

인체 자궁암 세포에서 천연 성분이 P-당단백질의 활성화에 미치는 영향

정수연 · 고은정 · 김나형 · 성민경 · 장정옥 · 이화정[†]

이화여자대학교 약학대학

(2005년 5월 30일 접수 · 2005년 7월 15일 승인)

Effect of Natural Compounds on P-glycoprotein Activity in Human Uterine Sarcoma Cells

Soo Yeon Chung, Eun Jung Go, Na Hyung Kim, Min Kyung Sung, Jung Ok Jang and Hwa Jeong Lee[†]

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

(Received May 30, 2005 · Accepted July 15, 2005)

ABSTRACT – Multidrug resistance (MDR) of cancer cells is, at least in part, associated with the overexpression of P-glycoprotein (P-gp). Many studies have demonstrated that natural compounds obtained from fruits, vegetables, teas and medicinal plants may modulate P-gp activity. The objective of the present investigation was to examine the effect of seven natural compounds on the P-gp activity in human uterine sarcoma cell line, MES-SA/DX5. Daunomycin uptake was significantly increased by biochanin A and silymarin ($p < 0.0001$) whereas it was reduced by morin ($p < 0.01$). The efflux of daunomycin from the cells was significantly inhibited by biochanin A, morin, cephalotaxine, berberine ($p < 0.05$) and silymarin ($p < 0.0001$). Biochanin A, berberine and silymarin significantly decreased IC_{50} value of daunomycin ($p < 0.05$) while morin increased it ($p < 0.05$). These results suggest that some natural compounds such as biochanin A and silymarin may inhibit P-gp function and can be developed as MDR reversing agents to improve the efficacy of chemotherapeutic drugs when administered concomitantly.

Key words – P-glycoprotein, Natural compounds, Daunomycin, MES-SA/DX5 cells, Multidrug resistance

다제내성(multidrug resistance)은 성공적인 항암 치료에 심각한 제약을 가져오는데¹⁾ 이러한 현상은 구조나 작용기전이 전혀 다른 항암제들에 대한 암세포의 내성이 유발되는 것으로 P-당단백질(P-glycoprotein)의 과다 발현과 밀접한 관계가 있다.²⁾ P-당단백질은 항암제를 포함한 여러 종류의 지용성 약물들을 세포 밖으로 내보내는 ATP-의존성 배출 펌프로써,³⁾ 다양한 종류의 암세포에 과다 발현되어 항암제의 치료 효과를 저하시키며⁴⁾ 또한 여러 정상세포에도 존재하여^{5,6)} 생체에 독성을 일으키는 물질들을 체외로 배출함으로써 해독작용을 하기도 한다.^{7,8)}

이미 연구된 바로는 차, 과일 및 야채 등에 풍부하게 들어있는 플라보노이드들이 인체의 여러 암세포들과 쥐의 간세포에서 P-당단백질의 활성화 조절에 관여하고⁹⁻¹³⁾ 또한 이들이 P-당단백질에 의한 dimethylbenz[α]anthracene, benzo[α]pyrene 및 doxorubicin의 배출에도 영향을 미친다고 보고된 바 있다.^{9,13,14)} 뿐만 아니라, 전통적으로 쓰여지는 한약

