

햄스터 난소세포에서 Daidzein과 Genistein에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 Vitamin C의 효과

김민혜 · 김안근[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received July 30, 2007; Revised August 7, 2007)

Effect of Vitamin C on Oxidative Stress Induced by Daidzein and Genistein in Hamster Ovary Cells

Min Hye Kim and An Keun Kim[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — The oxidative stress causes many diseases like cancer, aging, cardiovascular disease, degenerative neurological disorders (Parkinson's disease, and Alzheimer's disease) by damage of cell membrane, protein deformation, and damage of DNA due to the oxidation of lipid of cell membrane, protein of tissue or enzyme, carbohydrate, and DNA. It is caused by the reactive oxygen species (ROS) that is produced in the metabolic process of oxygen in cell. The superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) in cell systemize the antioxidative enzymes to control the oxidative stress. In this research, it is measured that the survival rate of cell by the typical isoflavonoid of daidzein or genistein, activity of antioxidative enzyme, and ROS level, in order to study the effect of isoflavonoid over the ROS production in cell and antioxidative system. As the similar action of the isoflavonoid with the estrogen is examined, women are encouraged to get bean. In view of this trend, it is very important to find out a combination medicine that lowers the oxidative stress caused by the daidzein in the ovarian cell. In the combined treatment of the typical antioxidant of vitamin C to oxidative stress which induced by daidzein recover the control level particularly lowering the ROS in cell by 30%. However, it made no effect in the combined treatment with genistein. Therefore, the research took the combination effect of daidzein with vitamin C in order to check it effect over the antioxidative system. In conclusion, it was disclosed that the oxidative stress caused by daidzein is related to the lowering activity of SOD, and the specific combination effect of daidzein with vitamin C is related to the recovery of SOD activity.

Keywords □ daidzein, genistein, oxidative stress, vitamin C, antioxidant enzyme, hamster ovary cells

환경적 변화는 살아있는 유기체에 반복적이고 다양한 스트레스(stresses)를 야기하기 때문에 유기체는 변화하는 내부, 혹은 외부 환경에서 살아남기 위해 끊임없이 적응해야 한다. *In vivo* 에서 산소는 호기성 생물의 생존에 필수적이지만 환원된 형태로는 유기체에 가장 강력한 독성 물질로 작용하는 양면성을 가지고 있다. 긍정적인 측면은 생물학적으로 중요한 화합물의 합성, 세포내의 신호, 세포 성장의 조절, 식균 작용, 에너지 생성에 관여한다. 그러나 부정적인 측면으로는 방사선, 염증, 공기 오염물질(O₃, NO₂), 담배연기, reperfusion injury, ischemia 등과 같은

비정상적인 조건에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 과도하게 생산되면 이로 인해 세포막의 지질, 조직의 단백질이나 효소, 탄수화물, DNA에 산화를 유발시켜 단백질을 변형시키거나 세포막 및 DNA를 손상시킨다. 활성산소종은 사실상 거의 모든 세포 내부기관의 일상적인 대사 과정의 결과물로 발생하기 때문에 각각의 기관은 산화적 스트레스의 중요한 표적이 되고 있다.¹⁻³⁾

최근 연구들은 산화적 스트레스가 활성산소종의 유발에 의한 것임을 규명하고 다양한 질병과 환경적 세포손상에 활성산소종이 공통요인임을 지적하고 있다. 또한 제초제, 살충제, 생체이물질, 살균제, 오존, 흡연, 방사선 등의 수많은 화학독성요인들도 활성산소종을 발생함으로써 유해한 작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다.³⁾ 이러한 산화적 스트레스를 최소화하기 위해 호기성

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9566 (팩스) 02-710-9871
(E-mail) akkim@sookmyung.ac.kr

유기체들은 효소적 그리고 비효소적인 항산화방어계를 갖고 있다. 비 효소적방어계는 vitamin C와 E, glutathione, β -carotene 등의 항산화제이다. 순수한 효소적 방어계인 superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx)는 직접적으로 라디칼을 제거하여 활성이 낮은 형태로 이들을 전환시킨다.⁴⁾

