J. Fd Hyg. Safety
Vol. 24, No. 3, pp. 267~272 (2009)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

사람 전립선암세포주인 LNCaP에서 셀레늄의 G1/S 세포주기억제에 관한 연구

남정석[1] · 정지윤[2]*
[1] 가천의과학대학교 이길여 암당뇨연구원, [2]공주대학교 특수동물학과

Selenium arrest G1/S phase of cell cycle in LNCaP human prostate cancer cells

Jeong-Seok Nam[1] and Ji-Youn Jung[2]*
[1]*Lee Gil Ya Cancer and Diabetes Institute, Gachon University of Medicine and Science, Inchon, 406-840, Korea*
[2]*Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan, 340-702, Korea*
(Received July 17, 2009/Revised July 25, 2009/Accepted July 29, 2009)

ABSTRACT - The trace element nutrient selenium discharges its well-known nutritional anti-tumor activity. Converging data from epidemiological, ecological and clinical studies have shown that selenium can decrease the risk for some types of human cancers, especially those of the prostate, lung, and colon. Mechanistic studies have indicated that selenium has many desirable attributes of chemoprevention targeting cancer cells through DNA single strand breaks, the induction of reactive oxygen species. However, there is no reports about the relationship between methylseleninic acid (MSeA), one of methylselenol metabolites and cell cycle arrest in LNCaP human prostate cancer cells. Our data showed that MSeA arrested G1/S pahse of cell cycle arrest and inhibited DNA synthesis in LNCaP cells and those cellular events by MSeA were due to the induction of p27 protein which is a well-known cyclin-dependent kinase inhibitor. Taken together, cell cycle arrest occurred by MSeA may contribute to the growth-inhibition of prostate cancer cells.

Key words: selenium, Methylseleninic acid (MSeA), cell cycle arrest, prostate cancer

전립선암 (Prostate Cancer)은 미국에서 남성암 중 가장 발생빈도가 높고, 암관련 사망의 두번째 원인이 되는 종양으로 국내에서도 서구화된 식습관과 생활양식으로 그 발생빈도와 사망률이 증가하고 있는 추세이다. 국내에서 전립선암은 비뇨기계에서 발생하는 암 중에서 두번째로 빈발하는 암이었으나, 유병율이 점차로 증가하면서 현재는 비뇨기계 암 중에서 가장 흔한 암이 되었다[1]. 우리나라 남성 암 중에서는 6위이며 증가속도는 중앙 암등록사업 연례보고서에 따르면 1995-2002년 전립선암 증가율은 211%로 남성암 중 최고를 기록했다. 미국과 유럽에서 남성 암 발생율 1위이며 사망률은 폐암에 이어 2위이고 우리나라도 식생활 서구화, 인구 노령화 등 미국, 유럽과 비슷한 경향을 보이고 있어 전립선암의 위협은 점점 증가하고 있다. 이러한 전립선암을 예방하기 위해 합성화합물이나 천연물 유래 화합물을 이용한 화학예방요법(chemoprevention)은 향후 전립선암의 발생빈도와 사망률을 낮추기 위해 전망이 좋은 것으로 높은 관심을 갖고 있다[2]. 최근에 전립선암에 대해 보완대체의학에 의한 예방과 치료에 대한 관심이 증가하면서 여러 가지 약물제제에 대한 연구가 진행되고 있는데, 그 중 전립선암 예방효과를 가지는 가능성이 있는 것으로 알려진 약물제제 중의 대표적인 것이 셀레늄(selenium)이다[3].

셀레늄은 우리 몸에 필수적인 미량원소(무기질)이고, 셀레늄의 농도는 지역의 토양, 섭취되는 음식의 형태, 그리고 셀레늄의 흡수를 촉진시키거나 억제시키는 여러 가지 다른 요소들에 따라 다양하다. 셀레늄은 생체 내에서 다양한 형태로 존재하는데, 셀레늄이 생체 내에서 소화될 때, 생리적으로 활성화된 methylselenol(CH_3SeH)로 대사되기도 하고, 항산화효소와 셀레노시스테인을 함유한 셀레노 단백질로 전환되기도 한다. 1957년 Schwarz 와 Foltz에 의하여 셀레늄이 인간의 체내에 필요한 주요 영양소로 밝혀지면서 부터 연구가 급속히 이루어지기 시작했다[4]. Rotruck 등은 셀레늄이 산화적 스트레스로부터 glutathione

