

## MDA-MB-231 유방암 세포에서 Genistein 처리에 의한 p27<sup>kip1</sup>과 p57<sup>kip2</sup>의 발현 변화

건양대학교병원 <sup>1</sup>외과학교실 및 <sup>2</sup>명곡임상의학연구소

윤 대 성<sup>1</sup> · 송 기 학<sup>2</sup> · 김 성 태<sup>2</sup>

### Different Expression of p27<sup>kip1</sup> and p57<sup>kip2</sup> by Genistein Treatment in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells

Dae Sung Yoon<sup>1</sup>, Ki Hak Song<sup>2</sup> and Sung Tae Kim<sup>2</sup>

Department of <sup>1</sup>Surgery and <sup>2</sup>Myungkok Medical Research Center, Konyang University Hospital, Daejeon, Korea

**Purpose:** The isoflavones in soy are likely to contribute to the historically low incidence of breast cancer among Asian women who consume traditional diets. The possible role of isoflavones in controlling the expression of p27<sup>kip1</sup> and p57<sup>kip2</sup> has not been previously explored. In this study, the ability of the isoflavone, genistein, to regulate the expression of p27<sup>kip1</sup> and p57<sup>kip2</sup> in breast cancer cells was evaluated.

**Methods:** The effects of genistein was examined on the expression of p27<sup>kip1</sup> and p57<sup>kip2</sup> at the mRNA level, using the MDA-MB 231 human breast cancer cell lines.

**Results:** By genistein treatment, p27<sup>kip1</sup> mRNA increased significantly in comparison to the control group. In particular, p27<sup>kip1</sup> mRNA level in 10μM and 50μM genistein treated-groups increased about two-folds more than the control. p57<sup>kip2</sup> mRNA was not different from control group. p57<sup>kip2</sup> mRNA decreased slightly only in the 50μM genistein treated-group. PPAR-γ mRNA level increased slightly according to the concentration-dependent manner of genistein, but it was not significantly different.

**Conclusions:** These results suggest that the up-regulated p27<sup>kip1</sup> by genistein might contribute to cancer prevention or inhibition. (Journal of Korean Breast Cancer Society 2004; 7:98-103)

**Key Words:** Breast cancer, p27<sup>kip1</sup>, p57<sup>kip2</sup>, Genistein  
**중심 단어:** 유방암, p27<sup>kip1</sup>, p57<sup>kip2</sup>, Genistein

책임저자 : 김성태, 대전시 서구 가수원동 685번지  
☎ 302-718, 건양대학교병원 산부인과학교실  
Tel: 042-600-9381, Fax: 042-600-9090  
E-mail: stkim@kyuh.co.kr

접수일 : 2004년 3월 15일, 게재승인일 : 2004년 5월 21일

### 서 론

유방암은 우리나라 부인암 중에서 첫 번째로 발생빈도가 높은 암으로 점차 그 발생 빈도가 증가 추세를 보이고 있어 유방암의 조기발견과 예방 및 치료에 많은 연구가 필요하다. 현재까지 다양한 종양 유전자, 조절인자, 종양 억제 유전자들이 종양의 형성에 영향을 끼치며, 종양세포의 자연사멸과 증식 간의 불균형이 종양 크기의 증가와 관련이 있다는 연구 결과가 많이 보고되고 있다.(1) 다른 암과 마찬가지로 유방암 역시 여러 가지 유전자의 변이 및 발현 양상의 변화에 의해 발생하는 것으로 알려져 있고, 지금도 많은 관련 유전자들이 보고되고 있다.

