AMC-HN3 인체 두경부 암세포에서 genistein과 photofrin PDT의 병행처리에 의한 세포 독성능의 증가

강정욱^{1,3} · 정필상^{1,2} · 신장인¹ · 손승렬³ · 안진철^{1,2*}

¹단국대학교 의학레이저 의료기기 지역혁신센터, ²단국대학교 의과대학 이비인후과교실

³단국대학교 첨단과학대학 미생물학과 및 기초과학연구소

Received June 23, 2008 / Accepted September 23, 2008

The Anticancer Effect of Combination of Genistein and Photofrin PDT in Human AMC-HN3 Head and Neck Cancer Cell Lines. Jung-Wook Kang^{1,3}, Phil-Sang Chung^{1,2}, Jang-In Shin¹, Seung-Yeol Son³ and Jin-Chul Ahn^{1,2*}. ¹Medical Laser and Device Research Center, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea, ²Department of Otolaryngology-Head and Neck surgery, College of Medicine, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea, ³Department of Microbiology and Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea - Photodynamic therapy (PDT) is a treatment utilizing the generation of singlet oxygen and other reactive oxygen species (ROS), which selectively accumulated in target cells. Genistein, soy-derived phytoestrogen, is one of the anticancer agents found in soybean. In the current study, we investigated the effect of photofrin-induced PDT and genistein on apoptotic cell death in head and neck cell line (AMC-HN3) to confirm the photodynamic therapy of genistein. It was determined by MTT assay that the combination group had more cytotoxicity effect than PDT group alone. Combination of photofrin PDT and genistein induced apoptosis more when comparing with PDT alone. Our data also showed that ROS was increased in combination therapy, indicating apoptosis by mitochondrial damage. These results indicated that the combination of photofrin PDT and genistein showed more cytotoxic effect and induced apoptosis in head and neck cancer cell line.

Key words : Photodynamic therapy (PDT), genistein, photofrin, cytotoxicity effect, reactive oxygen species (ROS)

서 론

광역학 치료(Photodynamic Therapy)는 광감작제(Photosensitizer)의 투여 후 광감작제를 활성화 시킬 수 있는 파장의 빛을 조사함으로써 광감작제가 축적되어 있는 암조직에 치명적인 손상을 유도하여 괴사시키는 치료방법이다[5]. 광역학 치료에 의한 세포내 작용기전의 시작은 세포 내의 반응으로 세포 내에 축적된 광감작제가 외부의 빛에너지와 산소가 반응하여 ROS 또는 활성산소(O_2)를 생성시키거나(Type II 반응), 감작제가 전자 전달계에 관여하는 경우 자유라디칼이 형성되어(Type I 반응) 세포파괴가 일어난다[7,19]. 광역학 치료는 다양한 암세포들에 세포 독성능을 가지고 있으며[2,17], carboplatin과 같은 항암제와의 병행 치료 시에 효과적인 세포 독성능을 나타낸다고 보고되었는데[9], 이 때 세포 괴사 뿐 만 아니라 세포고사를 통해서 세포 사멸을 유도한다고 알려져 있다[3].

Hematoporphyrin 유도체(HPD) 중 하나인 photofrin은 1세대 광감작제 중 하나로 현재 임상적으로 널리 사용되고 있

다[1]. Photofrin의 세포 내 축적은 세포마다 조금씩 다르게 나타나는데, 자궁 경부암세포에서는 핵막에 위치하고, 악성 흑색종세포에서는 mitochondria에 축적된다고 보고되었으며[22], 표피종양세포에서는 세포막에 위치하여 ROS를 형성한 후 세포고사를 유도한다고 보고되었다[8].

Chemopreventive agent의 항암효과에 대해 많은 연구가 진행되고 있는데 이 중 genistein은 콩류에 존재하는 phenol계 화합물이다[18]. Flavonoid의 한 그룹인 isoflavones의 주요물질 중 하나로 백혈병 세포[13], 신경교종 세포[25], 자궁 경부암 세포[27,31], 위장암 세포[28] 등에서 세포사멸을 일으킨다. 특히, in vitro 위암세포 모델에서 genistein에 의한 암세포 증식억제기전의 연구결과 세포고사 유발과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다[14].