에서 유래된 천연 성분들이 P-당단백질의 활성을 조절함으로써 다제내성을 감소시켜 항암 효과를 증진시켰다는 보고도 있다.¹⁵⁾

본 연구에 사용된 천연 성분들에 대해서 간단하게 살펴보면, artemisinin은 쑥과의 sesquiterpene으로서 말라리아, 백혈병 및 대장암에 치료 효과가 있다고 밝혀진 바 있다.^{16,17)} Biochanin A는 붉은 토끼풀이나 달구지풀에서 많이 발견되는 이소플라본으로서 식물성 에스트로겐으로 알려져 있고¹⁸⁾ 항산화 작용을 나타내며 화학적으로 유발되는 쥐의 유방암 발생률을 감소시킨다는 것이 보고된 바 있다.^{19,20)} Biochanin A와 같은 이소플라본인 daidzein은 갈근에서 발견되며 식물성 에스트로겐으로 분류되지만 항에스트로겐 효과도 함께 갖고 있는 것이 특징이다.²¹⁾ 또한 알코올을 섭취했을 때 불쾌감을 주는 알데하이드의 대사를 막아 혐주제로서 사용되기도 한다.²²⁾ Morin은 뽕나무의 열매나 뽕나무의 어린 가지인 상지의 잎에 많이 분포하고 있는 플라보노이드로서²³⁾ 동맥경화를 막고²⁴⁾ 암의 분화를 저해한다고 알려져 있다.²⁵⁾ Silymarin은 엉겅퀴에서 발견되는 항산화성 플라보노이드로서²⁶⁾ 오랫동안 간 강장제로 사용되었으며²⁷⁾ 최근 연구에서

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)3277-3409, E-mail : hwalee@ewha.ac.kr

는 인슐린 내성과 당뇨병의 합병증을 줄여주며 항암 효과도 가지고 있는 것으로 보고되었다.²⁸⁾ 또한 항암 효과가 알려져 있는 cephalotaxine은 인도네시아나 중국에 있는 개비자 나무에서 발견되는 알칼로이드이며,^{15,29)} berberine 또한 미나리아재비과의 히드라티스에서 추출할 수 있는 알칼로이드로서 사탕무우 등에서 찾아볼 수 있으며, 박테리아나 곰팡이 등에 대한 항균 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다.³⁰⁾

따라서 본 연구에서는 위에서 언급한 여러 천연 성분들이 P-당단백질이 과다 발현된 인체 자궁암 세포(MES-SA/DX5)에서 P-당단백질의 기질인 daunomycin의 세포 내 축적, 세포 외로의 배출 및 세포 독성에 미치는 영향을 알아봄으로써 P-당단백질의 활성 조절 인자로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

Dulbecco's modified eagle medium/저농도 글루코스(DMEM), 0.25% trypsin-1 mM EDTA 및 페니실린 (10,000 units/mL)-스트렙토마이신 (10,000 µg/mL)은 Invitrogen (Calsbad, CA, USA)으로부터, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone (South Logan, UT, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. Hanks' balanced salts without sodium bicarbonate (HBSS), daunomycin (DNM), verapamil, artemisinin, biochanin A, daidzein, morin, silymarin, cephalotaxine, berberine, dimethyl sulphoxide (DMSO), sulforhodamine B (SRB) 및 trichloroacetic acid (TCA)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), Triton® X-100 및 Tris base는 USB (Cleveland, OH, USA)에서 구입하였으며 NaCl, KCl, MgCl₂는 Duksan pure chemical (Ansan, Korea)에서, CaCl₂는 Showa chemical (Tokyo, Japan)에서, acetic acid는 Daejung (Siheung, Korea)에서 구입하였다. Microscint™40 (scintillation cocktail)은 Packard Instrument Co. Inc. (Meriden, CT, USA)에서, [³H]-DNM (1-5 Ci/mmol)은 Perkin-Elmer Inc. (Boston, MA, USA)로부터 구입하였다. 기기로는 세포배양기 (3158, Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA), 방사선 측정기 (Topcount NXT, Packard Instrument Co. Inc., Meriden, CT, USA), orbital shaker (SLOS-20, SLB, Seoul, Korea) 및 ELISA reader (3550, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 등을 사용하였다.

