

대두박 식용사포닌의 항산화 및 대장암세포 성장 억제효과

박경욱 · 김재용¹ · 서권일[†]

순천대학교 식품영양학과, ¹경북대학교 식품공학과

Antioxidative and Cytotoxicity Activities against Human Colon Cancer Cells Exhibited by Edible Crude Saponins from Soybean Cake

Kyung-UK Park, Jae-Yong Kim¹ and Kwon-Il Seo[†]

Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

¹Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 750-701, Korea

Abstract

To develop soybean cake as a functional food material, the anti-oxidative and cytotoxic activities against human colon cancer cells of crude saponins isolated from 70% (v/v) ethanol extracts of cake were investigated. The Diaion HP-20 adsorption method was used for isolation of crude saponins, which were then eluted with 100% ethanol. The non-saponin fraction was removed by elution with H₂O and 20% (v/v) ethanol. The results of thin layer chromatography (TLC) analysis confirmed that crude saponins were present in the 100% ethanol extract of soybean cake. The hydrogen-donating properties of saponins were more than 60% at a concentration of 1,000 µg/mL. malondialdehyde(MDA) production was 1,200 µmol MDA/g in mouse liver homogenate treated with crude saponins at the concentration of 1,000 µg/mL. This value was lower than that of the control, which was 3,700 µmol MDA/g. Saponins inhibited the growth of colon cancer cells in a dose- and time-dependent manner. Saponins also resulted in a decrease in the proportion of cells in the G1 phase of the cell cycle, whereas the cell proportion in G2/M phase was increased with 1,000 µg/mL saponins. Thus, we conclude that saponins may induce G2/M cell cycle arrest.

Key words : soybean cake, saponins, antioxidation, cytotoxicity

서 론

현대인들은 과도한 스트레스, 운동부족 및 불규칙한 영양섭취 등으로 암, 당뇨병, 고혈압, 심혈관질환 등 성인병 발병률이 증가하고 있다. 특히 이런 질병들은 식생활과 밀접한 연관성을 갖고 있다는 것이 역학적으로 보고되면서 식품에 대한 건강과 안전성이 더욱 더 부각되고 있다(1). 최근에 이러한 질병들을 예방 및 치료하기 위하여 천연식물들에서 안전성이 입증된 생리활성물질 탐색 및 이를 이용한 기능성 식품 및 의약품 개발 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

콩은 단백질 및 지방을 다량 함유하고 있는 작물로 영양

학적으로 우수한 식량자원 뿐만 아니라, 사포닌, 식물성 스테롤, isoflavone류 등과 같은 생리활성물질들이 풍부하게 함유되어 있다(2). 지금까지 콩의 생리활성 연구는 주로 isoflavone류에 관한 연구들이 진행되어 왔으며(3,4), 최근 식물에 함유되어 있는 사포닌들이 다양한 약리적 효과들을 나타내는 연구들이 보고됨에 따라 사포닌의 중요성이 증대되고 있다(5). 콩에 함유되어 있는 사포닌은 과거에는 단순히 단백질분해 효소 저해제, 적혈구 응집소 같은 항 영양물질로 인식되어 왔으나(6), 최근에 콩 사포닌은 혈중 콜레스테롤 감소 효과(7), 항암효과(8,9) 및 면역증진효과(10) 등의 생리활성 밝혀짐에 따라 그 중요성이 재인식되고 있으며, 의약품 및 기능성식품원료 활용가능성이 시사되고 있다.