본 연구에서는 두경부 암세포 주에서 genistein의 증식억제 효과를 알아보고, genistein을 광역학 치료와 병행 치료 시 나타나는 세포 독성능 및 세포고사 유발에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

광감작제 및 광원

광감작제로 사용한 photofrin (Axcan Pharma Inc., Canada)

*Corresponding author

Tel : +82-41-550-1786, Fax : +82-41-550-1788

E-mail : jcahn@dankook.ac.kr

은 멸균된 증류수에 녹여서 1 mg/ml의 용액으로 제조한 후 -20°C의 냉동실에서 보관하였다. 광원은 광감작제가 최대 광독성능을 나타내는 630 nm diode laser (Biolitec, Germany)를 사용하였다. 1 cm cylindrical diffuser fiber를 메탈박스 안에 설치하여 단위면적 당 에너지 세기를 0.83 mW/cm²이 되도록 조절하여 15분간 총 7.47 J/cm²의 에너지를 조사하였다.

세포 배양

실험에 사용한 인체 두경부 암세포 주(Human Head and Neck Cell Line)인 AMC-HN3은 서울 아산 병원에서 분양 받았으며[15], RPMI-1640 (Hyclone, USA)배지에 10% fetal bovine serum (Hyclone)과 100 units/ml의 penicillin 및 100 µg/ml의 streptomycin (Hyclone)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 배양기(Thermo Forma, USA)에서 배양하였다.

세포 독성능

인체 두경부 암세포주에서 genistein과 광역학 치료와의 병행치리에 의한 세포 독성능을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 지수 성장시기의 세포를 10⁴ cells/well이 되게 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 배양한 후 genistein을 25, 50, 100, 200 µM의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이에 광감작제(100 µg/ml) 100 µl 첨가한 후 2배 희석법으로 처리하여 6시간 동안 배양기에서 배양하고 새로운 배지로 교환 후 630 nm diode laser로 조사하였다. 24시간 배양 후 pH 7.3의 DPBS에 녹인 MTT (Sigma Chemical Co., USA)용액(2 mg/ml)을 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Japan)를 첨가하여 formazan을 잘 용해시키고 microplate reader (Bio-Rad 550, Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Hoechst 33342 및 PI 염색

핵의 형태학적 변화로 세포사멸을 관찰하기 위해서 고사 세포와 정상세포의 핵을 파랗게 염색하는 Hoechst 33342 (Sigma Chemical Co.)와 괴사세포의 핵을 붉게 염색하는 Propidium Iodide (PI, Sigma Chemical Co.)를 사용하였다 [6]. 광역학 치료 후 Hoechst 33342 (1 µg/ml)를 첨가하여 30분 동안 반응시킨 후, 배지를 교환하여 PI (1 µg/ml)를 첨가하여 10분 동안 배양한 후 confocal microscopy (Carl Zeiss, Germany)를 이용해 관찰 하였다.

General reactive oxygen species 측정

H₂DCF-DA (Molecular Probes Inc., USA)형광시약을 사용하여 세포 내에 존재하는 general reactive oxygen species (G-ROS)를 확인하였다. H₂DCF-DA는 acetylation에 의해 변

한 DCF 자체로는 형광이 없지만 세포내의 ROS와 만나게 되면 형광을 가지는 특성을 가지고 있다. 광역학 치료 후 두경부 암세포를 DPBS로 두세 번 씻어내고, 10 µM의 H₂DCF-DA를 첨가하여 30분 동안 배양 후 flow cytometer (BD Biosciences, USA)로 측정하였다.

결 과

Genistein에 의한 인체 두경부 암세포 증식 억제

Genistein이 인체 두경부 암세포의 성장에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서 AMC-HN3 세포 주에서 세포 독성능을 조사하였다. Genistein을 다양한 농도로(0 - 1,000 µM) 처리한 후 24, 48시간 후의 세포 독성능을 확인해본 결과, genistein의 농도 및 시간 의존적으로 세포 증식 억제가 나타났다(Fig. 1). 즉, 인체 두경부 암세포에서 genistein이 세포 증식을 억제시키는 것을 확인하였다.

