

인체 암세포에서 genistein에 의한 cyclooxygenase-2 및 telomerase의 활성 저하

김정임¹ · 김성윤² · 서민정³ · 임학섭⁴ · 이영춘³ · 주우홍⁵ · 최병태⁶ · 정영기³ · 최영현^{1,2*}

¹동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 ²대학원 바이오물질제어학과(BK 21 program), ³동아대학교 생명자원과학대학 생명공학과, ⁴(주)천연약속, ⁵창원대학교 자연과학대학 생물학과, ⁶부산대학교 한의학전문대학원 해부학교실

Received May 19, 2008 / Accepted June 10, 2008

Genistein-induced Growth Inhibition was Associated with Inhibition of Cyclooxygenase-2 and Telomerase Activity in Human Cancer Cells. Jung Im Kim¹, Cheng-Yun Jin², Min-Jeong Seo³, Hak-Seob Lim⁴, Young-Choon Lee³, Woo-Hong Joo⁵, Byung Tae Choi⁶, Yong Kee Jeong³ and Yung Hyun Choi^{1,2*}. ¹Department of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine and ²Department of Biomaterial Control (BK21 program), Dongeui University Graduate School, Busan 614-052, South Korea, ³Department of Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science and BK21 Center for Silver-Bio Industrialization, Dong-A University, Busan 604-714, South Korea, ⁴Bioinstitute, Millennium Promise Co., LTD, Jeonggwan-myeon Gijang-gun, Busan 619-691, South Korea, ⁵Department of Biology, Changwon National University, Changwon City 641-773, South Korea, ⁶Department of Anatomy, Graduate School of Oriental Medicine, Pusan National University, Busan 609-735, South Korea - Genistein, an isoflavone in soybean products, is a potential chemopreventive agent against various types of cancer. There are several studies documenting molecular alterations leading to cell cycle arrest at G2/M phase and induction of apoptosis; however, its mechanism of action and its molecular targets on the prostaglandin E₂ (PGE₂) production and telomere length regulation in human cancer remain unclear. In this study, we investigated the effect of genistein on the levels of cyclooxygenases (COXs) and telomere regulatory components of several human cancer cell lines (T24, human bladder carcinoma cells; U937, human leukemic cells; AGS, human stomach adenocarcinoma cells and SK-MEL-2, human skin melanoma cells). Genistein treatment resulted in the inhibition of cancer cell proliferation in a concentration-dependent manner. It was found that genistein treatment markedly decreased the levels of COX-2 mRNA and protein expression without significant changes in the expression of COX-1, which was correlated with a decrease in PGE₂ synthesis. Genistein treatment also partly inhibited the levels of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) as well as human telomerase RNA (hTR) and telomerase-associated protein (TEP)-1, and the activity of telomerase. Taken together, these findings provide important new insights into the possible molecular mechanisms of the anti-cancer activity of genistein.

Key words : Genistein, cancer, cyclooxygenase-2, telomerase

서 론

Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone)은 대두에 풍부하게 존재하는 phytoestrogen isoflavone으로 *Pseudomonas* sp.에서 최초로 분리된 estrogen과 비슷한 heterocyclic diphenolic 구조를 가진다[20,22]. Genistein은 protein tyrosine kinase, DNA topoisomerases, protein histidine kinase 및 ribosomal S6 kinase 등의 활성을 억제하며[1,13,23], 항에스트로젠, 항산화, 항혈전 활성 등을 가지는 것으로 알려져 있다[3,26]. Genistein은 또한 생쥐의 배 발생 단계의 성장 및 세포증식을 억제하거나 세포분화를 유도하고[24], 유방암, 폐암, 전립선암, 위암 및 혈구암 등과 같은 여러 종류의 인체 암세포에서 세포주기 G2/M arrest에 의한 세포의 증식 및

전이를 억제하고 apoptosis를 유발하는 것으로 보고되어지고 있다[7,8,12,15,16,27].

최근 연구에 의하면 genistein에 의한 apoptosis에는 염증 반응에 중요한 인자로 작용하는 cyclooxygenase (COX)-2의 발현을 억제함으로써 암발생의 개시 단계를 차단할 수 있을 가능성이 제시되었으며[4,14], 염색체 말단에 존재하는 telomere의 길이 조절에 중요한 telomerase의 활성을 억제할 수 있는 것으로 알려져 오고 있다[2,6,19]. 그러나 genistein의 이러한 COX-2 및 telomerase 활성 억제가 암세포 증식 억제와 연관된 apoptosis 유도에 동반되는 일반적인 현상인지에 대한 의문점은 여전히 확실하게 잘 알려져 있지 않은 상태이다. 본 연구에서는 다양한 인체 암세포를 이용하여 genistein에 의한 이들 암세포의 증식억제에 따른 apoptosis 유도에 COX-2 및 telomerase 활성이 어떻게 조절되는지에 관한 연구를 실시하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-8649, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 genistein은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 mRNA 분석을 위하여 Bioneer (Taejeon, Korea)에서 구입한 primer는 Table 1에 나타난 바와 같다. 단백질 발현 분석을 위하여 사용된 항체는 CalBiochem (San Diego, CA, USA), 및 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. Prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성량의 측정에는 Amersham Corp.의 enzyme immunoassay (EIA) kit를 사용하였으며, telomerase 활성의 측정에는 polymerase chain reaction (PCR)에 기초를 둔 면역반응 분석법[PCR-based telomeric repeat amplification protocol (TRAP) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)]을 이용하였고 이를 위한 kit는 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)에서 구입하였다.