*Correspondence to: Assistant Professor Ji-Youn Jung, Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan, Korea
Tel: 82-41-330-1526, Fax: 82-41-330-1529
E-mail: wangza@kongju.ac.kr

peroxidase와 thioredoxin reductase등의 항산화효소를 생성하는데 관여하여 인체 방어기능에 관련된다는 것을 보고하였다[5]. 셀레늄에 대한 항암작용에 대해서 지금까지 알려진 항암작용에 따르면 셀레늄의 항암작용이 세포성장, DNA, RNA 및 단백질 합성을 억제하는 작용을 하며, 이러한 항암작용은 세포의 성장 및 분열에 관여하는 단백질 인산화효소의 활성을 억제하고 NF-kB와 같은 전사조절인자에도 영향을 주는 것으로 알려졌다[6-8]. 그러나, 이러한 셀레늄의 항암작용에 못지 않게 셀레늄이 여러 부작용 및 문제점을 가지고 있는 것 또한 사실이다. 가장 큰 문제점으로 알려진 부분은 동물 종에 따라 다른 효과를 나타낸다는 점과 투여 농도에 따라 발암성을 나타낸다는 점이다. 그럼에도 불구하고 셀레늄의 항암작용에 관한 연구가 계속되는 이유는 이 물질의 발암예방효과 가능성이 상당히 높은 데에 기인한다. Clark박사 연구팀에서 1996년에 사람의 임상시험을 통해서 셀레늄이 전립선암을 예방할 수 있는 가능성이 있다는 것을 보여줌으로써[9] 셀레늄의 전립선암 예방효과 및 기전에 관한 연구가 활발하게 진행되었다. Clack박사 연구팀의 연구는 셀레늄의 섭취가 암발생을 줄일 수 있다는 가설을 테스트하기 위한 최초의 double-blind, placebo-controlled된 실험으로 매일 200 μg의 셀레늄을 먹은 사람들은 암 사망률이 50% 이상 더 낮아지고, 암 발생률은 37% 더 낮아졌으며, 전립선암의 발생률은 63%, 대장암의 발생률은 58%, 폐암의 발생률은 46% 더 낮아졌다. 즉, 200 μg의 셀레늄을 4년반동안 섭취한 결과, 암과 관련된 사망률 및 발생률이 40%가 감소하였다.

2002년부터 미국의 Lu 박사는 MSeA를 비롯한 여러 형태의 셀레늄을 이용하여 전립선 암세포주에서의 암억제효능을 밝혔는데, 예를 들면, MSeA는 안드로젠 비의존성 전립선암세포주인 DU145에서 p21 단백질을 증가시킴으로써 G1/S기 세포주기를 억제하여 암을 예방하는 것을 보고한 바 있고, Akt와 ERK 기전과 tumor microvessel density에 영향을 줌으로써 caspase 의존성 세포사멸을 유도한다는 것을 보고한 바 있다[10-14]. 또한 Cho 등의 보고에 따르면, 셀레늄은 전립선암에 특이적인 단백질 중에 하나인 Prostate Specific Antigen (PSA)의 발현을 조절함으로써 전립선암을 예방한다는 사실을 밝힌 바 있다[15]. 하지만, 아직까지 안드로젠의존성 전립선암 세포주인 LNCaP 세포에서 MSeA의 세포주기에 미치는 영향과 그 기전에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서, 이번 연구에서는 셀레늄의 한 형태인 MSeA가 전립선암세포주인 LNCaP의 세포주기에 미치는 영향과 그 관련 기전을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용된 Methylseleninic acid (MSeA)는 미국 미네소타주립대학 산하연구소인 Hormel Institute의 Lu 박사로부터 공급받았고, p21, p27 그리고 actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포배양

사람전립선암세포주인 LNCaP 세포는 미국세포주은행인 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였고, 10% Fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine이 함유된 RPMI1640에서 5% CO_2, 37°C가 유지되는 incubator에서 배양하였다.

시험에 사용되는 세포는 배양접시 (6-well cell culture plate와 60 mm^2 세포배양접시)에 세포가 60-70%되었을 때, 5 μM의 MSeA를 12, 18 그리고 24시간 동안 처리한 후, 다음의 실험을 진행하였다.