Genistein과 광역학 치료의 병행 치료에 의한 세포 독성능 증가

Genistein과 광역학 치료의 병행 치료 시 세포 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해서 genistein을 25, 50, 100, 200 µM의 농도로 첨가하고 100 µg/ml의 photofrin을 2배 희석법으로 처리 하여 세포 독성능을 확인하였다. 광역학 치료를 단독으로 처리했을 때는 세포 독성능이 1.56 µg/ml일 때부터 농도 의존적으로 증식 억제 효과를 관찰할 수 있었다. 그러나, genistein과 병행 치료하였을 때는 photofrin의 농도가 1.56 µg/ml일 때는 광역학 치료 단독치리에 비해 약 5%정도 세포독성능이 증가하였다. 그러나 photofrin의 농도가 3.13 µg/ml 이상의 농도에서는 광역학 치료의 단독 처리군과 비슷한 세포 독성능을 나타냈다(Fig. 2). 광역학 치료와 genistein과 병행 치료 시에는 1.56 µg/ml에서 세포독성능이 증가한 것으로 나타났다.

Fig. 1. Effect of genistein on AMC-HN3 cell growth. Cells were treated various concentrations of genistein (0-1,000 µM) for 24 or 48 hr. After treatment, cell viability was determined by MTT assay. Each value represents the mean±SD (n=4) of three independent experiments.

Fig. 2. Effect of combination of genistein and PDT on AMC-HN3 cell viabilities. Cells were treated with 25, 50, 100, and 200 μM genistein respectively for 24 hr. Cells were then treated various concentrations of photofrin for 6 hr. Treated cells were irradiated by 630 nm diode laser ($0.83 \text{ mW}/\text{cm}^2$) for 15 min. After treatment, cell viability was determined by MTT assay. Each value represents the mean $\pm$ SD ($n=4$) of three independent experiments.

Genistein과 광역학 치료의 병행 치료 시 나타나는 세포의 형태적 변화 양상

Genistein과 광역학 치료의 병행 치료 시 나타나는 세포사멸의 형태학적 변화를 관찰하기 위해서 광역학 치료 1, 3, 6, 12시간 후 Hoechst 33342 및 PI 염색을 실시하였다(Fig. 3A). 광역학 치료시 photofrin의 농도를 50% inhibition concen-

tration (IC_{50})인 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 80% inhibition concentration (IC_{80})인 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하였을 때는 세포괴사의 형태가 관찰되었으며, apoptotic body는 거의 관찰되지 않았다. 그러나, photofrin의 농도를 IC_{80} 으로 병행 치료한 실험군에서는 광역학 치료 단독처리군과 비교하였을 때 3시간 경과 시 apoptotic body가 약 3배 정도 증가하여(Fig. 3B), 6시간까지 계속 증가하고(Fig. 3C), 12시간 경과 시에는 오히려 세포괴사가 일어났다(Fig. 3D). 즉, 세포괴사를 유발하는 광역학 치료를 genistein과 병행 치료 시에 세포괴사를 유도하는 것으로 나타났다.

Genistein과 광역학 치료의 병행 치료 시 나타나는 ROS의 동반 증가

Genistein과 광역학 치료의 병행 치료 시 나타나는 세포내 ROS를 확인하기 위해서 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 로 염색해 FACS를 이용해 분석하였다. Photofrin의 농도를 IC_{50} 과 IC_{80} 으로 광역학 치료를 단독 처리한 경우 photofrin 농도 의존적으로 ROS가 증가한 것으로 나타났다(Fig. 4A). 또한, genistein을 단독으로 처리한 경우도 대조군과 비교하여 ROS가 증가하였으며, genistein과 광역학 치료의 병행 치료 시에는 genistein을 단독 처리 시 형성된 ROS가 동반 증가한 것으로 나타났다(Fig. 4B).

Fig. 3. Effect of genistein and PDT on cell death pattern in AMC-HN3 cell lines. AMC-HN3 cells were pretreated or not with genistein. Afterwards, cells were adjusted with PDT, then incubated with Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were incubated PI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 10 min. The cell death pattern was visualized by confocal microscopy. A) Morphological change of AMC-HN3 cells after genistein combination PDT. Magnification, $\times 200$. B, C, D) The apoptotic and necrotic cells were counted at 3, 6 and 12 hr after combination treatment or not.

Fig. 4. Effect of genistein and PDT on the intracellular ROS level in AMC-HN3 cell lines. Each treated cells were washed by DPBS and incubated with $H_2DCF\text{-}DA$ ($10 \mu M$) for 30 min at $37^\circ C$. The ROS of cells were measured using a flow cytometer. A). a. photofrin IC_{50} , b. photofrin IC_{80} , B) a. control, b. genistein $50 \mu M$, c. PDT IC_{80} , D. genistein $50 \mu M$ +PDT IC_{80}

고 찰

현재 광역학 치료에 사용되는 수많은 광감작제들은 세포의 소기관에 축적되어 세포사멸을 야기한다. 현재 사용되고 있는 광감작제 중 hematophorphyrin 유도체(HPD)를 근간으로 하는 photofrin은 실제 임상에 쓰이고 있고 주로 종양의 혈관손상을 야기하여 간접적으로 세포괴사를 일으키지만, 체내에서 유지되는 시간이 길다는 단점을 가지고 있다[20]. 단점을 해결하고자 항암제들과의 병행 치료를 통해 세포괴사를 유도하는 연구가 진행되고 있다[9].