암세포의 배양

실험에 사용한 세포(AGS 인체위암세포, SK-MEL-2 흑색종세포, T24 방광암세포 및 U937 백혈병세포)는 생명공학연구원(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C의 조건하에서 배양하였다. Genistein은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 100 mM의 stock 용액으로 제조한

뒤 -20°C에 보관하였고 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

MTT assay를 이용한 세포 성장 억제 조사

세포배양용 6 well plate에 well 당 1×10⁵개의 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 genistein을 배지에 희석하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma) 시약을 0.5 mg/μl 농도로 희석하여 200 μl 씩 분주하고 3시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 100 μl 씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 3회 실시하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

Reverse transcription (RT)-PCR 분석

동일한 조건에서 준비된 세포들을 대상으로 TRIzol B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, ONE-STEP RT-PCR PreMix (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Korea)를 이용하여 2 μg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이들 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자(Table 1)를 PCR로 증폭하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr)로 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

단백질의 분리, 전기영동 및 Western blotting

정상 및 genistein이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis

Table 1. Sequence of primers used for RT-PCR

Gene name		Sequence
iNOS	Sence	5'-AGA-GAG-ATC-CGG-TTC-ACA-3'
	Antisence	5'-CAC-AGA-GCT-GAG-GGT-ACA-3'
hTERT	Sence	5'-AGC-CAG-TCT-CAC-CTT-CAA-CC-3'
	Antisence	5'-GTT-CTT-CCA-AAC-TTG-CTG-ATG-3'
TEP-1	Sence	5'-TCA-AGC-CAA-ACC-TGA-ATC-TGA-G-3'
	Antisence	5'-CCC-CGA-GTG-AAT-CTT-TCT-ACG-C-3'
hTR	Sence	5'-TCT-AAC-CCT-AAC-TGA-GAA-GGG-CGT-AG-3'
	Antisence	5'-GTT-TGC-TCT-AGA-ATG-AAC-GGT-GGA-AG-3'
COX-1	Sence	5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CIT-3'
	Antisence	5'-GTG-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3'
COX-2	Sence	5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3'
	Antisence	5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CTT-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시킨 후, 특정 단백질에 대한 항체와 그에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현 양을 분석하였다.

Telomerase 활성 측정

정상 및 genistein이 처리된 배지에서 배양된 세포들을 모아 200 µl lysis reagent에 1x10⁶개의 세포를 섞어서 30분간 얼음 위에서 lysis를 실시하였다. TRAP 반응을 위하여 2 mg의 단백질이 함유된 2 µl의 세포 추출액을 25 µl의 reaction mixture에 혼합 후, 증류수를 첨가하여 최종 volume이 50 µl가 되도록 하였다. PCR은 primer elongation (25°C에서 30분간), telomerase inactivation (94°C에서 5분간), product amplification (94°C에서 30초, 50°C에서 30초 및 72°C에서 90초를 30 cycles)의 순서로 진행이 되었으며, 이를 이용하여 hybridization과 ELISA reaction 반응을 시켰다.

Prostaglandin E₂의 측정

PGE₂ 생성량의 변화를 조사하기 위하여 준비된 세포를 96-well plate에 well 당 160 µl의 배지에 10⁴ cell/well 정도로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, genistein을 농도별로 배지에 희석하여 처리하였다. 이때 마지막 배지의 양을 모두 180 µl로 통일시켰다. 48시간 후 배지에 2.5%의 dodecyltrimethylammonium bromide가 함유된 buffer를 20 µl 첨가하여 총 배지의 양이 200 µl 되게 한 후 lysis가 잘 일어나도록 pipetting을 수회 실시하였다. 상온에 약 10분간 incubation 한 후 trypan blue를 이용하여 암세포의 수를 계수하였다. 약 50 µl의 lysate를 취하여 kit에 준한 protocol에 따라 EIA를 실시한 후 450 nm의 파장에서 얻어진 값을 기준으로 PGE₂의 양을 추정하였다.

