

대두박으로부터 분리한 식용 조사포닌의 항암 및 면역활성

박경욱¹ · 위재준² · 김재용³ · 정창호¹ · 강갑석⁴ · 조영숙¹ · 서권일^{1*}

¹순천대학교 식품과학부, ²KT&G 중앙연구원
³경북대학교 식품공학과, ⁴부산정보대학 호텔조리과

Anticancer and Immuno-Activities of Edible Crude Saponin from Soybean Cake

Kyung-Uk Park¹, Jae-Joon Wee², Jae-Yong Kim³, Chang-Ho Jeong¹,
Kap-Suck Kang⁴, Young-Sook Cho¹ and Kwon-Il Seo^{1*}

¹Division of Food Sciences, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

²Division of Ginseng Research, KT&G Central Research Institute, Daejeon 305-764, Korea

³Dept. of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 750-701, Korea

⁴Dept. of Culinary Arts, Busan College of Information Technology, Busan 616-737, Korea

Abstract

To develop a new functional food material, edible crude saponin was isolated from soybean cake using HP-20 resin and its anticancer effect and immuno-activity were investigated. The saponin significantly inhibited the growth of cancer cells such as A549, MCF-7 and SW480 at a concentration of 1,000 µg/mL. Morphological changes was observed in the A549 cells surface treated with the saponin of 1,000 µg/mL concentration. The proliferation of mouse spleen cells treated with saponin was increased in a dose-dependent manner compared with untreated control cells until the concentration of 1 µg/mL but decreased at higher concentrations than that. The NO production in macrophage cell lines (RAW 264.7) treated with saponin was increased in a dose-dependent manner compared with untreated control cells.

Key words: saponin, anticancer and immuno-activities, NO

서 론

콩에 대한 연구로 80년 이전까지는 단백질과 지방 등의 영양성분에 대한 것에 초점이 맞추어져 왔으나 80년대 들어서부터 이들이 함유한 기능성 물질들이 밝혀지고 있어 현재에는 콩의 기능성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 콩의 생리활성에 대한 물질로 각광을 받고 있는 것이 genistein, daidzein 등과 같은 isoflavone류이며(1,2), 이에 대한 많은 연구가 보고되고 있다. 그러나 콩에는 isoflavone류 이외에도 2차 대사 산물인 saponin이 콩의 종류에 따라서 2~3%이상을 함유하고 있는 것으로 보고되고 있으며, 이들에 대한 다양한 생리적 기능성에 대하여 밝혀지고 있다(3-5).

최근 대두 saponin의 항산화 효과에 대한 보고에서 soyasaponin I, II, III이 혈중 과산화지질 생성을 억제하므로써 성인병 예방 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 대두사포닌의 생체 방어기능으로 혈청 cholesterol의 저하 및 각종 질병에 대한 면역 증강, 항암작용 및 항산화성 등의 면에서 효과가 크며, 인체내 유해한 활성산소(superoxide: O₂⁻)를 산소와

과산화수소(H₂O₂)로 분해할 수 있는 SOD(superoxide dismutase)활성이 높다고 보고되어 대두 사포닌이 기능성 식품 소재로서 관심의 대상이 되고 있다(6-9).

이와 같은 연구결과로 콩의 saponin이 생리활성 물질로 이용가치가 충분히 인정되지만 인삼 saponin과 비교하여볼 때 현재까지 콩 saponin에 대한 체계적인 분리방법 및 생리활성에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

한편, 우리나라의 식용유 및 대두 가공공장에서 발생하는 대두박과 같은 폐 대두단백질이 매년 100만톤 이상이나 되는데, 이중 가공되어 식용으로 사용되는 것은 10%정도에 불과하고 나머지는 사료용 정도로 사용되고 있는 실정임으로 이들로부터 생리활성 물질을 분리하여 산업적으로 이용한다면 높은 부가가치를 기대할 수 있으리라 생각된다.

따라서 본 연구에서는 대두 사포닌을 기능성 식품소재로 이용하기 위한 방안으로 활용도가 매우 낮은 대두박으로부터 유기용매를 사용하지 않는 수지흡착법으로 식용조사포닌을 제조한 후 그에 대한 항암 효과 및 면역활성을 조사하였다.