FACScan 유세포 분석법

12, 18 그리고 24시간동안 Vehicle과 5 μM의 MSeA을 LNCaP세포에 처치한 다음, trypsin을 통해 세포를 배양접시에서 분리하고, 원심분리 (1500 rpm, 5분)를 통해 세포를 수거하였다.

세포주기분석은 flow cytometry를 이용하여 분석을 하였는데, 먼저 세포를 -20°C, 70% 에탄올에서 하루동안 고정하고, 원심분리를 하여 에탄올을 제거하고, 0.02 mg/ml의 propidium iodide (PI)과 0.05 mg/ml의 RNase A로 염색한 다음, FACScan (Beckon-Dickinson, USA) 유세포분석을 이용하여 DNA content를 측정하였다.

BrdU 염색법

MSeA가 처리된 LNCaP세포에 세포를 수거하기 30분전에 30분동안 100 μl의 BrdU (Boehringer Mannheim, Germany)를 처리하였다. PBS로 두 번 세척하고 100 μl의 생리식염수를 첨가하였다. 5 ml의 70% 에탄올을 흔들면서 튜브에 넣고 하루동안 고정시켰다. PBS로 세척 후 1 ml의 2N HCl/0.5% Trition X-100 (Sigma, USA)을 넣고 상온에서 30분간 배양하였다. PBS로 세척한 후 1 ml의 0.1M sodium tetraborate에 재부유하였다. PBS로 세척 후 50 μl의 0.5% Tween 20/BSA/PBS에 부유시켰다. 20 μL의 anti-BrdU (Becton Dickinson)를 넣고 상온에서 30분간 배양하였다. PBS로 세척 후 50 μl의 0.5% Tween 20/BSA/PBS에 재부유시켰다. 1 ml의 FITC-goat anti-mouse IgG (Becton Dickinson)를 넣고 상온에서 30분간 배양하였다. 대조군 세포에는 첨가하지 않았다.

Western Blot분석법

Lysis buffer (20% SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM iodoacetoamide, 1 mM leupeptin,

1 mM antipain, 0.1 mM sodium orthovanadate, 5 mM sodium fluoride)를 이용하여 세포를 융해시킨 다음, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)로부터 구입한 DC protein assay kit를 이용하여 단백질을 정량하였다. 20-60 μg의 단백질을 SDS-PAGE에 의해서 크기별로 분리하고, nitrocellulose membrane으로 transfer한 다음, 상온에서 한시간 동안 blocking 용액을 이용하여 배양했다. 그런 다음, 1차항체로 4°C에서 하루동안 배양하고, horseradish peroxidase (HRP)가 복합된 2차 항체를 이용하여 상온에서 2시간동안 배양하였다. 항체에 결합한 단백질은 ECL kit(Perkin Elmer Life and Analytical Science, Boston, MA, USA)를 이용하여 X-ray film에 노출시켜 현상하였다.

결과 및 고찰

PI 염색에 의한 MSeA의 LNCaP 세포에 대한 세포주기분석 결과

전립선암세포주인 LNCaP 세포주에서 MSeA의 세포주기억제효과를 확인하기 위해 5 μM의 MSeA를 12, 18 그리고 24시간동안 처리하고, PI로 염색한 다음, 유세포분석을 통하여 DNA content를 확인하였다. 위의 분석법에 따라 분석한 결과, MSeA를 처리한지 12시간째 대조군에서는 G1기가 76.08%인 반면 MSeA 처리군에서는 79.21%로 G1기가 약 4% 증가하였다. 물질처리한지 18시간째에는 77.88%에서 89.91%로 약 12%, 24시간째에는 74.22%에서 89.30%로 약 15% 증가하였다. 이는 MSeA를 LNCaP 세포주에 처리했을 때, 시간의존적으로 G1기가 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 이는 MSeA가 G1/S기의 세포주기를 억제함을 의미하고, 이를 통해 전립선암세포주의 세포증식을 억제하는 것으로 사료된다.