결과 및 고찰

몇 가지 암세포의 증식에 미치는 genistein의 영향

Genistein에 의한 몇 가지 인체 암세포에서 COX-2 및 telomerase 활성 연관 실험을 수행하기 위한 조건의 설정을 위하여, 48시간 동안 다양한 농도의 genistein을 처리한 후 MTT assay를 실시하였다. Fig. 1에 나타난 결과에서 알 수 있듯이 조사된 4가지 암세포에 모두는 genistein 처리 농도의 증가에 따라 증식이 억제되었으나, genistein에 대한 감수성은 백혈병 세포주인 U937에서 가장 높게 나타났으며, 방광암 세포인 T24에서 가장 낮게 나타났다. 이러한 genistein 처

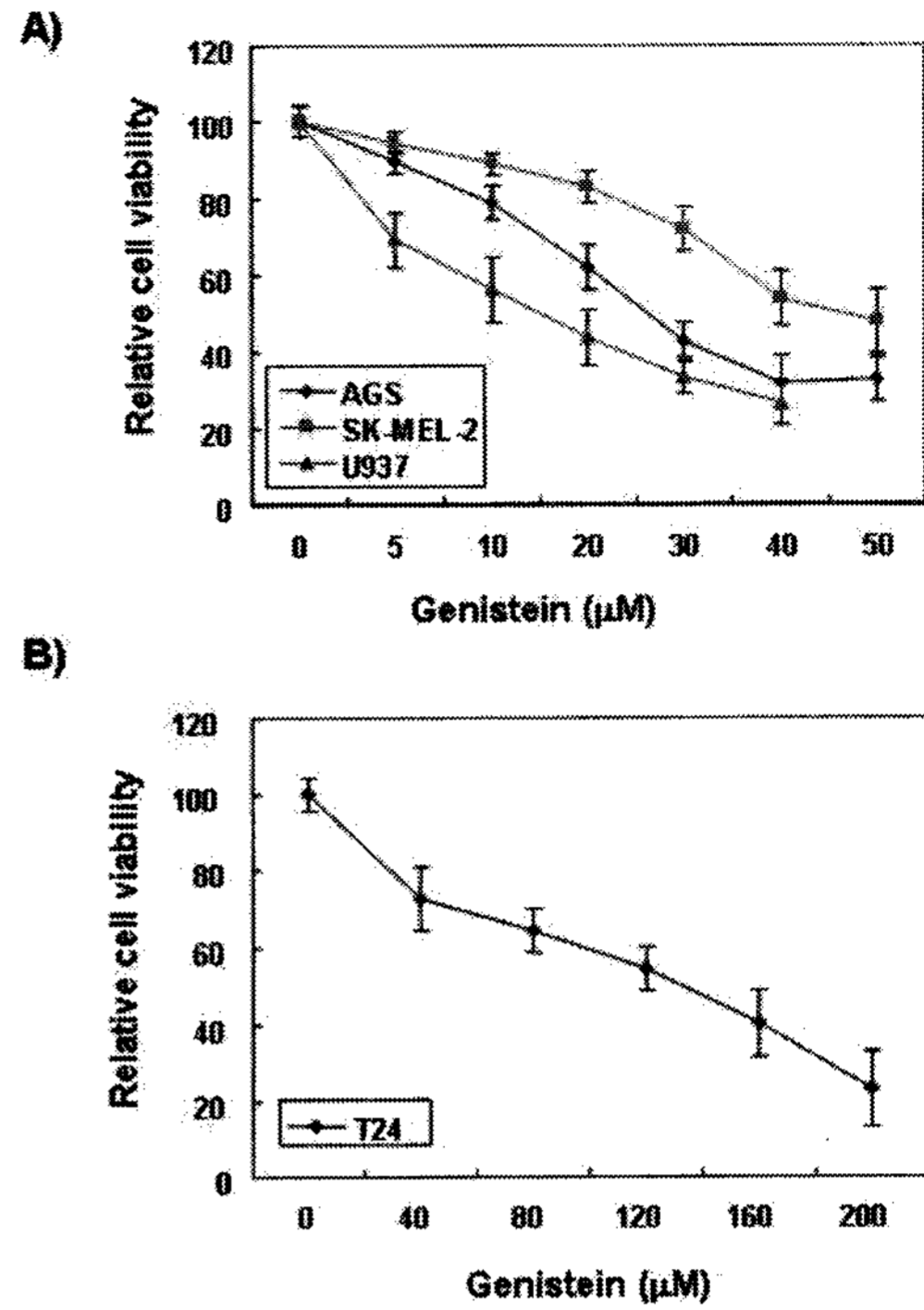


Fig. 1. Growth inhibition of human cancer cells after treatment with genistein. Cells (T24, human bladder carcinoma; U937, human leukemic; AGS, human stomach adenocarcinoma and SK-MEL-2, human skin melanoma cells) were plated at 1x10⁵ cells per 60-mm plate, and incubated for 24 hr. The cells were treated with various concentrations of genistein for 48 hr. The growth inhibition was measured by the metabolic-dye-based MTT assay. Results are expressed as the means±S.E. of three independent experiments.

