-8.
- 9) Yip-Schneider MT, Barnard DS, Billings SD, Cheng L, Heilman DK, Lin A, et al. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2000;21:139-46.
- 10) Song H, Koo TY, Park JH, Song KH, Kim ST, Kim YM, et al. Expression of cyclooxygenase-2 (Cox-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast tumors. *Konyang Med J* 2003;3:28-33.
- 11) Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:455-60.
- 12) Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-4.

- 13) Cotterchio M, Kreiger N, Sloan M, Steingart A. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1213-7.
- 14) Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, Seibert K. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. *Cancer Res* 2000;60:2101-3.
- 15) Alshafie GA, Abou-Issa HM, Seibert K, Harris RE. Chemotherapeutic evaluation of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor in a rat mammary tumour model. *Oncol Rep* 2000;7:1377-81.
- 16) Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, Chiarugi V, Masini E. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001;3:53-61.
- 17) Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:135-8.
- 18) Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000;60:1306-11.
- 19) Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59:4574-7.
- 20) Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995;83:493-501.
- 21) Balch CM, Dougherty PA, Cloud GA, Tilden AB. Prostaglandin E2-mediated suppression of cellular immunity in colon cancer patients. *Surgery* 1984;95:71-7.
- 22) Shutt DA, Cox RI. Steroid and phytoestrogen binding to sheep uterine receptors in vitro. *J Endocrinol* 1972;52:299-310.
- 23) Martin PM, Horwitz KB, Ryan DS, McGuire WL. Rhythmic interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinol* 1978;103:1860-7.
- 24) Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, et al. Genistein a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 1987;262:5592-6.
- 25) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
- 26) Markovits J, Linossier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, et al. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res* 1989;49: 5111-7.