Isoflavonoid는 flavonoid의 하위그룹의 하나로서 콩류에 포함되어 있으며 세포 내 ROS와 관련하여 매우 활발히 연구되고 있는 폐놀성 천연물질이다. Daidzein이나 genistein은 대표적인 isoflavonoid로 이들은 에스트로겐 호르몬과의 구조적 유사성으로 인해 에스트로겐 수용체와 상호 작용하는 것으로 알려져, phyto-estrogen으로 불리우기도 한다.⁵⁾ 콩은 전세계적으로 널리 소비되고 있는 식품으로서 특히 한국, 일본, 인도네시아 등의 아시아 국가들에서 그 소비가 집중되어 있다. 서구 사회의 여성들은 하루 평균 1 mg 이하만을 섭취하고 있는 반면 일본, 중국 등의 여성들은 하루 평균 25~100 mg의 isoflavonoid를 섭취하고 있다.⁶⁾ 많은 역학연구에서 유방암, 전립선암, 심혈관계 질환 그리고 동맥경화증 등의 발생위험 감소가 콩의 소비증가와 관련이 있는 것으로 입증된 바 있다.^{7,8)} 아시아국가에서도 콩의 소비는 노화에 의한 산화관련 질환이나 암의 발생율이 낮은 것에도 관련 있는 것으로 알려져 있다. 우리나라는 isoflavonoid의 주요 공급원인 콩의 소비가 세계적으로 높은 국가이고, 특별히 이 isoflavonoid의 에스트로겐 유사작용이 규명됨에 따라 여성들에게 그 섭취가 권장되는 추세이다. 하지만 이전 연구결과에서 보는 바와 같이 햄스터의 난소세포에서 daidzein이나 genistein에 의해 산화적 스트레스가 유도됨을 확인하고^{9,10)} 이 스트레스를 감소시켜주는 약물을 찾는 일은 매우 중요하다고 사료되었다.

본 실험에서는 특히 여성들에게 유익한 성분으로 알려진 daidzein이나 genistein이 암세포에서는 항암효과가 있는 것으로 알려져 있지만 설치류의 난소 상피세포인 chinese hamster ovary-K1(CHO-K1)세포에서는 ROS가 상승되는 결과를 보고 이를 감소시키기 위하여 항산화제로 잘 알려진 vitamin C를 투여하여 효과를 검토하고자 하였다. 이를 위해 세포 생존율을 알아보기 위한 MTT assay, reactive oxygen species(ROS) level의 변화, 항산화 효소의 활성 변화 등을 측정하고 vitamin C의 ROS 소거 효과를 검토하여 보고하고자 한다.

실험 방법

시약 및 기기

세포주는 Chinese hamster ovary(CHO-K1)을 American type culture collection(ATCC)에서 구입하였다.

RPMI 1640 powder medium, antibiotics(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 μ g/ml, streptomycin sulfate) 및 trypan blue는 Gibco BRL life Technologies Inc. 제품을 사용하

였고, fetal bovine serum(FBS)은 BioWhittakerTM로부터, protease inhibitor cocktail tablets은 Roche로부터, MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], bicinchoninic acid protein assay kit, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form(β -NADPH), glutathione reduced form 및 hematoxylin는 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였다.

ELISA reader는 Bio-Tek instrument Inc., cytofluor 2350 plate reader는 Millipore, Bedford, MA, USA제품, 그리고 inverted microscope는 Olympus CK2 제품을 사용하였다.

CHO-K1 세포배양

10% heat-inactivated fetal bovine serum, 항생제(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 μ g/ml streptomycin sulfate), 1 mM sodium pyruvate를 포함하는 RPMI 1640 배지를 배양액으로 하여 37°C, humidified 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 25 cm³ tissue culture flask나 75 cm³ tissue culture flask에서 계대 배양하였고 confluent 되었을 때 cell dissociation solution을 처리하여 실험에 이용하였다.

시료의 조제

Daidzein과 genistein은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에, vitamin C는 phosphate buffered saline(PBS)에 녹여 0.2 μ m pore size syringe filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 실험에 이용하기 직전에 DMSO의 최종농도가 0.1% 이하가 되도록 RPMI 1640 세포배양 배지로 희석하여 사용하였다.