세포의 분열은 세포 내, 외부로부터 전달된 다양하고 복잡한 신호들에 의해 조절되는데, 이 신호들은 결국 cyclin-dependent kinases (Cdks)의 활성을 조절하는 쪽으로 귀결된다. 세포분열의 정확한 조절은 세포의 분화에도 중요하다. 대부분의 세포는 분화하기 위해서 세포주기의 G1기에서 분열을 멈춘다. 그래서 G1기에서 S기로 넘어가는 것을 특이적으로 억제하는 인자에 대한 연구가 근래의 몇 년간 이루어져 왔다. G1기에서 S기로 들어가기려면 Cdk2-cyclin E, Cdk4/6-cyclin D의 복합체 형성이 필요하다. 이 복합체의 활성을 Cdk inhibitors (CKIs)가 결합하여 억제하게 된다. CKIs에는 그들의 구조적인 특성과 Cdk의 억제 방법, 기질 특이성 등에 따라 CIP/KIP와 INK4 family로 나눈다. CIP/KIP family에는 p21, p27, p57이 속하는데, Cdk4/6-cyclin D, Cdk2-cyclin E 복합체 모두를 억제한다. 그러나 INK4 family는 Cdk4/6-cyclin D 복합체만 억제할 수 있다.(2) 분화하는 많은 조직에서 CIP/KIP 단백질들이 많이 발현되는 것으로 보아, 이 단백질들이 세포의 분열을 멈춤으로써 분화를 시작하게 하는 것으로 추측하고 있다.(3) 초파리의 배아 발달 과정에서 cyclin E의 억제와 Cdk inhibitor의 증가가 세포 주기의 정지를 야기시키고 정상적인 배아 발달에 영향을 준다는 것이 밝혀져서 G1-phase regulation에 CIP/KIP family의 역할에 많은 관심이 모아지고 있다. 그중 p27<sup>kip1</sup>은 TGF-β, rapamycin, contact inhibi-

tion, growth factor의 제거와 같은 성장 억제 환경에 반응하여 세포 주기의 arrest를 일으키는 것으로 알려지고 있다.(4-6) 또한 유방암(7,8)을 비롯해서 전립선암,(9) 대장암,(10) 폐암,(11) 난소암(12) 등에서 감소된 p27<sup>kip1</sup>의 발현이 보고되었다. p57<sup>kip2</sup>는 Cdk-cyclin-inhibitory domain, central proline-rich region, acidic-repeat region, protein interaction domain (Gln-Thr box)을 가지고 있다.(13,14) 또한 p57은 분화된 세포와 많은 성체의 조직에서 발현되는 것으로 밝혀졌다.(13,15) p57<sup>kip2</sup>의 생화학적 활성이나 염색체상의 위치 등의 이유로 암 억제 유전자로 인식되고 있다. 췌장암(16)과 방광암,(17) 대장암,(18) 전립선암(19) 등 다양한 조직의 암에서 그 발현이 감소됨을 보고하고 있다.

Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )는 여러 종류의 PPAR 중 한 타입으로, nuclear hormone receptor superfamily의 ligand-dependent transcription factor이다.(20) PPAR- $\gamma$ 는 지방조직에서 대부분 높게 발현되며, 지방생성, 포도당 및 콜레스테롤 대사과정에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다.(21) 또한 세포의 분화와 사멸(apoptosis)의 조절에 매우 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다.(22,23) 특히 사람의 유방암에서 PPAR- $\gamma$ 의 불활성이 보고되었으며,(24) 다양한 체외 배양 실험을 통해 PPAR- $\gamma$  ligand에 의해 유방암 세포의 성장이 저하되는 양상이 보고되었다.(25,26) 그러나 MDA-MB-231 유방암 세포에서 genistein의 영향에 의한 PPAR- $\gamma$ 의 발현 변화는 아직까지 보고되지 않았다. 따라서 본 연구진들은 MDA-MB-231 유방암 세포에서 genistein 처리에 따른 p27<sup>kip1</sup>과 p57<sup>kip2</sup>, 그리고 PPAR- $\gamma$ 의 발현 양상을 mRNA 수준에서 확인하고자 하였다. 이를 통해 궁극적으로 유방암 발생 빈도가 상대적으로 낮은 한국과 일본의 전통식이 중 콩에 함유된 isoflavone phytoestrogen인 genistein이 세포주기 조절인자인 Cdk inhibitor 발현에 미치는 영향과 유방암 발생의 억제효과에 대해 유추하고자 하였다.