*Corresponding author. E-mail: seoki@suncheon.ac.kr
Phone: 82-61-750-3655. Fax: 82-61-750-3655

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용된 대두박은 (주)S회사에서 식용유지를 추출하고 남은 대두박을 제공받아 사용하였으며, diaion HP-20수지는 일본 Mitsubishi Kasei사 제품을 구입하였고, 발효주정(알콜농도 95%)은 대한발효주정주식회사(전주, 한국)으로부터 구입하였다.

대두박으로부터 diaion HP-20 수지흡착법에 의한 식용조사포닌 분리

실험에 사용한 식용조사포닌은 diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 분리하였다. 즉, 대두박에 70% 식용 에탄올(주정)을 첨가하여 80°C에서 3시간 환류냉각을 3회 반복한 후 그 여액을 감압 농축한 시료에 물을 일정량 첨가하여 diaion HP-20 chromatography를 실시하여 물, 20% 식용에탄올 및 95% 식용에탄올을 사용하여 순차적으로 추출한 분획물을 각각 회수하였다. 그 중 95% 식용에탄올 추출물을 여과한 후 감압 농축한 것을 대두박 식용조사포닌 시료로 사용하였다.

암세포주 성장 억제 효과

실험에 사용한 암세포주는 A549(human lung carcinoma cell), MCF-7(human breast adenocarcinoma cell) 및 SW480(human colon carcinoma cell)으로, 한국 세포주은행으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 이때 사용되는 배지로는 RPMI 1640 배양액으로 각각 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 것을 사용하였으며, 이들 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다. Monolayer로 자란 암세포주를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 인체 폐암 및 유방암 세포주에 최종 세포농도가 5×10^4 cell/mL 되도록 희석하여 48 well plate에 각 well당 450 μ L씩 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 부착시킨다. 여기에 대두사포닌 희석액을 50 μ L씩 각 농도별로 well에 첨가하여 48시간 더 반응시켰다. 배양이 종료된 후, 50 μ L의 50% TCA를 가해주고, 냉장 4°C에 1시간 동안 고정시키고, 증류수로 5회 세척하여 잘 건조시킨 다음, 각 well에 1% 빙초산에 녹인 SRB용액을 가하여 실온에서 30분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 1% 빙초산으로 5회 세척하여 잘 건조시키고 10 mM unbuffered Tris 용액으로 SRB dye를 녹여 96-well plate용 microplate reader(Titertek Multiscan Plus, Finland)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(10).

형태학적 변화

폐암(A549)세포를 각 well당 1×10^5 개씩 넣고 24시간 경과 후 1,000 μ g/mL 농도로 첨가하여 48시간 동안 배양한 다음 위상차 현미경(Diaphot 300, Nikon, Japan)을 이용하여 대조군과 시료처리군의 형태학적 변화를 비교, 관찰하였다.

면역세포증식 측정

본 실험에서 사용된 생쥐(BALB/c, C57BL/16)는 대한실험동물센터(충북 음성군)에서 구입한 생후 8~12주된 암컷을 사용하였고, 실험 전까지 고품사료와 1차 증류수를 공급하면서 사육실에서 사육하였다. 먼저 생쥐(BALB/c, C57BL/16)를 경추탈골시킨 후, 70% 알코올로 소독하여 spleen을 떼어낸 후 미리 준비해 둔 RPMI 1640배지가 들어 있는 petri dish에 spleen를 담아 single세포로 만들고 4°C, 1,200 rpm에서 6분간 3번 원심 침전하는 방법으로 세척한 후 10% FBS RPMI 1640배지로 희석하여 실험에 사용하였다. 분리한 비장세포는 5×10^6 cell/mL으로 희석한 다음 96 well plate에 넣고 여기에 conA 및 LPS를 첨가 또는 무첨가 후 식용사포닌을 농도별로 희석한 것을 넣고 48시간 동안 5% CO₂ incubator에 배양한 후 각 조건에 따른 증식정도를 측정하였다. 비장세포 증식측정은 MTS assay(cell titer 96[®] aqueous one solution cell proliferation assay)를 사용하여 각각 배양된 배양액 100 μ L에 cell titer 15 μ L씩 첨가하여 4~8시간 동안 다시 5% CO₂ incubator에 배양한 다음 490 nm에서 O.D. 값을 측정하였다(11).

