

Genistein과 Daidzein이 대장암 HCT-116 세포의 성장에 미치는 영향

신종현 · 강구성 · 김정옥 · 윤길숙
권태균¹ · 김정완² · 손윤경

경북대학교 의과대학 병리학교실
¹비뇨기과학교실, ²치과대학 구강미생물학교실

접 수 : 2005년 11월 28일
게재승인 : 2005년 12월 19일

책임저자 : 손 윤 경
우 700-422 대구광역시 중구 동인동2가 101
경북대학교 의과대학 병리학교실
전화: 053-420-4852
Fax: 053-422-9774
E-mail: yksohn@knu.ac.kr

*본 논문은 1998년도 경북대학교 연구비
지원을 받아 연구되었음.

Effects of Genistein and Daidzein on the Growth of Human Colon Cancer HCT-116 Cells

Jong Heon Shin, Ku Seong Kang, Joung Ok Kim, Ghil Suk Yoon,
Tae Gyun Kwon¹, Jung Wan Kim² and Yoon Kyung Sohn

Department of Pathology, ¹Urology, Kyungpook National University, School of Medicine, and
²Department of Oral Microbiology, Kyungpook National University, College of Dentistry, Daegu,
Korea

Background : Genistein and daidzein are two major soybean isoflavones. They have received increasing attention because of their possible roles for cancer prevention. However, their mechanisms of action and molecular targets on the human colon cancer cells are not fully understood. **Methods :** Human colon cancer HCT-116 cells were treated with genistein and daidzein to investigate their effects on the cell growth and this was analyzed with MTT assay. TUNEL assay and Hoechst33342 stain were carried out to identify apoptosis. **Results :** Daidzein was able to inhibit cell proliferation and induce apoptosis of the HCT-116 cells, but genistein didn't affect the cell growth. The ER antagonist ICI182780 didn't attenuate the antiproliferative and proapoptotic effects of daidzein: this means the effect of daidzein on the HCT-116 cells may not be dependent on the ER pathway. The other soybean isoflavone, genistein, attenuated the effects of daidzein on the HCT-116 cells and its mechanism should be elucidated. **Conclusions :** These data suggest that daidzein may act as a preventive agent on human colon cancer, and its mechanism of action doesn't involve the ER-dependent pathway.

Key Words : Genistein; Daidzein; Colon cancer; HCT-116 cell

Phytoestrogen은 식물에 존재하는 비스테로이드성 에스트로젠으로 isoflavone, lignan, coumestrol의 세 그룹이 있다.¹ Isoflavone은 콩이나 콩 가공식품에 많이 포함되어 있다.² 콩 가공식품은 일반적으로 건량 1.2-3.3 mg/g의 isoflavone을 함유하는 것으로 알려져 있으며, 콩의 종류나 수확 시기 그리고 지형적 위치에 따라 함량이 다양한 것으로 알려져 있다.³

주요한 isoflavone으로는 genistein과 daidzein이 있는데, glycitein이 소량 함유되어 있고 천연상태에서는 genistin, daidzin, glycitin과 같은 당질이 결합된 glycosides 형태로 존재한다.³ 섭취된 후에는 내장에 존재하는 glucosidase에 의해서 aglycone 형태로 바뀐 후 흡수되며, 또한 내장에 있는 박테리아에 의해서 다시 다른 형태의 isoflavone 대사산물로 바뀌어 흡수된다.⁴

Isoflavone은 심혈관계질환과 골다공증 예방이나 유방암과 전립선암 등과 관련하여 많은 연구가 이루어지고 있는데, 특히 유방암과 전립선암에 대한 연구가 가장 활발하게 진행되고 있다. 아시아 지역은 구미에 비하여 유방암과 전립선암의 발병률이 현

저하게 떨어진다.¹ 그러나 미국으로 이주한 아시아인에게는 이들 종양의 발병률이 증가한다는 역학 연구 결과가 나왔고, 식이가 유방암이나 전립선암의 발생과 관계가 있으며 특히 여러 종류의 식물에 존재하는 식물성 에스트로겐이 중요한 역할을 할 것이라는 의견이 대두되었다.⁵