한편 콩기를 생산 시 부산물로 생산되는 탈지대두박은 대부분의 영양소가 잔존할 뿐만 아니라 isoflavone, saponin 등 생리활성물질들이 함유되어 있어 식품원료 뿐만 아니라

[†]Corresponding author. E-mail : seoki@sunchon.ac.kr,
Phone : 82-61-750-3655, Fax : 82-61-752-3657

기능성 식품의 원료로 활용할 가치가 있다고 보고되고 있다 (11,12). 하지만 이런 탈지대두박은 단지 10%만 식품으로 이용될 뿐 주로 사료용, 공업적인 원료로 이용되고 있는 실정이다. 또한 식물로부터 사포닌 분리방법은 주로 유기용매인 부탄올법이 이용되어 왔으나, 부탄올법으로 추출한 조사포닌은 유기용매 독성과 낮은 순도 등으로 인해 기능성 식품 및 의약품 원료로 활용하기에 부적합한 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 폐기되고 있는 대두박을 기능성 식품소재로 활용하기 위하여 대두박으로부터 식용 가능한 사포닌을 분리하여 항산화 효과 및 인체 대장암세포주의 성장에 대한 억제 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용된 대두박은 (주)신동방유량에서 식용유지를 추출하고 남은 대두박을 제공받아 사용하였다. Diaion HP-20수지는 Mitsubishi Hasei사(Japan)제품을 구입하였고, 주정(알콜농도 95%)은 대한발효주정(Korea)으로부터 구입하였다.

대두박으로부터 Diaion HP-20 수지 흡착법에 의한 식용 조사포닌 분리

본 실험에 사용한 대두박 조사포닌은 Diaion HP-20 수지 흡착법을 이용하여 분리하였다. 즉 대두박에 70% 에탄올(주정)을 80℃에서 3시간 환류냉각을 3회 반복한 후 그 여액을 감압 농축한 시료에 물을 일정량 첨가하여 Diaion HP-20 chromatography를 이용하여 물, 20% 에탄올 및 100% 에탄올을 사용하여 순차적으로 분획물을 회수하였다. 조사포닌이 함유된 분획물을 확인하기 위하여 TLC 상에서 대두사포닌 표준물질과 비교 분석하였다.

수소공여능

대두박 조사포닌의 대한 수소공여능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)의 환원성을 이용하여 528 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer 로 항산화 효과를 측정하였다. 즉 대두박 조사포닌 1 mL와 DPPH 용액 3 mL를 5초 동안 vortex로 균일하게 혼합하여 흡광도를 측정하고, 대조군은 시료대신 에탄올 1 mL을 첨가하여 흡광도를 측정하였다(13).

$$\text{수소공여능(\%)} = 1 - \frac{(\text{시료첨가군의 흡광도})}{(\text{무첨가군의 흡광도})} \times 100$$

흰쥐의 간 지질과산화 억제기능

흰쥐의 간을 적출하여 phosphate buffer (pH 7.4)로 균질화한 다음 균질액에 H₂O₂(1 M)와 FeSO₄(50 mM) 및 조사포닌

50 μL 를 가하여 total volume을 100 μL로 맞추는 다음 37℃에서 1시간 배양한 후 생성된 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 함량을 측정하였다(14).

암세포 성장 억제 효과

본 실험에 사용한 대장암세포 SW480(human colon carcinoma cell; KCLB 10228)은 한국 세포주은행으로부터 분양받아 10% FBS(fetal bovine serum)를 첨가한 RPMI 1640 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

Monolayer로 자란 암세포를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 최종 세포농도가 5×10⁴ cells/mL 되도록 희석하여 48 well plate에 각 well당 450 μL씩 분주한 다음 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 최종 농도가 200, 400, 600, 800, 1,000 μg/mL이 되도록 대두박 조사포닌을 첨가하고 24, 48 및 72시간 배양한 후 대장암세포의 성장 억제 효과를 SRB (Sulforhodamine B) 방법에 의하여 측정하였다(15).

