

Genistein 이 T lymphocyte 의 Apoptosis 및 복강 Macrophage 의 탐식능에 미치는 영향

조선경 · 이택렬 · 김대근 · 오찬호* · 소준노* · 은재순#

우석대학교 약학대학, *생명공학부

(Received November 19, 2001; Revised November 9, 2001)

Effect of Genistein on Apoptosis of T lymphocyte and Phagocytosis of Peritoneal Macrophage

Sun-Kyung Cho, Taek-Yul Lee, Dae-Keun Kim, Chan-Ho Oh*, June-No So* and Jae-Soon Eun#
College of Pharmacy and *Division of Biotechnology, Woosuk University

Abstract — The effects of genistein on murine thymocytes for inducing apoptotic cell death and phagocytic activity of peritoneal macrophage were studied *in vitro*. Addition of genistein (10 and 50 μ M) to cultured thymocytes from BALB/c mice definitely promoted DNA fragmentation. Also, cytofluorometric analysis of these cells demonstrated a reduction in mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$). But, repeated administration of genistein (1 mg/mouse/day) to mice for 7 days did not cause any detectable DNA fragmentation. Genistein decreased lucigenin chemiluminescence and engulfment of fluorescein-conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophage. These results suggest that genistein induce an apoptosis of thymocyte *via* reduction in $\Delta\Psi_m$ and decrease phagocytic activity of peritoneal macrophage *in vitro*.

Keywords □ genistein, thymocyte, DNA fragmentation, mitochondrial transmembrane potential, macrophage, phagocytosis

콩을 먹는 아시아 국가에서는 콩에 함유된 isoflavone인 genistein이 암 예방효과가 있어, 유방암, 전립선암 및 직장암 등이 비교적 적게 발생된다는 역학적인 보고가 많으며, 동물 및 세포배양 실험을 통하여 genistein이 암 예방효과가 있음이 증명되고 있다.¹⁻⁵⁾ 또한 genistein은 MCF-7 cell의 증식억제작용,⁶⁾ B16F-10 melanoma cell의 lung metasis 억제작용,⁷⁾ human bladder cell lines⁸⁾ 및 human prostatic cancer cell line인 LNCap의 apoptosis를 유도하는 작용이 있음이 보고되었다.⁹⁾

Isoflavones는 구조적으로 estrogen steroids와 관련이 있기 때문에, 처음에는 암 예방 효과가 antiestrogenic effect 때문이라 생각하였지만,¹⁰⁾ 최근에는 signal transduction시 tyrosine잔기인 phosphorylation시키는 tyrosine kinase를 강력히 억제하여 항암 작용을 나타내고 있음이 확인되었다.^{11,12)}

한편, 면역계는 gonadal steroids에 의해 일부 조절되는데,¹³⁻¹⁵⁾ isoflavones인 genistein은 gonadal steroids와 유사한 화학구조를

가지고 있어 면역조절작용이 있으리라 예견되었다. 그러나 genistein의 면역계에 대한 연구들은 *in vivo* 실험에서는 면역능을 증강시키나,^{16,17)} *in vitro* 실험에서는 면역능을 저하시킨다고 보고하고 있어,¹⁸⁾ *in vivo*계와 *in vitro*계에서 작용의 차이점이 있음을 시사하고 있다. 따라서 본 실험에서는 이들 차이점을 확인하고자 *in vivo* 실험을 실시한 전보¹⁹⁾에 이어 *in vitro*계를 이용하여 genistein이 murine thymocytes의 apoptosis 및 복강 macrophage의 탐식능에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험방법

실험동물 — 본 실험에 사용한 생쥐는 6 주령 BALB/c계 수컷을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고행사료와 물을 자유스럽게 섭취하도록 하였다.

