

인체 자궁암 세포에서 플라보노이드에 의한 P-당단백질의 활성 조절

고은정 · 정수연 · 김나형 · 이화정[†]

이화여자대학교 약학대학

(2003년 10월 25일 접수 · 2003년 11월 25일 승인)

Modulation of P-glycoprotein Activity by Flavonoids in Human Uterine Sarcoma Cells

Eun Jung Go, Soo Yeon Chung, Na Hyung Kim and Hwa Jeong Lee[†]

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

(Received October 25, 2003 · Accepted November 25, 2003)

ABSTRACT—One of the possible mechanisms of multi-drug resistance found in cancer cells is the over-expression of P-glycoprotein (P-gp). Studies have shown that compounds in plants including vegetables and fruits not only have anticancer activities but may also modulate P-gp activity. The effect of flavonoids and organic isothiocyanate on P-gp activity was studied in human uterine sarcoma cell lines, MES-SA (sensitive) and MES-SA/DX5 (resistant) cells. The accumulation of daunomycin (DNM), a P-gp substrate, was approximately 10 times greater in the sensitive cell as compared to the resistant cells over the entire time course (up to 2 hours). The positive control, verapamil increased the two hour accumulation of DNM while quercetin decreased that of DNM in the resistant cells. 1-Naphtyl-isothiocyanate (NITC) showed no effect on the two hour accumulation of DNM. The IC₅₀ values for DNM in the resistant cells was about 20 times higher than that observed in the sensitive cells (10.1±1.7 μM vs. 0.58±0.28 μM). Verapamil reduced the IC₅₀ value for DNM whereas flavonoids (quercetin and fisetin) increased those for DNM in the resistant cells.

Key words—P-glycoprotein, Flavonoids, Multi-drug resistance, Human uterine sarcoma cells

암은 가장 치명적인 사망 원인의 하나로 암을 치료하는데 현재 약 50여 가지의 화합물들이 쓰이고 있으나 암을 치료하는 데 있어서 대두되는 문제점 가운데 하나는 다제내성 (multidrug resistance, MDR) 현상이다.¹⁾ 이는 인체에서 암 치료가 실패하는 가장 주된 원인 중 하나로서 구조나 작용 기전이 전혀 다른 항암제들에 대한 암세포의 내성이 유발되는 것으로 P-당단백질(P-glycoprotein, P-gp)이라 불리는 수송 단백질의 과다발현과 관련되어진다.²⁾ P-gp는 인체 MDR1 gene으로부터 생성되는 ATP-의존적 수송 단백질(170 kDa)로 다양한 범위의 지용성 물질들을 세포 밖으로 배출시킨다.³⁾ 암세포에 발현되는 P-gp는 vinca alkaloids, anthracyclines, epipodophyllotoxins 및 택솔 등의 항암제들을 능동적으로 세포 밖으로 배출시킴으로써 암세포 내에서의 치료 약물의 농도를 감소시켜 내성을 증가시킨다.⁴⁾ 반면, P-gp는 신장, 간, 소장 및 뇌와 같은 정상 기관들에도 존재하며^{5,6)} 이는 생체에 노출되는 독성 물질들을 세포 밖으로 배출시켜 해독작용을 한다.^{7,8)} 인체 유방암 세포인 MCF-7 세포에서

benzo[α]pyrene 및 dimethylbenz[α]anthracene이 P-gp에 의해 배출되었다는 것이 보고된 바 있다.^{9,10)} 그러므로, P-gp로 인해 유발되는 항암제의 내성을 감소시켜 항암효과를 높이기 위해서, 또한 환경 독성물질들에 대한 방어기전으로서의 P-gp의 역할을 보다 깊이 연구하기 위해서 P-gp 발현 및 활성 조절에 관한 연구가 필요하다.

현재 과일이나 야채를 많이 섭취할수록 발암의 가능성이 감소한다는 보고가 있으며^{11,12)} 차나 적색 포도주와 같은 음료수, 과일 및 야채에 풍부하게 들어있는 플라보노이드류 물질들이 인체 유방암 세포, 결장암 세포 및 쥐의 간세포에서 P-gp의 활성을 조절한다는 결과가 보고되었다.^{10,13-16)} 또한, 십자화과 식물을 포함하여 식용 가능한 다양한 식물들에 분포되어 있는 유기 isothiocyanate들이 화학적 발암 물질들로 인한 암 유발을 동물모델에서 방지하였다는 보고도 있다.^{17,18)}

따라서 본 연구에서는 다양한 식물류에 분포되어 있는 플라보노이드와 유기 isothiocyanate가 P-gp 활성에 어떠한 영향을 미치는지에 관해 인체 자궁암 세포에서 검토하였다. 또한, P-gp의 활성을 조절할 수 있는 새로운 식물 추출 성분들을 찾아내는데 활용할 수 있는 P-gp 활성 검색법을 세포 수준에서 확립하였다.