대식세포 NO 생성능 측정

안정된 NO산화물인 NO₂⁻(nitrite)는 Griess반응을 이용하여 측정하였다(12). RAW 264.7(대식세포) 배양 상층액을 flat bottom 96 well plate에 100 μ L씩 넣고 여기에 Griess시약(0.1% N-1-naphthyl-ethylendiamine in H₂O: 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄ = 1:1)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, microplate reader(Titertek Multiscan Plus, Finland)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite를 32 μ M까지 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다.

통계처리

통계처리는 Window 용 SAS 8.01 version을 이용하여 분산분석(analysis of variance)을 실시하였으며, Duncan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)을 $\alpha=0.05$ 에서 유의성을 검정하였다(13).

결과 및 고찰

암세포주 성장 억제 효과

*In vitro*에서 대두 사포닌의 암세포주의 성장 억제 효과를 Fig. 1, 2 및 3에 나타내었다. 암세포주 모두 사포닌을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 사포닌을 1,000 μ g/mL 농도로 첨가하였을 때 암세포성장 억제효과가 가장 높게 나타났으며, 조사포닌 첨가 농도가 높을수록 암세포성장 억제효과가 점차 증가하는 것으로 나타났다. 특히 폐암세포주와 유방암세포에 1,000 μ g/mL 농도로 처리하였을 때 40% 이하의 생존율을 나타내어 대두의 식용사포닌이 폐암세포주의 성장을

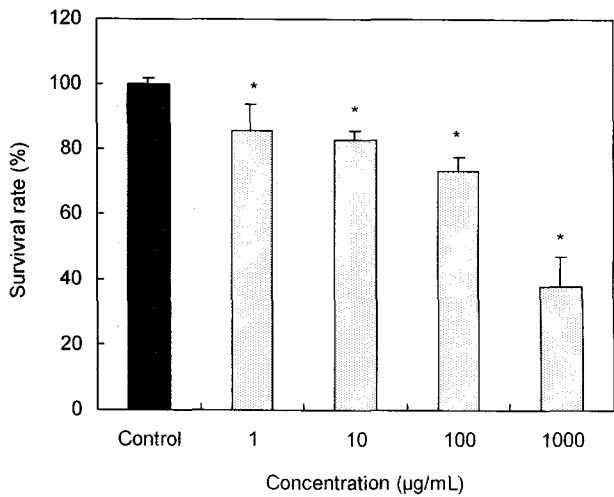


Fig. 1. Effects of 48 hours treatment of edible soybean saponin on proliferation of A-549 lung cancer cells by SRB assay. Bars with asterisk indicate statistically significant ($p < 0.05$) difference from control.

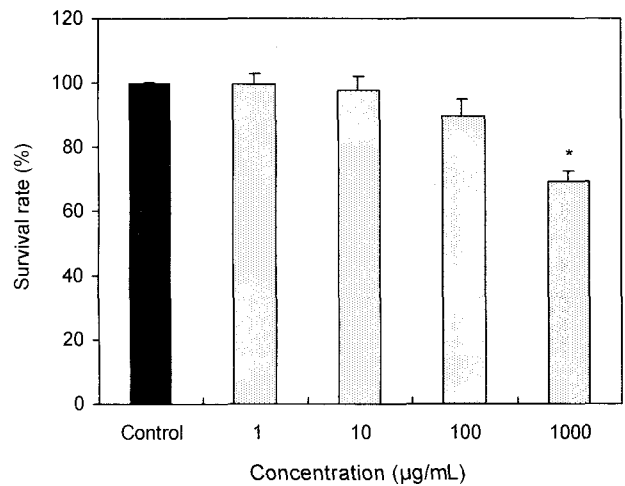


Fig. 3. Effects of 48 hours treatment of edible soybean saponin on proliferation of SW480 colon cancer cells by SRB assay. Bar with asterisk indicates statistically significant ($p < 0.05$) difference from control.