시약 및 기기 — 실험에 사용한 시약은 genistein, Dulbecco's modified Eagle's medium(DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A), propidium iodide(PI), Triton-X100, proteinase K, RNase A, MTT, ethidium

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 82-63-290-1569 (팩스) 82-63-290-1567
(E-mail) jseun@core.woosuk.ac.kr

bromide(EB), agarose, carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (mCICCP), lucigenin, zymosan은 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco Co., FITC-conjugated *E. coli* K-12 bio-particles, 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide(DiOC₆)는 Molecular Probes Co.에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기기는 Microplate-Reader(Dynatech MR5000), CO₂ incubator(Vision scientific Co.), flow cytometer(Coulter EPICS-XL), Imaemaster VDS (Pharmacia Biotech Co.), luminometer(Berthold 96LP), inverted fluoromicroscope(Zeiss Co.) 등을 사용하였다.

세포분리 - 생쥐의 thymocytes 분리는 Wysocki²⁰⁾ 및 Mizel²¹⁾ 등의 방법을 이용하였다. *In vivo* 실험에서는 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 전보¹⁹⁾에서 cytokine의 분비를 촉진한 용량인 genistein 50 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음, 8일째 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 적출한 흉선을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포 부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음(1,500 rpm에서 10 분간 원심분리), thymocytes 부유액으로 하였다. 복강 macrophage의 분리는 생쥐 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 4 일후 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 복강세포를 4°C에서 1,300 rpm으로 10 분간 원심분리하고 RPMI 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. 배지는 RPMI 1640을 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

세포생존율 측정 - 분리한 thymocytes의 생존율에 미치는 genistein의 영향은 MTT법으로 측정하였다. 본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann²²⁾이 개발하여 Kotnik 등²³⁾이 변형시킨 방법으로, 96-well plate의 각 well에 분리한 thymocyte를 각각 RPMI 1640 배지로 희석하여 96-well plate에 1.2×10⁶ cells/ml 농도로 분주하고, genistein 1, 10 및 50 µM 농도를 각각 처리한 다음 concanavalin A(Con A) 1 µg/ml를 첨가하였다. 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한 다음, 배양 종료 4시간 전에 MTT 시약을 가하였다. 배양 종료후, 0.1N-HCl에 용해시킨 10% SDS 100 µl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다.

DNA fragmentation 측정 - 동일한 방법으로 배양한 thymocytes를 1×10⁶ cells/ml로 조제하여 eppendorf tube에 1 ml를 넣고 propidium iodide(10 µg/ml) 20 µl를 혼합하여 4°C에서 30 분간 형광염색하고 flow cytometer(excitation: 488 nm,

emission: 620 nm)로 DNA fragmentation(Sub G1 peak)을 측정하였다.²⁴⁾

Agarose gel electrophoresis 측정 - Thymocytes에 nuclear lysis buffer 100 µl(50 mM Tris-HCl, 0.5% SDS, 10 mM EDTA, pH 8.0)를 가해 세포를 용해시킨 후, 4°C에서 10 분간 방치한 다음 원심분리(16,000 rpm, 20분) 하였다. 상층액을 분리하여 proteinase K(20 mg/ml) 3 µl 및 RNase(10 mg/ml) 3 µl를 혼합하여 55°C water bath에서 2 시간 배양하고, 5M NaCl 20 µl와 isopropyl alcohol 120 µl를 가해 -20°C에서 over-night 시켰다. 원심분리(16,000 rpm, 15분)하여 상층액을 제거한 후 TE buffer 20 µl에 용해시켜, 12 µl를 취해 0.25% bromophenol blue 3 µl를 혼합한 다음, 10 µl를 1.2%(w/v) agarose gel (ethidium bromide 함유)에 loading하고 전기영동(50 volt, 120분) 하였다. 전기영동 후 Imaemaster VDS로 사진 촬영을 하여 DNA laddering을 관찰하였다. 이때 marker로는 lamda NDA *EcoRI* Hind III digest를 사용하였다.²⁵⁾

Mitochondrial transmembrane potential (ΔΨm) 측정 - Thymocytes를 RPMI 1640 배지로 3 회 세척한 다음, 1.2×10⁶ cells/ml로 조제하여 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆)를 최종농도가 40 nM이 되도록 PBS에 희석하여 염색하고 37°C에서 15 분간 반응시킨 다음 flow cytometer(excitation: 488 nm, emission: 525 nm)로 측정하였으며, 이때 negative control로는 uncoupling agent로 carbonylcyanide m-chlorophenyl-hydrazone (mCICCP) 50 µM을 가하여 같은 방법으로 측정하였다.²⁶⁾

