

## Phase I, phase II 효소 및 ornithine decarboxylase에 미치는 해양심층수의 영향

손윤희 · 김미경 · 장정선 · 정은정<sup>1</sup> · 남경수<sup>1\*</sup>

동국대학교 지역연고산업진흥사업단, 난치병한양방치료연구센터 및 <sup>1</sup>의과대학 약리학교실

Received February 20, 2008 / Accepted March 7, 2008

**Effect of Deep Sea Water on Phase I, Phase II and Ornithine Decarboxylase.** Yun-Hee Shon, Mee-Kyung Kim, Jung-Sun Jang, Eun-Jung Jung<sup>1</sup> and Kyung-Soo Nam<sup>1\*</sup>. *Regional Innovation System, Intractable Diseases Research Center and <sup>1</sup>Department of Pharmacology, College of Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea* - Deep sea water was tested for cancer chemopreventive activity by measuring the activities of  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF)-induced cytochrome P 450 1A2 (CYP 1A2), quinone reductase (QR) and glutathione-S-transferase (GST), glutathione (GSH) levels, and ornithine decarboxylase (ODC) activity. 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 CYP 1A2 activity. QR and GST activities were induced about 1.1~1.2 fold with the treatment of deep sea water in murine hepatoma Hepa 1c1c7 cells. In addition GSH levels were increased 1.3~1.4 fold in a hardness range of 100~1,000. The deep sea water showed 20.3 and 35.0% inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced ODC activity at hardness 800 and 1,000, respectively. Therefore, deep sea water is worth further investigation with respect to cancer chemoprevention or therapy.

**Key words :** Deep sea water, cytochrome P450 1A2, quinone reductase, glutathione-S-transferase, glutathione, ornithine decarboxylase

### 서 론

해양심층수는 수심 200 m 이상에 있는 저온수로서 저온성, 청정성, 안정성 및 부영양성 등의 자원적 특성을 가진 유용한 해수자원이다[9]. 최근, 세계적으로 해양심층수를 이용한 개발사업이 확산되고 있는 추세이며, 미국, 일본 등 선진국에서는 10여년 전부터 해양심층수를 이용하여 대체에너지 개발, 수자원, 화장품, 생수 및 식품산업 분야에 활발히 이용하고 있다. 특히 일본을 중심으로 해양심층수의 난치성 질환(심혈관계질환, 알러지 등)에 대한 의학적 효능에 대한 관심이 증가하여 연구[11,17]가 진행되고 있으며 질병치료에의 응용에 대한 관심도 고조되고 있다. 국내에서도 2001년부터 동해안을 중심으로 정부 및 민간기업에 의해 해양심층수 취수사업을 추진하고 있으며, 2007년 국회 해양심층수법의 통과에 힘입어 해양심층수를 원료로 한 식품, 화장품 및 의약품 개발 등에 대한 관심이 높아지고 있다.

난치성 질환 증 앓은 다양한 방법에 의한 치료에도 불구하고 아직 완전하게 치료되지 않는 질병으로서 최근 들어 암 치료보다는 예방분야에 더 큰 비중을 두고 연구를 하고 있다. 특히 발암과정(carcinogenesis)을 단계별로 억제할 수 있는 표적 효소들을 제어함으로써 암을 예방할 수 있는 물질탐색에 많은 노력을 기울이고 있다[14]. 발암물질 대사효소는 발암물질이나 성호르몬의 활성화에 관여한다[24]. 그러므로 각

개인의 발암물질 대사의 차이는 간이나 표적조직에서의 대사효소의 활성도와 관계가 있다. 특히, cytochrome P450 효소는 외부의 발암물질을 전자친화적물질(electrophilic product), epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질로 전환시킨다. Phase II 효소는 화학적인 스트레스와 암 발생과정 중의 개시(initiation)단계에서 돌연변이물질, 발암물질로부터 세포를 보호하는 주요 대사이다[5]. 즉 quinone reductase (QR)은 quinone을 환원시켜 무독하게 만들고 세포내에 유도되어 발암물질에 의해 일어나는 돌연변이와 종양화 현상을 막아주고 발암물질을 무독하게 하는 역할을 한다[2]. Glutathione-S-transferase (GST)는 외부 이물질의 대사 과정 중 생성된 친전자성 대사산물을 glutathione과 결합하여 용해되기 쉬운 수용성 물질로 만들어 배설시키는 효소로서 유리기(free radical)를 파괴하여 반응성이 높은 산소들로부터 세포를 보호한다고 보고되고 있다[1].