항산화 효소의 활성 측정

시료의 처리와 단백질 정량 -3×10^6 cells/ml의 CHO-K1 cell suspension을 100 π tissue culture dish에 가하였다. 배양기에서 24시간 동안 안정화 시킨 후 daidzein나 genistein에 vitamin C를 4가지 농도(0.5, 1, 2, 4 mM)로 처리하여 24시간 배양하였다. Culture dish에서 배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 농도별 sample을 얻고 상등액을 제거한 pellet에 lysis buffer 1 ml를 가하였다. Lysis buffer를 가한 각각의 sample을 14,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리한 후 상등액만을 취하여 enzyme assay sample로 사용하였다. Sample protein의 정량은 bovine serum albumin(BSA)을 standard로 사용하여 BCA protein assay를 하였다.¹¹⁾

Superoxide dismutase(SOD)의 활성 측정 - SOD 활성 측정은 hematoxylin을 이용한 Martin의 방법을 사용하였다.¹²⁾ Hematoxylin은 자연상태에서 붉은색인 hematin으로 자가 산화한다. 이러한 과정에 SOD가 관여하면 자동산화를 억제하게 된다. 0.1 mM EDTA가 함유된 50 mM potassium phosphate

buffer(pH 7.5) 1 ml에 각각의 sample을 50 μ l씩 가하고 5분 동안 미리 배양 시켰다. 여기에 5 mM hematoxylin을 30 μ l을 가한 후 phosphate buffer를 blank로 하여 UV/visible spectrophotometer를 사용해 568 nm에서 흡광도를 측정하였고 5분 후 다시 흡광도의 변화를 측정하였다.

Catalase(CAT)의 활성 측정 - CAT의 활성 측정은 hydrogen peroxide의 분해에 따라 감소하는 흡광도를 측정하는 Aebi 방법을 이용하였다.¹³⁾ 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 30% H₂O₂를 넣어 10.5 mM substrate solution(A240=0.5)을 만들었다. 이 substrate solution 1 ml에 각 sample 50 μ l를 가한 후 43.6 M⁻¹cm⁻¹의 extinction coefficient를 사용하여 UV/visible spectrophotometer로 240 nm에서 phosphate buffer를 blank로 하고 30초마다 1분 동안 흡광도를 측정하였다.

Glutathione peroxidase(GPx)의 활성 측정 - GPx의 활성은 Paglia와 Valetine의 방법에 의해 측정하였다.¹⁴⁾ GPx의 반응 동안 glutathione(GSSG)은 GSH의 일정 농도에 대해서 제공되는 과잉의 glutathione reductase(GR)에 의해 환원되며 이 때 reduced nicotin-amide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)의 산화를 관찰하였다. 0.4 M Tris-HCl(pH 7.2) buffer 2.625 ml에 0.04 M GSH 75 μ l, 0.075 mM H₂O₂ 0.1 ml, 6 mM NADPH 0.1 ml을 각각 넣은 후 5분간 미리 배양시켰다. 여기에 각각의 sample을 가하여 UV/visible spectrophotometer로 340 nm에서 흡광도를 측정하고 5분 후 다시 흡광도를 측정하였다.

활성산소종 측정

CHO-K1 cell suspension을 96 well plate에 각 well당 2 \times 10⁴ cells로 가한 후 24시간 동안 배양하였다. 시료를 농도별로 처리한 후 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척한다. 상온에서 50 μ M DCF-DA를 처리 한 후 cytofluor 2350 plate reader를 이용하여 5분 간격으로 측정하였다. DCF-DA는 ROS의 세포 내 변화를 볼 때 사용하는 세포 투과성 염료로, H₂O₂나 superoxide에 의해 산화될 때 형광을 나타낸다. 산화된 DCF의 형광성은 485 nm의 excitation wavelength와 530 nm의 emission wavelength에서 측정하였다.¹⁵⁾

통계처리

본 연구의 그래프와 표의 모든 수치는 각 실험 횟수에 대한 평균과 표준오차로 표시하였으며, 모두 triplicate set로 세 차례 이상 수행하였다. 각 sample의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student *t*-test를 시행하여 계산하였다.