최근에 항암제와 비슷한 세포독성능을 가지고 있으면서 세포손상에 영향을 주지 않는 chemopreventive agent가 활발히 연구되어지고 있다[23]. 최근 Wang 등은 자연에서 추출한 genistein, curcumin, resveratrol, EGCG가 췌장암 세포에서 세포독성능을 일으키고 이들을 각각 병행치료 하였을 경우 세포사멸이 증가됨을 보고하였다[29]. 또한 genistein은 효율적인 암 치료를 위해서 항암제나 방사선치료법등과의 병행치료가 연구되어지고 있으며[23], curcumin은 광역학 치료와의 병행치료가 연구되었다[4,16]. 그러나, genistein과 광역학 치료의 병행치료가 아직 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 인체 두경부 암세포에 genistein과 광역학 치료의 병행 치료 시 나타나는 세포독성능을 살펴 보았다. 그 결과, 광역학 치료를 단독으로 처리한 군과 비교하여, genistein과 병행치료를 하였을 때 photofrin $1.56 \mu g/ml$ 에서 세포 독성능이 증가하였으나, photofrin $3.13 \mu g/ml$ 에서는 광역학 치료의 단독처리군과 병행 치료간의 세포 독성능이

비슷하게 나타났다(Fig. 2).

최근 연구에 의하면 레이저 조사 에너지의 양에 따른 세포사멸을 관찰하였는데 광역학 치료 시 IC_{50} 의 광량 에너지는 세포 고사가, IC_{80} 의 광량에서는 세포괴사를 통한 세포사멸이 더 활성을 갖는 것으로 보고되었다[30]. 본 연구에서 병행 치료 시 나타나는 세포 독성능에 따른 핵의 형태를 관찰한 결과, genistein을 $50 \mu M$ 의 농도로 단독처리한 경우 시간에 따라 큰 변화가 나타나지 않았고 광역학 치료를 단독 처리 시 IC_{50} 과 IC_{80} 모두 apoptotic body는 거의 없으며 시간 의존적으로 세포괴사가 나타났다. 그러나, 광역학 치료를 IC_{80} 으로 처리하였을 때 광역학 치료 단독처리와 비교하여 genistein과 병행치료 시 3시간 때부터 약 3배 이상의 apoptotic body를 관찰하였다. 즉, 광역학 치료와 genistein을 병행 치료 하였을 때 세포고사를 유도하는 것으로 나타났다.

암세포를 치료할 때 사용되는 여러 가지 항암제들은 mitochondria membrane의 손상으로 발생하는 ROS와 밀접한 연관이 있다[11,21]. 광역학 치료는 빛에 의해 활성화된 광감작제 분자와 체내 산소분자에 의해 ROS가 생성된다고 알려져 있다. 이러한 기전은 type I 반응과 type II 반응으로 나뉘는데 대부분의 광역학 치료기전은 type II 반응이 주로 일어난다[25]. Genistein을 항암제와 같이 병행치료를 하였을 때 ROS가 증가하여 세포고사를 유도한다는 보고가 있다[10]. 본 연구에서 처리하지 않은 세포에 비해 genistein과 광역학 치료를 단독으로 처리하였을 때 세포 내 존재하는 ROS가 각각 증가 하였으며, 병행 치료하였을 때는 더 많은 ROS가 형성되는 것으로 나타났다(Fig. 4). 즉, genistein에 의해 생성된 ROS가 photofrin에 연관된 광역학 치료에 의해 동반되어 증가하는 것으로 보여 진다.

