

Daidzein 과 Genistein 이 생쥐의 면역 기능에 미치는 영향

은재순[#] · 조선경 · 권진 · 서은실 · 전훈 · 염정열

우석대학교 약학대학

(Received March 20, 2000)

Effect of Daidzein and Genistein on Immune Function in Mice

Jae-Soon Eun[#], Sun-Kyung Cho, Jin Kwon, Eun-Sil Suh,
Hoon Jeon and Jung-Yul Yum

College of Pharmacy, Woosuk University, Samrye, 565-701 Korea

Abstract — High soy consumption leading to high exposures of soy isoflavones has been associated with a reduced risk of cancers at many sites. As part of a study focusing on the chemopreventive mechanisms, we have investigated the modulating effects of daidzein and genistein, a prominent and more bioavailable isoflavone in soy foods, on murine immune function. Daidzein (50 mg/kg) or genistein (50 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days in BALB/c mice. Daidzein decreased the mitogen-stimulated proliferation of murine splenocyte, but genistein increased it. Daidzein stimulated the secretion of interleukin-4, but inhibited the secretion of γ -interferon, interleukin-2 and tumor necrosis factor- α . Genistein stimulated the secretion of γ -interferon, interleukin-2 and tumor necrosis factor- α , but inhibited the secretion of interleukin-4. Daidzein and genistein inhibited the production of nitric oxide and enhanced the phagocytic activity in peritoneal macrophage. These results suggest that cancer preventive effects of daidzein is partly concerned with the secretion of T_H2 cells cytokine and the activation of macrophage phagocytosis, and genistein is partly concerned with the secretion of T_H1 cells cytokine, tumor necrosis factor- α and the activation of macrophage phagocytosis.

Keywords □ daidzein, genistein, cytokine, splenocyte, macrophage.

Isoflavone이 많이 함유된 콩을 먹는 아시아 국가에서는 유방암, 전립선암 및 직장암 등이 비교적 적게 나타난다는 역학적인 보고가 많으며, 실제적으로 동물 및 세포배양 실험에서 콩에 함유된 isoflavone, 특히 daidzein 및 genistein에 cancer chemopreventive effect가 있다는 것이 증명되고 있다.¹⁻⁵⁾ 또한 genistein이 daidzein보다 B16F-10 melanoma cell에 의한 lung metastasis⁶⁾ 및 MCF-7 cell의 증식⁷⁾을 강력히 억제하며, genistein은 human bladder cell lines 및 human prostatic cancer cell line LNCaP의 apoptosis를 유도하는 작용,^{8,9)} angiogenesis inhibitor

의 작용¹⁰⁾ 및 voltage-sensitive sodium channel을 차단하는 작용 등 다양한 작용이 있는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾

Isoflavones는 구조적으로 estrogen steroids와 관련이 있기 때문에 처음에는 암 예방 효과가 anti-estrogenic 효과 때문이라 생각하였지만,¹²⁾ 최근에는 signal transduction시 tyrosine 잔기를 phosphorylation시키는 tyrosine kinase를 강력히 억제하여 항암작용을 나타내고 있음이 확인되었다.^{13,14)}

암을 예방하는 인체의 능력에서 중요한 것은 면역능이라 할 수 있다. 아직까지 음식, 면역 및 암의 상관관계가 정확히 규명되지는 않았지만, 암을 예방하는데 음식을 통하여 면역능을 증강시키는 것은 중요한 의미를 가질 수 있다.^{15,16)}

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0652-290-1569 (팩스) 0652-290-1567

한편, 면역계는 gonadal steroids에 의해 일부 조절 되는데,¹⁷⁻¹⁹⁾ isoflavones인 daidzein 및 genistein은 gonadal steroids와 유사한 화학구조를 가지고 있어 면역조절 작용이 있으리라 예견된다.

최근 daidzein 및 genistein이 murine system에서 면역 기능을 증강시킨다는 보고들이 있으나,²⁰⁻²²⁾ daidzein 및 genistein의 면역조절작용과 cancer prevention 작용과의 관계에 대해서는 정확히 규명되지 않았다. 따라서 본 실험에서는 daidzein 및 genistein을 생쥐에 경구투여한 후, 생체의 면역조절기능의 변화를 관찰함으로써 cancer prevention 작용에 대한 기전을 규명하고자 실험하였다.