실험결과 및 고찰

본 연구에서는 hamster의 정상 난소세포에서 대표적 iso-

flavonoid 물질인 daidzein과 genistein이 유도하는 ROS를 감소시킬 수 있는 항산화제를 찾고 ROS가 감소되는 기전을 효소학적으로 살펴보고자 하였다. Hamster의 난소세포인 CHO-K1에 daidzein과 genistein을 각각 투여하여 세포생존율을 측정된 결

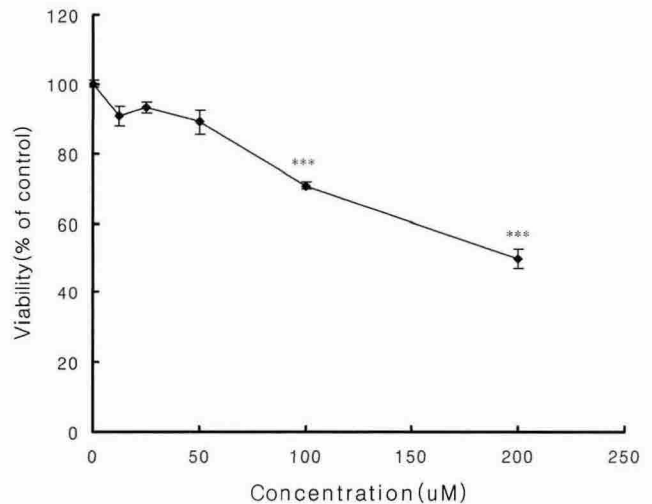


Fig. 1 - Cell viability of CHO-K1 cells after treatment with daidzein. The cells were exposed to various concentrations of daidzein for 24 hr. Percentage of cell viability was determined by using MTT assay. Results are expressed as percentage of control. Values are means \pm SD and were obtained from three different experiments. $P < 0.001$ vs. controls.

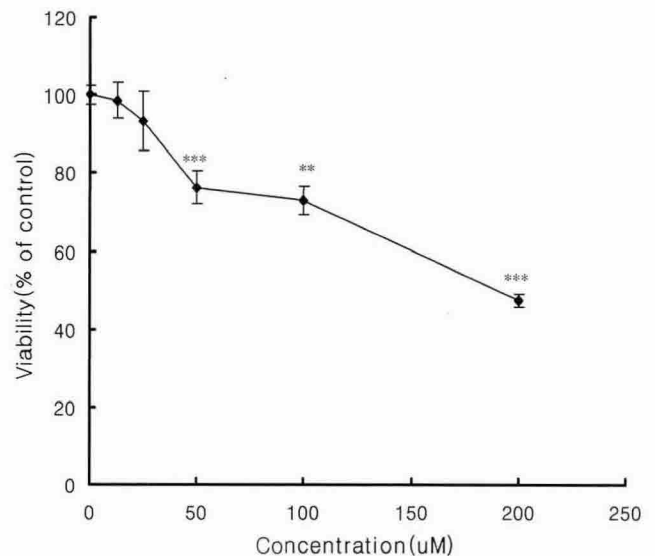


Fig. 2 - Cell viability of CHO-K1 cells after treatment with genistein. The cells were exposed to various concentrations of genistein for 24 hr. Percentage of cell viability was determined by using MTT assay. Results are expressed as percentage of control. Values are means \pm SD and were obtained from three different experiments. ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$ vs. controls.

과, 농도가 50 μM 때 daidzein인 경우에는 생존율이 89%, genistein인 경우에는 77%로 거의 세포 독성을 나타내지 않았으므로 50 μM 을 최고 농도로 하여 실험을 실행하였다(Fig. 1, 2).

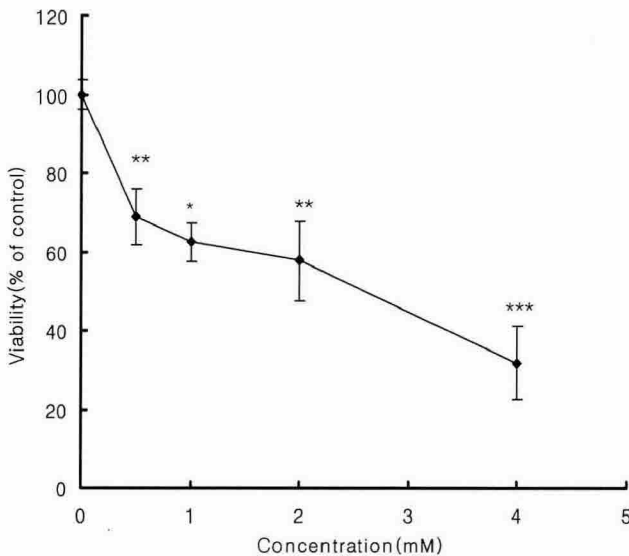


Fig. 3 – Cell viability of CHO-K1 cells after treatment with vitamin C in presence of 50 μM daidzein. The cells were exposed to various concentrations of vitamin C in presence of 50 μM daidzein for 24 hr. Percentage of cell viability was determined by MTT assay. Results are expressed as percentage of control. Values are means \pm SD, and were obtained from three different experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control.