최근 Kim 등은 흑색종 세포에서 genistein을 처리했을 때 Bcl-2의 감소 및 Bax의 증가가 나타났으며, 세포고사 유발에 mitochondria와 연관된 Bcl-2 family발현과 관련이 있다고 보고 하였다[14]. 또한 genistein이 간암세포에서도 mitochondria의 손상을 주어 ROS를 증가시키고 세포고사를 유도한다고 밝혀졌다[28]. 선행연구 등에 미루어 볼 때 genistein이 세포 내 ROS를 유발하여 mitochondria가 손상되고, 또한 photofrin에 의한 광역학 치료도 mitochondria를 손상시켜 세포고사를 유도하는 것으로 추측되어 진다. 그러나, 이에 대한 정확한 세포사멸기전의 신호전달 현상을 추가연구를 통해 밝혀내야 할 것이다.

인체 두경부 암세포 주에서 genistein과 광역학 치료를 병행 치료 시 세포 내에 발생하는 ROS에 의해 mitochondria에 세포손상을 주고 신호 전달을 통해 약 3시간에서 6시간 사이에 세포고사를 유도 하는 것으로 확인하였다. 부작용을 최소화 할 수 있는 chemopreventive agent인 genistein을 사용함으로써 더 효율적인 광역학 치료를 기대한다.

요 약

본 연구에서는 두경부 암세포 주에서 genistein의 증식억제 효과를 알아보고, genistein을 광역학 치료와 병행 치료 시 나타나는 세포 독성능 및 세포고사 유발에 대해 연구 하였다. 두경부 암세포 주에서 genistein의 세포독성능을 확인한 결과, 농도 및 시간 의존적으로 세포 독성능이 나타났다. 이에 genistein을 photofrin을 이용한 광역학 치료와 병행 치료 시 더 많은 세포 독성능이 나타났다. Genistein과 광역학 치료의 병행 치료 시 나타나는 형태적 변화는 광역학 치료시에는 주로 세포괴사의 형태가 관찰 되었으나, genistein과 병행 치료 시에는 세포고사가 관찰 되었다. 시간별로 관찰하였을 때, 광역학 치료를 IC₈₀으로 처리하였을 때 3시간 후에 apoptotic body가 약 3배정도 증가하였다. 세포 내 ROS를 확인한 결과 genistein과 광역학 치료를 단독으로 처리하였을 때 세포 내 존재하는 ROS가 각각 증가 하였으며, 병행 치료하였을 때는 더 많은 ROS가 형성되는 것으로 나타났다. 즉, genistein이 세포 내 ROS를 유발하여 mitochondria가 손상되고, 또한 photofrin에 의한 광역학 치료도 mitochondria를 손상시켜 세포고사를 유도하는 것으로 추측되어 진다.

감사의 글

본 연구는 단국대학교 의학래이저 의료기기 지역혁신 센터의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Almeida, R. D., B. J. Manadas, A. P. Carvalho and C. B. Duarte. 2004. Intracellular signaling mechanism in photodynamic therapy. *Biochem. Biophys. Acta.* **1704**, 59-86.
- Biel, M. 2006. Advances in photodynamic therapy for the treatment of head and neck cancers. *Lasers. Surg. Med.* **38**, 349-355.
- Buytaert, E., M. Dewaele and P. Agostinis. 2007. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta.* **1776**, 86-107.
- Chan, W. H. and H. J. Wu. 2004. Anti-apoptotic effects of curcumin on photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells. *J. Cell Biochem.* **92**, 200-212.
- Dougherty, T. J., J. E. Kaufman, A. Goldfarb, K. R. Weishaupt, D. Boyle and A. Mittleman. 1978. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* **38**, 2628-2635.
- Dursun, B., Z. He, H. Somers, D. J. Oh, S. Faubel and C. L. Edelstein. 2006. Caspases and calpain are independent mediators of cisplatin-induced endothelial cell necrosis. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **291**, F578-F587.
- Foote, C. S. 1991. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* **54**, 659.
- Hsieh, Y. J., C. C. Wu, C. J. Chang and J. S. Yu. 2003. Subcellular localization of photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: When plasma membranes are the main targets. *J. Cell Physiol.* **194**, 363-375.
- Golab, J., D. Olszewska, P. Mroz, K. Kozar, R. Kaminski, A. Jalili and M. Jakobisiak. 2002. Erythropoietin restores the antitumor effectiveness of photodynamic therapy in mice with chemotherapy-induced anemia. *Clin. Cancer Res.* **8**, 1265-1270.
- Hwang, J. T., J. H. Ha and O. J. Park. 2005. Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 433-440.
- Kang, Y. H., M. J. Yi, M. J. Kim, M. T. Park, S. W. Bae, C. M. Kang, C. K. Cho, I. C. Park, M. J. Park, C. H. Rhee, S. I. Hong, H. Y. Chung, Y. S. Lee and S. J. Lee. 2004. Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Cancer Res.* **64**, 8960-8967.
- Kiguchi, K., A. I. Constantinou and E. Huberman. 1990. Genistein-induced cell differentiation and protein-linked DNA strand breakage in human melanoma cells. *Cancer Commun.* **2**, 271-277.
- Kim, E. K., Y. H. Myong, K. S. Song, K. H. Lee, C. H. Rhu and Y. H. Choi. 2006. Induction of G2/M arrest of the cell cycle by genistein in human bladder carcinoma and leukemic cells. *J. life Science* **16**, 589-597.
- Kim, J. I., C. Park, B. T. Choi, C. H. Rhu, W. H. Lee and Y. H. Choi. 2006. Induction of apoptosis by genistein through caspase-3 activation in human gastric carcinoma and melanoma cells. *Cancer Prev. Res.* **11**, 225-234.
- Kim, S. Y., K. C. Chu, H. R. Lee, K. S. Lee and T. E. Carey. 1997. Establishment and characterization of nine new head and neck cancer cell lines. *Acta. Otolaryngol.* **117**, 775-784.
- Koon, H., A. W. Leung, K. K. Yue and N. K. Mak. 2006. Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cells. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **25**, 205-215.
- Lam, M., N. L. Oleinick and A. L. Nieminen. 2001. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 47379-47386.
- Macgregor, J. T. 1986. Genetic toxicology of dietary flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.* **206**, 33-43.
- Moan, J. and K. Berg. 1991. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* **53**, 549-553.
- Moor, A. C. 2000. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* **57**, 1-13.
- Osford, S. M., C. L. Dallman, P. W. Johnson, A. Ganesan and G. Packham. 2004. Current strategies to target the an-