실험방법

실험동물 - 본 실험에 사용한 실험동물은 6~8 주령 BALB/c계 수컷을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고행사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시약 및 기기 - 실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A), lipopolysaccharide(LPS), lucigenin, MTT, γ -interferon(γ -IFN), zymosan, sulfanilamide, daidzein, genistein, N-naphthylethylenediamine \cdot 2HCl,은 Sigma Co.에서, RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), trypsin은 Gibco Co.에서, mouse γ -interferon(γ -IFN) immunoassay kit, mouse interleukin-2(IL-2) immunoassay kit, mouse interleukin-4(IL-4) immunoassay kit, mouse tumor necrosis factor- α (TNF- α) immunoassay kit는 R&D Co.에서, FITC-conjugated *E. coli* K-12 bio-particles는 Molecular Probes Co.에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), multi-well plate(Costar), 96 well white plate (Berthold), microplate-reader(Dynatech MR5000), CO₂ incubator(Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope(Zeiss Co.), luminometer(Berthold 96LP) 등을 사용하였다.

세포분리 - 생쥐의 splenocyte 분리는 Wysocki²³⁾ 및 Mizel²⁴⁾등의 방법을 이용하였다. 생쥐 5마리를 1군

으로 하여 daidzein 및 genistein을 각각 50 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였으며, 8일째 생쥐를 경추 탈골하여 도살하였다. 적출한 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음(1,500 rpm으로 10 분간 원심분리), splenocyte로 사용하였다.

Macrophage의 분리는 daidzein 및 genistein을 각각 50 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였으며, 약물투여 4 일째 생쥐 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 8일째 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C에서 1,300 rpm으로 10분간 원심분리하고 RPMI 1640 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양시키고 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 macrophage를 cell scraper로 분리하여 사용하였다. 생쥐 splenocyte 및 macrophage는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하여 사용하였다.

세포 증식능 측정 - 동일한 방법으로 분리한 splenocyte의 증식에 미치는 daidzein 및 genistein의 영향은 MTT법^{25,26)}으로 측정하였다. 96-well plate의 각 well에 분리한 splenocyte를 각각 RPMI 1640 배지로 희석하여, 1.2×10^6 cells/ml 농도로 분주하고 concanavalin A(con A) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 lipopolysaccharide(LPS) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 후, 37°C의 CO₂ incubator에서 48 시간 배양한 다음, 배양 종료 4 시간 전에 MTT 시약을 가하였다. 배양 종료 시 0.1N-HCl에 용해시킨 10% SDS 100 μl 를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18 시간 더 배양한 후, 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570 nm에서 측정하여, 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 세포증식율을 측정하였다.

Cytokines 측정 - Splenocyte에서 분비되는 γ -interferon(γ -IFN), interleukin-2(IL-2) 및 interleukin-4(IL-4) 측정 시에는 동일한 방법으로 분리한 splenocyte를 2×10^7 cells/ml로 조제하여, 96 well plate에 200 μl 씩 분주한 후, con A 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하여 72 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였으며, 복강 macrophage에서 분비되는 tumor necrosis

factor- α (TNF- α) 측정 시에는 동일한 방법으로 분리한 macrophage를 2×10^6 cells/ml로 조제하여, 96 well plate에 200 μ 씩 분주한 후, LPS 10 μ g/ml를 첨가하여 72 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리(2,500 rpm, 5 분, 4°C)한 다음, 상등액 50 μ 를 취하여 각각의 mouse immunoassay kit를 이용하여 측정하였다. 즉 상등액 50 μ 에 assay diluent 50 μ 를 혼합하여 실온에서 2 시간 동안 incubation한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokines conjugate concentrate 100 μ 를 가하여 실온에서 2 시간 incubation한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100 μ 를 혼합하여 30 분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100 μ 를 가하여 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하고, 미리 작성한 검량선에 의해 cytokines의 양을 환산하였다.