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)3277-3049, E-mail : hwalee@ewha.ac.kr

실험 방법

시약 및 기기

세포 배양 배지인 Dulbecco's modified eagle medium/저농도 글루코스(DMEM), trypsin-EDTA(0.25% trypsin-1 mM EDTA) 및 페니실린(10,000 units/ml)-스트렙토마이신(10,000 µg/ml)은 Invitrogen(Calsbad, USA)사로부터, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone(South Logan, USA)사로부터 구입하였다. Hanks' balanced salts without sodium(HBSS), daunomycin(DNM), verapamil, quercetin, fisetin, 1-naphthyl isothiocyanate(NITC), dimethyl sulphoxide(DMSO), sulforhodamine B(SRB) 및 trichloroacetic acid(TCA)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, USA)사에서 구입하여 사용하였다. NaCl, KCl, MgCl₂는 Duksan pure chemical(Ansan, Korea)사에서, CaCl₂는 Showa chemical(Tokyo, Japan)사에서, Acetic acid는 Daejung(Siheung, Korea)사에서 구입하였다. N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES), Triton[®]X-100 및 Tris base는 USB(Cleveland, USA)사에서 구입하였고, Microscint[™]40(scintillation cocktail)은 Packard Instrument Co. Inc.(Meriden, USA)사에서 구입하였으며, [³H]-DNM(1-5 Ci/mmol)은 PerkinElmer Inc.(Wellesley, USA)사로부터 구입하였다. 6 well plate 및 96 well plate는 BD biosciences(Bedford, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 기기로는 세포배양기(3158, Forma Scientific Inc., Marietta, USA), 방사선 측정기(Topcount NXT, Packard Instrument Co. Inc., Meriden USA), orbital shaker(SLOS-20, SLB, Seoul, Korea), inverted microscope(Axiovert 200, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 및 ELISA reader(3550, Bio-Rad, Hercules, USA) 등을 사용하였다.

세포 배양 조건

자궁에서 유도된 암세포인 MES-SA 세포(모체 세포) 및 MDR을 가지는 MES-SA/DX5 세포(P-gp 과다발현 세포)를 화학연구소에서 분양 받아 사용하였다. 이 세포들은 CO₂ 5% 및 공기 95%가 공급되는 37°C의 세포 배양기 안에서 FBS 5% 및 항생제(100 units/ml 페니실린 - 100 µg/ml 스트렙토마이신)를 함유하는 DMEM/저농도 글루코스 배지에서 성장하였다.¹⁹⁾ 배양된 MES-SA 세포 및 MES-SA/DX5 세포들을 inverted microscope(Axiovert 200, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 할로겐 램프를 사용하여 사진 찍은 후 그 세포의 형태를 비교, 검토하였다.

[³H]-Daunomycin 세포 내 축적실험

시간에 따르는 [³H]-DNM uptake 양상을 알아보기 위하여 MES-SA 세포 및 MES-SA/DX5 세포를 6 well plate에 50,000개/well이 되도록 넣어준 후 72시간 동안 배양하였다. Uptake buffer(137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2.8 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4)로 세포들을 씻어준 후 0.025 µM 농도의 [³H]-DNM을 함유하는 uptake buffer 1 ml을 각 well에 넣어 10분, 30분, 60분 및 120분 동안 배양하였다. 각 배양 시간이 끝난 직후 각 well의 uptake buffer를 제거하고 ice-cold stop solution(137 mM NaCl, 14 mM Tris, pH 7.4)을 넣어 [³H]-DNM uptake을 종결시켰다. Lysis buffer(0.5% Triton X-100) 1 ml을 각 well에 넣고 150 rpm에서 30분간 shaking한 후 방사선 측정기로 radioactivity를 측정하였다.^{16,20)}