리에 따른 암세포들의 증식억제는 다양한 형태적 변형을 동반하였으며, 감수성의 정도는 선행연구의 결과들과 비슷하게 나타났다[9,16-18]. 선행연구들의 결과에 의하면 genistein에 의한 암세포의 증식억제는 모두 세포주기의 G2/M arrest와 연관된 apoptosis에 의한 것이었으므로 본 연구에 의해 나타난 다양한 암세포의 증식억제도 G2/M arrest 및 apoptosis와 연관성이 있을 것으로 기대되며 선행 연구 및 몇 가지 실험을 통하여 이를 이미 확인한 바 있다[7-9,16-18].

Telomere 조절인자들의 발현에 미치는 genistein의 영향

진핵세포의 염색체 말단 부위에 존재하는 telomere는 repeat sequences [(TTAGGG)_n]로 이루어져 있으며, 이런 반복구조의 형성 및 유지에 관여하는 효소가 telomerase이다[25]. 정상 체세포에서는 telomerase의 활성이 없기 때문에 세포가 분열할수록 telomere의 길이는 짧아지게 되지만, 암세포의 90% 이상에서는 telomerase의 catalytic subunit 단백질을 coding하는 human telomerase reverse transcriptase (hTERT)가 과발현 되어 있고 이로 인한 높은 telomerase의

활성을 나타내고 있다. 따라서 telomerase 활성 변화는 노화, 혈관신생 및 면역계질환 등에서 뿐만 아니라 암의 발생과 진행과도 밀접한 연관성이 있으며, 암의 진단과 진행의 정도를 나타내는 지표로 사용될 수 있음을 시사하여 준다[19,25]. 노화의 개념에서 결국 telomere의 소실은 염색체의 안정성이 상실되는 것이며 이는 DNA damaging agent에 의한 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현증가로 인한 세포주기 교란으로 설명되어 지고 있다[21]. 특히 암과 연관된 부분에서 telomerase의 활성은 hTERT 유전자의 발현 조절에 의한 것이고, hTERT 유전자의 promoter 부위에는 다른 유전자의 promoter 보다 훨씬 더 많은 전사 조절인자의 결합부위를 보유하고 있어 activator 또는 repressor로 작용할 수 있다[5,25]. 따라서 암세포에서 높은 활성을 지니는 telomerase의 활성을 선택적으로 억제함으로써 암세포의 성장과 분열을 억제하고자 하는 시도 역시 새로운 항암제 개발을 위한 표적이 되고 있다.

Genistein에 의한 암세포들의 증식억제가 telomere 조절인자들의 발현과 어떤 연관성을 지니는지를 조사하기 위하여 telomere 길이에 조절에 가장 중요한 역할을 하는 3가지 유전자인 hTERT, human telomerase RNA (hTR) 및 telomerase-associated protein (TEP)-1의 발현에 미치는 genistein의 영향을 먼저 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 genistein이 처리된 배지에서 48시간 동안 배양된 세포들을 대상으로 RT-PCR 및 Western blot 분석을 실시하였다. Fig. 2의 결과에서 알 수 있듯이 T24, U937 및 AGS 세포에서 genistein의 처리에 의하여 조사된 유전자 중 hTERT의 mRNA 발현이 genistein 처리 농도가 증가될수록 다소 감소되는 경향성을 보여 주었으나, SK-MEL-2 세포에서는 큰 변화가 없었으며, hTR의 단백질 수준의 변화도 이와 유사하게 나타났다. hTR의 경우 U937 및 SK-MEL-2 세포에서는 큰 변화가

없었으나, T24 및 AGS 세포에서는 genistein 처리 농도 의존적으로 감소되었으며, TEP-1의 경우 조사된 4가지 세포 모두에서 genistein의 농도가 증가할수록 매우 감소되었음을 알 수 있었다. 즉 조사된 암세포의 종류에 따라 genistein에 대한 telomere 조절인자들의 발현은 다양하게 나타났으며, 최소한 한 두 가지 인자 이상의 발현이 감소되었음을 알 수 있었다. 이러한 telomere 조절인자들의 발현 변화는 telomere 길이 조절에 직접적으로 중요한 조절 역할을 하는 telomerase 효소의 활성 변화와 연관성이 있을 것으로 추정되므로 이를 확인하기 위하여 genistein이 처리된 암세포들을 대상으로 telomerase 효소 활성의 정도를 정상 배지에서 자란 세포와 비교 조사하였다. 이를 위하여 AGS 및 SK-MEL-2 세포를 대상으로 실험 방법에 기술한 바와 같이 TRAP-ELISA를 통한 telomerase 활성을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 4A에 나타낸 바와 같다. Fig. 4A의 결과에서 볼 수 있듯이 genistein이 함유된 배지에서 자란 암세포들의 telomerase 활성은 genistein의 농도가 증가될수록 점차 감소되는 경향성을 보여 주어 genistein에 의한 암세포들의 증식 억제가 telomerase 활성 저하와 어느 정도 연관성이 있음을 알 수 있었다.