이러한 역학 연구 결과와 더불어 여러 동물실험과 많은 생체 외 실험에서 콩과 콩의 주 구성성분인 genistein이 항암효과를 나타낸다는 결과가 다수 보고되었다. 실험동물의 식이에 콩이나 isoflavone을 첨가하면 전립선의 염증이 경감되거나,⁶ 전립선암의 성장이 억제되었고,⁷ 유방암의 발생이 억제되었다는 연구들이 보고되었다.⁸ 또한 전립선과 유방암을 비롯한 여러 종류의 암세포에 isoflavone을 투여하고 배양한 결과 이들 세포의 성장이 억제되고 세포자멸사가 유발되었다.⁹⁻¹⁵

유방암과 전립선암 외에도 구미에서 발생빈도가 높은 대장암에서 식물성 에스트로겐이 어떠한 작용을 하는지에 대한 연구가 진행되고 있다. 대장암의 경우 실험적으로 isoflavone을 투여한

결과 실험동물의 암 발생 감소효과가 뚜렷하지 않았고 오히려 약간의 암 유발효과를 나타내기도 하였다.¹⁶ 역학조사 결과 콩의 섭취 정도와 대장암 발생빈도 사이에 뚜렷한 상관관계가 없다는 보고도 있으며,¹⁷ 일본의 후향 연구 결과 일본 된장인 미소가 오히려 유의하게 직장암의 위험도를 높인다는 보고도 있다.¹⁸ 그러나 이와 반대로 phytoestrogen이 대장암 발생률을 줄인다는 결과가 보고되었는데, Pereira 등¹⁹과 Bennink²⁰는 실험동물 Fischer 344 쥐에 75 $\mu\text{g/g}$ 과 150 $\mu\text{g/g}$ 의 genistein이 포함된 식이를 투여한 결과 화학적 발암물질에 의해 유발된 전암병소의 수가 유의하게 감소하였다고 보고하였다.

한편 대장암세포 배양실험에서는 isoflavone이 종양세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. Genistein은 농도에 비례하여 대장암세포주의 성장을 억제하였으며,²¹ 이러한 genistein의 작용에는 세포자멸사 유도과 topoisomerase II에 의한 DNA 분절 등이 관여할 것으로 보인다.²² Daidzein은 대장암세포주 LoVo 세포의 성장에 다른 효과를 나타냈는데, 1.0 μM 이하의 저농도에서는 LoVo 세포의 성장을 유도하고 10-100 μM 의 농도에서는 세포의 성장을 억제하였다.²³ 또한 콩 추출물은 농도에 비례하여 대장암세포주 Caco-2, SW-620, HT-29의 밀도를 감소시켰고, Caco-2와 SW-620 세포주에서는 세포사를 증가시켰다.²⁴

이상과 같이 isoflavone이 대장암에 미치는 영향은 아직 확실하게 정립되어 있지 않으며, 따라서 그 작용기전도 연구자에 따라 다르게 설명되고 있는 실정이다. 더구나 isoflavone 중 genistein에 대한 연구는 다수 있으나 daidzein을 대상으로 한 연구는 거의 없으며, 이들을 같이 사용할 경우에 대한 연구는 전무하다. 그러나 일상생활에서 주로 섭취하는 콩이나 콩 가공식품에는 genistein과 daidzein이 함께 들어 있으므로, 이들을 병합투여했을 때 어떤 효과가 있는지 규명해야 할 필요가 있다.

본 연구에서는 사람의 대장암세포주 HCT-116을 이용하여 daidzein과 genistein의 투여가 암세포 성장에 미치는 영향을 관찰하였으며, 이들의 작용과 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)가 어떤 관련이 있는지 알아보았다. 또한 genistein과 daidzein을 병합투여했을 때 나타나는 효과를 개별투여 효과와 비교하였다.

재료와 방법

연구재료

사람 대장암세포주 HCT-116은 ATCC (Rockville, MD)에서 구입하였고, genistein, daidzein, thiazolyl blue (MTT), Hoechst 33342는 Sigma (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. TUNEL 염색 키트는 Roche (Manheim, Germany)에서, TaqMan 역전사시약은 ABSystems (California, USA)에서, ICI182780은 TOCRIS (Elliville, MO, USA)에서 구입하였다.