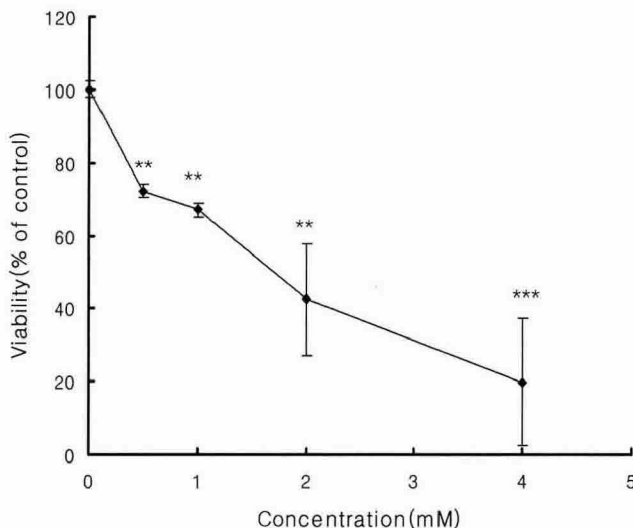


Fig. 4 – Cell viability of CHO-K1 cells after treatment with vitamin C in presence of 50 μM genistein. The cells were exposed to various concentrations of vitamin C in presence of 50 μM genistein for 24 hr. Percentage of cell viability was determined by MTT assay. Results are expressed as percentage of control. Values are means \pm SD, and were obtained from three different experiments. * $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control.

또한 daidzein과 genistein 을 투여하면 세포 내 ROS level이 증가하는 것이 이미 밝혀진 바 있으므로^{9,10} 이 산화적 스트레스 유발과 항산화효소와의 연관성을 조사하기 위하여 daidzein과 genistein에 항산화제인 vitamin C를 병용 투여하여 세포생존율을 측정하였다. Daidzein과 genistein의 농도는 거의 세포독성을 나타내지 않는 최고 농도인 50 μM 로 동일하게 처리하였으며 병용 처리하는 vitamin C는 0.5~4 mM 농도 범위에서 실험을 시행하였다. 그 결과, 병용처리 농도가 증가함에 따라 세포생존율이 농도 의존적으로 감소하였다. Daidzein 또는 genistein 50 μM 과 vitamin C, 1 mM을 병용 처리한 경우 daidzein은 63%, genistein은 66%의(Fig. 3, 4) 세포 생존율을 나타냈으므로 이 농도를 vitamin C 최고 농도로 하여 실험을 시행하였다.

Daidzein과 대표적인 항산화제인 vitamin C를 병용처리 한 세포에서 daidzein에 의해 유도되었던 산화적 스트레스가 감소되는 것으로 나타났다. Daidzein 50 μM 과 vitamin C 0.25~1 mM를 병용 처리한 세포 내 ROS를 측정된 결과 농도의존적인 결과는 아니었지만 vitamin C 1 mM로 병용 처리하였을 때는 control 수준까지 감소시키는 결과를 얻었으나(Fig. 5), 반면에 genistein에 의해 유도된 ROS 제거에는 유의적인 효과가 없었다(Fig. 6).