세포 배양 조건

P-당단백질을 과다 발현함으로써 다제내성을 나타내는 자궁암 세포인 MES-SA/DX5 세포를 화학연구소로부터 분양받아 사용하였다. 이 세포는 5% CO₂ 및 95% 공기가 공급되는 37°C의 세포 배양기 안에서 5% FBS 및 항생제 (100 units/mL 페니실린-100 µg/mL 스트렙토마이신)를 함유하는 DMEM/저농도 글루코스 배지에서 성장하였다.^{31,32)}

세포 내로의 Daunomycin 축적

위에서 언급한 천연 성분들이 P-당단백질 활성에 미치는 영향에 관하여 연구하고자 MES-SA/DX5 세포를 6 well plate에 150,000개/well이 되도록 넣어준 후 72시간 동안 배양하였다. 그 후 각 well에 P-당단백질 저해제로 잘 알려진 100 µM verapamil (positive control) 또는 각 성분의 농도-독성 곡선을 통해 그 자체로는 세포 독성을 나타내지 않는 농도의 각 천연 성분들 (20 µM artemisinin, 10 µM biochanin A, 50 µM daidzein, 100 µM morin, 100 µM silymarin, 10 µM cephalotaxine, 25 µM berberine) 및 [³H]-DNM을 넣어 DNМ의 최종 농도가 0.025 µM이 되도록 처리한 후 2시간 동안 배양하였다. 그리고 나서 ice-cold stop solution (137 mM NaCl, 14 mM Tris, pH 7.4)으로 세포들을 씻어준 후 lysis buffer (0.5% Triton® X-100) 1 mL을 각 well에 넣고 150 rpm에서 30분간 shaking한 뒤 세포 내 유입된 [³H]-DNM의 radioactivity를 방사선 측정기로 측정하였다.³³⁾ 대조군의 경우, 천연 성분을 넣지 않고 [³H]-DNM만으로 세포를 처리하였다. 대조군의 uptake 결과와 천연 성분들로 세포를 처리한 후 얻어진 uptake 결과를 unpaired student's t-test로 통계 처리하여 p값이 0.05 이하이면 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

세포로부터의 Daunomycin 배출

MES-SA/DX5 세포를 6 well plate에 각 well 당 150,000개가 되도록 넣어 주고 72시간 동안 배양한 다음 0.025 µM 농도의 [³H]-DNM을 함유하는 uptake buffer 1 mL을 각 well에 넣어 37°C에서 1시간 동안 배양함으로써 세포 내로 DNМ이 유입되도록 하였다. 그 후 [³H]-DNM을 함유하는 uptake buffer를 제거하고 세포들을 씻은 후 100 µM verapamil 또는 위에서 언급한 농도의 각 천연 성분들을 함유하는 uptake buffer를 넣어 1시간 동안 배양하였다. 대조군의 경우, 이들 성분을 함유하지 않는 uptake buffer를 넣어 주었다. 1시간 후에 ice-cold stop solution로 세포들을 씻어준 후 lysis buffer 1 mL을 각 well에 넣고 150 rpm에서 30분간 shaking한 뒤 그 중 100 µL를 취하여 방사선 측

정기로 radioactivity를 측정하였다.³⁴⁾ 대조군에서의 결과와 천연 성분들로 세포를 처리한 후 얻어진 결과를 unpaired student's t-test로 통계 처리하여 p값이 0.05 이하이면 통계적으로 유의성이 있다고 간주하였다.

세포 독성 실험

MES-SA/DX5 세포를 각 well 당 5,000개 정도 들어가도록 96 well plate에 넣은 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 1.8×10^{-9} M~ 1.8×10^{-5} M 농도 범위의 DNM과 100 μ M verapamil 또는 위에서 언급한 농도의 각 천연 성분들을 각 well에 넣고 2시간 동안 배양하였다. 이때, 대조군에는 천연 성분 대신 DMSO를 넣어주었다. 2시간이 지난 다음, incubation solution (DNM±천연 성분)을 제거하고 세포들을 HBSS로 씻어준 후 새 배지를 넣어 주었다.³³⁾ 3일 후 SRB staining assay를 통하여 세포 독성을 검토하였으며 그 방법을 간략하게 살펴보면 다음과 같다.³⁵⁾ 10% TCA로 1시간 동안 세포들을 고정시킨 후, 물로 5번 씻어주고 건조시켰다. SRB (0.4% w/v in 1% acetic acid)를 각 well에 넣고 15분 후에 1% 초산으로 4번 씻어주었다. Plate를 건조시킨 다음 단백질에 결합된 색소를 10 mM Tris-base (pH 10.5)로 용해시켜 515 nm에서의 흡광도를 측정 후 IC₅₀ 값을 구하였다. 대조군의 IC₅₀ 값과 천연 성분들로 세포를 처리한 후 얻어진 IC₅₀ 값을 unpaired student's t-test로 통계 처리하여 p값이 0.05 이하이면 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