세포배양 및 isoflavone 투여

세포배양을 위해 96 well 세포배양용기를 사용하였으며 한 well당 3,000개의 HCT-116 세포를 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후 DMSO에 녹인 genistein과 daidzein을 0, 1, 5, 10, 50 및 100 μM 로 투여하여 각각 24, 48, 72시간 후 MTT 분석을 하였다. MTT 분석을 위해 MTT 용액(2 mg/mL)을 한 well당 50 μL 씩 첨가하여 37°C에서 4시간 반응시키고 glycine:DMSO (1:8) 혼합액을 한 well당 150 μL 씩 첨가하여 반응을 종료한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 genistein 투여군은 0.1% DMSO를, daidzein 투여군은 0.2% DMSO를 사용하였다.

ICI182780, Daidzein과 genistein 병합투여 후 MTT 분석

ER β 길항제인 ICI182780이 daidzein에 의한 HCT-116 세포의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HCT-116 세포를 한 well당 3,000개씩 분주한 다음 24시간 배양하였다. 여기에 daidzein (50 μM , 100 μM)과 ICI182780 (1 μM , 10 μM)을 함께 투여하여 48시간 배양 후 MTT 분석을 하였다. Daidzein과 genistein의 병합투여가 HCT-116 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해서 HCT-116 세포를 한 well당 5,000개씩 분주하여 24시간 배양하였다. 이어 daidzein (100 μM)과 함께 genistein (0, 1, 10, 50, 100 μM)을 투여하여 24시간 및 48시간 배양한 다음 MTT 분석을 하였다. 대조군으로 ICI182780 단독투여군과 daidzein 단독투여군은 각각 0.1%와 0.2% DMSO를 사용하였고, daidzein과 ICI182780 병합투여군 및 daidzein과 genistein 병합투여군은 0.3% DMSO를 사용하였다.

세포자멸사 관찰

TUNEL 검사를 위하여 35 mm 배양용기에 5×10^5 개의 세포를 24시간 배양하고 daidzein을 100 μM 투여한 다음 48시간 후에 PBS로 2번 수세하였다. 4% paraformaldehyde로 10분간 고정하고 0.1% triton X-100이 함유된 0.1% sodium citrate (pH 6.0) 완충액으로 2분간 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. TUNEL 반응 혼합액(terminal deoxynucleotidyl transferase, nucleotide mixture)을 37°C에서 1시간 동안 어두운 상태에서 반응시키고 수세한 후 수용성 붕입액으로 붕입하여 형광 현미경으로 관찰하였다. Hoechst33342 염색을 할 때는 위와 동일한 과정을 거친 후 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 Hoechst33342를 10분간 상온에서 반응시킨 다음 PBS로 수세하고 붕입하였다.

First strand cDNA 합성 및 에스트로겐 수용체 ER β 에 대한 RT-PCR

60 mm 배양접시에 배양한 각각의 세포에 TRIzol 용액 1.0

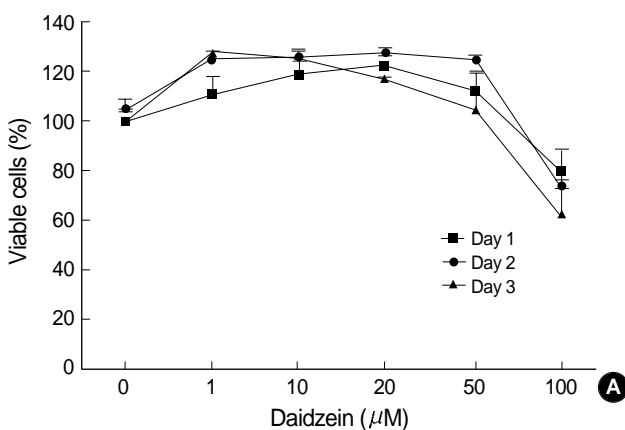
mL 첨가하여 세포를 용해했다. 그런 다음 0.2 mL의 클로로포름을 넣고 잘 섞어준 후 3분간 상온에서 반응시키고, $12,000 \times g$ 에서 7분간 원심분리하여 생긴 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 그런 다음 0.8배의 이소프로파놀을 첨가하여 상온에서 10분간 반응시키고 $12,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 생긴 침전물에 75% 알코올을 첨가하여 소용돌이혼합한 후 $7,500 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 용액을 덜어냈다. 침전물을 공기 중에서 말리고 각각의 튜브마다 30 μL 의 RNase free water를 첨가하여 녹인 후 원액을 100배 희석하여 260 nm 파장에서 정량을 하였다.