## 방 법

### 1) 세포배양 및 약물처리

사람의 유방암세포 주 MDA-MB-231는 한국세포주은행에서 구입하였다. 10<sup>5</sup>개의 MDA-MB-231유방암 세포를 60 mm 배양접시에 분주한 후 12시간 배양하였다. 세포의 착상을 확인한 후 준비된 배양접시에 genistein을 다른 농도(control, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M)로 처리된 배양액으로 5일간 배양하였고 3일째 새 배양액으로 교환하고 5일째 HBSS로 2회 세척 후 RNA를 추출하였다. 배양액으로 DMEM (with 1,000 mg glucose/L, pyridoxine-HCl and NaHCO<sub>3</sub>, D5546, Sigma®, 10% fetal bovine serum)을 사용하였으며, genistein은 DMSO에 녹여 사용하였다. 대조군에는 동량의 DMSO만을 처리하였다. 배양조건은 36.5°C, 5% CO<sub>2</sub>로 하였다.

### 2) 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 분리한 후 전체 RNA를 추출한 후 isopropanol을 이용하여 침강시켰다. 침강된 RNA를 75% ethanol로 2회 세척하고 건조시킨 후 diethylpyrococarbonate (DEPC)-treated distilled water로 재회석시켰다. 추출된 RNA의 순도와 정량은 전기영동과 분광흡광계(Amersham Pharmacia Biotech Ltd, Cambridge, UK)를 이용하였는데, 260 nm의 흡광도를 이용해 정량하고, 280 nm에 대한 260 nm 흡광도의 비율이 1.6~2.0인 것들을 실험에 사용하였다.

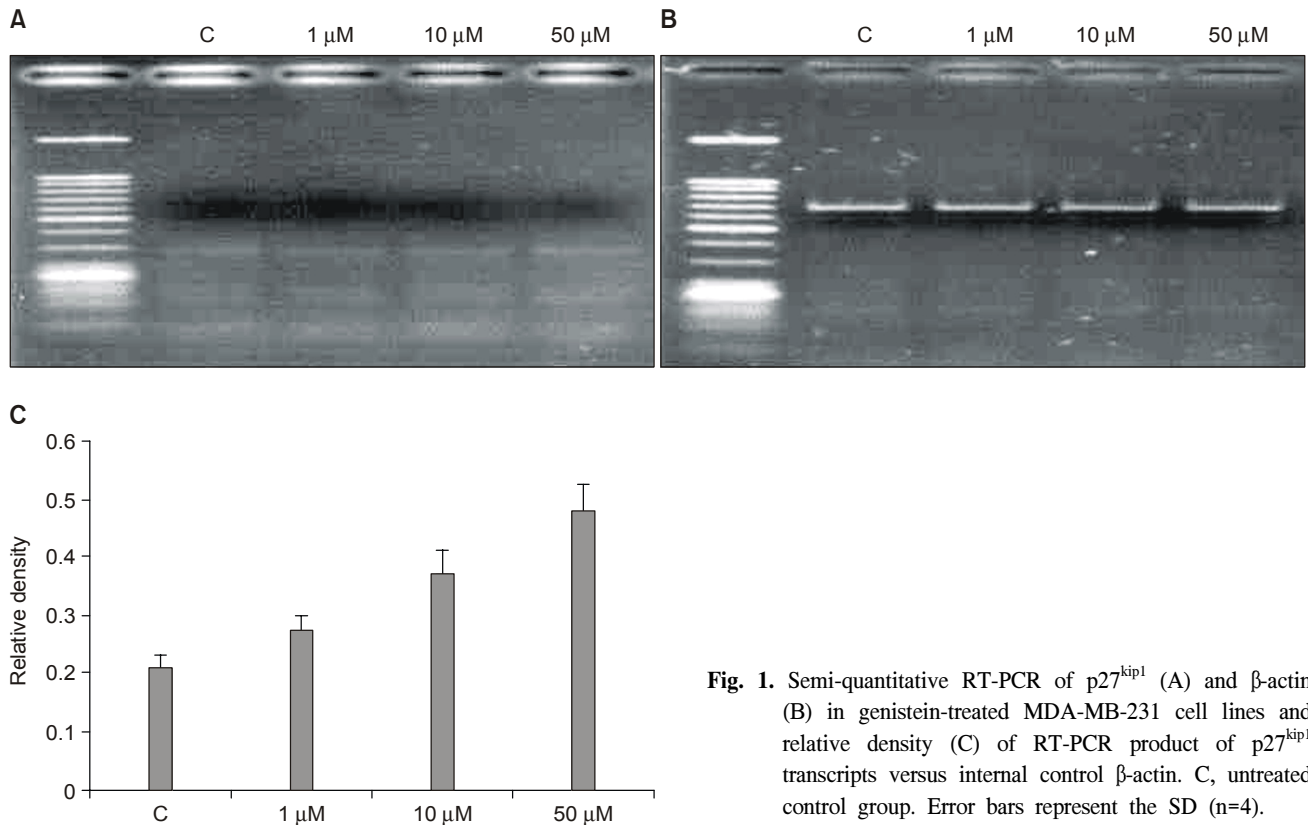
(2) 역전사(RT, Reverse Transcription): Takara RNA PCR kit (Takara Shuzo Co., Ltd. Shiga, Japan)를 이용하여 19 $\mu$ l RT-master mix (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x RNA PCR buffer, 1 mM each deoxy-NTP, 0.125 M oligo (deoxythymidine) primer, 1 unit/ $\mu$ l ribonuclease inhibitor, 0.25 unit/ $\mu$ l AMV reverse transcriptase)와 1 $\mu$ g 전체 RNA (diluted in DEPC-treated D.W.)를 혼합하여 전체 부피가 20 $\mu$ l 가 되도록 하여 thin wall PCR tube (Applied Scientific, South San Francisco, CA, USA)에 넣어 RT 때까지 얼음에서 냉각시켰다. 반응은 Thermal Mastercycler (Eppendorf, Germany)를 이용하였으며, 반응 후 각각의 sample을 PCR 때까지 -20°C에서 보관하였다.