Phagocytic activity 측정 - 분리한 macrophage를 2×10⁶ cells/ml가 되도록 DME(without pheno 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.^{7,28)} 측정용 microplate (white)의 각 well에 준비된 macrophage 부유액 50 µl를 분주하고, genistein 1, 10 및 50 µM를 각각 처리하여 2 시간 배양한 후, lucigenin 용액 50 µl 및 zymosan 용액 30 µl를 첨가하여, 37°C에서 15 분간 전처리한 후 5 분 간격으로 30 분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

Engulfment 측정 - FITC-conjugated *E. coli* particle를 HBSS에 1 mg/ml 농도로 현탁시켜 sonification한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer(pH 4.4)에 250 µg/ml 농도로 용해하여 사용하였다. 분리한 macrophage를 RPMI1640 배지로 1×10⁵ cells/ml 되도록 조정한 후, 100 µl를 96 well에 분주하고 *E. coli* 현탁액 25 µl를 가하여 1 시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해

trypan blue 100 μ l를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다.²⁹⁾

통계처리 - 모든 실험 결과들은 mean \pm SE로 나타내었고 통계 처리는 Student's *t*-test를 실시하여 $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험결과 및 고찰

Thymocytes의 생존율에 미치는 효과 - *In vitro* 실험에서는 대조군의 thymocytes에 T cell mitogen인 concanavalin A(Con A)를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하였을 때 세포생존율은 132.3 \pm 2.9%로 증가하였으며, genistein 1, 10 및 50 μ M을 처리하고 Con A를 첨가하였을 때 세포생존율은 각각 128.0 \pm 2.0, 91.4 \pm 2.4 및 77.9 \pm 2.2%로 10 μ M 이상의 농도에서 Con A를 처리한 대조군에 비해 세포생존율이 감소하였다(Table D). 이러한 결과는 전보¹⁹⁾에서 genistein을 경구투여 하였을 때 T-lymphocyte의 증식이 촉진되었고, γ -interferon 및 interleukin-2의 분비가 증가되었다는 결과와 비교하였을 경우, genistein을 경구로 투여하였을 때는 직접적으로 lymphocytes에 작용하지 않고, 다른 target cell을 경유하여 lymphocytes에 간접적으로 작용하고 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다. 또한, Wang³⁰⁾은 *in vitro*계에서 lymphocyte의 생존율을 daidzein은 증가시키나, genistein은 영향을 주지 않는다고 보고하였지만, 사용한 genistein의 농도가 저농도(10 μ M 이하)이었고, 본 실험에서 사용한 농도가 고농도(10 μ M 이상)이었기 때문에 용량 차이에 의한 결과라 추정된다.

Thymocyte의 DNA fragmentation에 미치는 효과 - *In vitro* 실험에서 genistein을 처리시 thymocytes 생존율의 감소가 apoptosis에 기인된 것인가를 확인하기 위하여, 이들 세포에 대한 DNA fragmentation을 flow cytometer로 측정하였다. 대조군의 DNA fragmentation은 14.4 \pm 1.7% 이었으나, genistein 1, 10 및 50 μ M을 처리하였을 때는 17.6 \pm 1.3, 37.0 \pm 2.8 및 62.1 \pm 2.1%로 10 μ M 이상의 농도에서 DNA fragmentation이 증가하

였다(Fig. 1). 또한 agarose gel electrophoresis에서도 genistein 10 μ M 이상의 농도에서 DNA laddering이 증가됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 한편, genistein 50 mg/kg을 경구투여하고 분리한 thymocytes는 DNA fragmentation에 변화가 없었다(Table II). 이는 *in vitro*에서 genistein에 의한 thymocytes의 생존율 감소가 apoptosis에 의해 유도되고 있음을 시사하는 것이며, *in vivo*