Yoon 등은 암예방에 효과적으로 알려진 Se-methyl-selenocysteine (MSC)이 HL-60 세포의 사멸을 유도하고, 이때 활성 산소종이 매우 중요한 역할을 한다고 밝혔다[16]. 세포에서 MSC의 흡수는 매우 빠르게 일어났으며 1시간 안에 최고조에 이르렀다. MSC를 처리한 결과 농도의존적으로 세포의 활성의 감소가 일어났으며 이는 DNA 절단의 증가와 일치했다. Flow cytometer를 사용한 결과를 보면 MSC는 세포사멸을 나타내는 sub-G1의 증가를 보였다. 이처럼 본 실험의 결과는 MSeA가 다른 종양세포주에서 G1기의 세포주기를 억제한다는 보고와 일치하는 것으로 MSeA가 종양의 성장을 억제하기 위해 관여하는 공통적인 기전으로 생각된다[17-19].

BrdU 표지법에 의한 MSeA의 LNCaP 세포에 대한 DNA 합성에 미치는 분석 결과

셀레늄이 여러 암들에서 효과가 있는 것은 어떤 특정조직이 아니라 생리적인 역할을 통하여 암을 예방하는 것으로 알려져 있는데, 셀레늄이 암세포 성장을 억제하는 것은 셀레늄 물질이 대사되어 DNA 가닥을 끊고 세포사멸을 유도하는 것과 관련된 것으로 유도된 세포사멸은 세포주기 조절인자와 DNA 손상 유전자의 변화로서 세포주기를 억제하며 세포증식을 막는다[20]. MSeA에 의한 세포주기억제

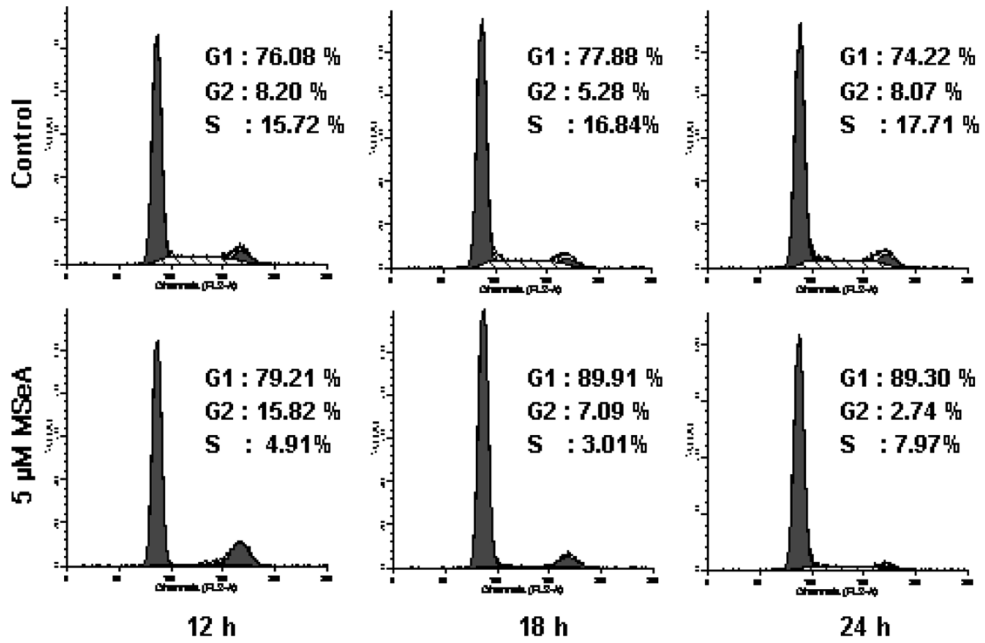

Fig. 1. Effect of MSeA on cell cycle progression of LNCaP human prostate cancer cells. LNCaP cells were treated with 5 μM of MSeA for 12, 18 and 24 hr. Both floating and attached cells were collected and processed for an analysis of cell cycle regulation as described in "Materials and Methods"