플라보노이드 및 유기 isothiocyanate가 P-gp 활성화에 미치는 영향에 관하여 연구하고자 MES-SA/DX5 세포를 6 well plate에 50,000개/well이 되도록 넣어준 후 72시간 동안 배양하였다. 그리고 나서 각 well에 100 µM 농도의 positive control인 verapamil, 플라보노이드인 quercetin, 또는 유기 isothiocyanate인 NITC를 넣어 30분 동안 배양한 후, 각 well에 [³H]-DNM을 넣어 최종 농도가 0.025 µM이 되도록 처리한 후 2시간 동안 배양하였다. 이 때, 세포 내 유입된 [³H]-DNM의 radioactivity를 방사선 측정기로 측정하였다. 대조군의 uptake 결과와 플라보노이드 및 유기 isothiocyanate로 세포를 처리한 후 얻어진 uptake 결과를 student's *t*-test로 통계 처리하여 *p*값이 0.05 이하이면(*p*<0.05) 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

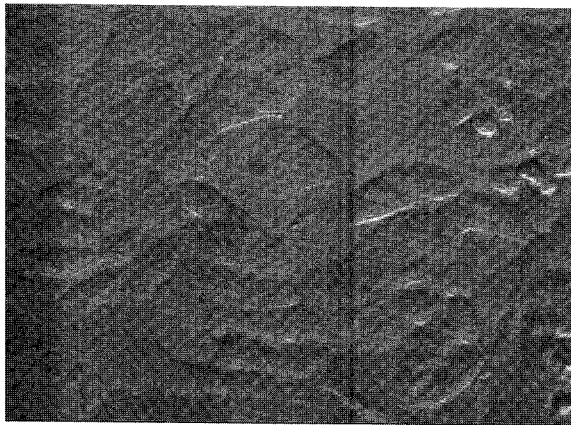
세포 독성 실험

MES-SA 세포와 MES-SA/DX5 세포를 각 well 당 5,000 개 정도 들어가도록 96 well plate에 넣은 후 세포들이 plate에 부착할 수 있도록 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. $1.8 \times 10^{-9} \text{M} \sim 1.8 \times 10^{-5} \text{M}$ 농도 범위의 DNM과 100 µM verapamil, quercetin, fisetin 또는 NITC를 각 well에 넣어주었다.²⁰⁾ 이때, P-gp 조절 물질 대신 DMSO를 넣은 그룹을 대조군으로 사용하였다. 2시간이 지난 다음, incubation solution(DNM±P-gp 조절 물질)을 제거하고 세포들을 HBSS로 2번 씻어준 후 새 배지를 넣어 주었다. 3일 후 SRB staining assay를 통해 세포 독성을 검토하였으며 그 방법을 간단히 서술하면 다음과 같다.²¹⁾ 세포들을 10% TCA로 1시간 동안 고정시킨 후, 물로 5번 씻어주고 건조시켰다. SRB(0.4% w/v in 1% acetic acid)를 각 well에 넣고 15분 후에 1% acetic acid로 4번 씻어주었다. Plate를 건조시킨 다음 단백질에 결합된 색소를 10 mM Tris base로 용해시켜 515 nm에

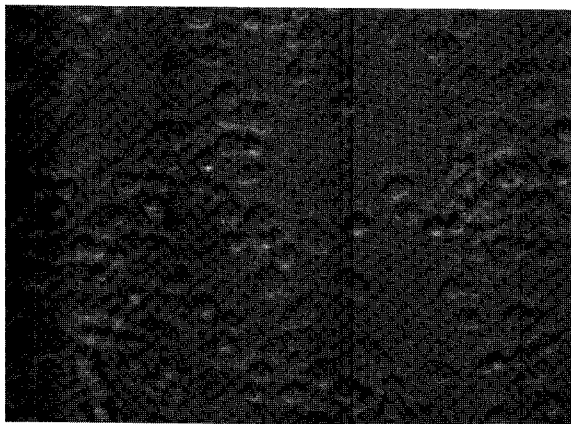
서의 흡광도를 측정 후 IC₅₀ 값을 구하였다. IC₅₀ 값은 어떠한 반응 A의 크기를 100%로 가정하였을 때, B라는 약물을 이용하여 반응 A의 크기를 50%로 감소시킬 수 있는 B의 농도를 의미한다. 대조군의 IC₅₀ 값과 플라보노이드 및 유기 isothiocyanate로 세포를 처리한 후 얻어진 IC₅₀ 값을 student's *t*-test로 통계 처리하여 p값이 0.05 이하이면(p<0.05) 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

