

대두 사포닌이 *t*-BHP를 이용해 산화스트레스를 가한 인체 간암 세포(HepG2)의 성장과 산화스트레스 조절 표지자에 미치는 영향

숙명여자대학교 식품영양학과

성 미 경 · 박 미 영

Effect of Soybean Saponins on the Growth and Oxidative Stress Biomarkers of *t*-BHP Treated Human Liver Cancer Cells

Mi-Kyung Sung and Mi-Young Park

Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, 140-742, Korea

Previous studies indicated that diets high in soybean-based foods are associated with reduced cancer incidence. Possible anticarcinogens in soybeans include saponins, protease inhibitors, and isoflavones. The present study was performed to examine the effects of soybean saponins on the growth and oxidative stress makers of human liver cancer cells (HepG2) exposed to a peroxide, and to compare their activities with major dietary antioxidants. Cells were treated with *t*-BHP (*tert*-butylhydroperoxide), and then incubated with soybean saponins, L-ascorbic acid, α -tocopherol (300, 600, and 1200 μ g/plate) or selenium (0.05, 0.1 and 0.2 μ g/plate) for 48 hours. Cells treated with *t*-BHP for 45 min had a increased level (46%) of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), while cell growth and enzyme activities were not changed. Soybean saponins and all of the antioxidants used significantly decreased cell growth in a dose-dependent manner ($p < 0.05$), and soybean saponins exhibited the highest cell growth inhibition. The cellular contents of TBARS were significantly reduced by soybean saponins and antioxidants treatment ($p < 0.05$). Cellular α -tocopherol content was increased in cells treated with L-ascorbic acid and α -tocopherol, although L-ascorbic acid showed a minor increase compared to α -tocopherol. The activity of SOD (superoxide dismutase) was slightly, but significantly, increased in cells treated with L-ascorbic acid and α -tocopherol. However, no dose-dependent effects was observed. Cellular GPx (glutathione peroxidase) activity was increased in cells incubated with selenium, L-ascorbic acid, and α -tocopherol in a dose-dependent manner. Soybean saponins and all of the antioxidants used were effective in enhancing GST (glutathione S-transferase) activity with no dose-dependent effect.

These results suggest that soybean saponins and major dietary antioxidants inhibit cancer cell growth possibly by reducing *t*-BHP-induced oxidative stress in HepG2 cells. Further mechanistic investigations on anticancer activities of soybean saponins is required.

Key Words: Soybean, Saponin, *tert*-butylhydroperoxide, Oxidative stress, Liver cancer

서 론

암화과정은 크게 개시(initiation), 촉진(promotion), 및 진행(progression)의 세 단계로 나뉠 수 있는데 개시단계에서 유전자의 비가역적인 변화가 일어난 후 촉진단계를 거치면서 비정상적으로 세포가 증식되고 진행단계를 통해 악성종양으로의 전환이 일어나게 된다. 선행 연구결과들에 의하면 세포 내에서 생성된 자유라디칼은 암의 개시와 촉진단계뿐 아니라 진행에 관여하게 되는데 특히 반응성 산소종은 암세포 내에서 각종 단백질과 유전자의 변형을 초래하여 세포 분화 및 세포자살기전에 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다.^{1~3)} 식품 중에는 산화스트레스 감소에 기여하는 다수의 항산화 인자들이 존재하며 그 중 대표적인 것이 항산화 비타민들과 항산화 효소들의 cofactor 기능을 가지는 미량영양소들이다. 많은 선행연구들에서 이들이 소지한 항산화능은 항암성과 깊은 관련이 있는 것으로 밝혀지고 있다.^{5~7)}

사포닌은 자연상에 존재하는 glycosidic 화합물로⁸⁾ 하나 혹은 그 이상의 당이 비극성인 triterpenoid 혹은 steroid와 연결되어 있어 유화제와 같은 성질을 소유한다. 예로부터 사포닌의 생리활성에 대하여 많은 연구가 수행되어지고 있는데 특히 사포닌은 다양한 암세포에 대한 항암효능을 소지한 것으로 연구되었다.^{9,10)} 최근에 보고된 사포닌의 항암효능에 대한 연구에 의하면 대두 사포닌은 인체 대장암 세포의 성장을 저해하는 것으로 나타났는데 그 가능한 기전으로는 세포증식과 밀접한 관련은 가지는 protein kinase C의 활성 억제 및 분화 촉진 작용이 제시되었다.¹¹⁾ 또한 대두 사포닌은 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-

pyran-4-one (DDMP)와 결합되어 있는 것으로 밝혀졌고 1 mg/ml의 DDMP는 SOD (superoxide dismutase) 17.1 units과 비슷한 라디칼 소거능을 지닌 것으로 보고된 바 있다.¹²⁾

간은 영양소, 알코올 및 약물대사가 활발히 진행되면서 다양한 산화스트레스에 노출되게 된다. 최근의 보고에 의하면 인삼을 포함한 다양한 식물에 함유된 사포닌이 간암세포의 신호전달과 apoptosis에 관여하여 암세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났고¹³⁾ 암세포 내에서 항산화효소의 활성 증가에도¹⁴⁾ 관여하는 것으로 관찰되었다. 따라서 본 연구에서는 간암세포의 산화스트레스 조절에 주요 식이성 사포닌인 대두 사포닌이 미치는 영향을 평가하고 이를 주요 항산화 영양소의 효능과 비교하였다.

재료 및 방법

1) 세포배양

인체간암세포(HepG2)는 서울의대 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받아 사용하였다. 세포(HepG2)는 10% fetal bovine serum (FBS)과 penicillin-streptomycin를 1% 함유하는 RPMI 1640 배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 격일마다 배지를 교환해 주었고 세포가 plate의 80% 정도를 채우면 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 계대배양하며 세포를 유지시켰다.

2) 실험처리

세포 (1×10⁷ cells/plate)에 0.5mM *t*-BHP (*tert*-butylhydroperoxide)를 45분간 처리하여 산화스트레스를 가한 후 대두 사포닌, L-ascorbic acid 및 α-tocopherol은 300, 600, 1200µg/plate로, selenium

은 0.05, 0.1, 0.2 μ g/plate의 농도로 처리하였다. 처리된 세포를 48시간 배양한 후 수거하여 성장 및 항산화 지표 분석에 사용하였다. 대두 사포닌은 전보에 보고된 대로 Wolf와 Thomas¹⁵⁾법으로 추출하여 사용하였고 이들 각 처리군의 농도는 사전 실험을 통해 항산화능이 감지된 범위로 정하였다.

