

도노마이신의 세포 외 배출 및 세포 독성에 미치는 플라보노이드의 효과

정수연 · 고은정 · 김나형 · 이화정[†]

이화여자대학교 약학대학

(2004년 2월 6일 접수 · 2004년 2월 23일 승인)

Effect of Flavonoids on Efflux and Cytotoxicity of Daunomycin

Soo Yeon Chung, Eun Jung Go, Na Hyung Kim and Hwa Jeong Lee[†]

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

(Received February 6, 2004 · Accepted February 23, 2004)

ABSTRACT—One mechanism which plays a prominent role in development of multi-drug resistance seen in cancer cells is the over-expression of P-glycoprotein (P-gp). It is known that compounds found in vegetables and fruits not only have anticarcinogenic properties but may also modulate P-gp activity. The effect of some dietary components on efflux of daunomycin (DNM), a P-gp substrate, was examined in P-gp over-expressed human uterine sarcoma cell line, MES-SA/DX5. The efflux of DNM from the cells was significantly inhibited by quercetin and verapamil, but not by 1-naphthyl-isothiocyanate (NITC). The IC₅₀ values for DNM in MES-SA/DX5 cells were increased by flavonoids (quercetin and fisetin), but not by NITC after 72 hour incubation with dietary constituents. In conclusion, flavonoids may play a role in the modulation of P-gp activity in human uterine sarcoma cells.

Key words—P-glycoprotein, Quercetin, Fisetin, 1-Naphthyl-isothiocyanate, Verapamil, Human uterine sarcoma cells

인체에서 암 치료가 실패하는 주된 원인 중 하나는 다제 내성 (multidrug resistance, MDR) 현상 때문이며¹⁾ 이는 구조나 작용기전이 전혀 다른 항암제들에 대한 암세포의 내성이 유발되는 것으로 P-당단백질 (P-glycoprotein, P-gp)의 과다발현과 밀접한 관계가 있다.²⁾ P-gp는 항암제를 포함한 다양한 종류의 지용성 물질들을 세포 밖으로 배출시키는 ATP-의존성 수송단백질로서³⁾ 암세포 내에서 치료 약물의 농도를 감소시켜 내성을 증가시킨다.⁴⁾ 반면, P-gp는 여러 정상 기관들에도 존재하여^{5,6)} 생체에 노출되는 독성 물질들을 세포 밖으로 배출시키는 해독작용도 한다.^{7,8)}

현재 과일이나 야채의 다량 섭취가 암 발생의 위험을 감소시킨다는 것이 알려져 있으며^{9,10)} 차, 과일 및 야채에 풍부하게 들어있는 플라보노이드들이 인체의 암세포들과 쥐의 간세포에서 P-gp의 활성 조절에 관여한다는 것이 보고된 바 있다.¹¹⁻¹⁵⁾ 또한, 플라보노이드들이 P-gp에 의한 dimethylbenz[α]anthracene, benzo[α]pyrene 및 doxorubicin의 배출에 영향을 미친다는 것이 보고되었다.^{11,15,16)} 뿐만 아니라, 식용 가능한 다양한 식물들에서 발견되는 유기 isothiocyanate들이 동물모델에서 화학적 발암 물질 생성을 억제하여 암 유발을

방지하였다는 것이 보고되었으며^{17,18)} 최근 cytochrome P-450 (CYP) 및 P-gp는 기질을 공유하는 것으로 알려져 있으므로 CYP를 포함하는 여러 효소들의 유도제로 알려진 유기 isothiocyanate들이 P-gp의 발현 및 활성에 영향을 미칠 가능성이 있다.

그러므로 본 연구에서는 식용이 가능한 식물들에 분포되어 있는 천연 성분들인 quercetin, fisetin 및 1-naphthyl-isothiocyanate (NITC)가 인체 자궁암 세포에서 P-gp 기질인 daunomycin (DNM)의 배출 및 세포 독성에 미치는 영향을 조사함으로써 P-gp 활성 조절 인자로서의 가능성을 검토하였다.