결과 및 고찰

MES-SA/DX5 세포는 다양한 종류의 항암제들에 대해 내성이 있는 것으로 이미 보고된 바 있으며³²⁾ 모체 세포인 MES-SA 세포와 비교했을 때 MES-SA/DX5 세포 내로의 DNM 축적이 10배 이상 감소되었고 DNM에 의한 세포 독성 또한 약 17배 정도 감소하였다.³³⁾ 이는 MES-SA/DX5 세포에서 P-당단백질이 과다 발현되어 항암제인 DNM을 세포 밖으로 능동적으로 배출함으로써³⁴⁾ 세포 내로의 DNM 축적을 감소시켰기 때문인 것으로 보고되었다.

7개의 천연 성분을 가지고 MES-SA/DX5 세포 내로의 DNM 축적을 연구한 결과, silymarin 및 biochanin A ($p < 0.0001$)은 대조군과 비교 시 세포 내로의 DNM 축적을 유의적으로 증가시킨 반면 morin ($p < 0.01$)은 오히려 DNM의 세포 내로의 유입을 감소시켰다. 그 외 cephalotaxine, berberine, artemisinin 및 daidzein은 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Figure 1).

Silymarin ($p < 0.0001$), biochanin A, morin, cephalotaxine 및 berberine ($p < 0.05$)은 MES-SA/DX5 세포로부터 DNM의 배출을 유의적으로 감소시켰으나 artemisinin 및 daidzein은 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Figure 2).

Silymarin, biochanin A 및 berberine ($p < 0.05$)은 DNM의 IC₅₀ 값을 유의적으로 감소시켰으므로 세포 독성을 증가시켰으나 morin ($p < 0.05$)은 그 값을 유의적으로 증가시켰다. 반면, daidzein, artemisinin 및 cephalotaxine은 세포 독성에

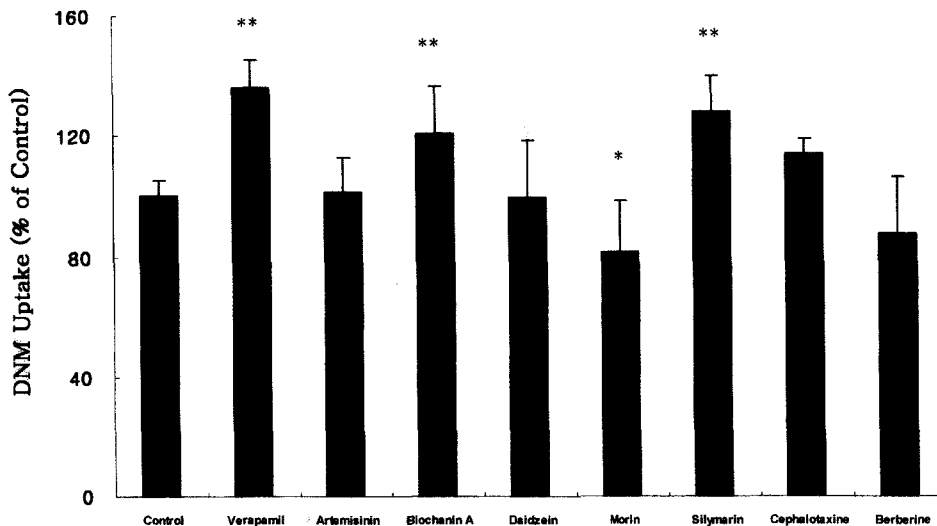


Figure 1—Effects of natural compounds on [³H]-daunomycin uptake into MES-SA/DX5 cells. Verapamil, a P-gp inhibitor, was used as a positive control at 100 μ M. The concentrations of natural compounds used in the study were as follows: 20 μ M artemisinin, 10 μ M biochanin A, 50 μ M daidzein, 100 μ M morin, 100 μ M silymarin, 10 μ M cephalotaxine, and 25 μ M berberine. Bars represent the means±S.D. (n=3-4).