### (3) 중합효소연쇄반응(PCR, Polymerase Chain Reaction)

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers

| Gene                | Sequences                             | Size (bp) | Accession No. |
|---------------------|---------------------------------------|-----------|---------------|
| p27 <sup>kip1</sup> | Forward F 5'-atgtcaaacgtgcgagtgtc-3'  | 250 bp    | AY 004255     |
|                     | Reverse R 5'-tctgtagtagaactcgggcaa-3' |           |               |
| p57 <sup>kip2</sup> | Forward F 5'-gatttctcgccaagcg-3'      | 350 bp    | U 22398       |
|                     | Reverse R 5'-gggaccagtgtaccttctcg-3'  |           |               |
| PPAR- $\gamma$      | Forward F 5'-tcaagcccttactactgtt-3'   | 204 bp    | L 40904       |
|                     | Reverse R 5'-gctcttcagaggtattg-3'     |           |               |
| $\beta$ -actin      | Forward F 5'-agcacagagcctcgcttt-3'    | 697 bp    | XM 037235     |
|                     | Reverse R 5'-cttaatgtcagcagcattcc-3'  |           |               |

F = forward; R = reverse; bp = base pair.



**Fig. 1.** Semi-quantitative RT-PCR of p27<sup>kip1</sup> (A) and β-actin (B) in genistein-treated MDA-MB-231 cell lines and relative density (C) of RT-PCR product of p27<sup>kip1</sup> transcripts versus internal control β-actin. C, untreated control group. Error bars represent the SD (n=4).

tion): 본 연구에서 사용한 primer의 염기서열(Table 1)은 GenBank를 통하여 얻었으며 Bioneer사(Daejeon, Korea)에 주문 의뢰하였다. β-actin mRNA 발현은 내부 양성 대조군 및 RNA 추출물의 성실도를 비교하기 위해 사용하여 사용하였다. PCR은 PCR kit 제조사(Takara Shuzo Co., Ltd. Shiga, Japan)의 지침에 따라 시행되었고, 전체 20μl PCR mixture는 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x RNA PCR buffer, 20 pmol gene-specific primers, 0.5 U TaKaRa Taq,와 4μl의 RT product로 조성되었다. 반응 조건은 Table 2에 기술하였다. 최종 반응산물을 2% agarose gel (Q-BIOgene, USA, 0.5 x TBE)을 이용하여 100 V로 전기영동한 뒤 자외선 램프 하에서 band를 확인하였다. 전기영동에서 사용한 DNA marker는 Bioneer사에서 구입한 100 bp DNA Ladder를 사용하였다.