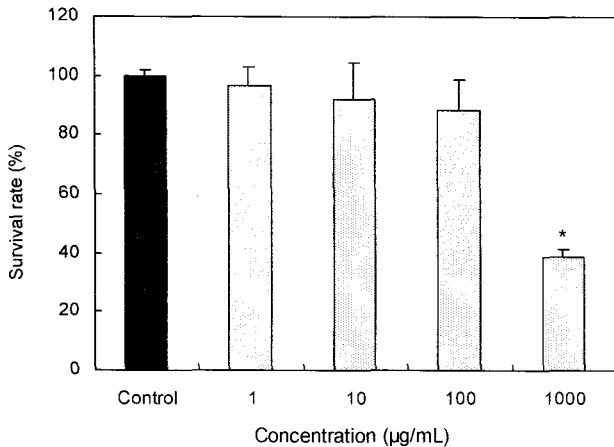


Fig. 2. Effects of 48 hours treatment of edible soybean saponin on proliferation of MCF-7 breast cancer cells by SRB assay. Bar with asterisk indicates statistically significant ($p < 0.05$) difference from control.

효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다. 대두 saponin이 대장암의 발생에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보기 위하여 인체 대장암 세포를 대두 saponin 및 gypsophilla saponin과 배양시킨 결과 대두 saponin의 경우 300 및 600 ppm에서는 배양 48시간까지 대장암세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났고, gypsophilla saponin은 80 ppm의 농도에서도 대장암세포의 성장을 억제하는 것으로 나타나 대장암 세포의 성장 및 세포생존율이 saponin의 농도에 비례하여 감소하는 결과를 나타내어 대두 saponin이 암세포의 성장을 효과적으로 억제하는 것으로 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 결과를 나타내었다(14,15).

형태학적 변화

폐암(A549)세포에 대두 식용사포닌을 1000 µg/mL의 농도로 처리하고 48시간이 지난 후에 위상차 현미경으로 실험군 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 대조군과 비교하여 대두 식용사포닌을 1000 µg/mL를 처리

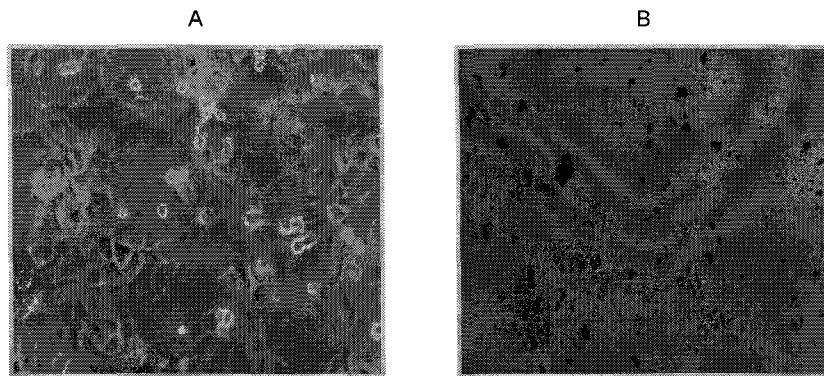


Fig. 4. Inverted photomicrograph of A-549 cells after incubation in with or without edible soybean saponin for 48 hours ($\times 200$). (A): Control, (B): Treated with soybean saponin of 1,000 µg/mL.

한 시료에서는 세포의 밀도가 점차 감소하면서 부착력을 상실하고 세포의 크기는 위축, 사멸되는 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 대두 식용사포닌이 암세포의 증식을 억제시키고, 세포의 분화를 촉진하는 것으로 생각된다. Sung 등(4)은 대두사포닌과 대나무 사포닌을 농도별로 처리하여 결장암 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과 대나무 사포닌을 40 ppm 첨가하였을 때 세포의 표면이 파괴되어 작은 크기로 분산되는 것을 관찰하였고, 대두사포닌을 1,200 ppm을 첨가하였을 때 결장암 세포의 표면이 손상되는 것으로 보고하였다.