실험 방법

시약 및 기기

Dulbecco's modified eagle medium/저농도 글루코스 (DMEM), trypsin-EDTA (0.25% trypsin-1mM EDTA) 및 페니실린 (10,000 units/ml)-스트렙토마이신 (10,000 µg/ml)은 Invitrogen (Calsbad, USA)사로부터, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone (South Logan, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. Hanks' balanced salts without sodium bicarbonate (HBSS), daunomycin (DNM), verapamil, quercetin, fisetin,

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

1-naphthyl isothiocyanate (NITC), dimethyl sulphoxide (DMSO), sulforhodamine B (SRB) 및 trichloroacetic acid (TCA)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)사에서 구입하였다. N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), Triton®X-100 및 Tris base는 USB (Cleveland, USA)사에서 구입하였으며 NaCl, KCl, MgCl₂는 Duksan pure chemical (Ansan, Korea)사에서, CaCl₂는 Showa Chemical (Tokyo, Japan)사에서, Acetic acid는 Daejung (Siheung, Korea)사에서 구입하였다. Microscint™40 (scintillation cocktail)은 Packard Instrument Co. Inc. (Meriden, USA)사에서, [³H]-DNM (16 Ci/mmol)은 Perkin Elmer Life Science (Wellesley, USA)사로부터 구입하였다. 기기로는 세포배양기 (3158, Forma Scientific Inc., Marietta, USA), 방사선 측정기 (Topcount NXT, Packard Instrument Co. Inc., Meriden USA), orbital shaker (SLOS-20, SLB, Seoul, Korea) 및 ELISA reader (3550, Bio-Rad, Hercules, USA) 등을 사용하였다.

세포 배양 조건

자궁암세포인 MES-SA 세포 (모체세포) 및 P-gp를 과다 발현함으로써 MDR을 나타내는 MES-SA/DX5 세포는 화학 연구소에서 분양받아 사용하였다. 이 세포는 CO₂ 5% 및 공기 95%가 공급되는 37°C의 세포 배양기 안에서 FBS 5% 및 항생제 (100 units/ml 페니실린-100 µg/ml 스트렙토마이신)를 함유하는 DMEM/저농도 글루코스 배지에서 성장하였다.¹⁹⁾

세포 내에 축적된 [³H]-Daunomycin 배출의 경시적 변화

MES-SA 세포 및 MES-SA/DX5 세포를 6 well plate에 150,000개/well이 되도록 넣어준 후 72시간 동안 배양하였다. Uptake buffer (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2.8 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4)로 세포들을 씻어 준 후 0.025 µM 농도의 [³H]-DNM을 함유하는 uptake buffer 1 mL을 각 well에 넣어 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 그리고 나서 [³H]-DNM을 함유하는 uptake buffer를 제거하고 drug-free uptake buffer를 각 well에 넣은 후 10분, 30분, 60분 및 120분 동안 배양한 다음 lysis buffer (0.5% Triton X-100) 1 mL을 각 well에 넣고 150 rpm에서 30분간 shaking한 뒤 그 중 100 µL를 취하여 방사선 측정기로 radioactivity를 측정하였다.^{16,20)}

또한, MES-SA/DX5 세포를 6 well plate에 150,000개/well이 되도록 넣어준 후 72시간 동안 배양하고 0.025 µM 농도의 [³H]-DNM을 함유하는 uptake buffer 1 mL을 각 well에 넣어 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 그후 [³H]-

DNM을 함유하는 uptake buffer를 제거하고 drug-free uptake buffer 또는 100 µM 농도의 verapamil (positive control)을 함유하는 uptake buffer를 각 well에 넣은 후 10분, 60분 및 120분 동안 배양하고 lysis buffer로 각 세포들을 용해시켰다. 그 중 100 µL를 취하여 방사선 측정기로 radioactivity를 측정하였다.

세포로부터의 [³H]-Daunomycin 배출에 천연 성분들이 미치는 영향

6 well plate에 MES-SA/DX5 세포를 well 당 150,000개가 되도록 넣어주고 72시간 동안 배양한 다음 0.025 µM 농도의 [³H]-DNM을 함유하는 uptake buffer 1 mL을 각 well에 넣어 37°C에서 1시간 동안 배양하여 세포 내로 DNМ을 축적시켰다. 그리고 나서, [³H]-DNM을 함유하는 uptake buffer를 제거하고 세포들을 씻은 후 100 µM 농도의 verapamil (positive control), quercetin (플라보노이드), 또는 NITC (유기 isothiocyanate)을 함유하는 uptake buffer를 넣어 1시간 동안 배양하였다. 반면, 대조군에는 이들 물질을 함유하지 않는 drug-free uptake buffer를 넣어 주었다. 1시간 후에 ice-cold stop solution (137 mM NaCl, 14 mM Tris, pH 7.4)로 세포들을 두 번 씻어준 후 lysis buffer (0.5% Triton X-100) 1 mL을 각 well에 넣고 150 rpm에서 30분간 shaking한 뒤 그 중 100 µL를 취하여 방사선 측정기로 radioactivity를 측정하였다.