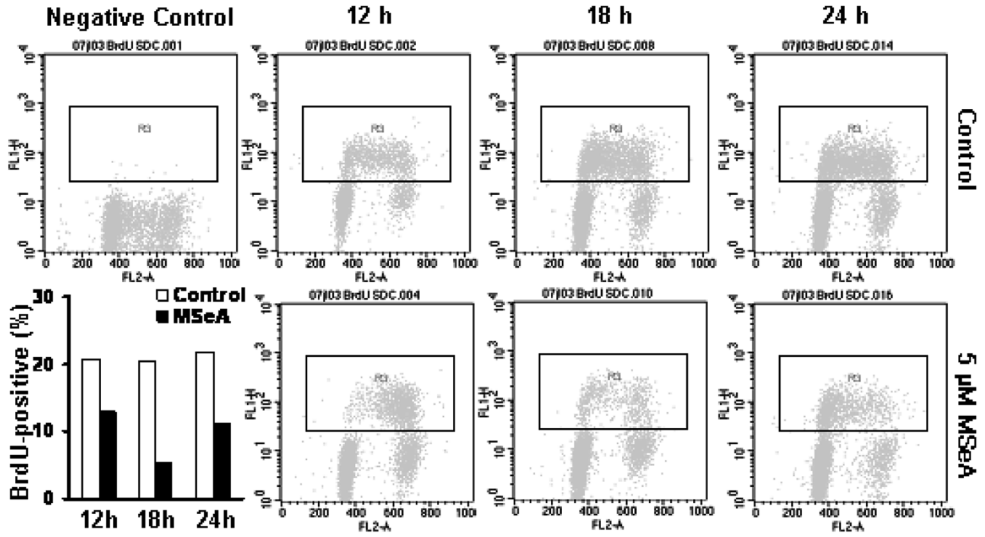

Fig. 2. Effect of MSeA on DNA synthesis of LNCaP human prostate cancer cells using BrdU staining. LNCaP cells were treated with 5 μM of MSeA for 12, 18 and 24 hr.

효과를 검증하기 위해서 이번에는 BrdU 염색법을 이용하여 MSeA의 LNCaP 세포주에 대한 DNA 합성에 미치는 영향을 확인하였다. FITC-goat anti-mouse IgG를 첨가하지 않은 음성대조군에서는 네모상자안의 DNA합성과 연관된 S기에 전혀 세포가 존재하지 않는 것으로 보아 실험에는 이상이 없는 것으로 확인되었다. 결과를 분석해 보면, 12시간 처리한 대조군에서는 BrdU가 염색된 세포가 20%인 반면, MSeA를 처리한 군에서는 12%로 나타났다. 18시간 처리한 군에서는 5%, 그리고 24시간 처리한 군에서는 약 10%로 나타나 대조군과 비교하여 MSeA 처치군에서 DNA 합성이 줄어드는 것을 확인할 수 있었고, 18시간에서 가장 높게 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이는 MSeA가 G1/S기 세포주기를 억제할 뿐만아니라, 전립선암세포의 DNA 합성도 방해함으로써 세포증식을 억제하는 것임을 암시한다.

MSeA의 세포주기조절단백질에 미치는 영향 분석결과

MSeA에 의하여 LNCaP 세포주에 미치는 영향은 위의 두 결과에서 알 수 있듯이 MSeA는 세포주기 및 DNA 합성을 억제한다는 사실을 확인할 수 있었다. Mitogen에 의해서 자극된 G1기에서 S기로의 세포주기 진행은 여러 종류의 Cyclin-dependent kinases(CDKs)와 이것의 활성을 억제하는 CDK inhibitors (CDKIs) 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다[21]. CDK inhibitors는 Cyclin/CDK 복합체와 결합하여 그 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는데, 특히 CIP/KIP 군에 속하는 p21은 종양억제 유전자인 p53에 의하여 활성화 되어 G1기 뿐만 아니라 G2/M기를 포함한 전체 세포주기의 진행을 억제하는 주요한 조절인자이다[22-24]. CDK inhibitor p21의 전사활성에는 p53이 관여하는 것이 일반적이지만 암세포의 종류나 항암제 및 후보물질의 종류에 따라서 p53 비의존적인 경로를 통하여 p21이 활성화 된다고도 알려져 있다[25-26]. 그러나 p16의 경우 일반적으로 G1기 arrest에만 관여하는 것으로 알려져 있으며, p27 역시 G1기 arrest에 중요하지만 부분적으로 G2/M기 arrest에도 관여할 수 있는 것으로 보고되어지고 있다[25]. CDKIs에는 INK, CIP 그리고 KIP가 포함되는데, 이것들은 CDK4/cyclin D1(early G1), CDK/cyclin D1 (early G1) 그리고 CDK2/ cyclinE (late G1)의 키나아제 활성을 조절한다. 따라서 이번 실험에서는 대표적인 CDKIs인 p21과 p27 단백질의 발현양을 Western blot 분석법을 이용하여 확인하였다. 결과를 확인한 결과, p21 단백질의 발현양에는 변화가 없는 반면에 p27의 경우 12, 18 그리고 24시간 처치한 MSeA군에서 시간의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 이는 MSeA에 의한 G1/S기 세포주기억제가 p27