면역세포 증식 효과

생쥐의 비장세포를 이용하여 면역세포의 증식효과를 측정 한 결과는 Fig. 5와 같다. 1 µg/mL의 농도까지는 농도 의존적으로 면역세포의 증식을 유도하였으나 그 이상의 농도에서는 면역세포의 증식을 오히려 감소시키는 경향으로 나타났다. 이는 대두 식용사포닌의 농도가 10 µg/mL 이상의 농도에서는 세포에 대한 독성을 나타내는 것으로 생각된다. 또한 비장세포의 T세포와 B세포의 증식을 각각 자극하는 ConA 및 LPS의 혼합 첨가 시에도 비장세포에 사포닌을 단독 첨가한 처리구와 유사한 결과를 나타내었으나, ConA 첨가 시는 0.01 µg/mL의 농도에서, LPS 첨가 시 1 µg/mL의 농도에서 면역세포의 증식이 최대로 나타났다. Chavali 등(16) 여러 가지 사포닌을 이용하여 생쥐의 비장세포의 T세포와 B세포의 증식을 확인한 결과 조사포닌은 B세포의 증식을 자극하는 것으로 나타났으며, Quil-A를 첨가하였을 때는 T세포의 증식을 자극하였고, 또한 Quillayanin과 glycyrrhizic acid를 첨가하였을 때는 T세포와 B세포의 증식을 모두 증가시키는 것으로 보고하여 사포닌계 화합물이 T세포와 B세포의 면역활성을 증가시키는데 큰 도움을 주는 것으로 나타났다.

대식세포 NO 생성능 측정

면역세포 RAW(대식세포) 이용하여 세포에서 생성되는 NO산화물인 NO₂⁻(nitrite)를 Griess 시약과 반응 발색시켜

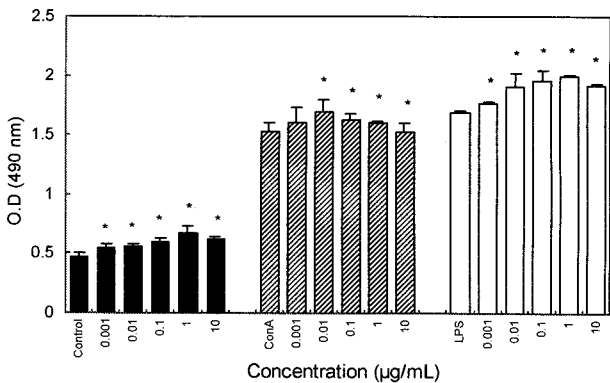


Fig. 5. Effects of edible soybean saponin on mouse spleen cell proliferation. Bars with asterisk indicate statistically significant (p<0.05) difference from controls.

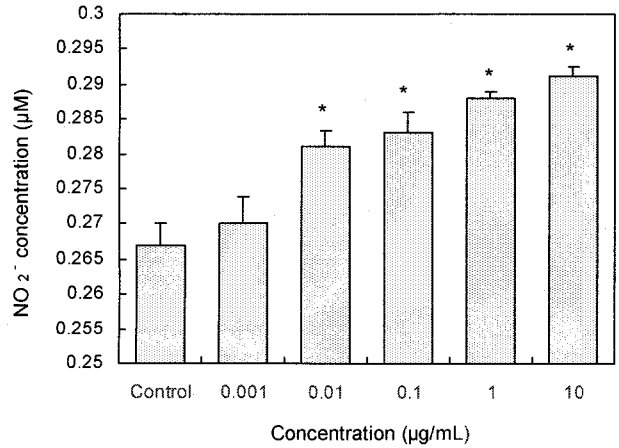


Fig. 6. Effects of edible soybean saponin on proliferation of RAW 264.7 mouse macrophage cells. Bars with asterisk indicate statistically significant (p<0.05) difference from control.

대식세포의 생성정도를 나타낸 결과는 Fig. 6과 같다. 수지 흡착법으로 추출한 사포닌을 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 µg/mL의 농도로 첨가하였을 때 농도 의존적으로 NO₂⁻(nitrite)가 높게 생성되는 것을 알 수 있었으며, 또한 사포닌이 가지는 세포독성 함량과는 상관없는 0.01 µg/mL 이상부터 높은 NO₂⁻ 생성능을 나타내어 대두박으로부터 분리한 식용사포닌이 대식세포의 생성을 도와주는 것으로 생각된다. So 등(17)은 RAW 264.7 세포의 NO 생성에 대한 산디덕 추출물의 효과를 실험한 결과 농도 0.001 mg/mL에서 6.3 µM의 NO가 생성되었으며, 1 mg/mL의 농도에서는 8.1 µM의 NO가 생성되어 산디덕 추출물의 농도에 따라 NO생성이 증가됨과 동시에 면역활성이 증가되는 것으로 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 경향을 보였다.