MES-SA 세포를 5×10⁻⁷M doxorubicin의 존재 하에서 배양함으로써 MDR이 유도된 MES-SA/DX5 세포²⁰⁾는 모체 세포인 MES-SA 세포에 비해 그 크기가 작고 동그란 모양을 나타내었다(Figure 1의 (A) 및 (B)). MES-SA/DX5 세포는 vinblastine, 택솔, colchicine, vincristine, etoposide, dactinomycin, mitoxantrone 등의 항암제에 대해 내성이 있는 것으로 알려져 있으므로 시간에 따르는 [³H]-DNM uptake



(A)



(B)

Figure 1—Micrographs of (A) MES-SA and (B) MES-SA/DX5 Cells. MES-SA (sensitive) and MES-SA/DX5 (resistant) cells were observed under inverted microscope.

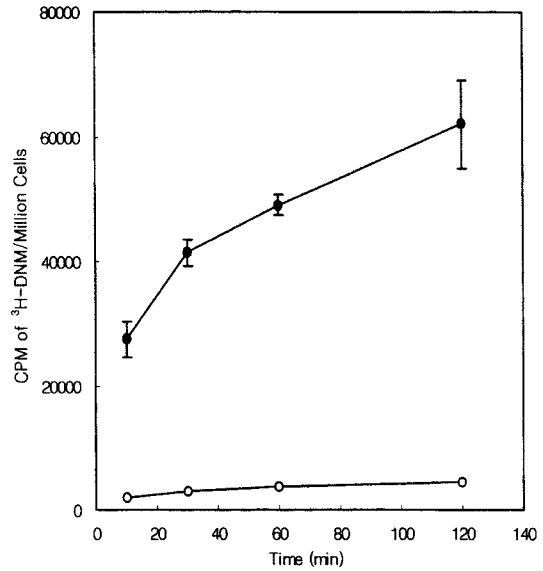


Figure 2—Time Course of [³H]-DNM Uptake in MES-SA (●) and MES-SA/DX5 (○) Cells. Each data point is presented as the mean±S.D. from three wells in one representative study. The study was repeated three times with similar results.

양상을 관찰함으로써 이를 확인하였다. MES-SA 세포에서의 DNM uptake은 MES-SA/DX5 세포에 비해 각 시간대에서 약 10배 이상 증가되었다(Figure 2). 이는 MES-SA/DX5 세포의 경우 P-gp가 과다 발현되어 항암제인 DNМ을 세포 밖으로 배출함으로써 세포 내의 DNМ의 축적을 감소시키기 때문인 것으로 사료된다.²⁰⁾ 또한, 시간이 증가함에 따라 MES-SA 세포에서의 DNМ uptake은 꾸준히 증가하였으나, MES-SA/DX5 세포에서는 시간의 변화에 따라 DNМ uptake은 거의 증가하지 않았고 2시간 후에도 낮은 수준의 [³H]-DNМ만이 세포 안에 남아 있었다.

또한, 기존에 알려진 식물추출물들 가운데 일부를 선택하여 이들 암세포에서의 P-gp 조절 물질로서의 가능성을 검토해 보았다.¹³⁻¹⁸⁾ 100 μM 농도의 verapamil, quercetin(플라보노이드) 및 NITC(유기 isothiocyanate)로 MES-SA/DX5 세포를 처리한 후, 2시간 동안의 [³H]-DNМ uptake을 관찰하였다. 그 결과, P-gp 저해제로 알려진 verapamil은 대조군에 비해 세포 내의 DNМ uptake를 유의성(p<0.001) 있게 증가시켰으나 플라보노이드인 quercetin은 DNМ uptake를 유의성(p<0.01) 있게 감소시켰고 NITC는 대조군에 비해 별다른 변화를 보이지 않았다(Figure 3).