3) 암세포 성장 측정

Hemocytometer를 이용하여 세포성장을 측정하였다. 세포의 생존율은 trypan blue dye exclusion법으로 측정하였으며 membrane integrity를 유지하여 염색이 되지 않은 살아 있는 세포와 총 세포수를 측정하여 백분율로 계산하였다.

4) 항산화 지표 측정

(1) 암세포내 지질과산화물(TBARS) 함량 측정: 지질과산화물인 세포의 TBARS 함량은 Yagi¹⁶⁾법을 수정하여 측정하였다. 즉, 세포분쇄액 200 μ l에 trichloroacetic acid (3 ml, 0.3 mol/L)를 가하여 산화를 정지시키고 thiobarbituric acid (0.5 ml 34 mol/L)를 넣고 100°C에서 15분간 반응시킨 후 얼음 상에서 4°C로 냉각시킨다. 냉각 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였고 표준물질로는 1,1,3,3-tetramethoxy propane을 사용하였다.

(2) 암세포내 α -tocopherol 함량 측정: α -Tocopherol 함량은 Bieri 등¹⁷⁾의 HPLC를 이용한 방법에 준하여 측정하였다. 세포 분쇄액 300 μ l에 내부 표준물질로 α -tocopherol acetate (50 μ g/ml EtOH)를 가한 후 vortex로 10초간 섞는다. 여기에 n-hexane 400 μ l를 넣고 1분간 vortex로 세계 혼합한 후 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층 n-hexane을 갈색 vial (4.5 ml)에 넣고, 하층은 n-hexane 400 μ l로 두 번째 추출한 후 상층을 위 갈색 vial에 합한다. Vial에 있는 추출물은 syringe filter (0.45 μ m membrane)로 여과하여 질소 가스로 건조시킨다. 건조된 시료에 diethyl ether : methanol (1 : 3) 100 μ l를 넣어 잘 용해시키고 그 중 20 μ l를 HPLC (Waters, USA)에 주입하여 정량하였다. Column은 μ Bondapak C₁₈ (Waters, USA)을 이용하였으며 이동상의 구성은 methanol : H₂O (95 : 5), 유속은 1 ml/min으로 하였으며 파장 292 nm에서

UV detector를 이용하여 정량·분석하였다. α -Tocopherol과 α -tocopherol acetate (Junsei Co., Japan)를 사용하여 weight ratio를 구하고 이에 대응하는 peak height ratio를 구하여 response factor를 얻어 함량을 계산하였다.

(3) 항산화효소활성 측정: 세포의 항산화효소의 활성을 측정하기 위하여 300 μ l의 세포 분쇄액을 3000 rpm에서 20분간 원심분리하고 상층액을 취하여 사용하였다.

① Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정; SOD활성 측정은 NAD(P)H oxidation의 저해를 관찰하는 Francesco 법¹⁸⁾을 사용하였다. 즉 100 mM triethanolamine-diethanolamine HCl buffer (TDB) 800 μ l, EDTA-MnCl₂ 25 μ l, NADH 40 μ l, mercaptoethanol 100 μ l에 시료 100 μ l를 넣어 340 nm에서 20분간 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소의 활성도는 NAD(P)H oxidation을 50% 저해하는데 필요한 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

② Glatathione peroxidase (GPx) 활성 측정; Glatathione peroxidase 활성은 Flohe 법¹⁹⁾을 사용하였다. 인산염 완충액(50 mM, pH 7.0) 3.0 ml에 NADPH 1.17 mg, glutathion (환원형) 1.842 mg, glutathione reductase 33.6 μ l, H₂O 4.8 ml를 넣어 혼합액을 제조한 후 이 혼합액 1.6 ml에 H₂O : H₂O₂ (1 : 1) 0.2 ml을 가한 후 시료 100 μ l를 첨가하여 340 nm에서 3분 동안 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소의 활성도는 1분 동안 1 μ mol의 H₂O₂를 분해시키는 양을 1 unit으로 하였다.

③ Glutathione S-transferase (GST) 활성 측정; 세포의 GST의 활성은 chlorodinitrobenzene (CDNB)와 GSH를 기질로 사용하는 Habig 등²⁰⁾의 방법을 사용하여 측정하였다. 시료 100 μ l를 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5)로 희석한 후 희석액 0.5 ml에 1 mM 환원형 glutathione (GSH) 1 ml과 1 mM CDNB 1 ml을 가하여 340 nm에서 2분간 흡광도의 변화를 측정하였다. GST의 활성도는 340 nm에서 1 mg protein 당 1분 동안 conjugate되는 CDNB의 nmol수로 표시하였다.

5) 통계처리

본 연구에서 얻은 모든 결과는 SAS (statistical analysis system) 프로그램을 이용하여 통계처리하

였다. *t*-BHP 처리군과 미처리군은 *t*-test를 이용하여 유의성을 검정하였고, 그 외의 생화학적 실험 결과는 ANOVA와 duncan's multiple range test를 이용하여 실험군 간의 유의차를 검증하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 대두 사포닌이 인체 간암세포의 성장 및 산화스트레스 관련지표들의 활성화에 미치는 영향을 알아보고자 수행되었으며 이의 효과를 주요 항산화 물질들과 비교, 평가하였다. 산화스트레스는 *t*-BHP로 유도하였고 처리 조건(0.5 mM, 45분)은 세포손상이 나타나지 않은 수준으로 예비실험을 통해 정하였다. *t*-BHP를 처리한 세포와 대조군에서 세포의 성장, 과산화지질(TBARS), α -tocopherol 및 항산화효소의 활성을 비교한 결과는 Table 1과 같다. *t*-BHP 처리는 세포 내 과산화지질 함량을 유의하게 증가시키고 반면 α -tocopherol 함량은 유의하게 감소시켰다. 세포성장은 *t*-BHP 처리에 의해 증가하는 경향을 보였으나 유의한 차는 관찰되지 않았고 GST활성을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다. 본 연구에서 사용한 *t*-BHP는 산화스트레스를 이용한 세포 손상 연구에 가장 널리 사용되는 물질로서 미토콘드리아의 cytochrome c나 cytochrome c₁에 의해 대사되어 *tert*-butoxyl, *tert*-butylperoxyl 및 methyl radical 등의 자유기를 생성하게 된다. 이 자유기들은 세포막의 불포화 지방산을 기질로 삼아 lipid radical을 생성하고 이는 다시 산소분자와 반응하여 과산화지질을 만들게 된다.²¹⁾ 이러한 과산화지질을 비롯한 여러 대사산물들은 직·간접적으로 다단계의 암화과정에 관여하며 암세포의 성장과 종양의 전이에 관여하는 것으로 알려져 있다.²²⁾ 본 연구결과로 미루어 볼 때 *t*-BHP에 의한 산화스트레스는 과산화지질형성 촉진을 유도하며 이는 세포막 지질의 산화와 직접적인 관련을 가질 것으로 사료되고 따라서 세포막에 존재하는 α -tocopherol의 소모가 증가하는 것으로 보인다. 최근의 연구 결과에 의하면 친수성 자유라디칼 생성인자를 이용하여 자유라디칼을 생산하는 경우 ascorbate < α -tocopherol < β -carotene의 순으로 항산화물질이 소모되며 반면, 소수성 자유라디칼 생성인자를 사용