Daidzein나 genistein이 두 가지 모두 isoflavonoid이면서 햄스터의 난소세포에서 산화적 스트레스를 일으키는 물질임에도 불구하고 vitamin C는 daidzein로 인한 ROS 소거에 효과가 크고

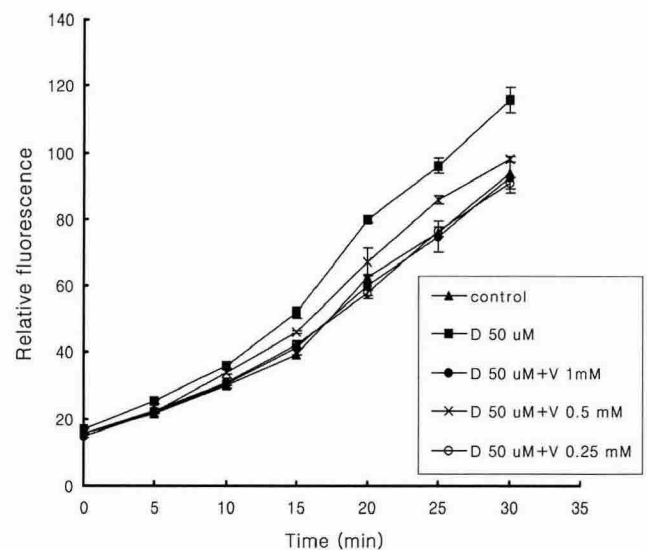


Fig. 5 – Measurement of reactive oxygen species (ROS) level after vitamin C treatment in the presence of daidzein 50 μM . CHO-K1 cells (2×10^4 /well) were incubated with various concentration of vitamin C in the presence of daidzein 50 μM and then 200 μl DCFH-DA (50 μM) was added as a substrate for ROS. After incubation for 30 min. ROS level were measured by spectrofluorometer (excitation : 485 nm, emission : 530 nm). Results are expressed as average of triplicate samples with \pm SD.

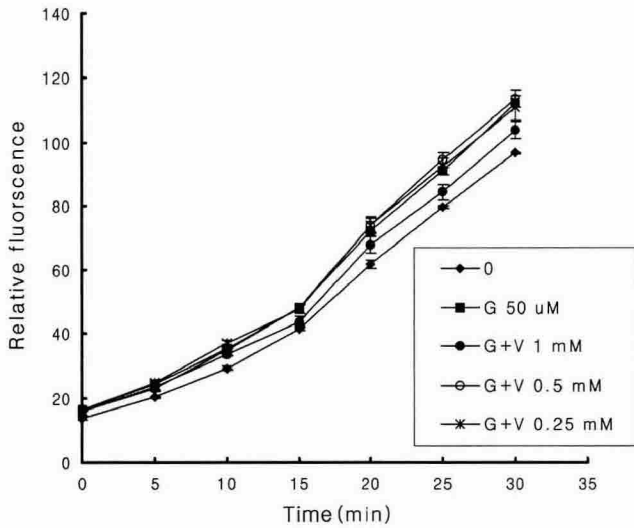


Fig. 6 – Measurement of reactive oxygen species (ROS) level after vitamin C treatment in the presence of genistein. CHO-K1 cells (2×10^4 /well) were incubated with various concentration of vitamin C in the presence of genistein 50 μ M and then 200 μ l DCFH-DA (50 μ M) was added as a substrate for ROS. After incubation for 30 min. ROS level were measured by spectrofluorometer (excitation : 485 nm, emission : 530 nm). Results are expressed as average of triplicate samples with \pm SD.

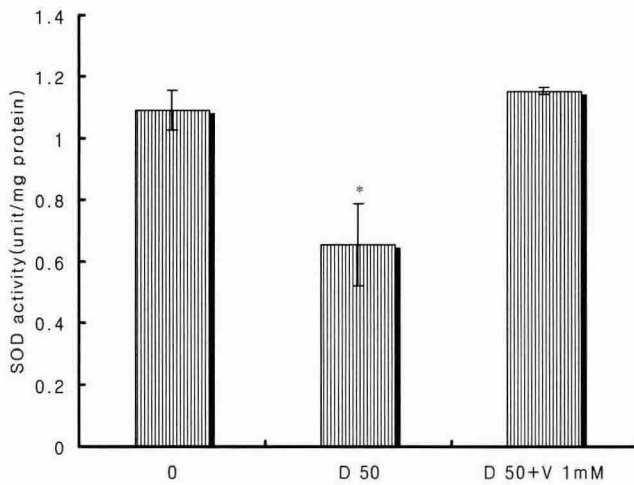


Fig. 7 – Effect of vitamin C in the presence of daidzein on superoxide dismutase activities in CHO-K1 cells. The cells were exposed to vitamin C (V) 1 mM in the presence of 50 μ M daidzein (D) for 24 hr. The vitamin C in the presence of 50 μ M daidzein-treated cells and control cells were harvested and protein was isolated from the cells. Absorbance of each enzyme sample was read at 568 nm. Results are expressed as average of triplicate samples with \pm SD. *P<0.05 compared with control.

genistein에는 거의 영향을 미치지 않았다. 이와 같은 결과는 성분에 따라 항산화효과가 다르게 나타날 수 있다는 것을 알 수 있다.