* $p < 0.01$ compared with control

** $p < 0.0001$ compared with control

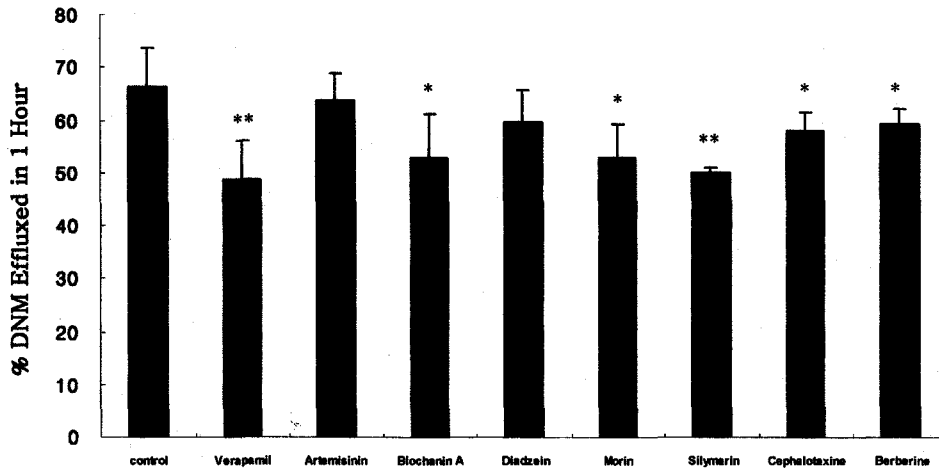


Figure 2—Effects of natural compounds on [³H]-daunomycin efflux from MES-SA/DX5 cells. Verapamil, a P-gp inhibitor, was used as a positive control at 100 μM. The concentrations of natural compounds used in the study were as follows: 20 μM artemisinin, 10 μM biochanin A, 50 μM daidzein, 100 μM morin, 100 μM silymarin, 10 μM cephalotaxine, and 25 μM berberine. Bars represent the means±S.D. (n=3-4). *p<0.05 compared with control **p<0.0001 compared with control

Table I—IC₅₀ Values of Daunomycin (μM) in MES-SA/DX5 Cells after 2 hour Incubation in the Presence of Each Natural Compound

	IC ₅₀ (μM)
Control	8.70 ± 1.47 (5)
Verapamil	1.58 ± 0.48 (6)**
Artemisinin	8.36 ± 1.84 (3)
Biochanin A	4.54 ± 0.16 (3)*
Daidzein	11.4 ± 2.09 (3)
Morin	10.2 ± 0.36 (3)*
Silymarin	2.67 ± 1.08 (3)*
Cephalotaxine	8.85 ± 4.36 (6)
Berberine	5.41 ± 1.00 (4)*

Number in parenthesis indicates n.
*p<0.05 compared with control
**p<0.01 compared with control

별다른 효과를 나타내지 않았다 (Table I). 이와 같은 결과는 P-당단백질이 과다 발현된 MDA435/LCC6MDR1 세포에서 biochanin A 및 silymarin이 doxorubicin의 IC₅₀ 값을 감소시켰다는 Zhang 등의 결과와도 일치하였다.³⁶⁾

P-당단백질의 대표적인 저해제인 verapamil의 경우 세포로부터의 DNM의 배출을 억제함으로써 세포 내 항암제의 축적을 증가시켜 세포 독성을 증가시킨 것을 본 연구를 통해 확인할 수 있었다 (Figure 1, 2 및 Table I).