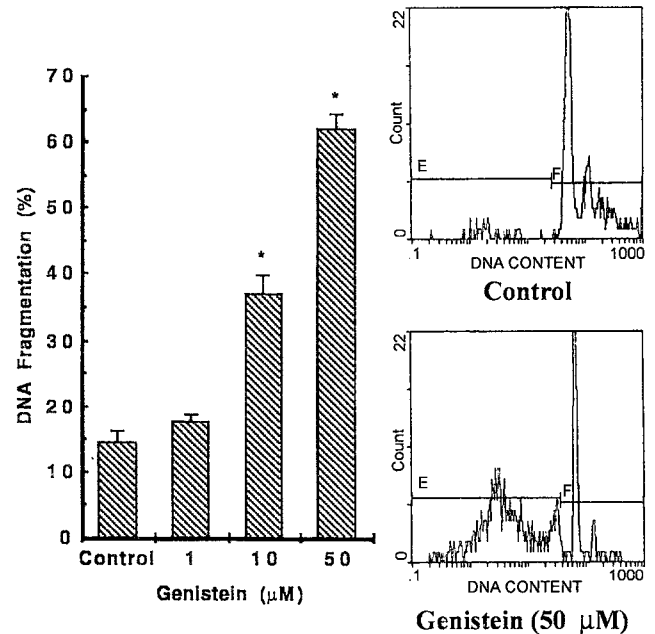


Fig. 1 - Effect of genistein on DNA fragmentation in murine thymocytes *in vitro*. The cells were lysed in a hypotonic solution with propidium iodide and DNA fragmentation was analysed by a flow cytometry. The data represents the mean \pm SE from 3 experiments.

*; Significantly different from control group ($p < 0.001$).

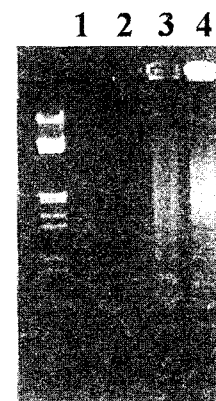


Fig. 2 - Agarose gel electrophoresis pattern of DNA in a murine thymocytes. Genomic DNA was then purified and subjected to gel electrophoresis. DNA was electrophoresed in a 1.2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed by UV illumination. Lane 1; Control, Lane 2; Genistein 1 μ M, Lane 3; Genistein 10 μ M, Lane 4; Genistein 50 μ M.

Table I - Effect of genistein on cell viability in murine thymocytes *in vitro*

Samples	Dose (μ M)	Cell viability (%)
Control	-	100.0 \pm 2.4
Control + Con A	-	132.3 \pm 2.9
Genistein + Con A	1	128.0 \pm 2.0
Genistein + Con A	10	91.4 \pm 2.4*
Genistein + Con A	50	77.9 \pm 2.2*

The cells (1.2×10^6 cells/ml) were cultured for 48 h mixed with concanavalin A (Con A) and the cell viability was measured with MTT method. The data represents the mean \pm SE from 3 experiments. Control; Con A non-treated group.

*; Significantly different from Con A-treated control group ($p < 0.001$).

Table II – Effect of the administration of genistein on DNA fragmentation in murine thymocytes

Samples	DNA Fragmentation (%)
Control	12.2 ± 1.1
Genistein	13.4 ± 1.2

Genistein (50 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days and the separated thymocytes were lysed in a hypotonic solution with propidium iodide and DNA fragmentation was analysed with a flow cytometry. The data represents the mean ± SE from 5 mice.