Glutathione (GSH)는 다단계 발암과정 중 개시(initiation)와 촉진(promotion)단계에서 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다. 즉, 개시단계에서는 발암물질 분자의 전자친화적 부위와 작용하여 독성이 강한 물질에 의한 DNA의 공격을 저해하는 역할을 하며, 촉진단계에서는 산화적 유리 라디칼의 공격을 제한함으로써 세포를 보호하는 역할을 한다[16].

Ornithine decarboxylase (ODC)는 polyamine 생합성 과정 중 putrescine의 생성에 관여하는 효소로서 정상세포와 종양세포의 증식에 필수적이다[18]. 또한 ODC의 유도는 암 촉진 단계에도 중요한 기능을 담당하고 있어 생쥐의 여러 조직을 이용한 암촉진 실험에서 ODC 활성 유도와 발암물질의

\*Corresponding author

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

E-mail : namks@dongguk.ac.kr

암촉진 능력간의 밀접한 관계가 보고되었다[3,7].

본 논문에서는 동해 해양심층수가 효과적인 암발생 억제 물질 연구에 활용되고 있는 생화학적 표식자(biochemical markers)인 CYP 1A2 활성, QR과 GST의 활성, GSH 함량 및 ODC 활성에 미치는 영향을 측정하여 동해 해양심층수의 암 예방 효능을 살펴보았다.

### 재료 및 방법

#### 시약

Minimum essential medium (MEM), S-MEM, antibiotics, trypan blue dye,  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF), methoxyresorufin, 2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (flavone), 3,4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucose-6-phosphate, chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), Na-phosphate, Na-EDTA, tert-butylhydroquinone (tBHQ), difluoromethylornithine (DFMO), EDTA, dithiothreitol, pyridoxal phosphate, L-ornithine, glutathione (GSH) chloro-2,4-dinitrobenzene, bovine serum albumin (BSA), Tris-HCl, bicinchoninic acid protein kit는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, L-[1-<sup>14</sup>C] ornithine은 PerkinElmer (Boston, MA, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS), dialyzed FBS는 웰진사 (Daegu, Korea)제품을 사용하였다.

#### 시료

본 실험에 사용된 해양심층수는 동해의 해저 1,100 m에서 취수하여 역삼투압 시스템으로 탈염과 농축을 하였으며, 탈염된 심층수(경도 0)와 그 심층수에 미네랄을 첨가하여 경도 4,000으로 조절된 심층수를 (주)워터비스(Seoul, Korea)로부터 제공받아 희석하여 실험에 사용하였다. 탈염된 해양심층수와 경도 4,000의 해양심층수에 대한 미네랄의 함량은 Table 1에 나타내었다.

#### 세포배양

계대 보존중인 Hepa 1c1c7 세포(mouse hepatoma)는 10%

FBS가 포함된 MEM 배지로, mouse epidermal cells, line 308은 불필수아미노산(1×), 5% dialyzed fetal bovine serum 과 0.05 mM Ca<sup>2+</sup>이 포함된 S-MEM 배지로 하여 CO<sub>2</sub> 배양기 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 배양하였고, 배양액은 2~3일 간격으로 교환해 주었다. 세포는 액체질소에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 사용하였으며, 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

#### CYP 1A2 활성

관류법으로  $\beta$ -NF (80 mg/ml body weight, 매일 1회, 3일)을 처리한 흰쥐의 간 조직으로부터 마이크로솜의 분리는 Phol과 Fouts의 방법[19]을 참고하여 실시하였다. CYP 1A2의 활성은 methoxyresorufin O-demethylase (MROD) 활성으로 측정하였으며[21] methoxyresorufin으로부터 resorufin의 형성 측정을 위하여 기질로 methoxyresorufin을 사용하였다. 양성 대조군은 flavone을 사용하였으며 결과는 대조군에 대한 각 시료들의 저해도 정도를 %로 나타내었다.