Phagocytic activity 측정 - 동일한 방법으로 분리한 macrophage를 2×10^6 cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO₃, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Lucigenin 용액의 제조는 10 ml의 DPBS-A에 용해한 후, 여과 멸균하여 -20°C에서 보관하면서 사용하였다 (stock solution). Lucigenin stock solution은 사용하기 직전에 DME 배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37°C에서 측정하였다.^{27,28} 측정용 microplate(white)의 각 well에 준비된 macrophage 세포부유액 50 μ 와 lucigenin 용액 50 μ 를 넣고 37°C에서 15 분간 전처리한 후, 5 분 간격으로 30 분 동안 chemiluminescence를 측정하였다.

복강 macrophage의 phagocytosis를 확인하기 위하여 FITC-conjugated *E. coli* particles를 Hank's balanced salt solution(HBSS)에 현탁시켜 sonification 한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer (pH 4.4)에 250 μ g/ml 농도로 용해하여 사용하였다. 분리한 macrophage를 RPMI 1640 배지로 5×10^5 cells/ml 되도록 조정한 후, 100 μ 를 96 well에 분주하고 1 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. *E. coli* 현탁액 25 μ 가하여 1 시간 동안 더 배양한 후, 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100 μ 를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다.^{29,30}

Nitric oxide 측정 - 동일한 방법으로 분리한 macrophage를 24 well plate에 well당 2×10^6 cells를 분주한 후, macrophage로부터 생성되는 nitric oxide (NO)의 양을 Griess법³¹)으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 24 시간 배양한 후, 배양액 100 μ 와 Griess 시약(1% sulfanilamide+0.1% N-naphthylenediamine · 2HCl+2.5% H₃PO₄) 100 μ 를 혼합하여 96 well module에 넣고, 37°C에서 10 분간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO₂⁻의 농도를 환산하였다.

통계처리 - 모든 실험 결과들은 mean \pm SE로 나타내었고 통계처리는 Student *t*-test를 실시하여 P < 0.05를 기준으로 하여 유의성 여부를 판정하였다.

실험결과 및 고찰

Splenocyte의 증식에 미치는 효과 - Daidzein을 투여하고 분리한 splenocyte에 T-lymphocyte mitogen인 Con A를 처리하였을 때 세포증식율은 대조군에 비해 감소하였으나, genistein을 투여한 군은 대조군에 비해 세포증식율이 증가하였다. Daidzein을 투여하고 분리한 splenocyte에 B-lymphocyte mitogen인 LPS를 처리하였을 때 세포생존율은 대조군에 비해 감소하였으나, genistein을 투여한 군은 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였다(Table I). 이러한 결과는 daidzein은 T 및 B-lymphocyte의 증식을 억제하나 genistein은 T 및 B-lymphocyte의 증식을 촉진할 수 있음을

Table I - Effect of daidzein and genistein on mitogen-stimulated proliferation of murine splenocytes

Samples	Cell Proliferation (%)	
	Concanavalin A	Lipopolysaccharide
Control	100.0 \pm 0.9	100.0 \pm 0.7
Daidzein	88.8 \pm 0.8*	89.7 \pm 1.6*
Genistein	110.4 \pm 0.9*	111.1 \pm 1.1*

Daidzein or genistein (50 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated splenocytes (1.2×10^6 cells/ml) were cultured for 48 hours in RPMI 1640 media mixed with activating mitogen of concanavalin A at 5 μ g/ml or lipopolysaccharide at 10 μ g/ml. The cell proliferation was determined by MTT method. The cell proliferation of Con A non-treated control group is $66.7 \pm 1.2\%$ and the cell proliferation of LPS non-treated control group is $71.2 \pm 0.9\%$. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *Significantly different from control group ($p < 0.01$).