Table 1. Effects of *tert*-butylhydroperoxide(*t*-BHP) exposure on HepG2 cell growth

	Control	<i>t</i> -BHP
Cell number ($\times 10^6$ cells/plate)	21.5 \pm 1.25 ¹⁾	27.6 \pm 1.61
TBARS (nmol/mg protein)	0.24 \pm 0.03	0.35 \pm 0.02*
α -Tocopherol (μ g/mg protein)	219.3 \pm 18.25	162.5 \pm 4.28*
SOD (units/mg protein)	1.44 \pm 0.45	1.09 \pm 0.11
GPx (units/mg protein)	0.66 \pm 0.01	0.65 \pm 0.01
GST (units/mg protein)	21.12 \pm 0.84	18.91 \pm 0.31*

¹⁾Mean \pm SE

*Significantly different from the control by t-test at p < 0.05

하는 경우는 α -tocopherol과 β -carotene의 소모가 가장 많은 것으로 관찰되었다.²³⁾ 따라서 본 연구에서 관찰된 α -tocopherol 함량의 감소도 이와 유사한 기전에 의한 결과로 사료되며 이와 함께 항산화효소의 활성 감소도 초래되는 것으로 보인다.

본 연구결과 대두 사포닌과 각종 항산화물질들의 산화스트레스를 받은 인체간암세포의 성장은 모든 처리군에서 감소하였으며 그 억제율은 대두 사포닌 > α -tocopherol > L-ascorbic acid = selenium으로 나타났다(Fig. 1). 대두 사포닌은 대조군에 비해 300 μ g/plate에서 41.3%, 600 μ g/plate에서 38.4%, 1200 μ g/plate에서 37.0%로 억제시켜 가장 효과가 뛰어났고, α -tocopherol의 경우 농도별로 41.8%, 40.8% 및 38.0%로 억제되어 항산화 인자 중 가장 큰 억제효과를 보였다. L-ascorbic acid의 경우 1200 μ g/plate 농도에서 대조군에 비해 37.2%로 억제하였고 selenium 처리군 역시 1200 μ g/plate에서 41.9%로 높은 세포 성장 억제효과를 나타내었다 (p < 0.05). Cerutti 등²⁴⁾은 과산화물이 DNA 염기배열 변화에 관여하고 이는 c-fos와 c-myc를 발현시켜 암세포의 성장을 촉진시킨다고 하였다. 그러나 본 연구에서 나타난 수준의 지질과산화물 함량 증가는 세포 성장에 유의한 영향을 미치지 않았

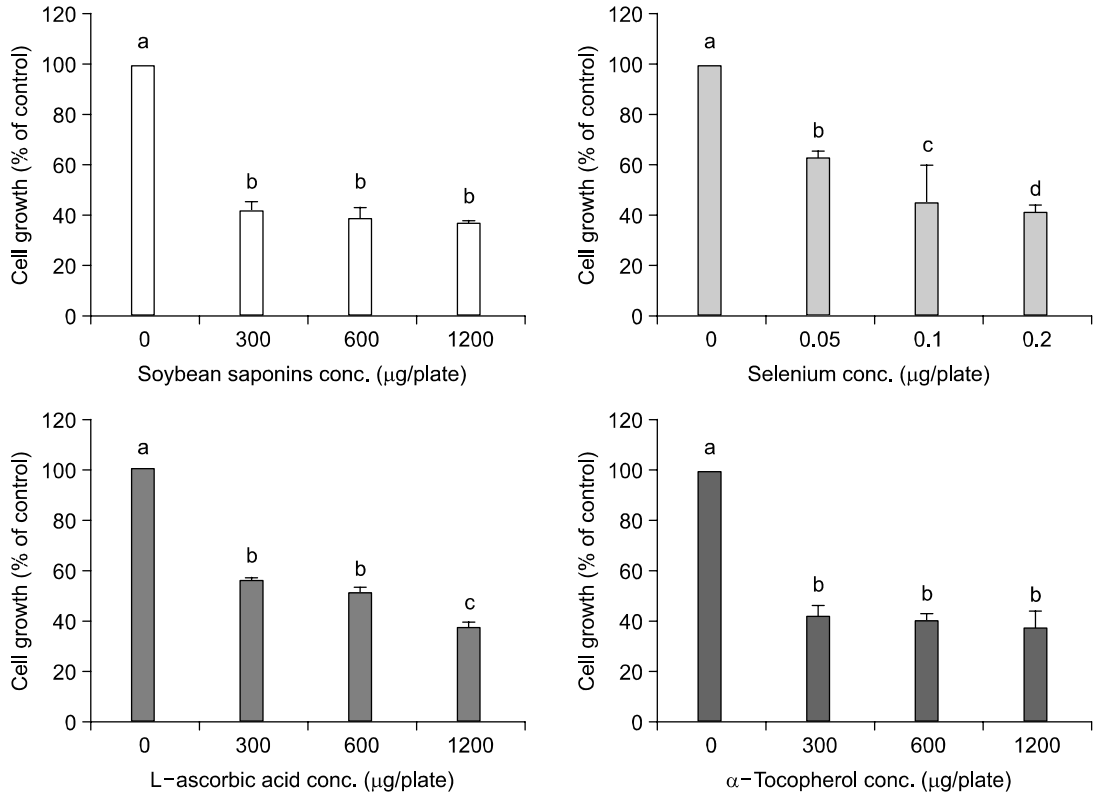


Fig. 1. Effects of soybean saponins and major antioxidants on the cell growth of *t*-BHP treated HepG2 cells. Results are expressed as means±SD. Bars with different letters indicate significant differences by ANOVA ($p < 0.05$).