본 연구에서 사용한 7가지의 천연 성분들 가운데 다제내성을 지닌 MES-SA/DX5 세포로부터 DNM의 배출을 감소시키므로써 세포 내 DNM의 축적을 증가시켜 세포 독성

을 증가시키므로써 P-당단백질의 활성을 저해한 천연 성분은 silymarin 및 biochanin A이었다. 반면에 daidzein과 artemisinin은 P-당단백질 활성에 어떠한 영향도 미치지 않았다. Berberine의 경우 세포로부터 DNM의 배출을 억제함으로써 세포 독성을 증가시켰으나 세포 내 DNM의 유입은 대조군과 비교 시 통계적으로 유의하게 증가시키지 않았다. Cephalotaxine은 세포로부터 DNM의 배출을 어느 정도 저해하기는 하였으나 실제로 세포 독성이나 세포 내 항암제의 축적에는 영향을 미치지 않았다. Morin의 경우 세포 내로의 DNM 유입, 세포로부터의 DNM 배출 및 암세포에 대한 항암제의 독성을 모두 감소시켰다. 이는 이전 연구에서 quercetin이 보여준 결과^{33,34)}와 유사하며 그 이유에 대해서는 정확히 알 수 없으나 morin 또한 quercetin과 마찬가지로 세포막과 상호작용을 하여 일단 세포 내에 있는 항암제의 배출을 억제하고 세포 밖에 있는 항암제의 유입을 감소시키는 것으로 사료된다.³⁴⁾ Movileanu 등은 quercetin이 재구성된 이중 지질막 (reconstituted planar lipid bilayer) 내에 삽입되며 그 위치가 pH에 따라 달라진다고 보고한 바 있으며³⁷⁾ 이는 quercetin이나 morin과 같은 플라보노이드들이 세포막과 상호작용을 하여 세포막을 통한 약물의 이동에 영향을 미칠 수 있다는 것을 보여주는 것으로 생각된다.

위에서 살펴본 바와 같이 천연물로부터 유래한 P-당단백질 활성 저해제들은 항암제에 대한 내성을 감소시켜 암의 치료 효과를 증진시키고 항암제의 용량을 줄여 정상세포에 대한 부작용을 감소시키는 항암증감제로 개발될 수 있을 것으로 생각된다. 또한, P-당단백질의 활성을 저해하는 천연 성

분들은 다양한 종류의 P-당단백질 기질 약물들과 함께 섭취될 때 위장관 흡수를 증가시켜 이들의 생체 이용률을 증가시킬 가능성이 있으므로³⁸⁾ P-당단백질의 기질이 되는 약물들의 생체이용률을 증가시키는 흡수촉진제로서도 개발될 수 있으리라 기대된다.

결 론

천연물로부터 유래한 성분인 silymarin과 biochanin A는 P-당단백질의 대표적인 저해제인 verapamil과 마찬가지로 P-당단백질이 과다 발현되어 다제내성을 나타내는 MES-SA/DX5 세포에서 DNM의 세포 외 배출을 감소시키고, 세포 내 축적을 유의적으로 증가시켜 항암제의 세포 독성을 증가시켰다. 이와 같은 성분들은 항암제와 병용 투여 시 항암제의 내성을 감소시켜 암의 치료 효과를 증진시킬 수 있으리라 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 이화여자대학교 약학연구소의 연구비 지원을 받아 진행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 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) J.M. Phang, C.M. Poore, J. Lopaczynska and G.C. Yeh, Flavol-stimulated efflux of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene in multidrug-resistant breast cancer cells. *Cancer Res.*, **53**, 5977-5981 (1993).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) T. Efferth, M. Davey, A. Olbrich, G. Rucker, E. Gebhart and R. Davey, Activity of drugs from traditional Chinese medicine toward sensitive and MDR1- or MRP1-overexpressing multidrug-resistant human CCRF-CEM leukemia cells, *Blood Cells Mol. Dis.*, **28**, 160-168 (2002).
- 16) N.P. Singh and H. Lai, Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells, *Life Sci.*, **70**, 49-56 (2001).
- 17) T. Efferth, H. Dunstan, A. Sauerbrey, H. Miyachi and C.R. Chitambar, The anti-malarial artesunate is also active against cancer, *Int. J. Oncol.*, **18**, 767-773 (2001).
- 18) H. Saloniemi, K. Wahala, P. Nykanen-kurki, K. Kallela and I. Saastamoinen, Phytoestrogen content and estrogenic effect of legume fodder, *Pros. Soc. Exp. Biol. Med.*, **208**, 13-17 (1995).
- 19) Y.S. Lee, T.H. Kim, K.J. Cho and J.J. Jang, Inhibitory effects of biochanin A on benzo[α]pyrene induced carcinogenesis in mice, *In vivo*, **6**, 283-286 (1992).
- 20) T. Gotoh, K. Yamada, H. Yin, A. Ito, T. Kataoka and K. Dohi, Chemoprevention of N-nitroso-N-methylurea-induced rat mammary carcinogenesis by soy foods or biochanin A. *Jpn. J. Cancer Res.*, **89**, 137-142 (1998).
- 21) W.M. Keung, O. Lazo, L. Kunze and B.L. Vallee, Potentiation