COX-2 발현 및 PGE2의 생성에 미치는 genistein의 영향

다양한 질환의 매개체로 작용할 수 있는 PG은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다[11,29]. PG의 합성에서 2가지 COX isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하고 있으나, COX-2는 다양한 성장인자, cytokines, 종양 촉진인자들 등의 자극에 의한 유도성 isoform으로서 세포 증식을 촉진하고 apoptosis를 억제하며 세포의 이동성 및 부착성을 강화시킴으로서 각종 퇴행성

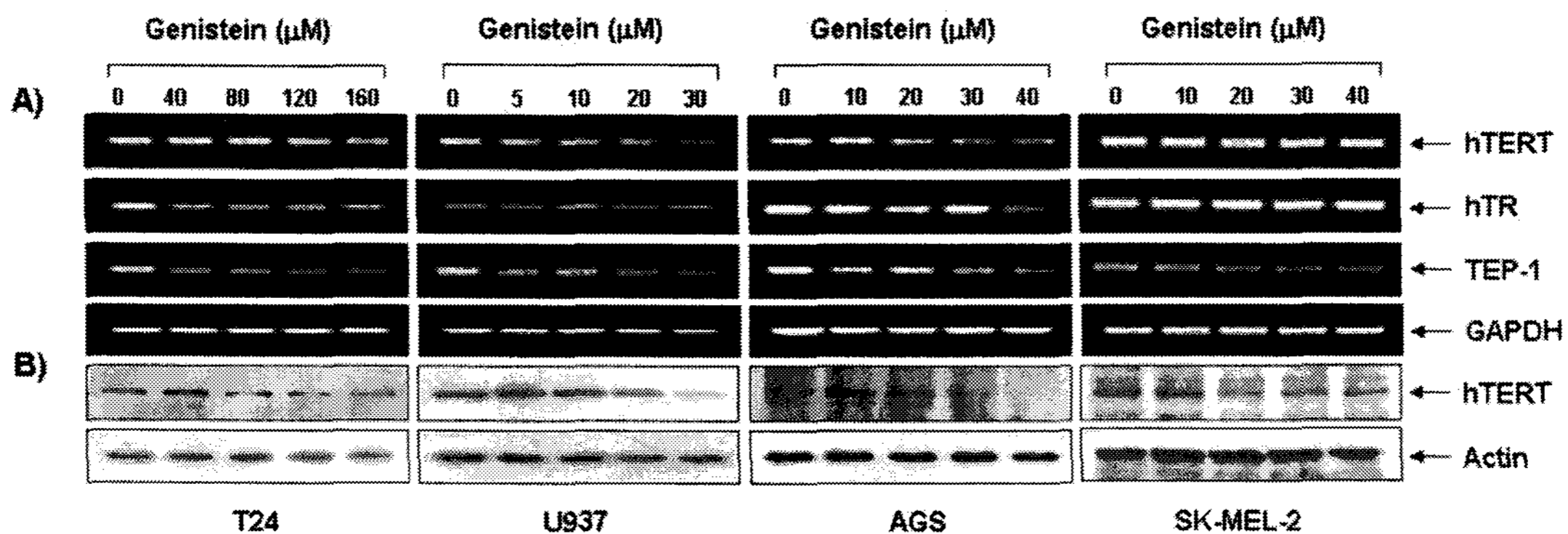


Fig. 2. Effects of genistein treatment on the levels of telomere regulatory genes in human cancer cells. (A) After 48 hr incubation with genistein, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with the indicated primers, and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-hTERT antibody. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