세포주기 변화량 측정

Monolayer로 배양한 세포주를 0.25% trypsin-EDTA용액으로 처리하여 단일세포로 만든 후 배양액으로 최종농도가 1×10⁶ cells/mL가 되도록 희석하여 6well plate에 seeding한 다음 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 각 well의 배양액을 제거한 후 대두박 조사포닌을 다양한 농도를 처리하여 48시간 더 배양시켰다. 배양이 종료된 후 회수한 세포를 PBS로 2회 세척 후 상층액을 제거한 세포에 차가운 70% ethanol 첨가하여 4℃에서 하루 동안 방치하였다. 고정된 세포를 3회 세척하고 0.1 mg/mL RNase를 처리하여 37℃ 30분 반응시켰다. 반응 종료 후 1 mg/mL의 PI(propidium iodide) 용액으로 30분간 염색하였다. 염색된 세포 현탁액은 flow cytometer (EPICS XL, Beckman Coulter, USA)를 이용하여 세포주기를 분석하였다(16).

통계처리

실험결과는 평균(mean)±표준편차(SD)로 나타내었고, Student t-test를 이용하여 통계처리한 후 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

대두박으로부터 분리한 조사포닌의 확인

대두박으로부터 분리한 조사포닌의 순도 및 사포닌이 함유되어 있는 분획물을 확인하기 위하여 대두사포닌 표준물질과 대두박으로부터 분리한 조사포닌을 TLC에서 비교해 본 결과는 Fig. 1과 같다. 즉 대두박 70% 에탄올 추출물에

는 육안으로 확인하기 힘든 많은 물질이 있음을 확인 할 수 있었으며, Diaion HP-20 흡착 수지에 물, 20% 주정 및 100% 주정으로 순차적으로 분획하였을 때 물과 20% 주정에서는 TLC상 사포닌 이외의 단백질 및 당 물질 등의 다른 물질들이 함유되어 있음을 알 수 있었으며, 100% 주정에는 대두사포닌 표준물질과 비슷한 물질들이 함유되어 있으며, 전개 양상이 비슷하여 사포닌들이 함유되어 있음을 확인 할 수 있었다(Fig. 1).

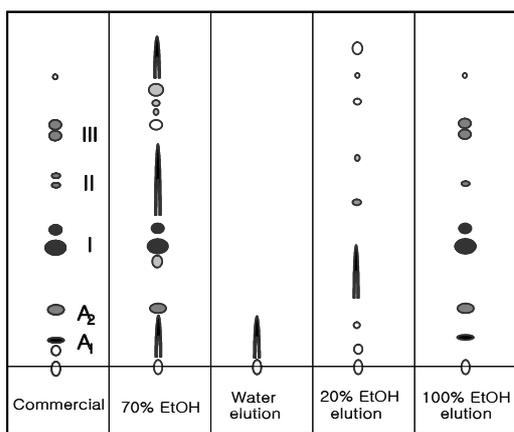


Fig. 1. TLC patterns of each fraction of a 70% ethanol extract of soybean cake.

A₁: glc-glc-glcUA-A-ara-glc, A₂: gal-glcUA-A-ara-glc, I: rha-gal-gluUA-B, II: rha-ara-glcUA-B, III: gal-glcUA-B.

Kim등(17)은 홍삼추출물을 Diaion HP-20수지에 흡착시킨 후 주정을 농도별로 용출한 후 사포닌 성분을 TLC로 분석한 결과 주정 25% 미만의 농도에서는 사포닌이 용출되지 않았으며, 주정 농도가 높아짐에 따라 사포닌의 함량이 증가한다고 보고하였다.

따라서 본 연구 결과에서도 물, 20% 주정에서는 사포닌 외의 물질들만이 용출되었으며, 100% 주정 분획물에서 사포닌들이 함유되어 있음을 확인하였다. 앞으로 Diaion HP-20 흡착 수지를 이용하여 식물로부터 식용사포닌을 분리하여 기능성 식품 원료로 활용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

대두박 사포닌의 항산화 효과

대두박 조사포닌에 대한 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 1과 Fig. 2와 같다. 즉 대두박 조사포닌을 1, 10, 100 및 1,000 µg/mL로 처리하여 수소 공여능을 측정한 결과 농도 의존적으로 항산화 효과를 나타내었으며, 고농도 1,000 µg/mL 에서 합성항산화제인 BHT 보다는 그 효과가 낮았지만 50% 이상의 항산화 효과가 나타내었다. (Table 1).