First strand cDNA 합성을 위해 TaqMan 역전사시약을 이용하였다. 각각의 튜브에 전체 RNA를 5 μg , Random hexamer를 2.5 μg , 25 mM MgCl_2 을 5.5 mM, deoxy NTP를 500 μM , RNase inhibitor를 0.8 U, 10X RT buffer를 2 μL , 역전사효소를 0.5 U 넣은 다음 최종 부피가 20 μL 가 되게 한 후, 25°C 에서 10분, 48°C 에서 30분, 95°C 에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. PCR에 사용된 각각의 길잡이 염기서열은 다음과 같다.

ER β sense primer: 5'-TAG TGG TCC ATC GCC AGT TAT-3'

ER β antisense primer: 5'-GGG AGC CAC ACT TCA CCA T-3'

PCR 산물의 크기는 393 bp이며, PCR 반응액은 10 \times Taq buffer 2.5 μL , 50 mM MgCl_2 0.75 μL , 10 mM dNTP 2.5 μL , sense primer (10 μM) 1.0 μL , antisense primer (10 μM) 1.0 μL , Taq polymerase (5 unit/ μL) 0.5 μL , cDNA 2 μL 를 넣고 dH_2O 로 최종 부피가 25 μL 가 되도록 하였다. 위의 반응액을 95°C 에서 5분간 반응시키고, 94°C 에서 45초, 58°C 에서 45초, 72°C 에서 90초씩 35 cycle을 증폭시켰다. 그런 다음 72°C 에서 5분간 반응시키고 2% 아가로오스 겔에서 전기영동하여 자외선 하에서 사진을 찍었다.



결 과

Daidzein에 의한 HCT-116 세포의 성장 억제효과

HCT-116 세포에 daidzein과 genistein을 각각 투여하고 1-3 일 동안 배양한 후 MTT 분석을 하였다. 그 결과 100 μM daidzein을 투여한 지 24시간 후 세포성장률이 20% 억제되었고, 48시간 후 27%, 72시간 후에는 39%로 성장 억제효과가 증가하였으며 50 μM 이하에서는 세포성장률이 약간 증가하였다. 그러나 genistein을 투여한 경우에는 24시간 후 농도가 증가할수록 세포성장률이 오히려 약간 증가하였으며 72시간까지 경과한 후에도 세포 성장에 별다른 영향을 미치지 않았다(Fig. 1).

Daidzein에 의한 HCT-116 세포의 세포자멸사 유도

TUNEL 검사에서 HCT-116 세포는 daidzein을 투여하지 않은 대조군에서는 양성반응을 나타내는 세포가 관찰되지 않았다(Fig. 2A). 그러나 daidzein을 100 μM 투여한 후에는 TUNEL 양성세포가 다수 관찰되었다(Fig. 2B). Hoechst33342 염색 결과 역시 대조군에서는 농축된 핵을 가진 세포가 관찰되지 않았으나(Fig. 2C), daidzein을 100 μM 투여한 후에는 농축된 핵들이 다수 관찰되었다(Fig. 2D).

Daidzein에 의한 세포 성장 억제와 에스트로겐 수용체의 상관관계

HCT-116 세포에서 ER β 에 대한 RT-PCR을 한 결과 ER β mRNA가 발현되는 것을 확인하였다(data not shown). Daidzein에 의한 HCT-116 세포의 증식 억제작용이 ER과 관련이 있는지 알아보기 위해 ER의 길항제인 ICI182780을 사용하였다. ICI 182780을 단독 투여했을 경우에는 HCT-116 세포의 성장은 억