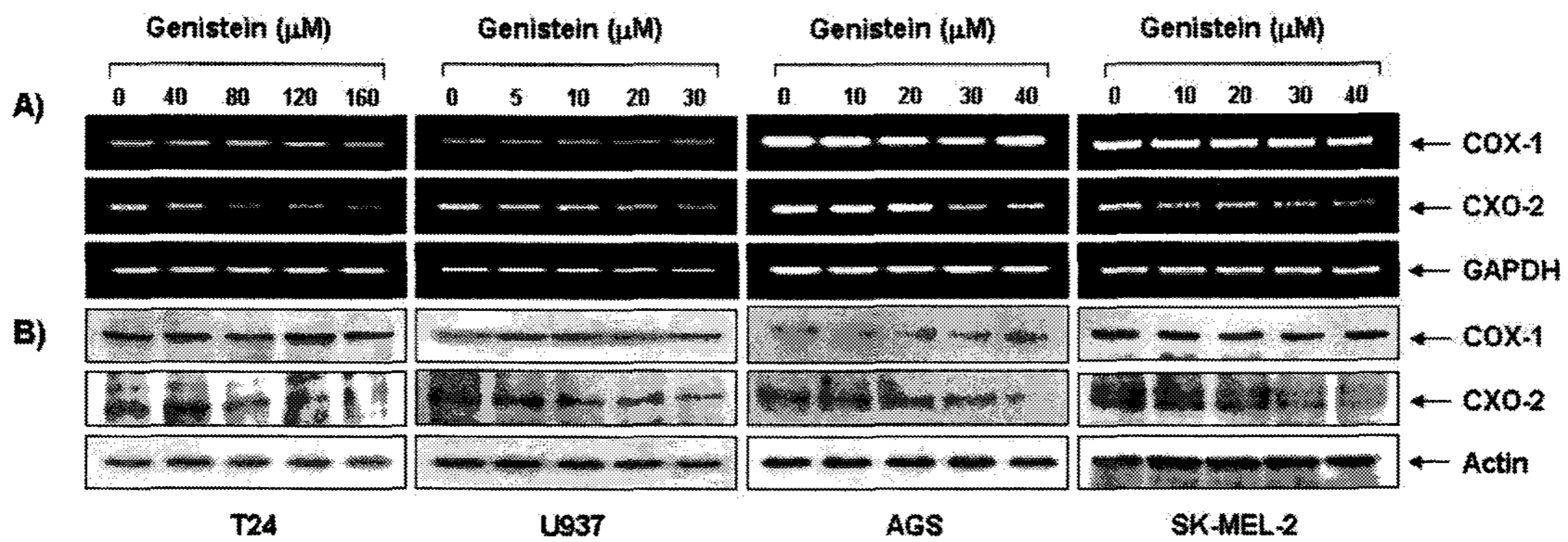


Fig. 3. Effects of genistein treatment on the levels of COX-1 and COX-2 in human cancer cells. (A) After 48 hr incubation with genistein, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with COX-1 and COX-2 primers, and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-COX-1 and anti-COX-2 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다[11,29]. 역학적 조사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2가 높은 발현을 유지하는 것이 apoptosis에 대한 저항성 획득과 염증반응과 연관된 세포의 암화에 밀접한 관련이 있을 것으로 보고되어 지고 있다 [28]. 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고, COX-2의 선택적 억제제에 의한 angiogenesis와 종양형성 억제 등의 결과에서 COX-2의 선택적 조절에 의한 암예방 및 항암전략이 대두되고 있다.

따라서 genistein이 처리된 몇 가지 암세포의 증식 억제에 COX-2의 발현 저하 및 PG의 생성 변화와의 연관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 COX-1 및 -2의 발현 변화를 먼저 조사하였다. Fig. 3의 결과에서 알 수 있듯이 조사된 4가지 암세포주의 COX-1의 mRNA 및 단백질 발현에는 genistein이 별다른 영향을 미치지 못하였으나, COX-2의 경우 전사 및 번역 수준에서 genistein의 처리 농도 증가에 따라 점차적인 발현의 감소를 보여주었다. 이러한 genistein에 의한 COX-2의 선택적 발현 저하가 PGE₂의 생성 저하와 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 PGE₂의 생성에 미치는 genistein의 영향을 조사한 결과는 Fig. 4B에 나타낸 바와 같다. Fig. 4B에서 조사된 2가지 세포주 AGS 및 SK-MEL-2 세포 모두에서 genistein의 처리 농도가 증가할수록 PGE₂의 생성이 매우 감소되었으며, PGE₂의 생성 감소 경향성은 COX-2의 발현 저하와 유사한 경향성을 보여 주었다. 따라서 genistein 처리에 의한 암세포의 증식 억제에는 COX-2의 선택적 발현 억제에 의한 PGE₂의 생성 저해와 연관성이 있음을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 대두의 대표적인 생리활성 물질인 genistein의 처리에 따른 암세포의 증식억제에서 telomerase 및