고 따라서 이들 항산화물질의 세포성장 감소 효과는 *t*-BHP에 의해 유도된 산화스트레스 감소효과 이외의 기전에 의한 것으로 사료된다. 특히 대두 사포닌에 의한 세포성장 저해 효과는 앞서 언급한 세포증식촉진인자인 PKC 활성감소와 세포분화촉진 효능이 모두 관여할 것으로 보인다. 한편 비타민E의 가장 효과적인 생리활성 형태인 α-tocopherol은 혈장 lipoprotein에 존재하며 지질과산화물을 억제하는 기능 외에도 PKC 활성을 저해하고²⁵⁾ 세포성장과 apoptosis에 관여하여 암세포억제에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.²⁶⁾ 특히 간에서 α-tocopherol transfer protein의 mRNA 수준은 SOD나 GPx의 mRNA 발현 보다 산화스트레스 감소에 더 효과적이라는 연구결과도 보고된 바 있다.²⁷⁾

산화 스트레스로 유발된 암세포의 지질과산화물 함량은 대두 사포닌 및 각종 항산화물질들 처

리 후 모든 처리군에서 농도의존적으로 감소함을 알 수 있었고 저농도에서 처리 인자들의 효과는 α-tocopherol=L-ascorbic acid>selenium>대두 사포닌의 순으로 나타났다(Fig. 2). α-Tocopherol과 L-ascorbic acid은 300μg/plate 농도에서 대조군에 비해 각각 50.48%, 51.43%로 감소하여 저농도에서 효과가 뛰어났으며 selenium은 1200μg/plate에서 39.04%까지 지질과산화물의 함량이 감소하는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 대두 사포닌의 경우 항산화인자들의 효과에는 미치지 못하였으나 사용된 모든 농도에서 지질과산화물 함량의 유의적인 감소를 유도하였다. 특히 1200μg/plate 첨가시 대조군의 58.10%까지 감소함을 알 수 있었다($p < 0.05$). 대두에 존재하는 다수의 사포닌의 항산화 효과는 사포닌에 결합되어 있는 DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one)에 기인하는 것으로 보인다. 이는 SOD와 유사한 superoxide 라

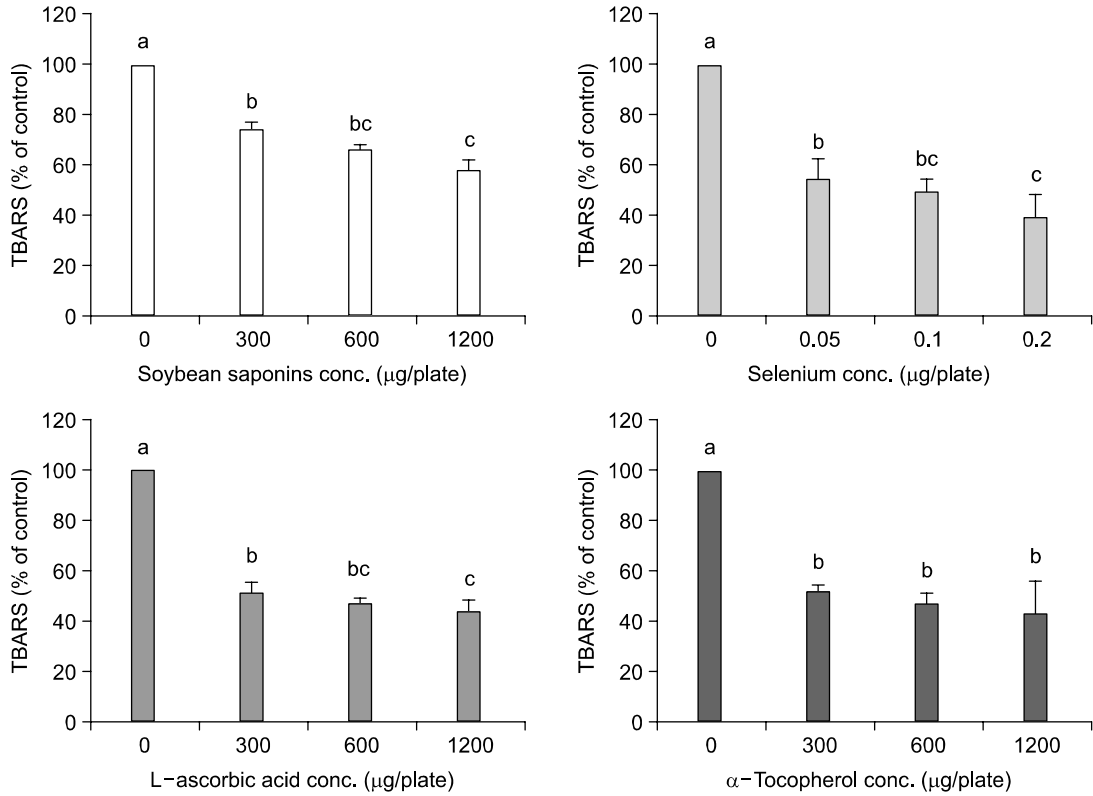


Fig. 2. Effects of soybean saponins and major antioxidants on the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) contents of *t*-BHP treated HepG2 cells. Results are expressed as means±SD. Bars with different letters indicate significant differences by ANOVA ($p < 0.05$).

디칼($O_2 \cdot$)소거 기능이 있는 것으로 알려지고 있고¹³⁾ 이같은 효과는 DDMP구조와 배당체 C-28에 위치한 aldehyde 그룹과 관련이 있는 것으로 보고 있다. DDMP사포닌은 자유기의 공격으로부터 DNA와 단백질의 변이 및 지질과산화를 막는 중요한 생리적 기능이 있는 것으로 보고된 바 있어²⁸⁾ 본 연구에서 관찰된 saponins의 지질과산화물 억제효과에는 DDMP가 관련된 것으로 보인다.