세포 독성을 검토하기 위하여 MES-SA 세포 및 MES-SA/DX5 세포를 2시간 동안 항암제인 DNМ과 함께 배양한 다음 얻어진 IC₅₀ 값은 각각 0.58±0.28 μM(n=5) 및 10.1±1.70 μM(n=5)이었으며 이 결과를 통해 MES-SA/DX5 세포

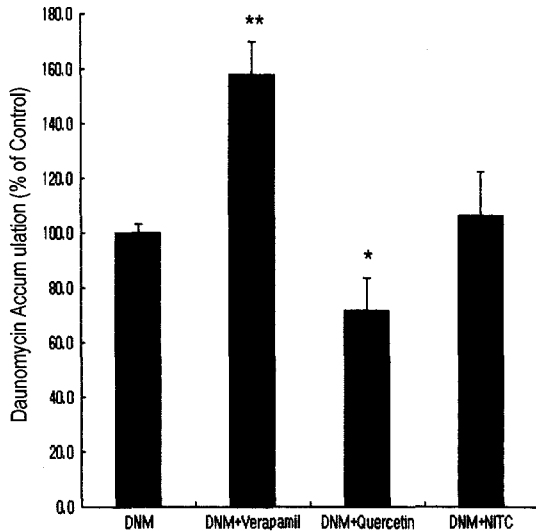


Figure 3—Effect of Quercetin and NITC on DNM Uptake in MES-SA/DX5 Cells. The two hour accumulation of 0.025 μ M DNM was examined in the presence and absence of 100 μ M dietary compounds. Verapamil, P-gp inhibitor was used as a positive control. Each data point represents the mean \pm S.D. (n=5-7). *p<0.01 compared with control and **p<0.001 compared with control.

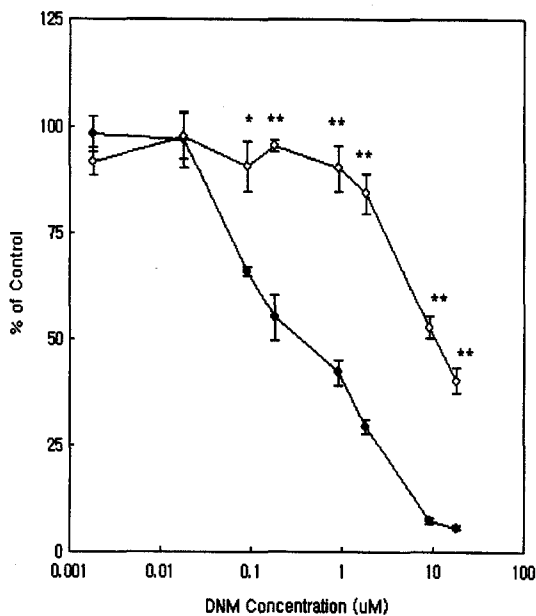


Figure 4—DNM Cytotoxicity in MES-SA (●) and MES-SA/DX5 (○) Cells. The effect of different concentrations of DNM on cell growth of MES-SA and MES-SA/DX5 cells was examined. Each data point represents the mean \pm S.D. from five wells in one representative study. The study was repeated three times with similar results. *p<0.001 compared with control and **p<0.0001 compared with control.

가 P-gp를 과다 발현함으로써 항암제에 대한 내성을 나타낸다는 것을 다시 한번 확인하였다(Figure 4). 또한, 항암제에

Table I— IC_{50} Values of DNM in MES-SA and MES-SA/DX5 Cells (μ M)

	MES-SA (sensitive)	MES-SA/DX5 (resistant)
Control	0.58 \pm 0.28 (5)	10.1 \pm 1.70 (5)
Verapamil	0.55 \pm 0.42 (3)	1.31 \pm 0.38 (3)*
Quercetin	1.01 \pm 0.48 (4)	18.0 \pm 5.55 (3)
Fisetin	1.39 \pm 0.64 (3)	14.9 \pm 1.24 (3)
NITC	2.73 \pm 1.75 (3)	8.57 \pm 2.85 (3)

Number in parenthesis indicates n.
*p<0.01 compared with control

의한 MES-SA 세포 및 MES-SA/DX5 세포 독성 연구에서 quercetin, fisetin 및 NITC가 미치는 영향에 관하여 조사한 결과, MES-SA 세포에서는 각 그룹간에 별다른 차이가 없었으나 MES-SA/DX5 세포에서는 verapamil이 P-gp 저해제로 작용하여 DNM의 IC_{50} 값을 대조군에 비해 유의성 (p<0.01) 있게 감소시켰고 플라보노이드인 quercetin과 fisetin은 오히려 그 값을 증가시켰으나 대조군에 비해 유의적인 차이는 없었다(Table I). 이와 같은 결과는 P-gp를 발현하는 HCT-15 세포에서 여러 플라보노이드들이 [14 C]-adriamycin의 세포 내 축적 및 항암제로 인해 유발되는 암세포에 대한 독성을 감소시켰다는 Critchfield 등의 결과와 유사하였다.¹⁶⁾