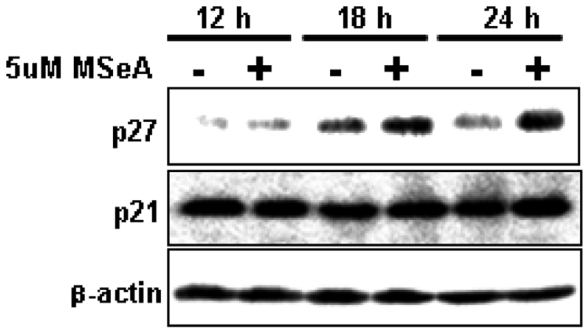

Fig. 3. Effect of MSeA on the levels of the proteins involved in the regulation of G1/S transition. Immunoblotting for p21 and p27 using lysates from control and MSeA-treated LNCaP cells. Actin was used to normalize the protein loading from each treatment.

단백질 발현에 의해 일어남을 암시해준다. 앞에서 언급한 바와 같이 MSeA는 많은 종양세포에서 G1기 세포주기를 억제하는 것으로 나타나고 있는데, 2008년 Lu J에 연구결과에서 보듯이, MSeA는 사람 제대정맥 내피세포인 HUVEC 세포주의 G1기를 억제할 때, p27단백질이 관여함을 확인하였는데, 이러한 결과는 이번 연구결과와 일치하는 결과라 할 수 있고[17], MSeA가 세포주에서 G1기의 세포주기를 억제할 때, p27 단백질의 유도를 통해 이루어지는 공통기전을 갖고 있음을 제시해준다.

요 약

우리 몸에 필수적인 미량원소인 셀레늄은 항암활성이 있는 것으로 알려져 있고, 역학적, 생태학적 그리고 임상시험을 종합해보면, 셀레늄은 종양, 특히 전립선암, 폐암, 대장암에 대한 위험성을 낮출 수 있을 것으로 생각되어진다. 기전연구에 따르면 셀레늄은 DNA single strand breaks와 활성산소종을 유도함으로써 종양을 억제하는 예방효능이 있는 것으로 밝혀지고 있다. 하지만, 아직까지 전립선암세포주에서 methylseloenol 대사체 중에 하나인 MSeA와 세포주기억제와의 관계에 대해서는 명확하게 밝혀져 있지 않은 실정이다. 따라서, 이번 연구에서는 전립선암세포주에서 셀레늄의 세포주기에 관한 효능을 확인해보고자 하였다.

결과를 종합해보면, MSeA는 전립선암세포주에서 G1/S기 세포주기를 억제하고 DNA 합성을 방해하는 것으로 나타났고, 이러한 현상은 cyclin의존성 키나아제를 길항하는 단백질 중에 하나인 p27단백질의 발현을 증가시킴으로써 일어남을 확인하였다.