본 연구결과 저농도(300μg/plate)의 항산화처리 시 암세포내 α-tocopherol 함량은 α-tocopherol > L-ascorbic acid > selenium > 대두 사포닌의 순으로 증가하였다(Fig. 3). α-Tocopherol의 경우 300μg/plate농도에서 대조군의 200%까지 함량이 증가하는 것으로 나타났으나 처리 농도가 증가할수록 증가폭은 다소 감소하는 것으로 나타났다. L-ascorbic acid 처리군 역시 농도 의존적으로 α-

tocopherol 함량이 증가함을 알 수 있었다. L-ascorbic acid는 α-tocopherol의 재생기전에 관여하는 것으로 알려져 있는데²⁹⁾ 세포막과 lipoproteins에서 α-tocopherol은 peroxy 라디칼($LOO \cdot$)을 소거한 후 α-tocopheroxy 라디칼($\alpha T \cdot$)로 전환되고 ascorbic acid에 의해 α-tocopherol로 재생되게 된다. 한편 selenium은 L-ascorbic acid의 재생에 관여하는 thioredoxin reductase (TR)를 활성화시켜 α-tocopherol 절약기능이 있는 것으로 알려져 있으나³⁰⁾ 본 연구에서 사용된 농도에서는 유의적인 효과를 보이지 않았다. 대두 사포닌 처리군 또한 α-tocopherol 함량에 유의적인 차이를 보이지 않았으나($p < 0.05$) 처리농도가 증가할수록 α-tocopherol 함량이 증가되는 경향이 나타나 *t*-BHP가 생성하는 *t*-butoxy, *t*-butylperoxy 및 methyl 라디칼을 soybean saponin가 일부 소거하여 산화스트

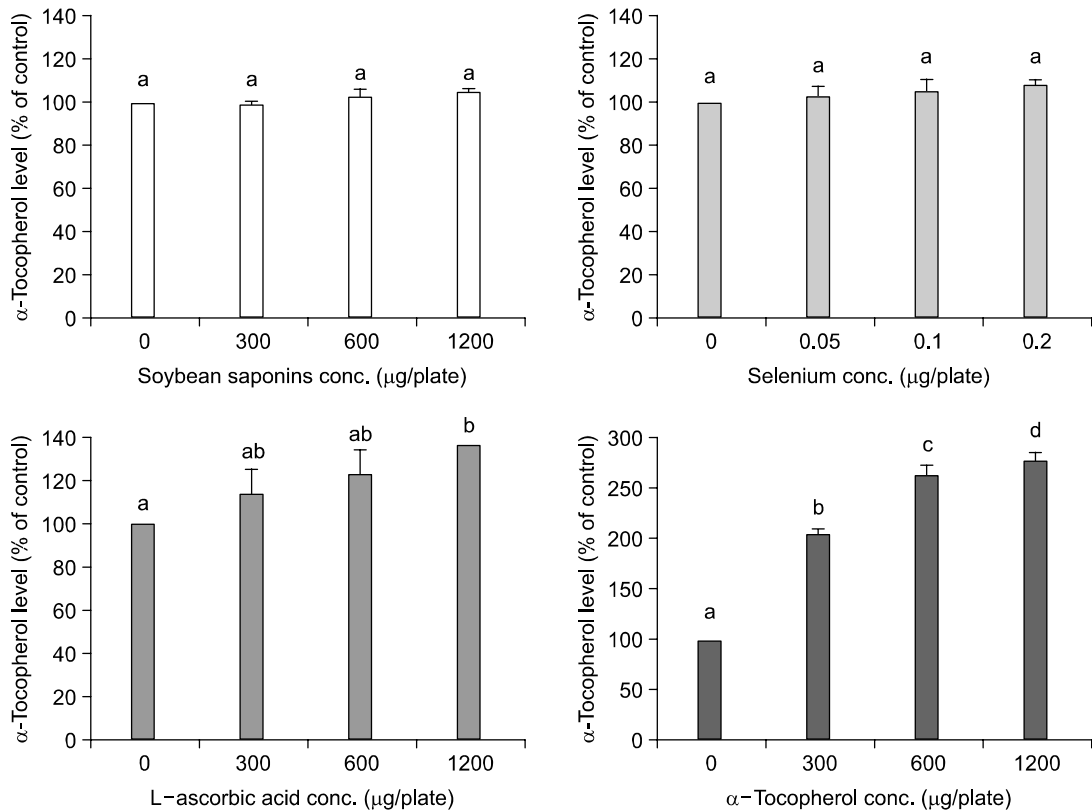


Fig. 3. Effects of soybean saponins and major antioxidants on the α -tocopherol contents of *t*-BHP treated HepG2 cells. Results are expressed as means \pm SD. Bars with different letters indicate significant differences by ANOVA ($p < 0.05$).

레스에 대한 1차 방어 역할을 하는 α -tocopherol의 절약작용을 하는 것으로 보인다. DPPH에 대한 전자공여능 연구 결과를 살펴보면³¹⁾ α -tocopherol이 대두 사포닌 보다 효과가 우수한 것으로 나타나 산화스트레스 상황에서 라디칼제거는 α -tocopherol이 1차적으로 담당하는 것으로 보인다.

일반적으로 암세포는 정상세포에 비해 항산화 효소들의 활성이 감소된 상태이며³²⁾ 본 연구에서는 대표적인 항산화 효소인 SOD, GPx 및 해독화 과정과 항산화계에 모두 관여하는 GST의 활성을 측정하였다. 세포내 SOD의 활성은 대두 사포닌과 selenium의 경우 처리농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보였으나 대조군과의 유의적인 차이를 나타내지 않은 반면 L-ascorbic acid과 α -tocopherol 처리군은 모든 농도에서 유의적으로 증가함을 볼

수 있었다($p < 0.05$)(Fig. 3). 반응성이 큰 superoxide radical은 SOD에 의해 반응성이 적은 hydrogen peroxide (H_2O_2)로 바뀌고 이는 GPx에 의해 H_2O 로 바뀌어 무독화된다. L-ascorbic acid는 원형질의 연쇄적인 산화반응을 막는 항산화제로 superoxide와 singlet oxygen ($O_2 \cdot$)과 직접 반응하며 대표적인 지용성 비타민E인 α -tocopherol은 세포막과 lipoproteins에서 peroxy radicals을 소거한 후 α -tocopherol radical로 전환되고 지질과산화물을 억제한다. 선행 연구에서도 L-ascorbic acid와 α -tocopherol은 항산화 효소의 활성 증가와 간암 세포의 성장이 억제될 유도를 하여 본 연구결과와 일치하였다.³³⁾

세포내 GPx의 활성은 selenium > α -tocopherol > L-ascorbic acid의 순으로 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 4). GPx의 cofactor인 selenium의 경우 0.05 μ g/plate