결론적으로, NITC는 P-gp 활성화에 별다른 영향을 미치지 않았으나 플라보노이드들은 항암제의 세포 내 유입을 감소시켜 항암제에 대한 암세포들의 독성을 감소시키는 방향으로 P-gp의 활성을 조절하였다. P-gp는 암세포 뿐 아니라 생체 여러 기관의 정상 세포에도 존재하므로 이와 같은 결과는 플라보노이드들이 환경오염 물질이나 발암성 물질들이 체내로 유입되지 못하도록 P-gp의 방어기전을 강화시켜 생체를 보호하는데 사용될 수 있음을 시사해 주었다.⁹⁻¹⁰⁾ 그러므로, 플라보노이드들이 풍부하게 들어있는 과일, 야채 및 녹차 등과 같은 음식을 매일 섭취함으로써 암 예방 효과를 증진시킬 수 있으리라 기대된다.^{11-12,22)} 뿐만 아니라, P-gp의 활성을 조절하는 플라보노이드들은 P-gp 기질 약물들의 위장관 흡수에도 영향을 미쳐 약물들의 생체 이용률에 변화를 가져올 수 있다.²³⁾ 또한, P-gp 활성을 저해하는 물질들(quinidine, verapamil 및 amiodarone)이 digoxin의 신장 클리어런스를 감소시켰다는 보고²⁴⁻²⁵⁾는 P-gp 활성을 조절하는 플라보노이드들이 P-gp 기질 약물들의 신장 배설에 영향을 미쳐 약물의 체내 동태에 변화를 가져올 수 있다는 것을 암시한다. 앞으로 플라보노이드들이 정확히 어떠한 기전에 의해 인체 자궁암 세포에서 P-gp의 활성을 조절하는 지에 대해서 배출 연구 등 더 많은 연구가 필요하므로 본 연구실에서는 이에 관한 연구를 계속 수행할 예정이다.

결 론

인체의 자궁암 세포에서 유래한 MES-SA/DX5 세포는 P-gp을 과다 발현하여 항암제인 DNMI이 세포 안으로 유입되어 축적되는 것을 방해함으로써 항암제에 대한 내성을 나타내었다. 또한, 플라보노이드인 quercetin 및 fisetin은 MES-SA/DX5 세포에서 P-gp 조절 물질로서 작용하여 그 활성을 증가시켰고, 유기 isothiocyanate인 NITC는 P-gp의 활성에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 뿐만 아니라, 이 연구를 통하여 확립된 P-gp 활성 검색법은 암세포에 과다 발현하는 P-gp의 활성을 저해하여 기존의 우수한 항암제들에 대한 내성을 억제할 수 있는 식물 추출물을 발견하고, 그 활성 원인 물질을 밝혀 chemosensitizer로 개발하는데 활용될 수 있으리라 사료된다. 또한, P-gp 활성 검색법은 소장에서 여러 약물들의 배출을 증가시켜 흡수를 저해하는 P-gp의 활성을 억제함으로써 이 약물들의 생체이용률을 증가시킬 수 있는 P-gp 활성 조절물질들을 찾아내는데 기여하리라 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단의 2002년 여자대학교 연구기반 확충사업의 연구비(R06-2002-011-01002-0)를 지원 받아 진행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 MES-SA 세포 및 MES-SA/DX5 세포를 분양해주신 화학연구소 최상운 박사님과 이 연구를 위하여 실험실적 조언을 아끼지 않으시고 실제적인 도움을 주신 이화여자대학교 약학대학 면역학 연구실 김미형 박사님께도 감사드립니다.

문 헌

- 1) P.F. Juranka, R.I. Zastawny and V. Ling, P-glycoprotein multidrug resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins, *FASEB J.*, **3**, 2583-2592 (1989).
- 2) S.A.W. Fuqua, I.M. Moretti-Rojas, S.L. Schneider and W.L. McGuire, P-glycoprotein expression in human breast cancer cells, *Cancer Res.*, **47**, 2103-2106 (1987).
- 3) J.A. Endicott and V. Ling, The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance, *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 137-171 (1989).
- 4) M.M. Gottesman and I. Pasran, Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter, *Ann. Rev. Biochem.*, **62**, 385-427 (1993).
- 5) F. Theibaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M.M. Gottesman, I. Pastan and M.C. Willingham, Localization of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 7735-7738 (1987).