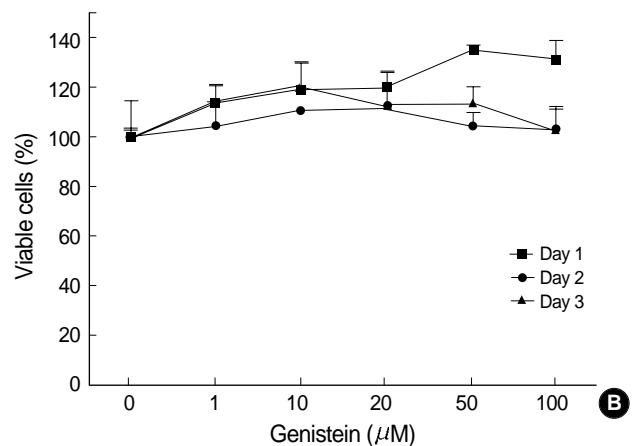


Fig. 1. Effects of daidzein (A) and genistein (B) on the growth of HCT-116 cells. Each cells were treated with 0, 1, 10, 20, 50 and 100 μM of daidzein and genistein, respectively for 1, 2, 3 days. DMSO (0.2% and 0.1%, respectively) was used as a control. Cell growth was measured using the MTT assay. Values are expressed as mean \pm SD represent of 6 replicates.

제되지 않았고 오히려 약간 증가하였다. 그러나 ICI182780과 daidzein (100 μ M)을 병합투여한 경우에는 daidzein을 단독 투여했을 때와 비슷한 정도로 세포성장이 억제되었다(Fig. 3).

Daidzein과 genistein의 병합투여가 HCT-116 세포의 성장에 미치는 영향

Daidzein 100 μ M과 genistein을 각각 0, 1, 10, 50, 100 μ M 씩 함께 투여하였을 때 genistein의 농도에 따라 daidzein의 세포 증식 억제효과가 점점 감소되어 살 수 있는 세포가 증가하였다

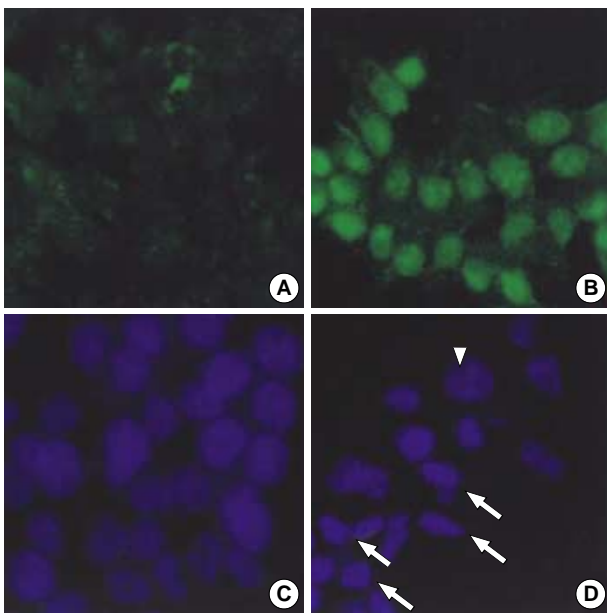


Fig. 2. TUNEL (A and B) and Hoechst33342 (C and D) staining 2 days after treatment with daidzein in HCT-116 cells. Daidzein treated HCT-116 cells are mostly TUNEL positive (B), and shows many apoptotic cells (arrows). A and C; control. Arrow head; non-apoptotic cell.