요 약

새로운 기능성 식품 소재를 개발하기 위하여 대두박으로부터 HP-20 수지를 이용하여 식용조사포닌을 분리한 후 이들에 대한 항암 및 면역 활성을 조사하였다. 분리한 식용사포닌은 1,000 µg/mL의 농도에서 A-549, MCF-7 및 SW480과 같은 암세포주의 성장을 강하게 억제하였으며, 폐암세포주에 1000 µg/mL의 농도를 사포닌을 첨가하였을 때 세포의 형태가 심하게 변화되었다. 사포닌은 생쥐의 비장으로부터 분리한 면역세포에 대하여 1 µg/mL의 농도까지는 대조구에 비하여 그 증식을 유도하였으나 그 농도이상에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 또한 대식세포주인 RAW 264.7에 사포닌의 처리 시 농도 의존적으로 NO의 함량이 높게 생성되었다.

문 헌

1. Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S. 1994. Soy

- intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr Cancer* 21: 113-131.
2. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262: 5592-5595.
 3. Mark AB, Elizabeth DW, Steven FV, Michael JP. 2000. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. *Mutat Res* 448: 11-22.
 4. Sung MK, Kendall CWC, Rao AV. 1995. Effect of soybean saponins and gypsophilla saponin on morphology of colon carcinoma cells in culture. *Food Chem Toxic* 33: 357-366.
 5. Ohminami H, Kimura Y, Okuda H, Arich S, Yoshikawa M, Kitagawa I. 1984. Effects of soyasaponins on liver injury induced by highly peroxidized fat in rats. *Planta Medica* 46: 440-441.
 6. Wang W, Goodman MT. 1999. Antioxidant property of dietary phenolic agents in a human LDL-oxidation ex vivo model: interaction of protein binding activity. *Nutr Res* 19: 191-202.
 7. Drachenberg DE, Elgamaal AA, Rowbotham R, Peterson M, Murphy GP. 1999. Circulation levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 41: 127-133.
 8. Yoshiki Y, Kinumi M, Kahara T, Okubo K. 1996. Chemiluminescence of soybean saponins in the presence of active oxygen species. *Plant Science* 116: 125-129.
 9. Yoshiki Y, Kahara T, Okubo K, Sakabe T, Tamasaki T. 2001. Superoxide- and 1,1-dephenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging activities of soyasaponin β g related to gallic acid. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 2162-2165.
 10. Skehan P, Storeng R, Scudiero D. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Nat'l Cancer Inst* 82: 1107-1112.
 11. Promega Protocol. 2001. Cell titer 96[®] Aqueous One Solution Cell proliferation Assay. Promega, USA.
 12. Yee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW, Jo SK. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extract in mouse macrophage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 342-348.
 13. Lee KH, Park HC, Her ES. 1998. *Statistics and Data Analysis Method*. Hyoil press, Seoul. p 253-296.
 14. Sung MK, Kendall CW, Koo MM, Rao AV. 1995. Effect of soybean saponins and gypsophilla saponin on growth and viability of colon carcinoma cells in culture. *Nutr Cancer* 23: 259-270.
 15. Rao AV, Sung MK. 1995. Saponin as anticarcinogens. *J Nutr* 125: 717-724.
 16. Chavali SR, Francis T, Campbell JB. 1987. An in vitro study of immunomodulatory effect of some saponins. *Int J Immunopharmacol* 9: 675-683.
 17. So MS, Lee JS, Yi SY. 2004. Induction of nitric oxide and cytokines in macrophages by *Codonopsis lanceolata*. *Korean J Food Sci Technol* 36: 986-990.

(2005년 8월 30일 접수; 2005년 11월 1일 채택)