따라서, MSeA에 의해 유발되는 세포주기 억제가 전립선암 세포의 성장억제에 기여하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 김원재, 정재일, 홍준혁, 김청수, 정세일, 윤덕기: 한국의 비뇨기 종양에 관한 역학 조사 (1998-2002). 대한비뇨기과학회지, **45**, 1081-1088 (2004).
2. Klein, E.A. and Thompson, I.M.: Update on chemoprevention of prostate cancer. *Curr. Opin. Urol,* **14**, 143-149 (2004).
3. 송승훈, 송강현, 이상복, 김청수: 한국인에서 혈중 셀레늄 (Selenium) 농도의 연령별 변화와 전립선암과의 상관관계. 대한비뇨기과학회지. **47**, 150-153 (2006).
4. Schwarz, K. and Foltz, C.M.: Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration-1951. *Nutrition,* **15**, 255 (1999).
5. Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G.and Hoekstra, W.G.: Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science,* **179**, 588-590 (1973).
6. El-Bayoumy, K.: The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat. Res,* **475**, 123-139 (2001).
7. Gopalakrishna, R., Chen, Z.H. and Gundimeda, U.: Selenocompounds induce a redox modulation of protein kinase C in the cell, compartmentally independent from cytosolic glutathione: its role in inhibition of tumor promotion. *Arch. Biochem. Biophys,* **348**, 37-48 (1997).
8. Sinha, R., Kiley, S.C., Lu, J.X., Thompson, H.J., Moraes, R., Jaken, S. and Medina, D.: Effects of methylselenocysteine on PKC activity, cdk2 phosphorylation and gadd gene expression in synchronized mouse mammary epithelial tumor cells. *Cancer Lett,* **146**, 135-145 (1999).
9. Clark, L.C., Combs, G.F. and Turnbull, B.W.: Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer trial. *JAMA*. **276**. 1957-1963 (1996).
10. Wang, Z., Jiang, C. and Lu, J.: Induction of caspase-mediated apoptosis and cell cycle G1 arrest by selenium metabolite methylselenol. *Mol. Carcinogenesis.* **34**. 113-120 (2002).
11. Jiang, C., Wang, Z., Ganther, H. and Lu, J.: Distinct Effects of methylseleninic acid versus selenite on apoptosis, cell cycle, and protein kinase pathways in DU145 human prostate cancer cells. *Mol. Cancer. Ther,* **1**. 1059-1066 (2002).
12. Hu, H., Jiang, C., Ip, C., Rustum, Y.M. and Lu, J.: Methylseleninic acid potentiates apoptosis induced by chemotherapeutic drugs in androgen-independent prostate cancer cells. *Clinical. Cancer. Res,* **11**. 2379-2388 (2005).
13. Hu, H., Jiang, C., Li, G. and Lu, J.: PKB/AKT and ERK regulation of caspase-mediated apoptosis by methylseleninic acid in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis.* **26**. 1374-1381 (2005).
14. Jiang, C., Hu, H., Malewicz, B., Wang, Z. and Lu, J.: Selenite-induced p53 Ser-15 phosphorylation and caspase-mediated apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Mol. Cancer. Ther,* **3**. 877-884 (2005).
15. Cho, S.D., Jiang, C., Malewicz, B., Dong, Y., Young, C., Kang, K.S., Lee, Y.S., Ip, C. and Lu, J.: Methyl selenium metabolites decrease prostate-specific antigen expression by inducing protein degradation and suppressing androgen-stimulated transcription. *Mol. Cancer. Ther,* **3**. 605-611 (2004).
16. Yoon, S.O., Kim, M.M. and Chung, A.S.: Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells. *J. Biol. Chem,* **276**, 20085-20092 (2001).
17. Wang, Z., Hu, Hm., Li, G., Lee, H.J., Jiang, C., Kim, S.H. and Lu, J.: Methylseleninic acid inhibits microvascular endothelial G1 cell cycle progression and decreases tumor microvessel density. *Int. J. Cancer,* **122**, 15-24 (2008).
18. Kaeck, M., Lu, J., Strange, R., Ip, C., Ganther, H. and Thompson, H.J.: Differential induction of growth arrest inducible genes by selenium compounds. *Biochem. Pharmacol,* **53,** 921-926 (1997).
19. Sinha, R., Said, T.K. and Medina, D.: Organic and inorganic selenium compounds inhibit mouse mammary cell growth in vitro by different cellular pathways. *Cancer Lett.* **107**. 277-

284 (1996).
20. Chung, A.S., Yoon, S.O., Jung, U. and Park, J.M.: Effect of Selenium on Chemoprevention and Metastasis. *J. Kor. Cancer. Prevention,* **8**, 45-52 (2003).
21. Sherr, C.J. and Roberts, J.M.: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1 phase progression. *Genes. Dev,* **13**, 1501-1512 (1999).
22. Elledge, S. J. and Harper, J.W.: Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol,* **6**, 847-852 (1994).
23. Sherr, C. J.: The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res,* **60,** 3689-3695 (2000).
24. Weinberg, R. A.: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell,* **81**, 323-330 (1995).
25. Harper, J. W.: Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cencer Surv,* **29**, 91-107 (1997).
26. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D.: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature,* **366**, 701-704 (1993).