세포 독성 실험

MES-SA 세포 및 MES-SA/DX5 세포를 각 well 당 5,000개정도 들어가도록 96 well plate에 넣은 후 세포들이 plate에 부착할 수 있도록 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 1.8×10^{-9} M~ 1.8×10^{-5} M 농도 범위의 DNМ과 10 µM verapamil, 10 µM NITC, 50 µM quercetin 또는 50 µM fisetin을 각 well에 넣고 72시간 동안 배양하였다.²⁰⁾ 이때, P-gp 조절 물질 대신 DMSO를 넣은 그룹을 대조군으로 사용하였다. 그리고 나서, SRB staining assay를 통해 세포 독성을 검토하였으며 그 방법은 다음과 같다.²¹⁾ 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 base로 용해시켜 515 nm에서의 흡광도를 측정한 후 IC₅₀ 값을 구하였다.

통계처리

대조군의 결과와 천연 성분들 또는 verapamil로 세포를

처리한 후 얻어진 결과를 unpaired student's t-test로 통계 처리하여 p값이 0.05 이하이면 ($p < 0.05$) 통계적으로 유의성이 있다고 간주하였다.

결과 및 고찰

MES-SA/DX5 세포는 여러 항암제들에 대해 내성이 있는 것으로 알려져 있으며²⁰⁾ 이는 [³H]-DNM uptake 양상을 모체세포인 MES-SA 세포와 비교함으로써 확인되었다. MES-SA 세포에서의 DNМ uptake은 MES-SA/DX5 세포에 비해 증가되었으며 이는 MES-SA/DX5 세포의 경우 P-gp가 과다 발현되어 항암제인 DNМ을 세포 밖으로 배출함으로써 세포 내로의 DNМ의 축적을 감소시키기 때문인 것으로 사료되었다.²²⁾

MES-SA 세포 및 MES-SA/DX5 세포에서의 [³H]-DNM 배출 양상을 시간에 따라 관찰한 결과, 이미 보고한 바와 같이 P-gp가 과다 발현한 MES-SA/DX5 세포의 경우 1시간 동안 축적된 DNМ이 모체세포인 MES-SA 세포에 비해 상당히 낮기 때문에²²⁾ 10분, 30분, 60분 및 120분 동안 배출되고 MES-SA/DX5 세포 내에 남은 DNМ이 모체세포에 비해 통계적으로 유의하게 ($p < 0.005$ 및 $p < 0.0001$) 낮았으나 배출 양상은 두 세포 사이에서 유사하였다 (Figure 1). Verapamil로 처리된 MES-SA/DX5 세포에서는 대조군에 비해

60분 및 120분에서 세포 내 [³H]-DNM 농도가 유의적으로 ($p < 0.05$) 증가하였다 (Figure 2). 이와 같은 결과들을 통해 MES-SA/DX5 세포에서 P-gp가 과다 발현되는 것²⁰⁾과 verapamil이 P-gp 저해제로서 작용하는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다.²²⁾

Quercetin 및 NITC가 MES-SA/DX5 세포로부터의 DNМ 배출에 미치는 영향을 조사한 결과, P-gp 저해제로 알려진 verapamil과 플라보노이드인 quercetin은 대조군에 비해 압세

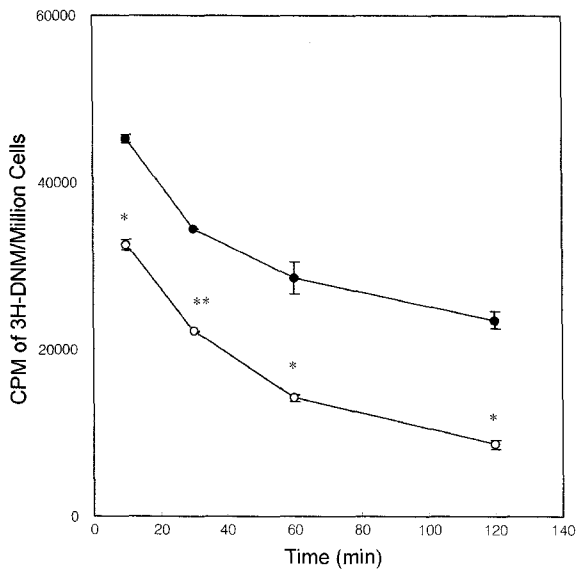


Figure 1—Time course of [³H]-Daunomycin efflux from MES-SA (●) and MES-SA/DX5 (○) cells. Each data point is presented as the mean ± S.D. from three wells in one representative study. The study was repeated two times with similar results. * $p < 0.005$ compared with control ** $p < 0.0001$ compared with control