#### QR 활성

Hepa 1c1c7 세포를 96-well plate에 0.5×10<sup>4</sup> cells/well로 접종시키고 24시간 배양 후, 해양심층수를 경도별로 포함한 새 배양액 200  $\mu$ l을 각 well에 처리하였다. 시료를 48시간 처리한 Hepa 1c1c7 세포에서의 QR 활성 유도 효과는 Prochaska와 Santamaria의 방법[20]을 수정하여 사용하였다. QR 활성은 분당 환원된 MTT의 흡광도와 crystal violet의 흡광도에 의해 산출하였고, QR의 활성 유도는 대조군의 QR 활성에 대한 시료에 의한 활성의 비로 계산하였다.

#### GST 활성

세포내 GST 활성 측정은 Habig 등[8]의 방법을 응용하여 측정하였다. Hepa 1c1c7 세포를 96-well plate에 0.5×10<sup>4</sup> cells/well로 접종시키고 24시간 배양 후, 해양심층수를 경도별로 포함한 새 배양액 200  $\mu$ l을 각 well에 처리하였다. 48시간 배양 후, 세포를 세척하고 용해시켰다. 배양된 세포내에서 유도된 GST 활성 측정을 위해 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5)에 2.5 mM glutathione (GSH), 1 mM chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)를 첨가한 혼합액을 100  $\mu$ l씩 각 well에 가하고 1분간 plate shaker에서 교반한 후, 3분간 흡광도의 증가를 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), 380 nm에서 측정하였다.

#### GSH 함량

Griffith[6]의 방법을 변형하여 세포내 총 GSH 생성량을 측정하였다. 즉, 0.5×10<sup>4</sup>개의 Hepa 1c1c7세포를 200  $\mu$ l MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종하였다. 24시간 배양 후, 배양액을 제거하고 해양심층수를 경도별로 처리하였다.

Table 1. Mineral ingredient content of deep sea water

Mineral ingredient	Desalinated water (mg/l)	Hardness <sup>a)</sup> 4,000 (mg/l)
Ca	0.9	322.0
Mg	2.8	773.2
K	1.0	219.0
Na	4.3	165.1
Cl	17.9	2147.0
SO <sub>4</sub>	3.6	1466.0

<sup>a)</sup>Hardness: Ca (mg/l)×2.5+Mg (mg/l)×4.1 [17]

48시간 뒤, PBS로 세척하고 freeze-thaw cycle을 3회 반복하여 세포를 용해시킨 후, 40 µl stock buffer (125 mM Naphosphate, 6.3 mM Na-EDTA, pH 7.5)를 가하고 170 µl 반응혼합물[6 mM 5,5'-dithiois-(2-nitrobenzoic acid), glutathione reductase solution (5 units/µl), NADPH-generating system {0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM glucose-6-phosphate, 50 mM NADP<sup>+</sup>, 100 units glucose-6-phosphate dehydrogenase}]과 반응시켰다. 상온에서 5분간 교반하면서 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. GSH 함량은 GSH 표준곡선으로 계산하였고, GSH 함량의 비는 대조군에 의한 GSH 양과 해양심층수에 의해 생성된 GSH 양의 비율로 측정하였다.

**ODC 활성**

Mouse epidermal cells, line 308을 24-well tissue culture plate에 well 당 2×10<sup>5</sup> cells/ml 세포를 접종시키고, 18시간 후에 해양심층수(경도 0, 100, 200, 400, 600, 800 및 1,000), 그리고 양성대조군으로 0.01 mM difluoromethyl- ornithine (DFMO)을 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 세포를 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free PBS (pH 7.4)로 두 번 세척한 후 freeze-thaw cycle을 실시하여 세포액의 ODC 활성은 L-[1-<sup>14</sup>C]ornithine에서 [<sup>14</sup>C]CO<sub>2</sub> 방출에 의하여 측정하였다[13]. 즉 L-[1-<sup>14</sup>C]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 CO<sub>2</sub>가스를 paper disk로 모아서 radioactivity를 liquid scintillation counting (Beckman LS 6500, USA)으로 측정하였다. ODC 활성 억제제는 TPA만 처리한 조절군에 대한 각 시료들의 저해도 정도를 percentage로 나타내었다.