- 6) B.L. Lum and M.P. Gosland, MDR expression in normal tissues. Pharmacologic implications for the clinical use of P-glycoprotein inhibitors. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, **9**, 319-336 (1995).
- 7) M.F. Fromm, P-glycoprotein: A defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drug, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **38**, 69-74 (2000).
- 8) R.W. Stenkampf and W.D. Klohs, Possible link between the intrinsic drug resistance of colon tumor and a detoxification mechanism of intestinal cell, *Cancer Res.*, **48**, 3025-3030 (1988).
- 9) G.C. Yeh, J. Lopaczynska, C.M. Poore and J.M. Phang, A new functional role for P-glycoprotein: Efflux pump for benzo[α]pyrene in human breast cancer MCF-7 cells, *Cancer Res.*, **52**, 6692-6695 (1992).
- 10) J.M. Phang, C.M. Poore, J. Lopaczynska and G.C. Yeh, Flavonol-stimulated efflux of 7,12-dimethylbenz[α]anthracene in multi drug-resistant breast cancer cells. *Cancer Res.*, **53**, 5977-5981 (1993).
- 11) J.D. Potter, Cancer prevention: epidemiology and experiment, *Cancer Lett.*, **114**, 7-9 (1997).
- 12) M.J. Wargovich, Experimental evidence for cancer preventive elements in foods, *Cancer Lett.*, **114**, 11-17 (1997).
- 13) T. Ikegawa, H. Ohtani, N. Koyabu, M. Juichi, Y. Iwase, C. Ito, H. Furukawa, M. Naito, T. Tsuruo and Y. Sawada, Inhibition of P-glycoprotein by flavonoid derivatives in adriamycin-resistant human myelogenous leukemia (K562/ADM) cell, *Cancer Lett.*, **177**, 89-93 (2002).
- 14) G. Scambia, F.O. Ranelletti, P.B. Panici, R. DiVincenzo, G. Bonanno, G. Ferrandina, M. Piantelli, S. Bussa, C. Rumi, M. Cianfriglia and S. Mancuso, Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **34**, 459-464 (1994).
- 15) E. Chieli, N. Romiti, F. Cervelli and R. Tongiani, Effects of flavonols on P-glycoprotein activity in cultured rat hepatocytes, *Life Sci.*, **57**, 1741-1751 (1995).
- 16) J.W. Critchfield, C.J. Welsh, J.M. Phang and G.C. Yeh, Modulation of adriamycin accumulation and efflux by flavonoids in HCT-15 colon cells: activation of P-glycoprotein as a putative mechanisms, *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1437-1445 (1994).
- 17) P. Talalay and Y. Zhang, Chemoprotection against cancer by isothiocyanates and glucosinolates. *Biochem. Soc. Trans.*, **24**, 806-810 (1996).
- 18) Y. Zhang and P. Talalay, Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms, *Cancer Res. (suppl)*, **54**, 1976-1981 (1994).
- 19) W.G. Harker, F.R. Mackintosh and B.I. Sikic, Development and characterization of a human sarcoma cell line, MES-SA, sensitive to multiple drugs, *Cancer Res.*, **43**, 4943-4950 (1983).
- 20) G. Harker and B.I. Sikic, Multidrug (Pleiotropic) resistance in doxorubicin-selected variants of the human sarcoma cell line

- MES-SA, *Cancer Res.*, **45**, 4091-4096 (1985).
- 21) P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenny and M.R. Boyd, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1107-1112 (1990).
- 22) D.F. Birt, S. Hendrich and W. Wang, Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.*, **90**, 157-177 (2001).
- 23) V.J. Wachter, L. Salphati and L.Z. Benet, Active secretion and enterocyte drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv. Drug Del. Rev.*, **20**, 99-112 (1996).
- 24) A. Somogyi, Renal transport of drugs: specificity and mechanisms, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **23**, 986-989 (1996).
- 25) G. Koren, Clinical pharmacokinetic significance of the renal tubular secretion of digoxin. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **44**, 467-477 (1988).