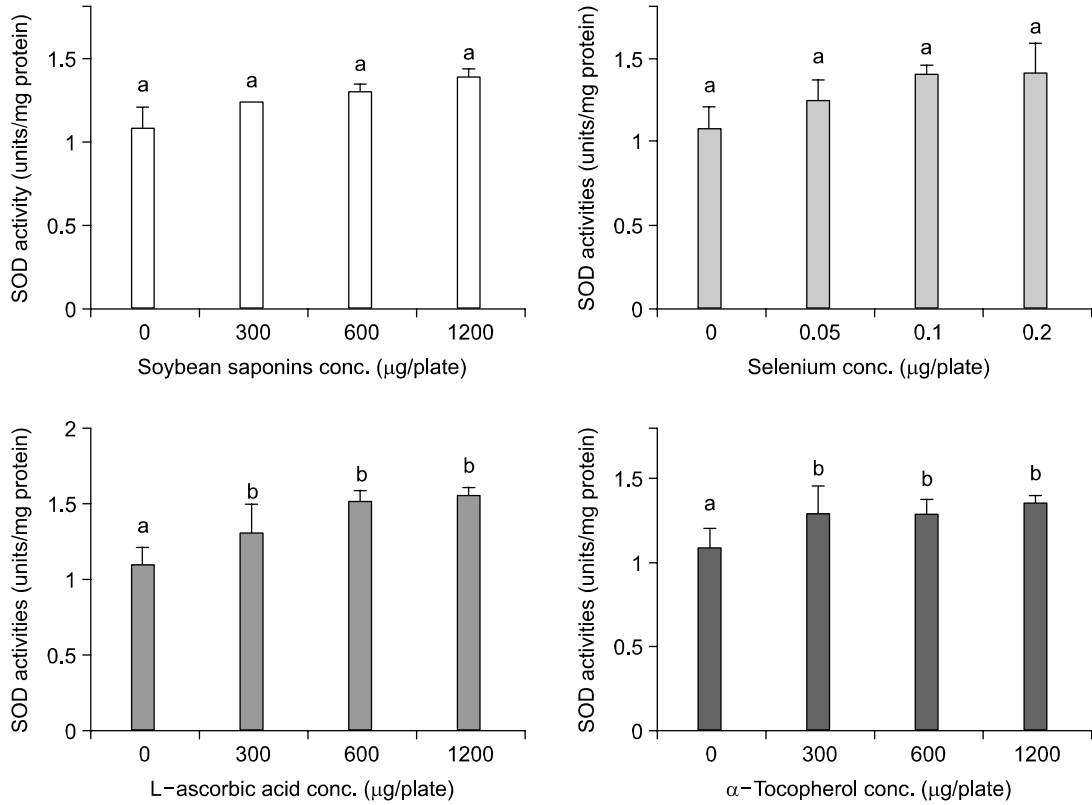


Fig. 4. Effects of soybean saponins and major antioxidants on the SOD activities of *t*-BHP treated HepG2 cells. Results are expressed as means±SD. Bars with different letters indicate significant differences by ANOVA ($p < 0.05$).

처리 농도에서 대조군의 130%까지 활성이 증가하였고 선행 연구에서 selenium에 의해 증가된 GPx는 *tert*-butyl hydroperoxide에 의한 공격을 효과적으로 막는 것으로 보고하였다.³⁴⁾

한편 HepG2 세포의 전체 GST 중 GSTA1-1가 90%를 차지하는데 이는 GPx와 유사하게 세포내 과산화물을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다.³⁵⁾ 본 연구에서 GST의 활성을 측정한 결과 모든 시료처리군에서 유의적인 증가가 관찰되었다($p < 0.05$)(Fig. 5). 그 효과는 α -tocopherol > L-ascorbic acid > selenium > 대두 사포닌 순으로 나타났고 특히 대두 사포닌의 경우 SOD와 GPx와는 달리 600µg/plate와 1200µg/plate 농도에서 대조군과 유의적인 차이를 나타냄을 볼 수 있었다. Chang 등³⁶⁾은 인삼사포닌에 의해 인체 간암세포의 SOD 유전자 발현 증가를 보고한 바 있고 따라

서 대두 사포닌에 의한 항산화효소 활성증가 역시 효소 발현의 증가가 관여되어 있을 수 있으나 이를 증명하기 위해서는 단백질 발현 변화를 보기 위한 추후 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

본 연구결과 대두 사포닌은 산화스트레스가 가해진 간암세포의 성장을 효과적으로 저해하였다. 한편 세포내 지질과산화물의 생성 역시 사포닌 처리에 의해 유의하게 감소되는 것으로 나타나 사포닌의 산화스트레스 억제효능이 역시 사포닌이 소유한 항암효능을 설명할 수 있는 가능한 기전이 될 수 있을 것으로 보인다. 그러나 soybean saponins는 식이성 항산화영양소와 달리 SOD 및 GPx 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 보여 그 산화억제 기전에 차이가 있음을 시사하고 있다. 한편 본 연구에서 사용된 수준의 산화스트레스는