**세포내 총 단백질 검량**

세포내 총 단백질 양은 bicinchoninic acid (BCA) protein kit를 사용하여 BSA를 표준 단백질 용액으로 이용한 표준검량선을 구하여 그 양을 산출하였다.

**결과 및 고찰**

**CYP 1A2의 활성 저해효과**

Phase I 약물대사 효소인 CYP 1A2는 체내·외의 각종 유해물질, 발암이나 돌연변이를 유발시키는 여러 화학물질(xenobiotics)의 체내 활성화를 유도하여 발암과정의 개시단계(initiation)를 유발시키는 것으로 알려져 있다[4]. 따라서 cytochrome P450 효소활성 억제효과는 암예방 효과를 의미하므로 해양심층수가 β-NF에 의해 유도된 CYP 1A2 효소활성 억제율을 측정할 결과, 해양심층수의 경도가 100, 200,

400, 600, 800, 1,000으로 증가함에 따라 저해율이 정도의존적으로 증가하였으며 그 저해율은 5.8~21.0%를 나타내었다(Fig. 1). 그러므로 해양심층수는 발암과정의 개시단계(initiation)를 저해할 수 있을 것으로 보인다.

**QR과 GST의 활성 유도효과**

발암물질을 무독화시키는 phase II 효소인 QR과 GST의 활성 유도효과를 생쥐의 간암세포인 Hepa 1c1c7 세포를 이용하여 측정함으로써 해양심층수의 암억제효과를 살펴보았다. 해양심층수를 경도 100~1,000으로 처리하였을 때 QR 활성 유도효과는 대조군에 비하여 1.1~1.2배 증가하였으며(Fig. 2), GST 활성 유도효과도 QR 활성과 유사한 증가율(1.2배)을 보였다(Fig. 3). 결과적으로 생쥐의 간암세포인 Hepa 1c1c7 세포에서 동해 해양심층수에 의하여 QR과 GST의 활성이 최대 20%까지 증가함을 측정할 수 있었다.

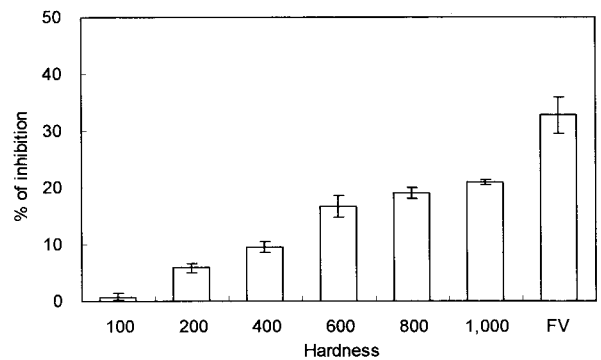


Fig. 1. Inhibition of cytochrome P450 1A2-mediated methoxyresorufin O-demethylase (MROD) activity using liver microsomes derived from β-naphthoflavone-treated rats. The MROD activity was assessed with the indicated hardness of deep sea water. FV, 4 nmol flavone. Indicated values represent mean±SD (n=3).

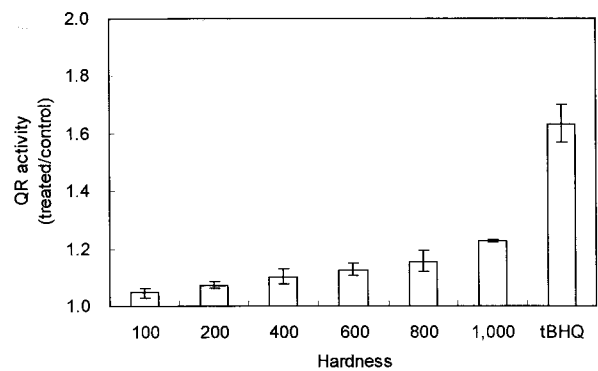


Fig. 2. Induction of quinone reductase (QR) activity by deep sea water in murine hepatoma Hepa 1c1c7 cells. Experimental details are described in Material and Methods. tBHQ, 10 µM tert-Butylhydroquinone. Indicated values represent mean±SD (n=3).