Table II – Effect of daidzein and genistein on the production of cytokines in murine splenocytes

Samples	Production of Cytokine (pg/ml)		
	γ -Interferone	Interleukin-2	Interleukin-4
Control	626.7 \pm 7.8	261.0 \pm 5.8	72.5 \pm 1.5
Daidzein	559.4 \pm 7.1*	224.4 \pm 6.2*	101.5 \pm 2.0*
Genistein	696.7 \pm 7.6*	297.6 \pm 4.2*	57.8 \pm 2.1*

Daidzein or genistein (50 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated splenocytes (2×10^7 cells/ml) were cultured for 72 hours in RPMI 1640 media mixed with activating mitogen of concanavalin A at 5 μ g/ml. The secretion of cytokine was determined in supernatants of cultures with ELISA kit. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *Significantly different from control group ($p < 0.05$).

의미하는 것이다. 한편 이러한 실험결과는 Wang 등²²⁾이 *in vitro* 실험계에서 daidzein은 splenocyte 증식 촉진작용이 있으나, genistein은 splenocyte 증식 촉진 작용이 없다는 보고와는 서로 상반된 결과이지만, 본 실험의 결과가 *in vivo* 실험계의 결과이기 때문에 경구 투여된 daidzein과 genistein이 직접적으로 lymphocyte에 작용하지 않고, 다른 target cell을 경유하여 lymphocyte에 간접적으로 작용하기 때문이 아닌가 추정되나, 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 과제이다.

Splenocyte 및 복강 macrophage의 cytokine 분비에 미치는 효과 – Splenocyte에서 분비되는 cytokine의 양을 측정된 결과, daidzein 투여군에서는 IL-4의 양이 대조군에 비해 증가하였으나, γ -IFN 및 IL-2의 양은 감소하였다. Genistein 투여군에서는 γ -IFN 및 IL-2의 양은 증가하였으나, IL-4의 양은 감소하였다 (Table II).

T 임파구 중 T_H1 임파구에서는 γ -IFN 및 IL-2와 같은 cytokine이 분비되고, T_H2 임파구에서는 IL-4 및 IL-10과 같은 cytokine이 분비되며, 분비된 IL-2는 T cell 증식 촉진 및 NK cell을 활성화하고, γ -IFN는 macrophage의 phagocytic activity를 촉진하며, IL-4는 IgE antibody의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다.³²⁾ Daidzein 투여군에서 γ -IFN 및 IL-2의 양은 감소되었으나, IL-4의 양은 증가되었고, genistein 투여군에서는 γ -IFN 및 IL-2의 양은 증가되었으나, IL-4의 양은 감소되었다. 이는 daidzein은 T_H2 임파구를 genistein은 T_H1 임파구를 주로 활성화하는 작용이 있음을 의미하는 것이다.

한편, 복강 macrophage에서 분비되는 TNF- α 의 양

Table III – Effect of daidzein and genistein on the production of tumor necrosis factor- α in murine peritoneal macrophage

Samples	Tumor necrosis factor- α (pg/ml)
Control	521.4 \pm 9.6
Daidzein	436.1 \pm 8.1*
Genistein	611.9 \pm 7.4*

Daidzein or genistein (50 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 hours adherence period were cultured for 72 hours in RPMI 1640 media mixed with activating mitogen of lipopolysaccharide at 10 μ g/ml. The secretion of cytokine was determined in supernatants of cultures with ELISA kit. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *Significantly different from control group ($p < 0.05$).

을 측정된 결과, daidzein 투여군은 TNF- α 양이 대조군에 비해 감소하였으나 genistein 투여군은 증가하였다 (Table III). Genistein 투여군에서 TNF- α 의 양이 증가하였다는 것은 genistein의 chemoprevention effect에 TNF- α 가 관여하고 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다.

복강 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 효과 – Phagocytic activity는 opsonic activity의 반응을 증가시키는 lucigenin을 이용하여 phagocyte chemiluminescence (CL)를 측정하였다.³³⁾ CL은 phagocytosis가 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, luminol 또는 lucigenin 등에 의해 증가되는데, luminol-dependent CL은 myeloperoxidase-H₂O₂ system과 관련되어 있으며, lucigenin-dependent CL은 phagocyte에 의해 생성되는 superoxide와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.³⁴⁾ Daidzein 및 genistein 투여군은 대조군에 비하여 모두 CL이 증가하였으며, genistein 투여군이 daidzein 투여군에 비해 더 증가하였다 (Fig. 1). 또한 FITC-conjugated *E. coli* particles을 이용하여 현미경으로 복강 macrophage에 uptake되는 particle을 관찰한 결과, daidzein 및 genistein 투여군에서 particle이 증가됨을 확인하였다 (Fig. 2).