Vitamin C를 병용 처리한 결과 daidzein에 의해 유도됐던 ROS

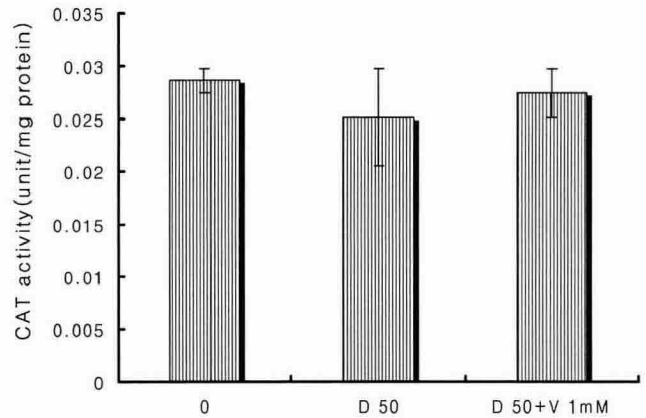


Fig. 8 – Effect of vitamin C in the presence of daidzein on catalase activities in CHO-K1 cells. The cells were exposed to vitamin C (V) 1 mM in the presence of 50 μ M daidzein (D) for 24 hr. The vitamin C in the presence of 50 μ M daidzein-treated cells and control cells were harvested and protein was isolated from the cells. Absorbance of each enzyme sample was read at 240 nm. Results are expressed as average of triplicate samples with \pm SD.

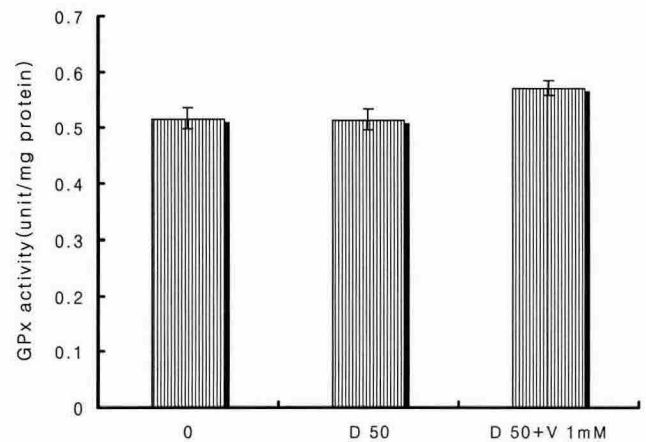


Fig. 9 – Effect of vitamin C in the presence of daidzein on glutathione peroxidase activities in CHO-K1 cells. The cells were exposed to vitamin C (V) 1 mM in the presence of 50 μ M daidzein (D) for 24 hr. The vitamin C in the presence of 50 μ M daidzein-treated cells and control cells were harvested and protein was isolated from the cells. Absorbance of each enzyme sample was read at 340 nm. Results are expressed as average of triplicate samples with \pm SD.

가 유의적으로 감소하였으므로 이와 관련된 항산화 효소 활성화에 미치는 영향을 검토하기 위하여 다음 실험을 실행하였다. ROS 관련실험과 동일한 농도인 daidzein 50 μ M에 ROS level을 감소시키는 데 유의적인 영향을 줄 수 있는 최대 농도인 vitamin C 1 mM을 병용 처리하여 24시간 후에 단백질을 추출하고 위의 항산화효소 활성화 측정방법으로 효소활성을 측정하였다. 그 결과, daidzein 단독 처리로 인해 45% 가량 감소했던 SOD활성이 control 수준이상으로 완전히 회복되었다(Fig. 7). CAT와 GPx인

경우 vitamin C를 병용 처리하여도 daidzein(50 μ M)을 단독 처리했을 때와 마찬가지로 이들 활성에는 유의적인 변화가 없었다 (Fig. 8, 9).