에서는 genistein이 thymocytes의 apoptosis를 유도하지 않음을 의미하는 결과이다. 이러한 결과는 genistein이 topoisomerase-II를 억제하여 immature human thymocytes의 apoptosis를 유도한다는 McCabe의 보고³¹⁾와도 동일한 결과라 할 수 있다. *In vivo* 실험에서 genistein 50 mg/kg 투여시에는 thymocytes의 apoptosis가 유도되지 않았으나, 농도가 증가하면 apoptosis가 유도될 수도 있기 때문에 용량에 따른 변화가 추후 연구되어야 할 것이다. 이러한 실험결과는 genistein이 다양한 암세포의 apoptosis를 유도하는 작용이 있다는 보고^{8,9)}와 비교하였을 때, genistein은 암세포뿐만 아니라 면역세포인 T lymphocytes의 apoptosis도 유도하여 T 세포가 주도하는 specific-immunity를 저하시킬 가능

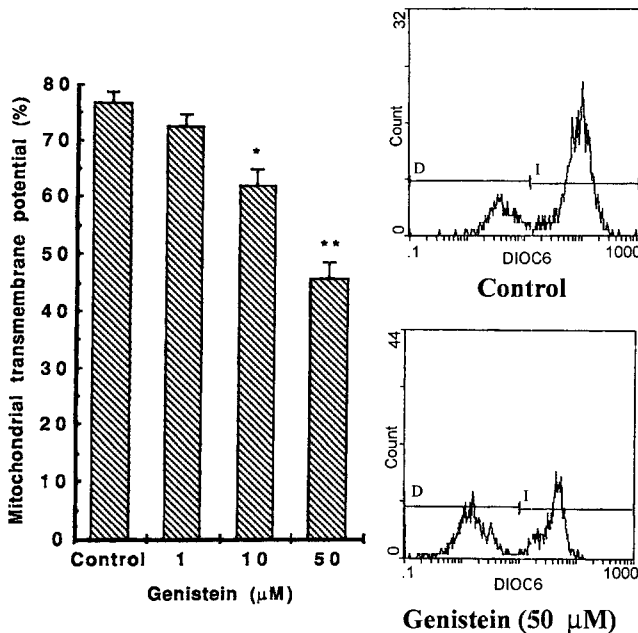


Fig. 3 – Effect of genistein on mitochondrial transmembrane potential in murine thymocytes *in vitro*. The cells were stained with DiOC₆ (40 nM). As a control, cells were incubated with mCICCP (50 μM), uncoupling agent that completely abolishes mitochondrial transmembrane potential. The data represents the mean ± SE from 3 experiments.

; Significantly different from control group (; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$).

성이 있음을 시사하는 것이다.

Thymocyte의 mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$)에 미치는 효과 – 생체에 있어서 세포사의 과정에는 일련의 단계적인 순서가 있는데 특히 mitochondrial의 swelling이 일어나기 전단계에 $\Delta\Psi_m$ 의 감소가 선행되어 일어나는 것으로 알려져 있다.²⁵⁾ 대조군의 $\Delta\Psi_m$ 은 $76.6 \pm 2.0\%$ 이었으나, genistein 1, 10 및 50 μM을 처리하였을 때는 72.6 ± 2.2 , 62.2 ± 2.7 및 $46.0 \pm 2.8\%$ 로 10 μM 이상의 농도에서 $\Delta\Psi_m$ 이 감소하였다(Fig. 3). 이 결과는 genistein이 thymocytes의 apoptosis를 유도하는 과정에 $\Delta\Psi_m$ 을 감소시켜 thymocyte의 apoptosis를 유도하고 있음을 시사하는 것이다.

복강 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 효과 – Chemiluminescence(CL)은 phagocytosis가 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다.³²⁾ *In vitro* 실험에서 분리한 복강 macrophage에 genistein 1, 10 및 50 μM을 처리하였을 때, CL은 genistein 1 μM에서는 대조군과 별 차이가 없었으나, 10 μM 이상의 농도에서는 농도의존적으로 CL이 감소하였다(Fig. 4). 또한, FITC-conjugated E. coli particles를 이용하여 형광현미경으로 복강 macrophage에 uptake되는 particle을 관찰한 결과, genistein 10 μM 이상의 농도에서 대조군에 비해 particle의 uptake가 감소함을 확인하였다(Fig. 5). 이 결과는 genistein이 *in vitro*에서 macrophage의 탐식능을 억제하여 non-specific immunity