- ti-apoptotic bcl-2 protein in cancer cells. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1031-1039.
22. Pelicano, H., D. Carney and P. Huang. 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat.* **7**, 97-110.
23. Saczko, J., M. Mazurkiewicz, A. Chwilowska, J. Kulbacka, G. Kramer, M. Lugowski, M. Snietura and T. Banas. 2007. Intracellular distribution of photofrin in malignant and normal endothelial cell line. *Folia. Biol (praha).* **53**, 7-12.
24. Sarkar, F. H. and Y. Li. 2006. Using chemopreventive agents to enhance the efficacy of cancer therapy. *Cancer Res.* **66**, 3347-3350.
25. Schmidt, F., C. B. Knobbe, B. Frank, H. Wolburg and M. Weller. 2008. The topoisomerase II inhibitor, genistein, induces G2/M arrest and apoptosis in human malignant glioma cell lines. *Oncol. Rep.* **19**, 1061-1066.
26. Sharman, W. M., C. M. Allen and J. E. van Lier. 1999. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov. Today* **4**, 507-517.
27. Shin, J. I., J. H. Shim, K. H. Kim, H. S. Choi, J. W. Kim, H. G. Lee, B. Y. Kim, S. N. Park, O. J. Park and D. Y. Yoon. 2008. Sensitization of the apoptotic effect of gamma-irradiation in genistein-pretreated CaSki cervical cancer cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 523-531.
28. Yanagihara, K., A. Ito, T. Toge and M. Numoto. 1993. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* **53**, 5815-5821.
29. Yeh, T. C., P. C. Chiang, T. K. Li, J. L. Hsu, C. J. Lin, S. W. Wang, C. Y. Peng and J. H. Guh. 2007. Genistein induces apoptosis in human hepatocellular carcinomas via interaction of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial insult. *Biochem. Pharmacol.* **73**, 782-792.
30. Wang, Z., S. Desmoulin, S. Banerjee, D. Kong, Y. Li, R. L. Deraniyagala, J. Abbruzzese and F. H. Sarkar. 2008. Synergistic effects of multiple natural products in pancreatic cancer cells. *Life Sci.* **83**, 293-300.
31. Wyld, L., M. W. Reed and N. J. Brown. 2001. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *Br. J. Cancer* **84**, 1384-1386.
32. Zhang, B., J. Y. Liu, J. S. Pan, S. P. Han, X. X. Yin, B. Wang and G. Hu. 2006. Combined treatment of ionizing radiation with genistein on cervical cancer HeLa cells. *J. Pharmacol. Sci.* **102**, 129-135.