- of the bioavailability of daidzein by an extract of *Radix puerariae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4284-4288 (1996).
- 22) W.M. Keung, O. Lazo, L. Kunze and B.L. Vallee, Daidzein suppresses ethanol consumption by Syrian golden hamsters without blocking acetaldehyde metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 8990-8993 (1995).
 - 23) I.M. Liu and S.J. Sheu, Analysis and processing of Chinese herbal drugs. VIII: The study of sophorae floe. *Am. J. Chin. Med.*, **17**, 179-87 (1989).
 - 24) V. Elangovan, N. Sekar and S. Govindasamy, Chemo-preventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis, *Cancer Lett.*, **87**, 107-13 (1994).
 - 25) T. Tanaka, K. Kawabata, S. Honjo, Tanaka T., H. Kohno, M. Murakami, R. Shimada, K. Matsunaga, Y. Yamada and M. Shimizu, Inhibition of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats by natural compounds, caffeine, quercetin and morin, *Oncol. Rep.*, **6**, 1333-40 (1999).
 - 26) R.P. Singh and R. Agarwal, Prostate cancer prevention by silibirin, *Curr. Cancer Drug Targets*, **4**, 1-11 (2004).
 - 27) K. Kropachova and E. Mishurova, Flavobion and thiocacid lessen irradiation-induced latent injury of the liver, *Biull. Eksp. Biol. Med.*, **113**, 547-549 (1992).
 - 28) M. Velussi, A.M. Cernigoi, A. De Monte, F. Dapas, C. Caffau and M. Zilli, Long-term (12 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients, *J. Hepatol.*, **26**, 4871-4879 (1997).
 - 29) T. Efferth, A. Sauerbrey, M.E. Halatsch, D.D. Ross and E. Gebhart, Molecular modes of action of cephalotaxine and homoharringtonine from the coniferous tree *Cephalotaxus hainanensis* in human tumor cell lines, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **367**, 56-67 (2002).
 - 30) A.H. Amin, T.V. Subbaiah and K.M. Abbasi, Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action, *Can. J. Microbiol.*, **15**, 1067-76 (1969).
 - 31) W.G. Harker, F.R. Mackintosh and B.I. Sikic, Development and characterization of a human sarcoma cell line, MES-SA, sensitive to multiple drug, *Cancer Res.*, **43**, 4943-4950 (1983).
 - 32) 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).
 - 33) E.J. Go, S.Y. Chung, N.H. Kim and H.J. Lee, Modulation of P-glycoprotein activity by flavonoids in human uterine sarcoma cells, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **33**, 305-310 (2003).
 - 34) S.Y. Chung, E.J. Go, N.H. Kim and H.J. Lee, Effect of flavonoids on efflux and cytotoxicity of daunomycin, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **34**, 95-99 (2004).
 - 35) 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).
 - 36) S. Zhang and M.E. Morris, Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin, and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **304**, 1258-1267 (2003).
 - 37) L. Movileanu, I. Neagoe and M.L. Flonta, Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers, *Int. J. Pharm.*, **205**, 135-146 (2000).
 - 38) 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).