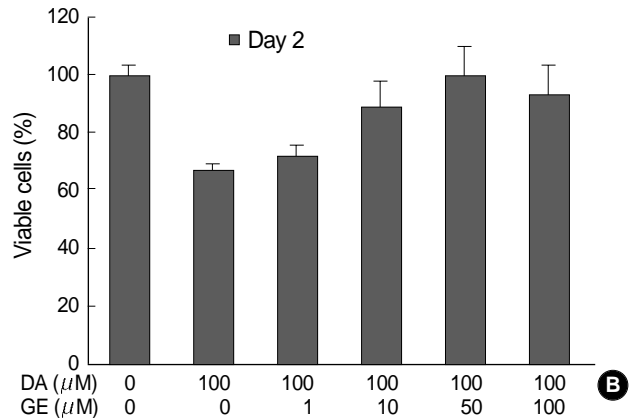
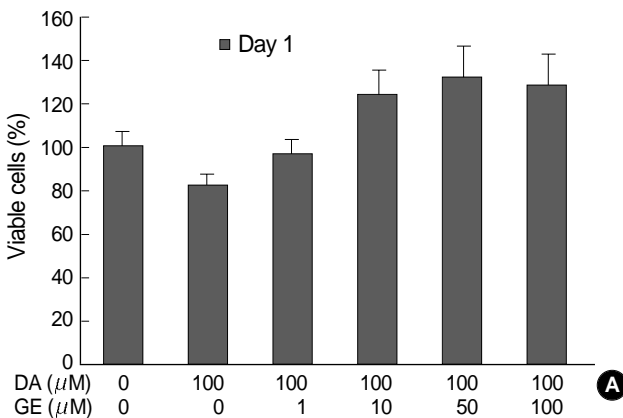


Fig. 4. Effects of co-treatment of daidzein with genistein on the growth of HCT-116 cells. HCT-116 cells were co-treated with daidzein (100 μ M) and genistein (0, 1, 10, 50, 100 μ M) for 2 days. DMSO (0.3%) was used as a 0-0 group. Cell growth was measured using the MTT assay. Values are expressed as \pm SD represent of 6 replicates. DA, daidzein; GE, genistein.

(Fig. 4A). 투여 24시간과 48시간에서도 같은 반응을 나타냈으며, 48시간에서는 24시간 군에 비하여 살아 있는 세포의 수가 전반적으로 감소하였다(Fig. 4B).

고 찰

Genistein과 daidzein은 콩에 많이 분포하는 식물성 에스트로겐인 isoflavone의 주성분으로 유방암과 전립선암 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 대장암에도 효과가 있는지에 대해서는 아직까지 논란이 많다.

본 연구에서는 isoflavone의 주요 구성 성분인 genistein과 daidzein이 대장암세포 HCT-116의 성장에 미치는 영향을 알아보았다. HCT-116 세포에 genistein과 daidzein을 0-100 μ M까지 농도별로 투여한 후 MTT 분석을 한 결과, HCT-116 세포는

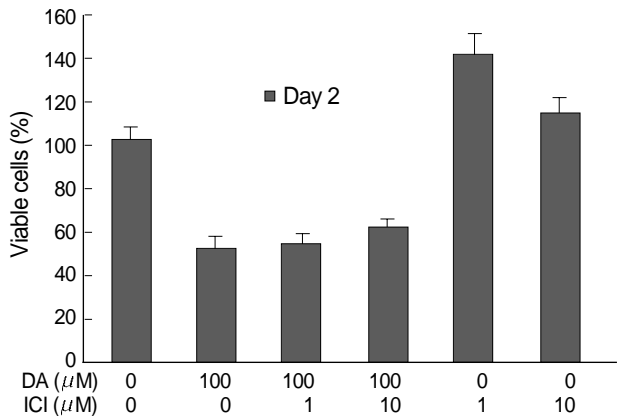


Fig. 3. Effects of co-treatment of daidzein and ICI182780 on the growth of HCT-116 cells. HCT-116 cells were co-treated with daidzein (100 μ M) and ICI182780 (0, 1, 10 μ M) for 2 days. DMSO (0.3%) was used as a control. Cell growth was measured using the MTT assay. Values are expressed as mean \pm SD represent of 6 replicates. DA, daidzein; ICI, ICI182780.

고농도(100 μM)의 daidzein에 의해 성장이 억제되었으며 세포 자멸사의 소견도 관찰하였다. 그러나 genistein은 농도를 높여도 HCT-116 세포의 성장에 뚜렷한 영향을 미치지 않았다. 따라서 isoflavone 중 daidzein이 대장암 HCT-116 세포의 성장을 억제하는 효과가 있으며, 여기에는 daidzein에 의한 종양세포의 세포 자멸사 유도작용이 관여한다는 것을 확인하였다.