복강 macrophage의 nitric oxide의 생성에 미치는 효과 – 복강 macrophage로부터 분비되는 nitric oxide의 양은 daidzein 투여군 및 genistein 투여군에서 모두 대조군에 비해 감소하였다 (Table IV). Mam-

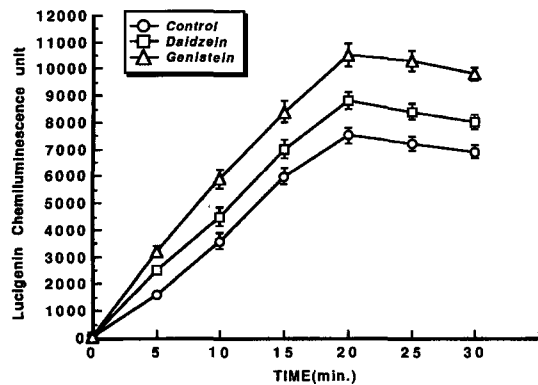


Fig. 1 - Effect of daidzein and genistein on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophage. Daidzein or genistein (50 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 hours adherence period were cultured in RPMI1640 media mixed with opsonized zymosan. The lucigenin chemiluminescence was determined for 30 min. with luminometer. Each point represents the mean \pm SE of 5 mice.

malian neutrophil과 macrophage는 pseudopodia formation을 하는 동안 phagocytosing molecule의 cytoskeleton이 cytosolic G-actin monomers로부터 F-actin polymerization으로 변화하는 것으로 알려져 있다.^{35,36} Nitric oxide는 human neutrophils의 F-actin 양을

Table IV - Effect of daidzein and genistein on the production of nitric oxide in murine peritoneal macrophage

Samples	Nitric oxide (μ M/ml)
Control	12.8 \pm 0.8
Daidzein	5.7 \pm 0.2*
Genistein	4.8 \pm 0.6*

Daidzein or genistein (50 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 hours adherence period were cultured for 24 hours in RPMI 1640 media mixed with γ -interferone and lipopolysaccharide. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *Significantly different from control group ($p < 0.01$).

감소시키며, phagosome에서 oxygen metabolites의 생성을 억제하여,³⁷ murine macrophage의 pseudopodia formation과 phagocytic activity를 억제하는 것으로 알려져 있다.³⁸ Daidzein 및 genistein 투여군에서 복강 macrophage로부터 nitric oxide가 감소하였다는 것은 daidzein 투여군 및 genistein 투여군에서 phagocytic activity가 증가된 것이 nitric oxide의 감소에 기인된 것이 아닌가 추정된다. 한편 nitric oxide는 암세포의 mitochondria function 및 DNA synthesis를 억제하여 다양한 cytostatic 및 cytotoxic effect를 나타내는 것으로 알려져 있다.³⁸ 본 실험에서 daidzein 및 genistein 투여시 nitric oxide의 양이 감