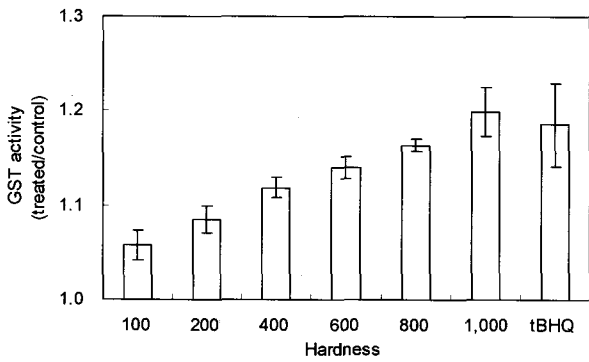


Fig. 3. Induction of glutathione-S-transferase (GST) activity by deep sea water in murine hepatoma Hepa 1c1c7 cells. tBHQ, 10  $\mu$ M tert-Butylhydroquinone. Indicated values represent mean $\pm$ SD (n=3).

QR과 GST 효소 유도는 활성물질을 투여함으로써 가능하며, 이러한 물질에 의해 발암이나 독성작용으로부터 생체를 보호할 수 있다[5,26]. Kim 등[10]은 암발생을 억제할 수 있는 한국산 채소를 세포 배양과 *in vivo* 모델 시스템에서 QR 활성의 증가를 측정하였다. Singh 등[22]도 콜로로필린이 간에서 GST 활성과 GSH 생성을 크게 증가시키는 것으로 보고하였다. 또, 일부물질의 암예방 기전이 발암물질의 활성 시스템을 억제하고 독성을 억제하는 효소의 유도와 관련이 있다고 보고하였다[25]. Spencer 등[23]은 마우스와 랫트의 식이에 0.2~0.5% 농도의 dimethyl fumarate를 투여한 결과, 간, 신장 등의 각 조직에서 GST와 QR의 활성이 증가하였다고 주장하였다. 따라서, 해양심층수에 의해 간세포에서의 QR과 GST의 활성이 증가된 것으로 보아 동해의 해양심층수는 외부물질이나 대사산물에 의해 일어날 수 있는 암발생 억제 효과가 있는 것으로 사료된다.

**GSH 함량**

해양심층수를 경도별로 Hepa 1c1c7 세포에 처리하여 GSH 생성을 살펴본 결과 경도의존적으로 증가하였으며, 26~40%의 증가를 나타내었다(Fig. 4). 환원형 glutathione (GSH)는 암예방 물질의 스크린에 사용되며 반응성이 있는 대사중간물로부터 세포를 보호한다. 발암과정의 개시단계에서는 GSH의 전자친화적인 성질로 인해 외부물질이 DNA와 결합하여 암을 유발하는 것을 막아준다. 진행·촉진의 단계에서는 산화적 유리 라디칼의 공격을 제한함으로써 발암과정을 저해할 수 있다. 보고에 따르면 aflatoxin에 의한 간종양을 가진 쥐에 많은 양의 GSH를 투여하였을 때, 종양이 감소하였고, butylated hydroxyanisole은 GSH 함량을 증가 시켜서 발암과정을 저해하였다[15]. 또한 GSH는 외부의 독성물질이 세포내 침입했을 때 직접 반응하거나 GST에 의해 독성물질과 결합하여 무독하게 하는 기능을 가지고 있다. GSH는 외부의 독성물질이 세포내 침입했을 때 직접 반응하거나 독

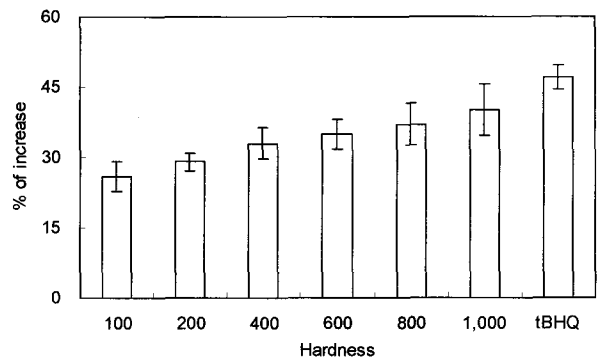


Fig. 4. Increase of glutathione (GSH) levels in murine hepatoma Hepa 1c1c7 cells by deep sea water. tBHQ, 10  $\mu$ M tert-Butylhydroquinone. Indicated values represent mean $\pm$ SD (n=3).