Table 1. Hydrongen – donating activities of soybean cake saponins (%)

Sample	Concentration (µg/mL)			
	1	10	100	1,000
BHT				93.23±2.04
Soybean cake saponin	6.37±1.27	18.15±1.46	24.28±1.58	61.33±2.08

Data values were expressed as mean ± SD of triplicate determinations.

한편 흰쥐의 liver homogenate에 대두박 조사포닌을 1, 10, 100 및 1,000 µg/mL의 농도로 처리하여 산화의 결과로 생성되는 TBARS 함량을 측정한 결과 100 µg/mL의 농도에서 그 생성량이 억제되었으며 1,000 µg/mL 농도에서는 대조구의 3700 µmol MDA/g liver에 비하여 1200 µmol MDA/g liver 생성이 측정되어 대두박 조사포닌 고농도에서 항산화 효과가 있었음을 알 수 있었다(Fig. 2).

Kao 등(18)은 대두박으로부터 생리활성 물질들을 분리하여 항산화 효과를 측정한 결과 대두박 사포닌 분획물에서 항산화 효과를 나타내었다고 보고하였다. 본 연구 결과에서도 대두박 조사포닌이 항산화 효과를 나타내었으나, 고농도에서만 그 효과를 나타내었다.

따라서 대두박 조사포닌에는 사포닌외의 물질들이 함유되어 있기 때문에 사포닌만을 분리 정제하여 항산화효과를 조사하면 더 낮은 농도에서도 그 효과를 나타낼 가능성이 있으므로 대두박 조사포닌이 앞으로 천연 항산화물질 소재로서 활용 가능성이 있을 것으로 생각된다.

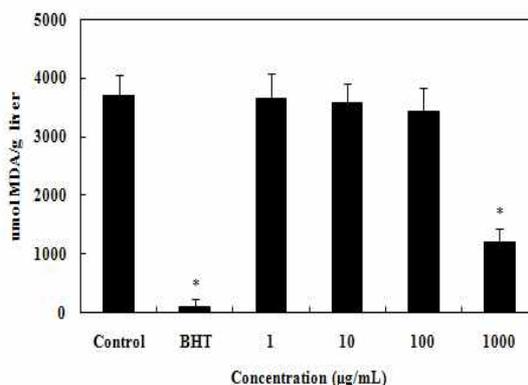


Fig. 2. Effect of soybean cake saponins on TBARS of mouse liver homogenate. Data values were expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at *p<0.05 by Student t-test.

암세포주 성장 억제 효과

대두박 조사포닌을 다양한 농도로 대장암세포주 (SW480)에 처리하여 24, 48 및 72시간 동안 배양한 후 암세포 증식 억제능을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 즉 대두박

조사포닌은 대조군에 비하여 시간 및 농도에 의존적으로 암세포의 증식을 억제하였으며, 특히 대두박 조사포닌을 72시간 배양 시 1,000 µg/mL 농도에서 대장암세포의 성장 억제율이 40% 이상으로 나타났다(Fig. 3). Xiao 등(19)은 대두사포닌(SS-II)을 자궁암세포(HeLa)에 50, 100, 200, 400 및 800 µg/mL 농도로 처리하여 2일, 4일 및 6일 동안 배양하여 암세포 성장을 측정된 결과 농도 및 시간 의존적으로 그 성장을 억제하였으며, 특히 농도 200, 400 µg/mL에서 자궁암세포의 사멸을 apoptosis에 의해 유도된다고 보고하였다.

따라서 본 연구 결과에서는 대두박 조사포닌이 대장암세포주(SW480)의 사멸을 농도 및 시간 의존적으로 억제하였으나, 그 사멸이 apoptosis에 의해서 유도 되는지를 확인하지 못하였으므로, 추후 대두박 사포닌의 암세포 사멸 기전에 대한 연구들이 진행되어야 할 것으로 생각된다.