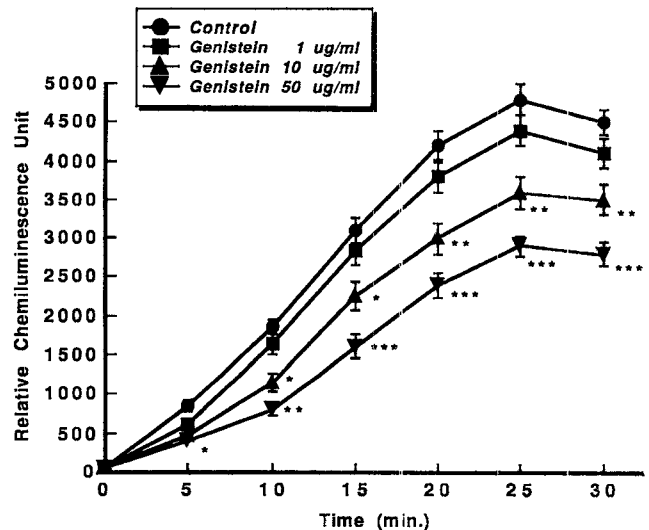


Fig. 4 – Effect of genistein on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages *in vitro*. The cells (2×10^6 cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan 2h after was cultured with genistein (1, 10 and 50 μM). The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean ± SE of 3 experiments.

; Significantly different from control group (; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$).

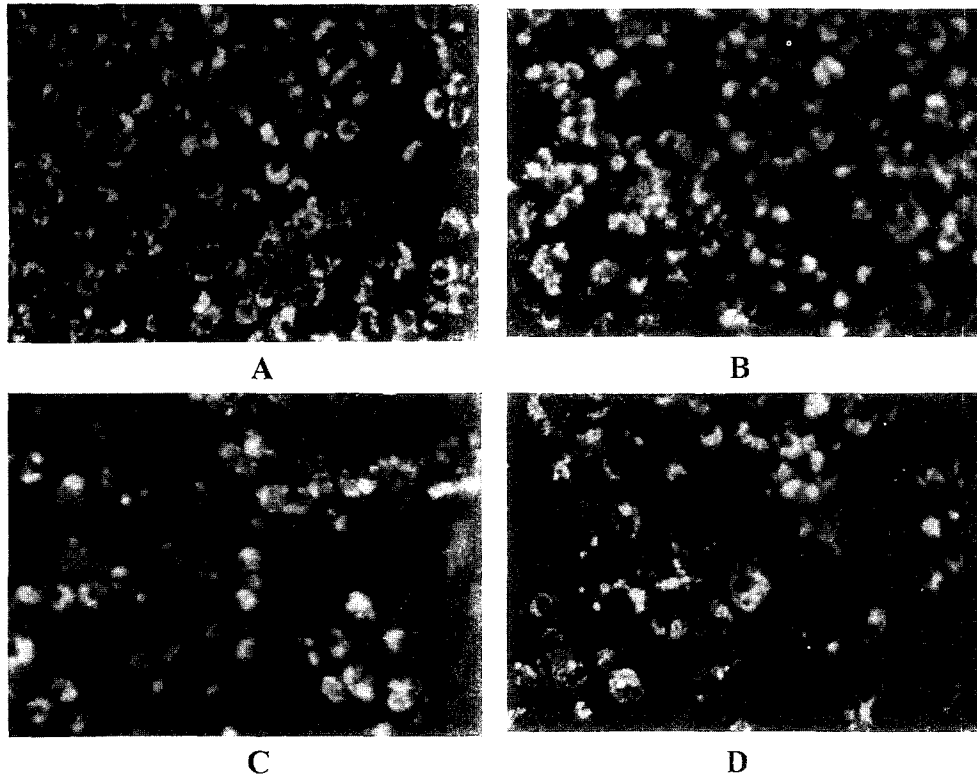


Fig. 5 - Photomicrographs of the engulfment of FITC-conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages obtained from genistein-treated mice *in vitro*. Photographs (taken at 200 × magnification) showing the uptake of FITC-conjugated *E. coli* particles in control (A) and treated with genistein 1 μM (B), 10 μM (C) and 50 μM (D). The macrophages were observed with an inverted fluoromicroscope.