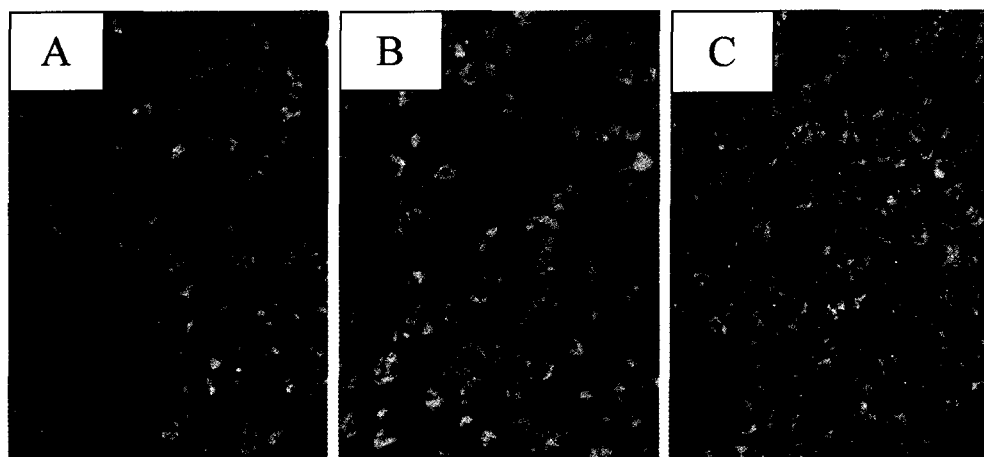


Fig. 2 - Photomicrographs of the engulfment of FITC-conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophage obtained from daidzein- or genistein-administered mice. Photographs (taken at 200X magnification) showed the uptake of FITC-conjugated *E. coli* particles in normal (A), daidzein-administered group (B) and genistein-administered group (C). The macrophages observed with an inverted fluoromicroscope.

소하였다는 것은 daidzein 및 genistein의 chemopreventive effect에 nitric oxide가 관여하고 있지 않음을 시사하는 것이라 할 수 있다.

결 론

Daidzein의 cancer preventive effect는 T_H2 임파구로부터 IL-4의 분비 및 복강 macrophage의 탐식작용을 증가시켜서, genistein은 T_H1 임파구로부터 γ -IFN과 IL-2의 분비 및 복강 macrophage로부터 TNF- α 의 분비와 탐식작용을 증가시켜 일부 나타나는 것이라 사료된다.

감사의 말씀

본 논문은 2000년도 우석대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Adlercreutz, H : Western diet and western disease; some hormonal and biochemical mechanism and associations. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **50**, 3 (1990).
- 2) Adlercreutz, H : Phytoestrogens; epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ. Health Perspect.*, **103(Supple 7)**, 103 (1994).
- 3) Messina, M. and Barnes, S. : The role of soy products in reducing risk of cancer. *JNCI*, **83**, 541 (1991).
- 4) Messina, M., Persky, V., Setchell, KDR. and Barnes, S.: Soy intake and cancer risk; a review of in vitro and in vivo data. *Nutr. Cancer*, **21**, 113 (1994).
- 5) Barnes, S., Grubbs, C., Setchell, KDR. and Carlson, J. : Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. *Prog. Clin. Biol. Res.* **347**, 239 (1990).
- 6) Menon, L.G., Kuttan, R., Nair, M.G., Chang, Y.C. and Kuttan, G. : Effect of isoflavones genistein and daidzein in the inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F-10 melanoma cells. *Nutrition and Cancer*. **30**(1), 74 (1998).
- 7) Verma, S. P. and Goldin, B. R. : Effect of soy-derived isoflavonoids on the induced growth of MCF-7 cells by estrogenic environmental chemicals. *Nutrition and Cancer*, **30**(3), 232 (1998).
- 8) Zhou, J. R., Mukherjee, P., Gugger, E. T., Tanaka, T., Blackburn, L. and Clinton, S. K. : Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in the cell cycle, apoptosis and angiogenesis. *Cancer Research*, **58**, 5231 (1998).
- 9) Onozawa, M., Fukuda, K., Ohtani, M., Akaza, H., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. : Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **28**(6), 360 (1998).
- 10) Kapiotis, S., Hermann, M., Held, I., Seelos, C., Ehringer, H. and Gmeiner, B. M. K. : Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenesis LDL. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **17**(11), 2868 (1997).
- 11) Paillart, C., Carlier, E., Guedin, D., Dargent, B. and Couraud, F. : Direct block of voltage-sensitive sodium channels by genistein, a tyrosine kinase inhibitor. *J. Pharm. & Exper. Ther.* **280**(2), 521 (1997).
- 12) Setchell, K. D. R., Borriello, S. P., Hulme, P., Kirk, D. N. and Axelson, M. : Nonsteroidal estrogens of dietary origin; possible roles in hormone-dependent disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **40**, 569 (1984).
- 13) Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Wantanabe, S. I. : Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592 (1987).
- 14) Akiyama, T. and Ogawara, H. : Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases. *Methods Enzymol.*, **201**, 362 (1991).
- 15) Watson, R. R. : Immunological enhancement by fat-soluble vitamins, minerals, and trace metals: a factor in cancer prevention. *Cancer Detect. Prev.* **9**, 67 (1986).
- 16) Lowell, J. A., Parnes, H. L. and Blackburn, G. L. : Dietary immunomodulation: beneficial effects on oncogenesis and tumor growth. *Crit. Care Med.* **18**, s145 (1990).
- 17) Appelbaum, J. W. : The role of the immune system in the pathogenesis of cancer. *Semin. Oncol. Nurs.* **8**, 51 (1992).
- 18) Grossman, C. J. : Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocr. Rev.* **5**, 435 (1984).
- 19) Grossman, C. J. : Interactions between the gonadal