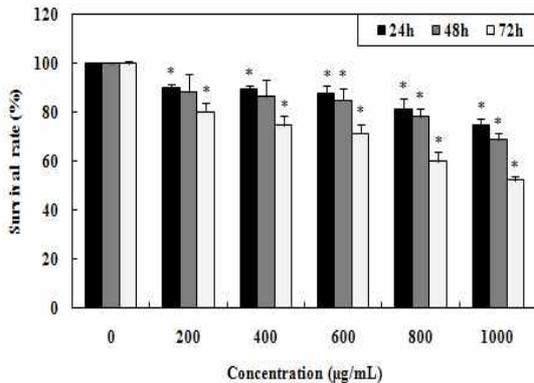


Fig. 3. Cell growth inhibition effects in SW480 cells treated with soybean cake saponins for 24, 48 and 72 h using the SRB assay.

Data values were expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at * $p < 0.05$ by Student *t*-test.

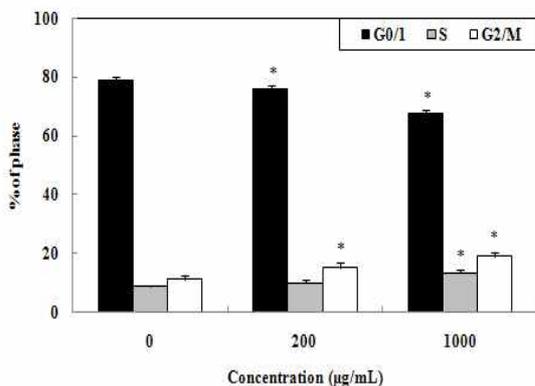


Fig. 4. Cell cycle distributions in the SW480 cells treated with soybean cake saponins for 72 h.

Data values were expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at * $p < 0.05$ by Student *t*-test.

대두사포닌 처리에 의한 암세포의 주기 변화량 측정

대두박 조사포닌이 대장암세포(SW480) 주기에 어떤 영향을 미치는 조사하기 위하여 대두박 조사포닌을 200 및 1,000 µg/mL 농도로 처리하여 72 시간 반응시킨 후 flow cytometer를 통하여 세포주기 변화량을 측정하였다(Fig. 3). 대두박 조사포닌을 처리하지 않은 대조군은 G1, S 및 G2/M phase이 각각 79.1, 8.6 및 11.3%를 나타내었으며, 대두박 조사포닌을 1,000 µg/mL의 농도로 처리한 군에서는 67.5, 13.4 및 19.1%를 나타내어 G1 phase의 비율은 감소한 반면에, G2/M phase의 비율은 증가하였다. 따라서 대두박 조사포닌은 암세포주기 중 G2/M phase를 arrest하는 것을 추측할 수 있었다.

요 약

본 연구는 폐기되고 있는 대두박을 기능성 식품 원료로 이용하기 위하여 대두박 70%에탄올 추출물로부터 Diaion HP-20 흡착수지를 이용하여 조사포닌을 분리 한 후 이들에 대한 항산화 효과 및 대장암세포 성장 억제효과를 조사하였다. Diaion HP-20 흡착 수지를 이용하여 분획한 물, 20% 및 100% 주정 분획물을 TLC상 확인한 결과 100% 주정 분획물에서 조사포닌들이 함유되어 있음을 확인 할 수 있었다. 대두박 조사포닌은 1,000 µg/mL 고농도에서 60% 이상의 수소 공여능을 나타내었다. 또한 대두박 조사포닌이 1,000 µg/mL의 농도로 처리된 흰쥐의 간 균질물에서 MDA의 생성량이 대조군의 3700 µmol MDA/g liver에 비하여 1200 µmol MDA/g liver로 낮게 나타내어 대두박 조사포닌은 고농도에서 항산화 효과가 있음을 알 수 있다. 대두박 조사포닌은 인체 대장암(SW480)세포의 성장을 농도 및 시간 의존적으로 억제하였으며, 대두박 조사포닌 1,000 µg/mL의 농도로 처리군에서는 G1 phase의 비율은 감소한 반면 G2/M phase의 비율은 증가하여 G2/M phase를 억제하는 것을 추측할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 순천대학교 장기 해견과견 지원사업에 의하여 수행된 연구 결과의 일부이며, 그 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee, K.S. and Hwang C.S (1990) A study on the actual utilization Korean traditional remedies-about foods used