Isoflavone이 대장암세포 성장에 미치는 영향에 관한 연구들은 이미 보고된 바 있다. 이들 연구 결과는 각각의 실험에 사용한 대장암세포의 종류나 세포배양시 처리한 isoflavone의 종류와 농도, 처리 기간 등에 따라 다소 차이가 있다. 즉 100 μM genistein을 사람 대장암세포 HT-29에 투여하였을 경우에는 종양세포의 증식이 억제되었고 세포자멸사가 유도되었으며,^{22,24,25} Guo 등²³은 사람 대장암 LoVo 세포에 0.1 μM 과 1 μM daidzein 투여시 세포의 성장이 촉진되었으나 5-100 μM 투여시에는 오히려 세포성장이 억제되는 상반된 효과를 나타냈다고 보고하였다. 따라서 100 μM daidzein 투여시 HCT-116 세포의 성장을 억제한 본 연구의 결과는 Guo 등²³의 논문에서와 같이 약물자체의 독성이 아닌 것으로 판단된다.

Wilson 등²⁶은 본 실험에 사용한 것과 동일한 대장암세포인 HCT-116 세포를 대상으로 genistein을 투여한 결과 HCT-116 세포는 50 μM genistein 투여에 의해 성장이 50% 억제되었다고 하였다. 이들의 연구 결과는 0-100 μM 의 농도별 genistein 처리가 HCT-116 세포의 성장에 뚜렷한 영향을 미치지 않은 것으로 관찰된 본 연구 결과와 차이가 있다. 그리고 상기한 여러 문헌에서 본 실험과 같은 HCT-116 세포를 대상으로 genistein과 daidzein의 두 가지 isoflavone을 병합투여한 연구결과는 발표된 바 없다.

본 실험에서 HCT-116 세포에 ER β 가 발현된다는 것을 확인하고 ER 길항제인 ICI182780을 daidzein과 함께 투여하고 세포 성장 결과를 측정하였다. 그 결과 ICI182780은 daidzein에 의한 HCT-116 세포의 성장 억제효과에 유의한 영향을 미치지 않았다. 따라서 daidzein의 HCT-116 세포 성장 억제작용은 ER을 경유하지 않는 다른 경로를 통해서 이루어질 것으로 해석하였다.

Daidzein과 genistein을 같이 투여하였을 때 daidzein의 HCT-116 세포 성장 억제작용에 미치는 영향을 알아보기 위하여, daidzein의 농도를 100 μM 에 고정하고 genistein을 농도별로 HCT-116 세포에 병합투여 하였을 때, 살 수 있는 세포 수가 증가하여 genistein이 daidzein의 성장 억제작용에 길항효과를 나타냈으며 이러한 genistein의 길항작용은 genistein의 농도에 비례하였다.

본 실험에서 100 μM 농도의 daidzein은 estrogen 수용체를 경유하지 않고 HCT-116 세포의 증식을 억제하는 효과를 나타내었다. 따라서 100 μM 농도의 daidzein의 성장 억제작용에 대한 genistein의 길항작용은 estrogen 수용체의 영향을 받지 않는 것으로 보는 것이 타당하며, estrogen 수용체를 거치지 않는 다른 경로를 통한 반응으로 볼 수 있다.

상기한 본 실험 결과들을 요약하면 대표적인 isoflavone의 하

나인 daidzein은 사람 대장암 HCT-116 세포의 성장을 억제하는 작용을 하며, 또한 세포자멸사를 유도하는 작용도 관찰되었다. 그러나 genistein은 HCT-116의 성장에 영향을 미치지 않았다. Daidzein의 HCT-116 세포증식 억제작용은 estrogen 수용체에 의존하지 않는 경로를 통한 것으로 추정되며, daidzein과 genistein을 병합투여하였을 때 genistein이 daidzein의 대장암세포주 성장 억제효과를 저해하는 길항물질로 작용하였다.