- steroids and the immune system. *Science*. **227**, 257 (1985).
- 20) Paavonen, T. : Hormonal regulation of immune responses. *Ann. Med.* **26**, 255 (1994).
 - 21) Zhang, R., Li, Y. and Wang, W. : Enhancement of immune function in mice fed high doses of daidzein. *Nutr. Cancer*, **29**, 24 (1997).
 - 22) Wang, W., Higuchi, C. M. and Zhang, R. : Individual and combinatory effects of soy isoflavones on the in vitro potentiation of lymphocyte activation. *Nutr. Cancer*, **29**(1), 29 (1997).
 - 23) Wysocki, L. J. and Sato, V. L. : Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **75**, 2844 (1978).
 - 24) Mizel, S. B., Openheim, J. J. and Rosensteich, D. L. : Characterization of lymphocyte-activating factor (LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. *J. Immunol.* **120**, 1497 (1979).
 - 25) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods*. **65**, 55 (1983).
 - 26) Kotnic, V. and Fleischmann, W. R. Jr. : A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods*. **129**, 23 (1990).
 - 27) Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. : Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods*, **174**, 259 (1994).
 - 28) Blair, A. L., Cree, I. A., Beck, J. S. and Hating, M. J. G. : Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods*, **112**, 163 (1988).
 - 29) Sahlin, S., Hed, J. and Rundquist, I. : Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay. *J. Immuno. Methods*, **60**, 115 (1983).
 - 30) Chok, P. W., Choon, S. P. and Benjamin, H. S. : A rapid and simple micro-fluorometric phagocytosis assay. *J. Immuno. Methods*, **162**, 1 (1993).
 - 31) Rockett, K. A., Awburn, M. M., Cowden, W. B. and Clark, I. A. : Killing of Plasmodium faciparum in vitro by nitric oxide derivatives. *Infec. Immunity*, **59**(9), 3280 (1991).
 - 32) Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. : Cellular and molecular immunology. 2ed. Saunders, p.243-257 (1994).
 - 33) Holt, M. E., Ryall, M. E. T. and Campbell, A. K. : Albumin inhibits human polymorphonuclear leukocyte luminol-dependent chemiluminescence: evidence for oxygen radical scavenging. *Br. J. Exp. Pathol.* **65**, 231 (1984).
 - 34) Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C. : Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **45**, 1 (1984).
 - 35) Sheterline, P. and Rickard, J. E. : The cortical actin filament network of neutrophil leukocytes during phagocytosis and chemotaxis. CRC Press, Boca Raton, FL. p.141-165 (1989).
 - 36) Jaconi, M. E. E., Lew, D. P., Carpentier, J. L., Magnusson, K. E., Sjogren, M. and Stendahl, O. : Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J. Cell Biol.* **110**(5), 1555 (1990).
 - 37) Forslund, T. and Sundqvist, T. : Nitric oxide-releasing particles inhibit phagocytosis in human neutrophils. *Biochem. and Biophysical Research Communications*, **233**, 492 (1997).
 - 38) Jun, C. D., Park, S. K., Kim, J. M., Kim, J. D. and Chung, H. T. : Nitric oxide inhibits macrophage pseudopodia formation in the activated macrophages. *Korean. J. Immunol.* **18**, 635 (1996).
 - 39) Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB, J.* **6**, 3051 (1992).