성물질과 결합하여 무독하게 하는 기능을 가지고 있으므로 해양심층수에 의해 경도의존적으로 GSH의 함량이 증가되었으므로 산화물질과 기타의 독성물질을 무독화할 가능성이 있을 것으로 추측할 수 있다.

**ODC 활성 저해효과**

Mouse epidermal cells, line 308에서 해양심층수가 TPA에 의해서 유도된 ODC 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 해양심층수의 경도 800에서는 20%, 경도 1,000에서는 35%의 저해율을 나타내었다(Fig. 5). 한편, 경도 1,000에서는 ODC의 대표적인 저해제인 DFMO의 ODC 저해율 35%와 유사한 저해율을 나타내었다. ODC는 암예방 물질 연구에 사용되는 표식자 중의 하나이고, ODC 활성의 유도는 발암물질의 암촉진 능력간의 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다[12]. 따라서 ODC 활성증가는 종양발생의 촉진단계를 자극하므로 해양심층수의 ODC 활성억제 결과에 의하면 해양심층수가 암

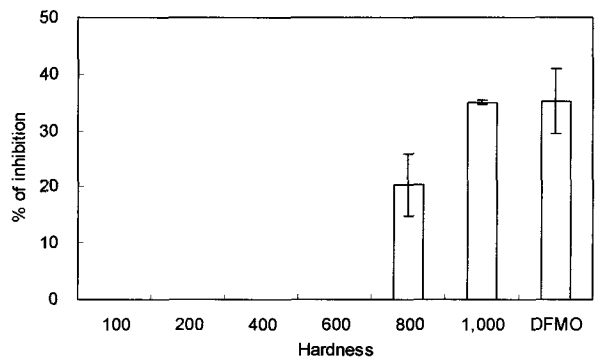


Fig. 5. Effect of deep sea water on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)-induced ornithine decarboxylase (ODC) activity in mouse epidermal cells, line 308. The ODC activity of the control was 411 $\pm$ 39 pmol <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>/h/mg protein. DFMO, 0.01 mM difluoromethylornithine. Indicated values represent mean $\pm$ SD (n=3).

발생 과정의 촉진(promotion) 단계를 차단하여 암예방 효과가 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

동해에서 취수한 해양심층수의 암예방 효능을 알아보고자 암발생 억제물질의 생화학적 표식자(biochemical markers)인 CYP 1A2 활성, phase II 효소인 QR과 GST의 활성, GSH 함량 및 ODC 활성에 미치는 영향을 살펴보았다. 해양심층수는 암의 개시단계(initiation)를 유발시키는 것으로 알려진 CYP 1A2 활성을 경도의존적으로 저해시켰다. 해양심층수를 Hepa 1c1c7 세포에 경도별(100~1,000)로 처리하였을 때 phase II 생체 해독효소인 QR과 GST의 활성은 최대 20%의 증가를 나타내었고, 외부의 독성물질이나 대사산물로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 GSH의 함량은 26~40%의 증가를 나타내었다. 그리고 발암과정의 촉진/진행단계에 관여하는 ODC의 활성은 해양심층수의 경도 800과 1,000에서 20%와 35%의 저해율을 나타내었으며, 경도 1,000을 처리한 군에서는 양성대조군인 DFMO와 같은 저해율을 나타내었다. 그러므로 본 연구 결과에 의하면 동해 해양심층수는 발암과정과 관련된 개시 및 촉진/진행단계를 저해시켜 암예방 효능을 나타낼 것으로 사료된다.