(4) **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

MDA-MB-231 유방암세포에서 genistein 처리에 따른 p27<sup>kip1</sup>,

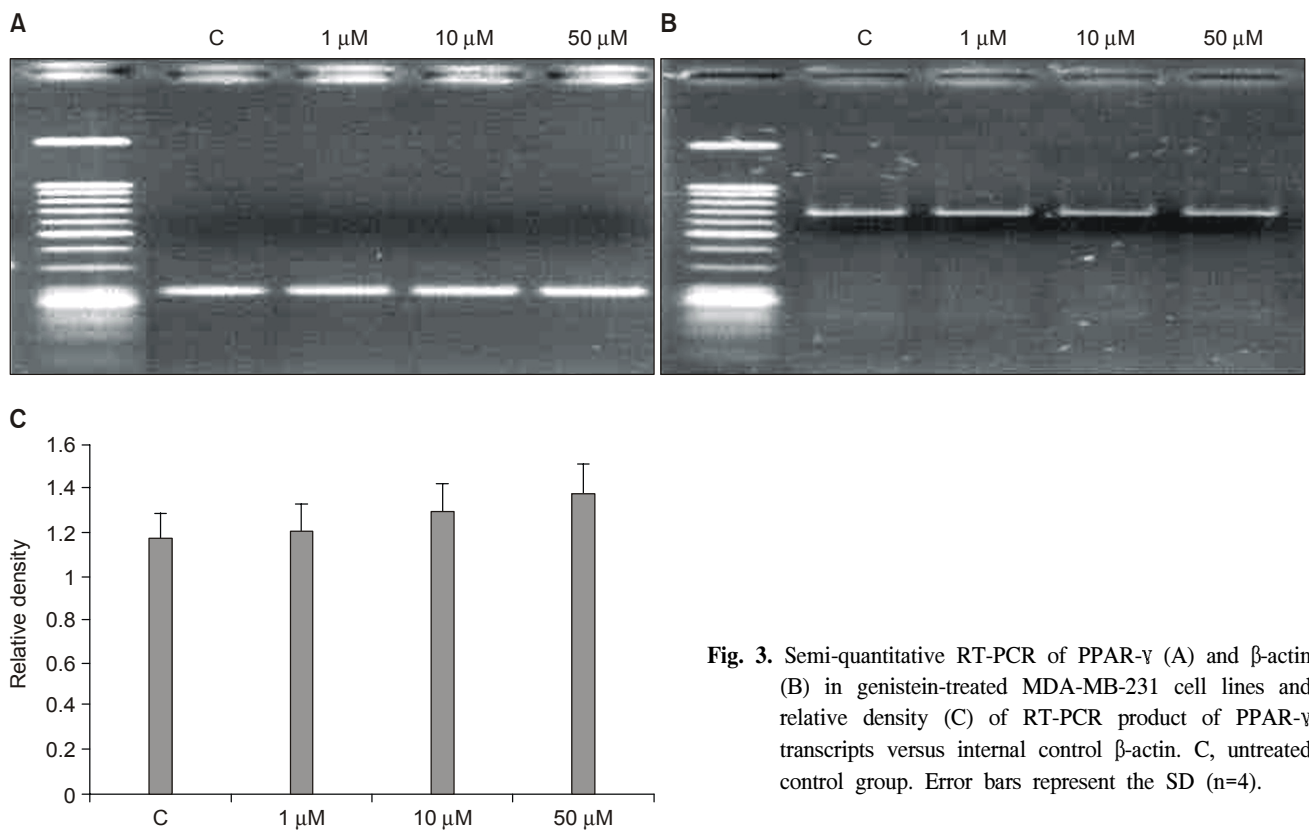
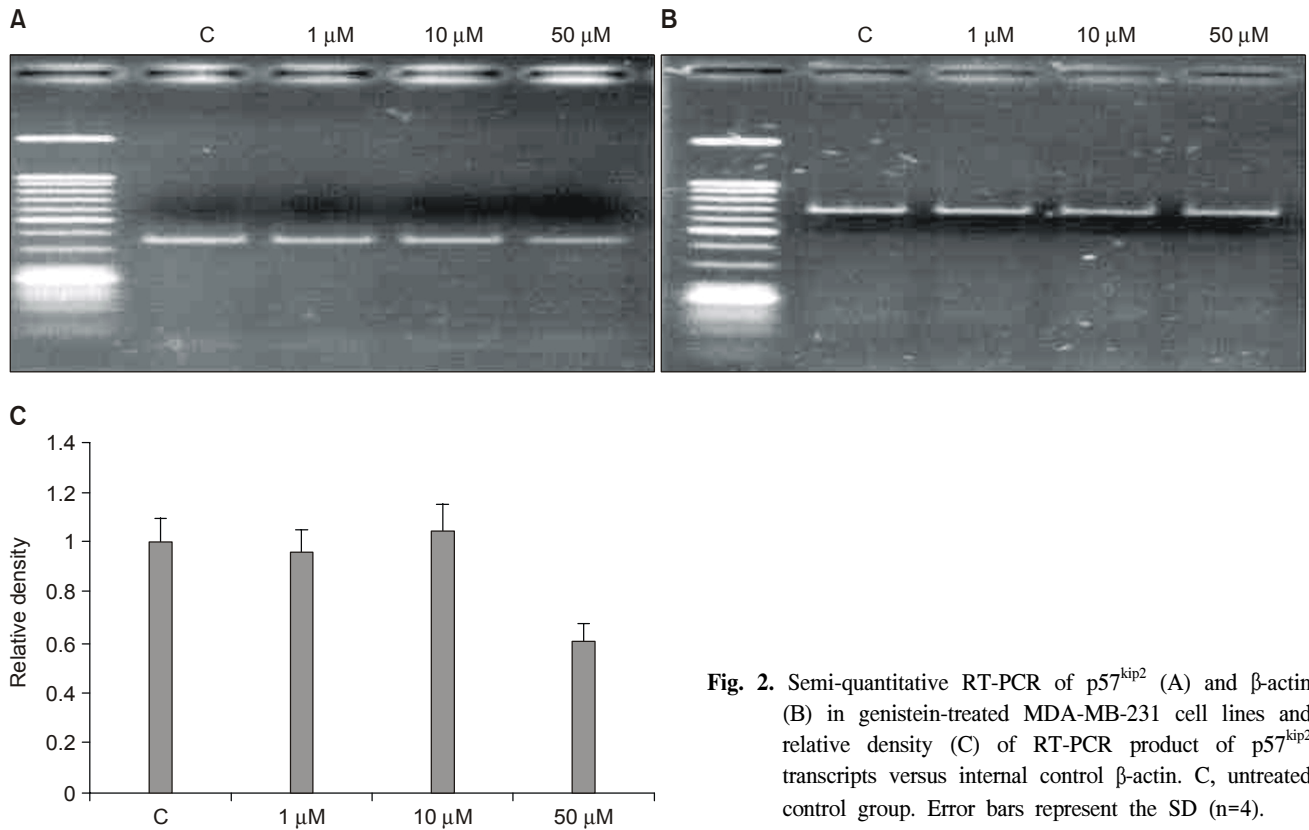
**Table 2.** Condition of PCR reaction