이러한 본 실험 결과로 보아 대장암세포에 대한 isoflavone의 항암효과를 얻기 위해서는 암세포의 종류에 따라 민감성이 있는 isoflavone을 선택할 필요가 있다고 생각된다. 또한 HCT-116 세포와 같이 두 가지 이상의 isoflavone을 투여하면 오히려 역효과를 초래할 가능성이 있다고 볼 수 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 암세포 종류에 따른 daidzein과 genistein의 작용기전을 규명하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Adlercreutz H. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol* 2002; 3: 364-73.
- Reinli K, Block G. Phytoestrogen content of foods -- a compendium of literature values. *Nutr Cancer* 1996; 26: 123-48.
- Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS. Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17: 253-71.
- Setchell KD, Cassidy A. Dietary Isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 1999; 129: 758S-67S.
- Adlercreutz H. Phytoestrogens and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 83: 113-8.
- Sharma OP, Adlercreutz H, Strandberg JD, Zirkin BR, Coffey DS, Ewing LL. Soy of dietary source plays a preventive role against the pathogenesis of prostatitis in rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 43: 557-64.
- Onozawa M, Kawamori T, Baba M, *et al.* Effects of a soybean isoflavone mixture on carcinogenesis in prostate and seminal vesicles of F344 rats. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 393-8.
- Magee PJ, Rowland IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr* 2004; 91: 513-31.
- Davis JN, Singh B, Bhuiyan M, Sarkar FH. Genistein induced upregulation of p21WAF1, downregulation of cyclin B, and induction of apoptosis in prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 1998; 32: 123-31.
- Li D, Yee JA, McGuire MH, Murphy PA, Yan L. Soybean isoflavones reduce experimental metastasis in mice. *J Nutr* 1999; 129: 1075-8.
- Lian F, Bhuiyan M, Li YW, Wall N, Kraut M, Sarkar FH. Genistein-induced G2-M arrest, p21WAF1 upregulation, and apoptosis in a non-small-cell lung cancer cell line. *Nutr Cancer* 1998; 31: 184-91.

12. Alhasan SA, Pietraszkiewicz H, Alonso MD, Ensley J, Sarkar FH. Genistein-induced cell cycle arrest and apoptosis in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Nutr Cancer* 1999; 34: 12-9.
13. Spinozzi F, Pagliacci MC, Migliorati G, *et al.* The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *Leuk Res* 1994; 18: 431-9.
14. Bucheler P, Gukovskaya AS, Mouria M, *et al.* Prevention of metastatic pancreatic cancer growth in vivo by induction of apoptosis with genistein, a naturally occurring isoflavonoid. *Pancreas* 2003; 26: 264-73.
15. Gercel-Taylor C, Feitelson AK, Taylor DD. Inhibitory effect of genistein and daidzein on ovarian cancer cell growth. *Anticancer Res* 2004; 24: 795-800.
16. Messina M, Bennink M. Soyfoods, isoflavones and risk of colonic cancer: a review of the in vitro and in vivo data. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998; 12: 707-28.
17. McKeown-Eyssen GE, Bright-See E. Dietary factors in colon cancer: international relationships. *Nutr Cancer* 1984; 6: 160-70.
18. Tajima K, Tominaga S. Dietary habits and gastro-intestinal cancers: a comparative case-control study of stomach and large intestinal cancers in Nagoya, Japan. *Jpn J Cancer Res* 1985; 76: 705-16.
19. Pereira MA, Barnes LH, Rassman VL, Kelloff GV, Steele VE. Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis* 1994; 15: 1049-54.
20. Bennink MR, Thiagarajan D, Bourquin LD, Kavas. Prevention of precancerous colonic lesions rats by soy flakes, soy flour, Genistein and calcium. Second International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease, Belgium, p 29.
21. Yanagihara K, Ito A, Toge T, Numoto M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993; 53: 5815-21.
22. Salti GI, Grewal S, Mehta RR, Das Gupta TK, Boddie AW Jr, Constantinou AI. Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells. *Eur J Cancer* 2000; 36: 796-802.
23. Guo JM, Xiao BX, Liu DH, *et al.* Biphasic effect of daidzein on cell growth of human colon cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 1641-6.
24. Zhu Q, Meisinger J, Van Thiel DH, Zhang Y, Mobarhan S. Effects of soybean extract on morphology and survival of Caco-2, SW620, and HT-29 cells. *Nutr Cancer* 2002; 42: 131-40.
25. Yu Z, Li W, Liu F. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett* 2004; 215: 159-66.
26. Wilson LC, Baek SJ, Call A, Eling TE. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) is induced by genistein through the expression of p53 in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2003; 105: 747-53.