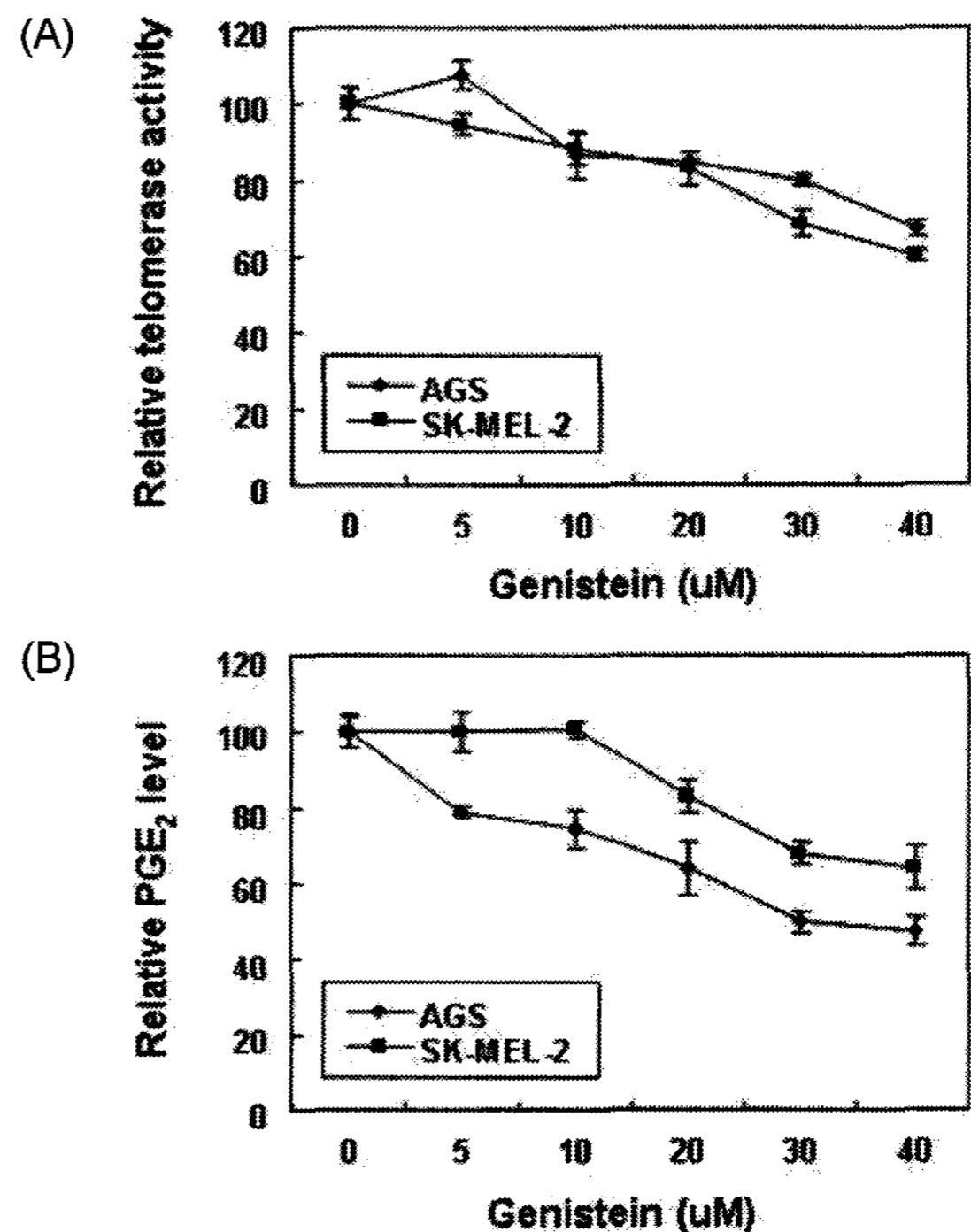


Fig. 4. Inhibition of telomerase activity and PGE₂ production in AGS and SK-MEL-2 cells after exposure to genistein. (A) After 48 hr incubation with genistein, telomerase activity of cells was measured using a TRAP-ELISA kit as indicated in the protocol. (B) The cells were treated with the indicated concentrations of genistein for 48 hr and collected. The PGE₂ accumulation in the medium was determined by an EIA kit as described in materials and methods. Results are expressed as the means±S.E. of three independent experiments.

COX-2 활성의 변화 연관성을 조사하였다. 이를 위하여 4가지 종류의 암세포주를 사용하였으며, genistein 처리에 의하

여 암세포들의 증식억제에서 백혈병 세포인 U937 세포의 감수성이 감장 높게 나타났으며, genistein 처리에 따라 telomere 조절인자들의 발현이 대부분 억제되었으며, telomerase의 활성도 매우 유의적으로 감소되었다. 또한 genistein 처리 농도가 증가함에 따라 COX-2의 발현이 전사 및 번역 수준에서 모두 감소되었으며 이에 따른 PGE₂의 생성 역시 현저하게 감소되었으나, COX-1의 발현에는 큰 변화가 없었다. 이러한 결과들은 genistein의 항암 활성을 이해하는 귀중한 자료로서 활용될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 농림부 농림기술개발사업의 지원(307003-03-1-HD140)에 의하여 이루어진 결과의 일부입니다.