| Gene                | PCR Condition                                       |
|---------------------|---|
| p27 <sup>kip1</sup> | 95°C/40 sec, 60.4°C/40 sec, 72°C/40 sec (30 cycles) |
| p57 <sup>kip2</sup> | 95°C/40 sec, 60.4°C/40 sec, 72°C/40 sec (30 cycles) |
| PPAR-γ              | 95°C/40 sec, 60.4°C/40 sec, 72°C/40 sec (30 cycles) |
| β-actin             | 95°C/40 sec, 60.4°C/40 sec, 72°C/40 sec (25 cycles) |

PCR = polymerase chain reaction.

p57<sup>kip2</sup>, PPAR-γ의 mRNA 발현을 조사하였다. p27<sup>kip1</sup> mRNA는 대조군에 비해 genistein 처리 농도에 의존적으로 유의하게 증가하는 양상을 나타내었다. 특히 10μM과 50μM genistein 처리군에서는 대조군에 비해 p27<sup>kip1</sup> mRNA가 2배 이상 증가된 양상을 보였다(Fig. 1). 반면 p57<sup>kip2</sup> mRNA는 genistein 처리에 상관없이 일정하게 발현되었다. 단, 50μM genistein 처리군에서는 50% 정도의 발현 감소를 나타내었다(Fig. 2). PPAR-γ mRNA는 genistein

처리 농도에 비례하여 약간의 발현 증가 양상을 나타내었으나, 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 3).