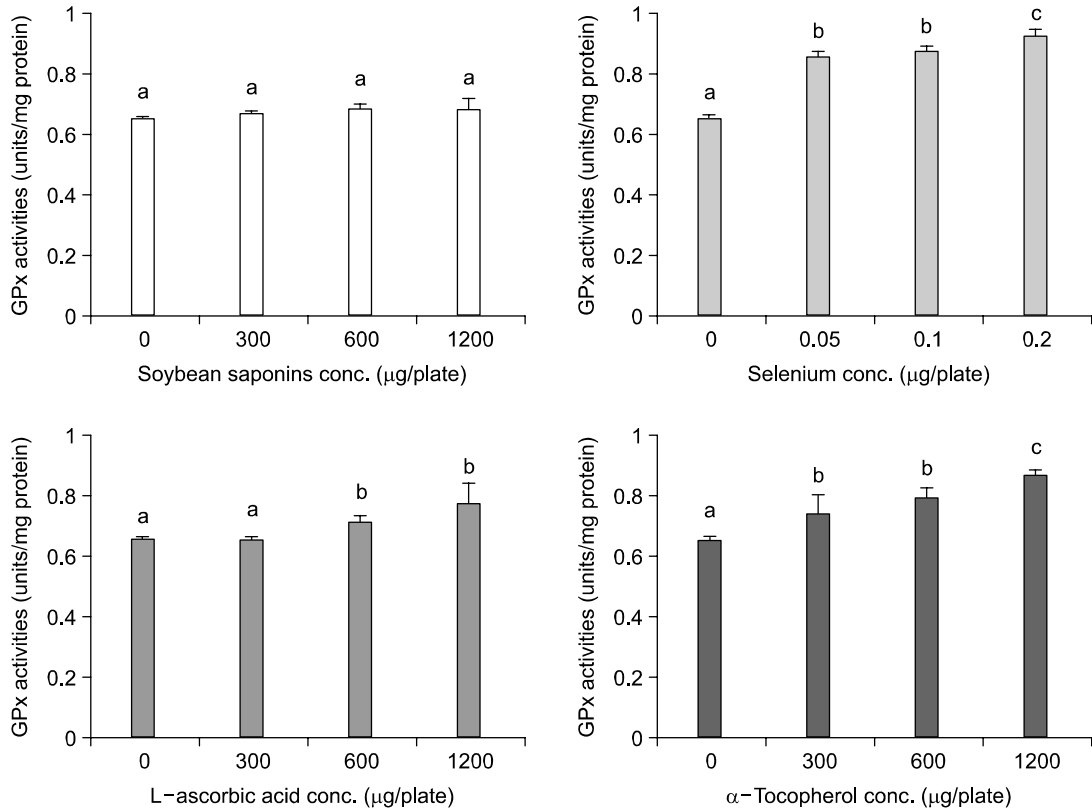


Fig. 5. Effects of soybean saponins and major antioxidants on the GPx activities of *t*-BHP treated HepG2 cells. Results are expressed as means±SD. Bars with different letters indicate significant differences by ANOVA ($p < 0.05$).

세포 성장에 유의한 영향을 미치지 않았으므로 세포 성장에 영향을 주는 수준의 산화스트레스 하에서 사포닌을 포함한 항산화제들에 의한 성장감소 기전을 설명하기 위한 후속 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

요약 및 결론

본 연구에서는 대두 사포닌이 산화스트레스를 받은 인체간암세포(HepG2)의 성장 및 이의 각종 항산화 관련 척도들에 미치는 영향을 밝히고 이의 효과를 항산화물질인 L-ascorbic acid, α-tocopherol 및 selenium과 비교하였다. 실험결과를 요약하면 다음과 같다.

1) *t*-BHP (0.5 mM) 처리 후 HepG2 세포내 지질 과산화물 함량은 46% 증가하였고 α-tocopherol

함량은 26% 감소하였으며 GST 활성도가 유의하게 감소하였다. 반면 세포 성장과 SOD, GPx의 활성도는 유의적인 차이가 없었다.

2) 대두 사포닌과 각종 항산화물질들의 산화스트레스를 받은 인체간암세포 성장은 모든 처리군에서 감소하였으며 그 억제율은 대두 사포닌 > α-tocopherol > L-ascorbic acid = selenium으로 나타났다.

3) 암세포의 총 지질과산화물 함량은 대두 사포닌 및 각종 항산화물질들 처리 후 모든 처리군에서 유의적으로 감소하였고 300µg/plate에서 효과는 α-tocopherol = L-ascorbic acid > selenium > 대두 사포닌의 순으로 나타났다.

4) 암세포 내 α-tocopherol 함량은 저농도(300µg/plate)에서 α-tocopherol > L-ascorbic acid > selenium > 대두 사포닌의 순으로 나타났다. Selenium과 대

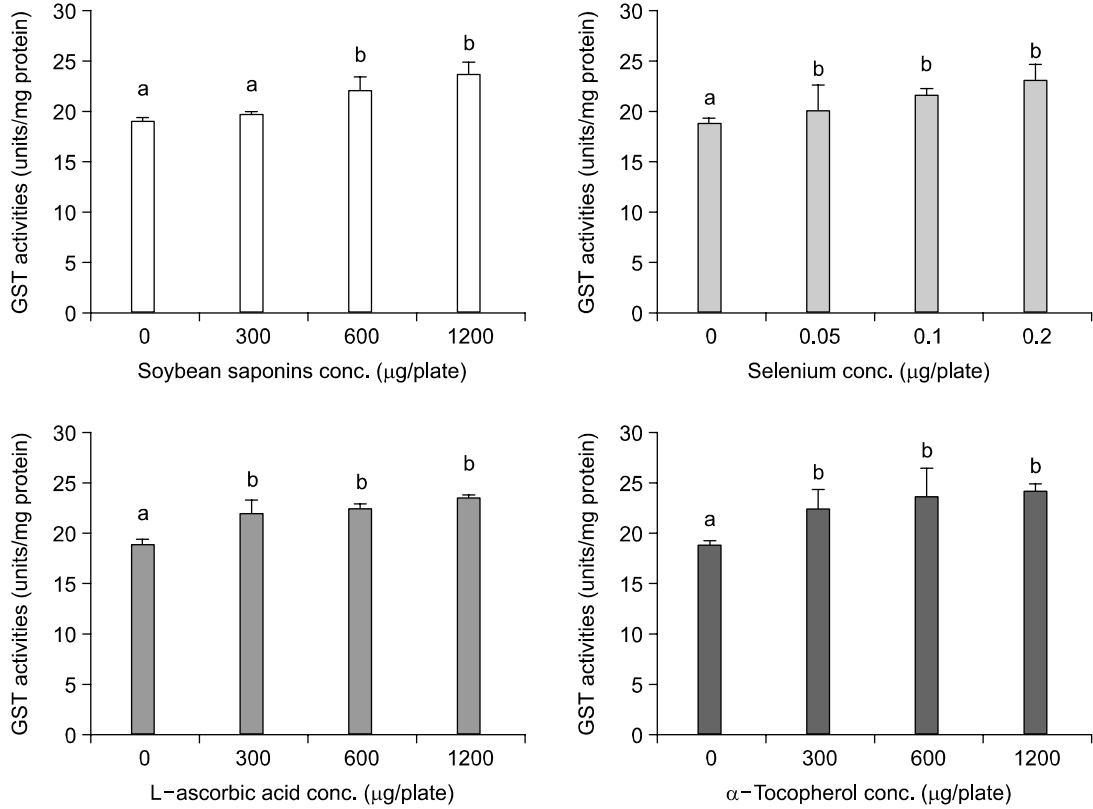


Fig. 6. Effects of soybean saponins and major antioxidants on the GST activities of *t*-BHP treated HepG2 cells. Results are expressed as means±SD. Bars with different letters indicate significant differences by ANOVA ($p < 0.05$).

두 사포닌의 경우 처리 농도가 증가할수록 α-tocopherol 함량이 증가하였으나 대조군과 유의적인 차이는 없었다.