를 저하시킬 수 있음을 의미하는 것이다. 전보¹⁹⁾에서 genistein 50 mg/kg을 경구투여 하였을 때 macrophage의 탐식능이 증가 되었다는 결과와 비교하였을 때, *in vivo*에서 genistein이 간접적인 경로를 통하여 복강 macrophage의 탐식능을 증가시키고 있음을 시사하는 것이며, genistein의 농도에 의한 차이가 나타날 수 있기 때문에 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다. 이상의 실험 결과는 genistein이 *in vivo*계에서는 면역세포의 활성을 촉진시킬 수 있으나, *in vitro*계에서는 활성을 억제시킬 가능성이 있음을 시사하는 것이다.

결 론

Genistein은 *in vitro*계에서 thymocytes의 mitochondrial transmembrane potential을 감소시켜 apoptosis를 유도하였으며, 복강 macrophage의 탐식능을 억제하였다.

감사의 말씀

본 논문은 우석대학교 2001년도 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., Satchell, 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., Satchell, KDR. and Carlson, J. : Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 347, 239 (1990).
- 6) Verna, S. R. 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).
- 7) Menon, L. G., Kuttan, R., Nair, M. G., Chang, Y. C. and Kutten, 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).
- 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) 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).
 - 11) Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H. and Watanabe, S. I. : Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592 (1987).
 - 12) Akiyama, T. and Ogawara, H. : Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases. *Methods Enzymol.*, **201**, 362 (1991).
 - 13) Appelbaum, J. W. : The role of the immune system in the pathogenesis of cancer. *Semin. Oncol. Nurs.*, **8**, 51 (1992).
 - 14) Grossman, C. J. : Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocr. Rev.*, **5**, 435 (1984).
 - 15) Grossman, C. J. : Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science*, **227**, 257 (1985).
 - 16) Paavonen, T. : Hormonal regulation of immune responses. *Ann. Med.*, **26**, 255 (1994).
 - 17) Zhang, R., Li, Y. and Wang, W. : Enhancement of immune function in mice fed high doses of daidzein. *Nutr. Cancer*, **29**, 24 (1997).
 - 18) Azuma, Y., Onishi, Y., Sato, Y. and Kizaki, H. : Induction of mouse thymocyte apoptosis by inhibitors of tyrosine kinases is associated with dephosphorylation of nuclear proteins. *Cell Immunol.*, **152**(1), 271 (1993).
 - 19) Eun, J. S., Cho, S. K., Kwon, J., Suh, E. S., Jeon, H. and Yum, J. Y. : Effect of daidzein and genistein on immune function in mice. *Yakhak Hoeji*, **44**(2), 182 (2000).
 - 20) Wysocki, L. J. and Sato, V. L. : Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2844 (1978).
 - 21) 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).
 - 22) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods*, **65**, 55 (1983).
 - 23) Kotnic, V. and Fleischmann, W. R. Jr. : A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods*, **129**, 23 (1990).
 - 24) Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C. A. : Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, **139**, 271 (1991).
 - 25) Nakashima, I., Zhang, Y. H., Rahman, S. M. J., Yoshida, T., Isobe, K., Ding, L., Iwamoto, T., Hamaguchi, M., Ikezawa, H. and Taguchi, R. : Evidence of synergy between Thy-1 and CD3/TCR complex in signal delivery to murine thymocytes for cell death. *J. Immunology*, **147**, 1153 (1991).
 - 26) Zamzami, N., Petit, P. X. and Kroemer, G. : Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.*, **181**, 1661 (1995).
 - 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) Chok, P. W., Choon, S. P. and Benjamin, H. S. : A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J. Immunol. Methods*, **162**, 1 (1993).
 - 30) 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).
 - 31) McCabe, M. J. Jr., Orrenius, S. : Genistein induces apoptosis in immature human thymocytes by inhibiting topoisomerase-II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**(2), 944 (1993).
 - 32) Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C. : Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, **45**, 1 (1984).