## 고 찰

본 연구의 궁극적인 목적은 아시아지역의 높은 콩 소비량과 상대적으로 낮은 유방암 발생률과 관계가 있으며, 이는 콩에 함유된 isoflavone phytoestrogen (genistein)이 Cdk inhibitor의 발현 증가를 통해 유방암 발생을 억제할 수 있다는 가설을 증명하고자 하였다. 우리나라의 유방암 발생률은 최근 증가 추세를 보이거나 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(27) 과거의 우리나라의 유방암 발생률이 낮은 이유로 전통적인 식이의 역할이라 유추할 수 있다.

최근 연구에 의하면 유방 세포가 암세포로 전환될 때 p27<sup>kip1</sup>의 발현이 감소한다는 보고가 있었다.(8,28) 이에 본 연구자들은 여러 유방암 세포주 중 MDA-MB-231 세포를 선택하여 genistein 처리에 따른 p27<sup>kip1</sup>, p57<sup>kip2</sup>, PPAR- $\gamma$ 의 mRNA 발현을 조사하였다. p27<sup>kip1</sup> mRNA는 대조군에 비해 genistein 처리 농도에 의존적으로 유의하게 증가하는 양상을 나타내었다. 특히 10 $\mu$ M과 50 $\mu$ M genistein 처리군에서는 대조군에 비해 p27<sup>kip1</sup> mRNA가 2배 이상 증가된 양상을 보였다(Fig. 1). 이 결과는 MCF-7 유방암 세포에서 genistein에 의한 p27<sup>kip1</sup>의 발현 증가를 보고한 이전 연구자들의 결과와 일치함을 알 수 있다.(29) 그러나 Cdk inhibitor 중 같은 family에 속하는 p57<sup>kip2</sup> mRNA는 genistein 처리에 상관없이 일정하게 발현되었다(Fig. 2). 이 결과는 유방세포의 암세포 전환을 억제하기 위한 cyclin-Cdk 복합체의 억제작용에는 p57<sup>kip2</sup>보다는 p27<sup>kip1</sup>의 특이적인 작용이 있음을 의미한다. genistein이 p27<sup>kip1</sup> 유전자의 발현을 증가시키는 결과를 보였으나, 세포주 단위의 실험이 아닌 정상 또는 유방암 세포의 1차배양 등을 통하여 보다 다양한 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 생각된다. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )는 ligand-dependent transcription factor로,(20) 지방조직에서 대부분 높게 발현되며 지방생성, 포도당 및 콜레스테롤 대사과정에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다.(21) 또한 세포의 분화와 사멸(apoptosis)의 조절에 매우 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다.(22,23) 특히 사람의 유방암에서 PPAR- $\gamma$ 의 불활성이 보고되었으며,(24) 다양한 체외 배양 실험을 통해 PPAR- $\gamma$  ligand에 의해 유방암 세포의 성장이 저하되는 양상이 보고되었다.(25,26) 본 연구에서 통계학적인 의미는 없었으나 PPAR- $\gamma$  mRNA는 genistein 처리 농도

에 비례하여 약간의 발현 증가 양상을 나타내었다(Fig. 3). 처리된 genistein의 농도 조건을 좀 더 낮게 또는 높게 하여 PPAR- $\gamma$  mRNA의 발현이 증가 또는 감소되는 농도를 찾아야 할 것으로 생각한다. 본 연구진의 이전 연구와 종합해 보면 genistein은 COX-2 유전자의 발현을 감소시키고,(30) Cdk inhibitor의 발현을 증가시켜 세포의 성장을 억제하는 것으로 볼 수 있다.

## 결 론

본 연구진은 기존에 알려진 genistein의 세포 성장 억제 작용의 분자생물학적 증거를 제시하기 위해 Cdk inhibitor 유전자의 발현을 조사하였다. genistein에 의한 p27<sup>kip1</sup> mRNA의 발현 증가양상을 통하여, genistein의 여러 작용기전 중 Cdk inhibitor를 통한 세포 성장 억제 작용이 있음을 밝혔고, 이에 genistein은 유방암에서 항암작용을 목적으로 사용될 수 있을 것으로 생각되며, 단백질 수준에서의 계속된 연구가 필요할 것으로 생각한다. 또한 genistein의 작용기전에 관한 지속적인 분자생물학적 연구를 통하여 유방암 치료에 대한 genistein의 적용에 관한 근거를 마련할 수 있으리라 생각한다.