## References

1. Boyland, E. and L. F. Chasseaud. 1969. The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol. Ralat. Areas Mol. Biol.* **32**, 173-219.
2. Chesis, P. L., D. E. Levin, M. T. Smith, L. Ernster and B. N. Ames. 1984. Mutagenicity of quinones: pathways of metabolic activation and detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1696-1700.
3. Feith, D. J., S. Origanti, P. L. Shoop, S. Sass-Kuhn and L. M. Shantz. 2006. Tumor suppressor activity of ODC anti-enzyme in MEK-driven skin tumorigenesis. *Carcinogenesis* **27**, 1090-1098.
4. 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.
5. Gerhauser, C., M. You, J. Liu, R. M. Moriarty, M. Hawthorne, R. G. Mehta, R. C. Moon and J. M. Pezzuto. 1997. Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase II drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.* **57**, 272-278.
6. Griffith, O. W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207-212.
7. Guo, Y., J. Zhao, J. Sawicki, S. A. Peralta and T. G. O'Brien. 1999. Conversion of C57Bl/6 mice from a tumor promotion-resistant to a -sensitive phenotype by enhanced ornithine decarboxylase expression. *Mol. Carcinog.* **26**, 32-36.
8. Habig, W. H., M. H. Pabst and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferase; the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139.
9. 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. Ocean Eng. Tech.* **18**, 15-22.
10. Kim, S. M., S. H. Ryu, H. D. Cho, S. S. Kim, J. H. Kim and J. S. Kim. 1998. Screening for Korean vegetables with anticarcinogenic enzyme inducing activity using cell culture system. *Korean J. Food Sci. Nutr.* **3**, 277-281.
11. Kimata, H., H. Tai, K. Nakagawa, Y. Yokoyama, H. Nakajima and Y. Ikegami. 2002. Improvement of skin symptoms and mineral imbalance by drinking deep sea water in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS). *Acta Medica (Hradec Kralove).* **45**, 83-84.
12. Kingsnorth, A. N., W. W. King, K. A. Diekema, P. P. McCann, J. S. Ross and R. A. Malt. 1983. Inhibition of ornithine decarboxylase with 2-difluoromethylornithine: Reduced incidence of dimethylhydrazine-induced colon tumors in mice. *Cancer Res.* **43**, 2545-2549.
13. Lan, L., C. Trempus and S. K. Gilmour. 2000. Inhibition of ornithine decarboxylase (ODC) decreases tumor vascularization and reverse spontaneous tumors in ODC/Ras transgenic mice. *Cancer Res.* **60**, 5696-5703.
14. Manson, M. M., P. B. Farmer, A. Gescher and W. P. Steward. 2005. Innovative agents in cancer prevention. *Recent Results Cancer Res.* **166**, 257-275.
15. Meister, A. and M. E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711-760.
16. Mitchell, J. R., J. A. Hinson and S. D. Nelson. 1976. Glutathione and drug induced tissue lesions: metabolism and function. pp. 357-367, In Arias, I. M. and W.B. Jakoby (eds.), *Glutathiones*, Raven Press., New York.
17. 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.
18. Pegg, A. E. 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* **234**, 249-262.
19. 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.
20. Prochaska, H. J. and A. B. Santamarina. 1988. Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anti-carcinogenic enzyme inducer. *Anal. Biochem.* **169**, 328-336.
21. 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.

22. Singh, A., S. P. Singh and R. Bamezai. 1996. Modulatory influence of chlorophyllin on the mouse skin papilloma-genesis and xenobiotic detoxification system. *Carcinogenesis* **17**, 1459-1463.
23. Spencer, S. R., C. A. Wilczak and P. Talalay. 1990. Induction of glutathione transferase and NAD(P)H: quinone reductase by fumaric acid derivatives in rodent cells and tissues. *Cancer Res.* **50**, 7871-7875.
24. Yang, C. S., Y. Y. Tu, D. R. Koop and M. J. Coon. 1985. Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P-450 isozymes. *Cancer Res.* **45**, 1140-1145.
25. Zhang, Y., T. W. Kensler, C. G. Cho, G. H. Posner and P. Talalay. 1994. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **91**, 3147-3150.
26. Zhang, Y. and P. Talalay. 1994. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Res.* **54**, 1976s-1981s.