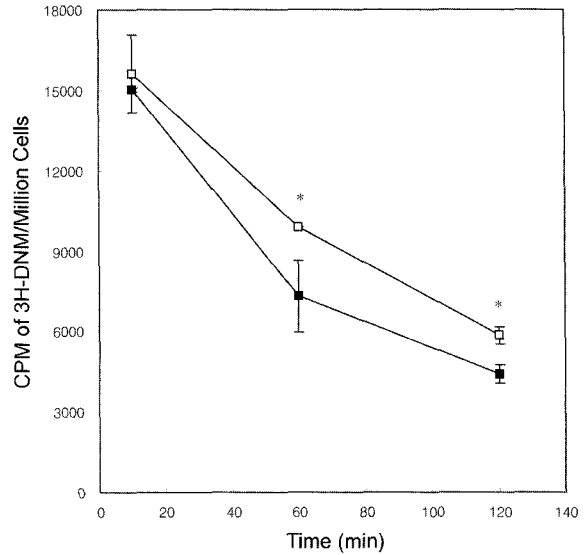


Figure 2—Time course of [³H]-Daunomycin efflux from MES-SA/DX5 cells. Daunomycin only (■) and Daunomycin + Verapamil (□). Each data point is presented as the mean ± S.D. from three wells in one representative study. The study was repeated two times with similar results. * $p < 0.05$ compared with control

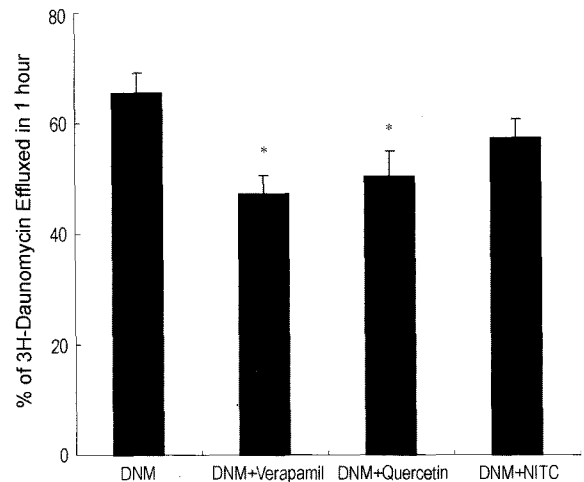


Figure 3—Effect of Quercetin and NITC on Daunomycin Efflux from MES-SA/DX5 cells. Verapamil, a P-gp inhibitor, was used as a positive control. Each data point represents the mean ± S.D. (n=7). * $p < 0.01$ compared with control

Table I— IC_{50} Values of Daunomycin in MES-SA and MES-SA/DX5 Cells (μM) after 72 Hour Incubation

	MES-SA (sensitive)	MES-SA/DX5 (resistant)
Control	0.472 \pm 0.319 (10)	2.18 \pm 0.82 (11)
Verapamil	0.409 \pm 0.205 (9)	0.269 \pm 0.127 (9) **
Quercetin	0.354 \pm 0.192 (9)	4.60 \pm 2.05 (10) *
Fisetin	0.578 \pm 0.377 (7)	6.04 \pm 2.99 (8) *
NITC	0.337 \pm 0.197 (7)	2.07 \pm 0.80 (8)

Number in parenthesis indicates n.

* $p < 0.01$ compared with control

** $p < 0.0001$ compared with control

포로부터의 DNM 배출을 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소시켰으나, NITC의 경우 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Figure 3).

MES-SA/DX5 세포를 72시간 동안 항암제인 DNM과 함께 배양한 다음 얻어진 IC_{50} 값은 $2.18 \pm 0.82 \mu M$ 이었다. Verapamil은 P-gp 저해제로 작용하여 DNM의 IC_{50} 값을 대조군에 비해 유의성 ($p < 0.0001$) 있게 감소시켰으나 플라보노이드인 quercetin 및 fisetin은 오히려 그 값을 유의성 ($p < 0.01$) 있게 증가시켰다 (Table I). 이와 같은 결과는 P-gp를 발현하는 HCT-15 세포를 adriamycin으로 처리했을 때 quercetin에 의해 HCT-15 세포의 성장이 오히려 증가되었다는 Critchfield 등의 결과와 일치하였다.¹⁵⁾