## REFERENCES

- 1) Binder C, Marx D, Binder L, Schauer A, Hiddemann W. Expression of Bax in relation and other predictive parameters in breast cancer. *Ann Oncol* 1996;7:129-33.
- 2) Zavitz KH, Zipursky SL. Controlling cell proliferation in differentiating tissue: genetic analysis of negative regulators of G1→S-phase progression. *Cur Opin in Cell Biol* 1997; 9:773-81.
- 3) Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9:1149-63.
- 4) Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, et al. 27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994;8:9-22.
- 5) Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee M, et al. Interleukin-2-mediated elimination of the p27<sup>Kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 1994;372:570-3.
- 6) Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM. Requirement of p27<sup>Kip1</sup> for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 1996;272:877-80.
- 7) Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27<sup>Kip1</sup> protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 1997;3: 227-30.
- 8) Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, et al. Expression of cell-cycle regulators

- p27<sup>kip1</sup> and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 1997;3:222-5.
- 9) Cordon-Cardo C, Koff A, Drobnjak M, Capodiceci P, Osman I, Millard SS, et al. Distinct altered patterns of p27<sup>KIP1</sup> gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1284-91.
  - 10) Mori M, Mimori K, Shiraishi T, Tanaka S, Ueo H, Sugimachi K, et al. p27 expression and gastric carcinoma. *Nat Med* 1997;3:593.
  - 11) Esposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, et al. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997;57:3381-5.
  - 12) Masciullo V, Sgambato A, Pacilio C, Pucci B, Ferrandina G, Palazzo J, et al. Frequent loss of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1999;59:3790-4.
  - 13) Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, et al. p57<sup>kip2</sup>, a structurally distinct member of the p21cip1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995;9:650-62.
  - 14) Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57<sup>kip2</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 1995;9:639-49.
  - 15) Yan Y, Frisn J, Lee MH, Massagu J, Barbacid M. Ablation of the CDK inhibitor p57<sup>kip2</sup> results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev* 1997;11:973-83.
  - 16) Yue H, Na YL, Feng XL, Ma SR, Song FL, Yang B. Expression of p57<sup>kip2</sup>, Rb protein and PCNA and their relationships with clinicopathology in human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:377-80.
  - 17) Oya M, Schulz WA. Decreased expression of p57<sup>(kip2)</sup> mRNA in human bladder cancer. *Br J Cancer* 2000;83:626-31.
  - 18) Shin JY, Kim HS, Lee KS, Kim J, Park JB, Won MH, et al. Mutation and expression of the p27<sup>KIP1</sup> and p57<sup>kip2</sup> genes in human gastric cancer. *Exp Mol Med* 2000;32:79-83.
  - 19) Schwarze SR, Shi Y, Fu VX, Watson PA, Jarrard DF. Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene* 2001;20:8184-92.
  - 20) Willson TM, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol* 1997;1:235-41.
  - 21) Rosen ED, Spiegelman BM. PPAR- $\gamma$ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 2001;276:37731-4.
  - 22) Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347:645-50.
  - 23) Gelman L, Fruchart JC, Auwerx J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:932-43.
  - 24) Jiang WG, Redfern A, Bryce RP, Mansel RE. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) mediates the action of gamma linolenic acid in breast cancer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000;62:119-27.
  - 25) Clay CE, Namen AM, Atsumi G, Willingham MC, High KP, Kute TE, et al. Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 1999;20:1905-11.
  - 26) Elstner E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptorgamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8806-11.
  - 27) Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-4.
  - 28) Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 1997;3:227-30.
  - 29) Kazi A, Daniel KG, Smith DM, Kumar NB, Dou QP. Inhibition of the proteasome activity, a novel mechanism associated with the tumor cell apoptosis-inducing ability of genistein. *Biochem Pharmacol* 2003;66:965-76.
  - 30) Song H, Koo TY, Park JH, Song KH, Kim ST, Choi IS, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression by genistein in breast cancer cell-line. *J Korean Breast Cancer Soc* 2003;6:277-82.