- on geriatric disease. Korean J. Dietary Culture, 5, 331-347
2. Han, J.S., Ha, T.Y. and Kim, S.R. (2006) Studies on physiological properties of isoflavone from soybean and its processing properties. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 35, 1427-1433
 3. Messina, M.J., Persky, V., Setchell, K.D. and Barnes, S. (1994) Soy-intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. Nutr. Cancer, 21, 113-131
 4. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Hibuya, M. and Fukami, Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. J. Biol. Chem., 262, 5592-5595
 5. Kim, S.M., Seo, K.I., Park, K.W., Jeong, Y.K., Cho, Y.S., Kim, M.J., Kim, E.J. and Lee, M.K. (2009) Effect of crude saponins from soybean cake on body weight and glucose tolerance in high-fat diet induced obese mice J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 38, 39-46
 6. Thompson, L.U. (1993) Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. Food Res. Int., 26, 131-149
 7. Oakenfull, D. and Sidhu, G.S. (1990) Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia? Eur. J. Clin. Nutr., 44, 79-88
 8. Park, K.U., Wee, J.J., Kim, J.Y., Jeong, C.H., Kang, K.S., Cho, Y.S. and Seo, K.I. (2005) Anticancer and immunoactivities of edible crude saponin from soybean cake. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 34, 1509-1513
 9. Tokuda, H., Konoshima, T., Kozuka, M. and Kimura, T. (1991) Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-promoted mouse skin papilloma by saponins. Oncology, 48, 77-80
 10. Wu, R.T., Chiang, H.C., Fu, W.C., Chien, K.Y., Chung, Y.M. and Horng, L.Y. (1990) Formosanin-C, an immunomodulator with antitumor activity. Int. J. Immunopharmacol., 12, 777-786
 11. Yeo, K.E., Cho, S.B. and Kim, W.J. (2003) Separation conditions of isoflavone from defatted soybean flour with using sorption resin. Food Eng. Prog., 7, 235-241
 12. Park, D.J., Ku, K.H. and Kim, S.H. (1996) Characteristics and application of defatted soybean meal fractions obtained by microparticulation/air-classification. Korean J. Food Sci. Technol., 28, 497-505
 13. Blois, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1204
 14. Gutteridge, J.M.C. (1982) Free-radical damage to lipids amino acids, carbohydrates and nucleic acid determined by thiobarbituric acid reactivity. Int. J. Biochem. 14, 649-654
 15. Promega Protocol. (2001) Cell titer 96[®] aqueous one solution cell proliferation assay. Promega, USA
 16. Wan, C.K., Wang, C., Cheung, H.Y., Yang, M. and Fong, W.F. (2006) Triptolide induces Bcl-2 cleavage and mitochondria dependent apoptosis in p53-deficient HL-60 cells. Cancer Lett., 241, 31-41
 17. Kim, S.K., Kwak, Y.S., Kim, S.W., Hwang, S.Y., Ko, Y.S., and Yoo, C.M., (1998) Improve method for the preparation of crude saponin. J. Ginseng Res., 22, 155-160
 18. Kao, T.H. and Chen, B.H. (2006) Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. J. Agric. Food Chem., 54, 7544-7555
 19. Xiao, J.X., Huang, G.Q., and Zhang, S.H. (2007) Soyasaponins inhibit the proliferation of Hela cells by inducing apoptosis. Exp. Toxicol. Pathol., 59, 35-42

(접수 2009년 3월 31일, 채택 2009년 7월 17일)