MES-SA/DX5 세포를 먼저 DNM으로 처리하여 세포 내로 항암제를 축적시킨 후 quercetin으로 처리하여 세포로부터의 DNM 배출을 관찰한 결과, 대조군에 비해 DNM의 배출이 감소함으로써 암세포 내 항암제 축적이 증가되었음을 알 수 있었다. 그러나, 이 세포를 quercetin과 DNM으로 동시에 처리하였을 때는 항암제에 대한 암세포의 독성이 감소하는 결과를 나타내었으며 이는 세포 내로의 항암제 유입 및 축적이 감소되었기 때문으로 사료된다.²²⁾ 이와 같은 결과는 서로 상반되는 것으로서 그 이유에 대해서는 정확히 알 수는 없으나 플라보노이드들이 P-gp의 활성을 조절할 뿐 아니라 세포막과도 상호작용을 하여 일단 세포 내에 있는 항암제의 배출을 억제하고 세포 밖에 있는 항암제의 유입을 감소시키는 것으로 생각되며 이에 관한 작용 기전에 대해서는 앞으로 좀 더 구체적으로 연구할 필요가 있으리라 사료된다. Movileanu 등은 플라보노이드인 quercetin이 재구성된 이중 지질막 (reconstituted planar lipid bilayer) 안에 삽입되며 지질막 내 삽입되는 위치는 pH에 따라 달라진다고 보고한 바 있다.²³⁾ 이는 quercetin이 세포막과 상호작용을 하여 DNM의 세포 내 축적이든 혹은 세포 밖으로의 배출이든 세포막을 통한 약물의 이동에 영향을 미칠 수 있다는 것을 암시해 준다. 반면에 NITC는 MES-SA/DX5 세포 내로의 항암제 축적²²⁾

및 세포로부터의 항암제 배출에 있어서 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았다.

이와 같이 P-gp의 활성을 조절할 뿐 아니라 생체막과 상호작용을 하는 플라보노이드들은 P-gp 기질 약물들과 함께 섭취될 때 위장관 흡수에 영향을 미쳐 약물들의 생체 이용률에 변화를 가져올 수 있다.²⁴⁾ 또한, P-gp 활성을 저해하는 약물인 quinidine, verapamil 및 amiodarone이 digoxin의 신장 클리어런스를 감소시켰다는 보고^{25,26)}는 P-gp 활성을 조절하는 플라보노이드들이 P-gp 기질 약물들의 신장 배설에 영향을 미쳐 약물의 체내 동태에 변화를 가져올 수 있다는 것을 암시한다. 지금까지의 연구 결과들에 기초하여 식용식물에서 유래한 플라보노이드들의 P-gp의 활성 조절 기전을 보다 정확하고 구체적으로 규명함으로써 항암제의 내성을 감소시키는 chemosensitizer 및 약물의 생체이용률을 증가시키는 의약품보조성분의 개발이 가능하리라 기대된다.

결론

플라보노이드인 quercetin과 fisetin은 다제내성을 나타내는 MES-SA/DX5 세포에서 P-gp의 활성을 조절하는 것으로 관찰되었고 생체막과도 상호작용을 하는 것으로 관찰되었으나, 유기 isothiocyanate인 NITC는 이 세포에서 P-gp 활성에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 한편, verapamil은 MES-SA/DX5 세포로부터 daunomycin의 배출을 감소시키고 세포독성을 증가시킴으로써 전형적인 P-gp 저해제로서 작용함을 보여주었다.

이와 같은 연구를 통해 음식물에서 섭취가 가능한 성분들 가운데 P-gp의 활성을 감소시키는 물질들을 찾아냄으로써 chemosensitizer 또는 약물의 생체 이용률을 증가시키는 의약품 보조성분으로 개발하는 것이 가능하리라 사료되며 이는 제약산업의 발전에도 크게 기여하리라 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단의 2002년 여자대학교 연구기반 확충사업의 연구비(R06-2002-011-01002-0)를 지원 받아 진행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 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. Stenkamp 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.D. Potter, Cancer prevention: epidemiology and experiment, *Cancer Lett.*, **114**, 7-9 (1997).
- 10) M.J. Wargovich, Experimental evidence for cancer preventive elements in foods, *Cancer Lett.*, **114**, 11-17 (1997).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) 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).
- 16) 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).
- 17) P. Talalay and Y. Zhang, Chemoprotection against cancer by isothiocyanates and glucosinolates. *Biochem. Soc. Trans.*, **24**, 806-810 (1996).
- 18) Y. Zhang and P. Talalay, Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms, *Cancer Res. (suppl)*, **54**, 1976-1981 (1994).
- 19) 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).
- 20) 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).
- 21) 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).
- 22) 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).
- 23) 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).
- 24) 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).
- 25) A. Somogyi, Renal transport of drugs: specificity and mechanisms, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **23**, 986-989 (1996).
- 26) G. Koren, Clinical pharmacokinetic significance of the renal tubular secretion of digoxin. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **44**, 467-477 (1988).