5) 실험인자들 처리 후 암세포 내 SOD의 활성은 모든 처리군에서 증가하였고 그 효과는 300µg/plate 처리 시 L-ascorbic acid > α-tocopherol > selenium = 대두 사포닌의 순으로 나타났다. 모든 처리군에서 농도의존성은 관찰되지 않았다.

6) 암세포 내 GPx의 활성은 저농도(300µg/plate)에서 selenium > α-tocopherol > L-ascorbic acid 순으로 활성이 유의하게 증가하였으나 대두 사포닌에 의한 효과는 관찰되지 않았다.

7) 암세포 내 GST의 활성은 저농도(300µg/plate)에서 α-tocopherol > L-ascorbic acid > selenium 순으로 유의하게 증가하였고 대두 사포닌의 경우 600µg/plate와 1200µg/plate 농도에서 대조군에 비

해 유의적으로 증가함을 볼 수 있었다.

이상의 결과로 미루어 보아 항산화 관련 물질은 개개의 독특한 대사과정을 통해 과산화물 생성 및 세포성장을 조절하는 것으로 보이고 대두 사포닌이 지닌 항암효과 역시 그 효과의 일부는 항산화성과 관련이 있는 것으로 보인다.

참 고 문 헌

- 1) Hochstein P, Atallah AS. The nature of oxidation and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mutat Res* 1998; 202: 363-375.
- 2) Jakus V, Lopuchova M. Role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in liver diseases. *Bratisl Lek Listy* 1999; 100: 548-559.
- 3) Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 583-599.

- 4) Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol* 2001; 2: 149-156.
- 5) Buring JE, Hennekens CH. 1995. Beta-carotene and cancer chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl* 1995; 22: 226-230.
- 6) Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 669: 7-20.
- 7) Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 194S-200S.
- 8) Gurfinkel DM, Rao AV. Soyasaponins: the relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity. *Nutr Cancer* 2003; 47: 24-33.
- 9) Sati OP, Pant G, Nohara T, Sato A. Cytotoxic saponins from asparagus and agave. *Pharmazie* 1985; 40: 586.
- 10) Ota T, Fujikawa-yamamoto K, Zong ZP, Yamazaki M, Odashima S, Kitagawa I, Abe H, Arichi S. Plant-glycoside modulation of cell surface related to control of differentiation in cultured B16 melanoma cells. *Cancer Res* 1987; 47: 3863-3867.
- 11) Oh YJ, Sung MK. Soybean saponins inhibit cell proliferation by suppressing PKC activation and induce differentiation of HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Nutr Cancer* 2001; 39: 132-138.
- 12) Yoshiki Y, Okubo K. Active oxygen scavenging activity of DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) saponin in soybean seed. *Biosci Biotech Biochem* 1995; 59: 1556-1557.
- 13) Hsu YL, Kuo PL, Chiang LC, Lin CC. Involvement of p53, nuclear factor kappaB and Fas/Fas ligand in induction of apoptosis and cell cycle arrest by saikosaponin d in human hepatoma cell lines. *Cancer Lett* 2004; 213: 213-221.
- 14) Chang MS, Lee SG, Rho HM. Transcriptional activation of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase genes by panaxadiol ginsenosides extracted from Panax ginseng. *Phytother Res* 1999; 13: 641-644.
- 15) Wolf WJ, Thomas BW. Thin layer and anion exchange chromatography of soybean saponin. *J Am Oil Chem Soc* 1970; 47: 86-90.
- 16) Yagi K. Lipid peroxidation in & medicine. *Academic Press New York* 1982; 3: 223
- 17) Motchnik PA, Frei B, Ames BN. Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Methods Enzymol* 1994; 234: 269-279.
- 18) Francesco Paoletti. Alessandra Mocali. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 209-220.
- 19) Flohe L, Gunzler WA. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-121
- 20) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139.
- 21) Videla LA, Fernandez V. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch Biol Med Exp* 1988; 21: 85-92.
- 22) Ray G, Husain SA. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J Exp Biol* 2002; 40: 1213-1232.
- 23) Yeum KJ, Aldini G, Chung HY, Krinsky NI, Russell RM. The activities of antioxidant nutrients in human plasma depend on the localization of attacking radical species. *J Nutr* 2003; 133: 2688-2691.
- 24) Cerutti P, Shah G, Peskin A, Amstad P. Oxidant carcinogenesis and antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 663: 158-166.
- 25) Ricciarelli R, Tasinato A, Clement S, Ozer NK, Boscoboinik D, Azzi A. alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem J* 1998; 334: 243-249.
- 26) Brigelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 1999; 13: 1145-1155.
- 27) Ban R, Takitani K, Kim HS, Murata T, Morinobu T, Ogihara T, Tamai H. alpha-Tocopherol transfer protein expression in rat liver exposed to hyperoxia. *Free Radic Res* 2002; 36: 933-938.
- 28) Berhow MA, Wagner ED, Vaughn SF, Plewa MJ. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. *Mutat Res* 2000; 448: 11-22.
- 29) Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 535-543.
- 30) Li X, Hill KE, Burk RF, May JM. Selenium spares ascorbate and alpha-tocopherol in cultured liver cell lines under oxidant stress. *FEBS Lett* 2001; 508: 489-492.
- 31) Yoshiki Y, Kahara T, Okubo K, Sakabe T, Yamasaki T. Superoxide- and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging activities of soyasaponin beta g related to gallic acid. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65: 2162-2165.
- 32) Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G.

- Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* 1982; 42: 1955-1961.
- 33) Zheng QS, Zhang YT, Zheng RL. Ascorbic acid induces redifferentiation and growth inhibition in human hepatoma cells by increasing endogenous hydrogen peroxide. *Pharmazie* 2002; 57: 753-757.
- 34) Kim CH, Yasumoto K, Suzuki T, Yoshida M. *tert*-Butyl hydroperoxide-induced hemolysis of α -tocopherol-decreased erythrocytes from selenium-deficient and selenium-adequate rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1998; 34: 481-490.
- 35) Castro VM, Soderstrom M, Carlberg I, Widersten M, Platz A, Mannervik B. Differences among human tumor cell lines in the expression of glutathione transferases and other glutathione-linked enzymes. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1569-1576.
- 36) Chang MS, Lee SG, Rho HM. Transcriptional activation of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase genes by panaxadiol ginsenosides extracted from *Panax ginseng*. *Phytother Res* 1999; 13: 641-644.
-