이상의 실험 결과, 대표적인 isoflavonoid인 daidzein은 햄스터의 난소세포에서 SOD 활성이 감소됨으로써 ROS를 제거하지 못하여 산화적 스트레스를 일으키게 되고 이 경우 vitamin C를 병용 처리함으로써 산화적 스트레스로부터 회복된다는 것을 알 수 있었다.

에스트로겐 유사작용 및 난소, 전립선, 자궁암에 대한 항암효과가 규명되면서 콩류에 포함된 isoflavonoid의 관심이 높아지고 있는 점을 고려할 때 chemoprevention 및 영양보조제로 사용 시 ROS를 감소시킬 수 있는 적당한 항산화제를 선택하여 병행 할 수 있는 보충요법이 필요하다고 생각되며, 많은 질병에 유효하게 적용되어지는 daidzein이 세포 상태에 따라 최적으로 활용되기 위해서는 향후 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 우수연구센터육성사업의 지원으로 수행되었음(R11-2005-017).

결 론

식생활을 통해 흔히 섭취되는 물질일 뿐 아니라 최근 항암작용과 에스트로겐 유사작용으로 주목 받고 있는 콩의 중요 isoflavonoid 성분인 daidzein 및 genistein은 세포 내 ROS level을 증가하는 것으로 이미 밝혀진 바 있으므로 그 산화적 스트레스를 낮춰주는 시도가 중요한 의미를 갖는 것으로 사료된다. 그러므로 본 연구에서 daidzein 및 genistein과 항산화제인 vitamin C를 병용 처리하여 항산화 효소의 활성, ROS level을 측정하여 세포 내 산화적 스트레스에 대해 살펴본 결과, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

Daidzein의 에 의해 유도된 ROS가 vitamin C의 병용처리 함으로써 control 수준 이하로 감소되었다.

Daidzein 단독처리 시 항산화효소와 관련하여 볼 때 SOD의 효소활성이 저하되었으나 vitamin C를 병용처리 함으로써 SOD 효소 활성이 control 수준 이상으로 회복되었으며 CAT나 GPx 활성에는 거의 변화가 없었다.

Genistein에 의해 유도된 ROS는 vitamin C를 병용 투여하여도 유의적인 변화가 없었다.

참고문헌

- 1) Scandalios, J. G. : Oxidative stress molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**, 995 (2005).
- 2) Halliwell, B. : Free radicals in biochemistry and medicine. *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine* **2**, 330 (1996).
- 3) Scandalios, J. G. : *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Plainview, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 527-568 (1997).
- 4) McCord, J. M. : Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity. *Reviews in Biochemical Toxicology* **1**, 109 (1979).
- 5) Middleton, E. : Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int. J. Pharmacognosy* **34**, 344 (1996).
- 6) Coward, L., Barnes, N. C., Setchell, K. D. R. and Barnes, S. : Genistein, daidzein, and the β -glycoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1961 (1993).
- 7) Anderson, J. J. and Garner, S. C. : The effects of phytoestrogens on bone. *Nutr. Res.* **17**(10), 1617 (1997).
- 8) Yamamoto, S., Sobue, T., Kobayashi, M., Sasaki, S. and Tsugane, S. : Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 906 (2003).
- 9) Kim, M. H. and Kim, A. K. : Effect of daidzein on activity and expression of antioxidant enzyme in hamster ovary cells. *Cancer. Prevention Res.* **11**(4), 321 (2006).
- 10) Kim, M. H. and Kim, A. K. : Effect of genistein on activity and expression of antioxidant enzyme in Hamster ovary cells. *Yakhak Hoeji* **51**, 75 (2007).
- 11) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76 (1985).
- 12) Martin, J. P., Dailey, M. and Sugarman, E. : Negative and Positive ass superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **255**(2), 329 (1987).
- 13) Aebi H. : Catalase *in vitro*. *Method in Enzymology* **105**, 93 (1984).
- 14) Paglia, D. E. and Valentine, W. N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 158 (1967).
- 15) Sattler, M., Winkler, T., Verma, S., Byrne, C. H., Shrikhande, G., Salgia, R. and Griffin, J. D. : Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. *Blood* **93**, 2928 (1999).