References

- Adlercreutz, H. 1990. Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **201**, 3S-23S.
- Alhasan, S. A., O. Aranha and F. H. Sarkar. 2001. Genistein elicits pleiotropic molecular effects on head and neck cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **7**, 4174-4181.
- Barnes, S. 1995. Related Effect of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancer. *J. Nutr.* **125**, 777-783.
- Bises, G., E. Bajna, T. Manhardt, W. Gerdenitsch, E. Kallay and H. S. Cross. 2007. Gender-specific modulation of markers for premalignancy by nutritional soy and calcium in the mouse colon. *J. Nutr.* **137**, 211S-215S.
- Cerni, C. 2000. Telomeres, telomerase, and myc. An update, *Mutat. Res.* **462**, 31-47.
- Chinni, S. R., S. A. Alhasan, A. S. Multani, S. Pathak and F. H. Sarkar. 2003. Pleiotropic effects of genistein on MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* **12**, 29-34.
- Choi, Y. H., W. H. Lee, K. Y. Park and L. Zhang. 2000. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 164-173.
- Choi, Y. H., L. Zhang, W. H. Lee and K. Y. Park. 1998. Genistein-induced G2/M arrest is associated with the inhibition of cyclin B1 and the induction of p21 in human breast carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **13**, 391-396.
- Choi, W. Y., C. Park, K. M. Kim, M. H. Han, Y. H. Choi and W. H. Lee. 2006. Induction of G2/M arrest by genistein in human AGS gastric carcinoma and SK-MEL-2 melanoma cells. *Cancer Prev. Res.* **11**, 311-320.
- Gescher, A. J., R. A. Sharma and W. P. Steward. 2001. Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise. *Lancet Oncol.* **2**, 371-379.
- Giercksky, K. E. 2001. COX-2 inhibition and prevention of cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **15**, 821-833.
- Gu, Y., C. F. Zhu, H. Iwamoto and J. S. Chen. 2005. Genistein inhibits invasive potential of human hepatocellular carcinoma by altering cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* **11**, 6512-6517.
- Huang, J., M. Nasr, Y. Kim and H. R. Matthews. 1992. Genistein inhibits protein histidine kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 15511-15515.
- Hwang, J. T., J. 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.
- Ismail, I. A., K. S. Kang, H. A. Lee, J. W. Kim and Y. K. Sohn. 2007. Genistein-induced neuronal apoptosis and G2/M cell cycle arrest is associated with MDC1 up-regulation and PLK1 down-regulation. *Eur. J. Pharmacol.* **575**, 12-20.
- Jin, C. Y., C. Park, J. Cheong, B. T. Choi, T. H. Lee, J. D. Lee, W. H. Lee, G. Y. Kim, C. H. Ryu and Y. H. Choi. 2007. Genistein sensitizes TRAIL-resistant human gastric adenocarcinoma AGS cells through activation of caspase-3. *Cancer Lett.* **257**, 56-64.
- 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 Sci.* **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.
- Kyo, S. and M. Inoue. 2002. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 688-697, 2002.
- Messina, M. and S. Barnes. 1991. The role of soy products in reducing risk of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 541-546.
- Narayan, S., A. S. Jaiswal, A. S. Multani and S. Pathak. 2001. DNA damage-induced cell cycle checkpoints involve both p53-dependent and -independent pathways: role of telomere repeat binding factor 2. *Br. J. Cancer* **85**, 898-901.
- Ogawara, H., T. Akiyama, J. Ishida, S. Watanabe and K. Suzuki. 1986. A specific inhibitor for tyrosine protein kinase from *Pseudomonas*. *J. Antibiot. (Tokyo)* **39**, 606-608.
- Okura, A., H. Arakawa, H. Oka, T. Yoshinari and Y. Monden. 1988. Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 183-189.
- Peterson, G. and S. Barnes. 1993. Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. *Prostate* **22**, 335-345.
- Poole, J. C., L. G. Andrews and T. O. Tollefsbol. 2001. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* **269**, 1-12.
- Setchell, K. D. 1998. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy

- isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 1333-1346.
27. Su, S. J., T. M. Yeh, W. J. Chuang, C. L. Ho, K. L. Chang, H. L. Cheng, H. S. Liu, H. L. Cheng, P. Y. Hsu and N. H. Chow. 2005. The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **69**, 307-318.
28. Surh, Y. J., K. S. Chun, H. H. Cha, S. S. Han, Y. S. Keum, K. K. Park and S. S. Lee. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res.* **480-481**, 243-268.
29. Thun, M. J., S. J. Henley and C. Patrono. 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 252-266.