

HT-29 인체 대장암 세포에서 검정콩 된장의 *in vitro* 항암 효과

박의성¹ · 이재양² · 박건영¹

¹부산대학교 식품영양학과
²(주)인산가

Anticancer Effects of Black Soybean Doenjang in HT-29 Human Colon Cancer Cells

Eui Seong Park¹, Jae-Yang Lee², and Kun-Young Park¹

¹Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University
²Insan Inc.

ABSTRACT *In vitro* anticancer effects of black soybean doenjang on HT-29 human colon cancer cells were studied. SD (soybean doenjang prepared with nine-time baked bamboo salt) and BD (black soybean doenjang prepared with nine-time baked bamboo salt) were compared with CD (commercial doenjang). There were no significant differences between experimental groups in terms of pH, amino-type nitrogen, and ammonia-type nitrogen levels of the doenjang samples. BD showed the highest antioxidative effect, followed by SD and CD in that order. BD also showed the highest total polyphenol concentration of all samples. CD, SD, and BD extracts showed no toxic effects on normal RAW 264.7 cells at a concentration ranging from 0.1 to 0.5 mg/mL. BD exhibited anticancer effect on HT-29 cells by MTT assay. Also, BD manipulated mRNA expressions in certain factors; it suppressed pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, and COX-2, promoted cell-cycle-related genes of p21, and p53, suppressed expression of cyclin D1, and suppressed anti-apoptotic Bcl-2; such manipulation by BD was the strongest, followed by SD and CD in order. From the results above, BD exhibited the highest anticancer effects by inhibiting growth of HT-29 cells, probably by regulating pro-inflammatory cytokines, cell cycling related genes, etc. These results might be due to using black soybeans containing high levels of polyphenol, including anthocyanins.

Key words: black soybean, doenjang, HT-29 colon cancer cells, anticancer

서 론

된장은 우리나라의 대표적인 전통발효식품으로 된장국은 한국인이 가장 선호하는 음식 중 하나로 자주 섭취하는 음식이다. 된장은 콩을 주원료로 한 우수한 단백질의 공급식품이고, 저장성이 뛰어난 조미 식품이다. 또한 된장은 발효, 숙성 과정 중 생성되는 각종 펩타이드, 아미노산, 유리당 등에 의해 구수한 맛과 향을 가진 것이 특징이며(1), 페놀화합물과 melanoidin 종류의 항산화 물질을 가지는 것으로 알려져 있다(2). 된장의 발효는 콩의 유용한 성분을 인체에 흡수가 잘 되는 물질로 변화시켜(3), 항염증(4), 항산화(5), 항암기능(6) 등을 가지는 것으로 알려져 있다. 콩의 여러 가지 이로운 성분 중 하나는 isoflavone이며, 콩의 isoflavone은 glucoside 형태인 genistin, daidzin, glycitin 등으로 형성되어 있다. 하지만 된장에서 콩의 발효가 진행됨에 따라 이들은

aglycon 형태인 genistein, daidzein, glycitein으로 전환된다(7). 이러한 aglycon된 형태의 genistein, daidzein은 항염증(8), 항산화(9), 항암 효과(10)를 가진 것으로 알려져 있으며 된장이 발효되면서 이러한 성분이 많이 생성된다(7).

우리나라에서 흔히 먹는 검정콩 중 흑태는 검은콩 가운데서도 크기가 크고 콩밥이나 콩자반 등에 사용되며 서리태는 껍질이 검은색이지만 속이 파랗다고 하여 속칭이라고 불린다. 서목태는 다른 검은콩보다 크기가 작아 마치 쥐 눈처럼 보인다고 하여 쥐눈이콩이라고 부른다(11). 콩에 함유된 주요 성분들은 단백질이 40%, 지질이 20%, 탄수화물이 35%, 기타 성분이 5% 정도로 구성되어 있다. 이들 성분은 단백질, 지질, 탄수화물, 비타민, 무기물 등과 같은 영양 성분과 생리활성을 나타내는 식물성 물질인 비영양 성분으로 나눌 수 있는데, 검정콩의 성분을 살펴보면 일반 노란콩과 영양 성분 면에서 큰 차이가 없고 단지 종피색이 다른 것으로 알려져 있다(12). 검정콩은 일반콩과 비교하여 노화방지 성분이 4배나 많으며(13), 다이어트에 효과가 있다고 알려져 있다(14). 검정콩이 일반적인 노란콩과 다른 점 중 하나는 종피에 anthocyanin이 함유되어 있는 것인데, anthocyanin은

Received 8 June 2015; Accepted 12 August 2015

Corresponding author: Kun-Young Park, Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 46241, Korea
E-mail: kunypark@pusan.ac.kr, Phone: +82-51-510-2839

수용성 플라보노이드 색소로 항산화 효과 등의 생리활성이 높은 것으로 알려져 있으며(15), 검정콩 종피에는 노란콩보다 많은 anthocyanin을 함유하고 있어 높은 항산화(16) 및 항암(17) 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

본 실험은 검정콩된장과 노란콩된장, 일반 된장을 이용하여 pH, 암모니아태 질소 및 아미노태 질소 함량 및 항산화 효과, RAW 264.7 cells에서 된장 추출물의 독성 확인, HT-29 인체 대장암세포를 이용하여 암세포 성장 억제 효과, RT-PCR을 이용해 대장암의 inflammation 관련 유전자 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2와 대장암세포의 cell cycle에 영향을 주는 유전자인 p21, p53, cyclin D1과 apoptosis와 관련된 유전자 Bcl-2의 발현 정도도 살펴보았다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서는 (주)인산가(Hamyang, Korea)에서 메주를 이용하여 전통식으로 제조 후 1년을 발효하고 9회 죽염이 첨가된 노란콩(대원콩)된장(soybean doenjang, SD)과 검정콩(서리태)된장(black soybean doenjang, BD)을 사용하였다. 각각의 된장은 콩을 세척하고 불린 후 가마솥에서 장작불로 삶고 나서 분쇄하여 일정한 크기의 육면체 모양(3 kg, 10×15×20 cm)의 메주를 제조한 후 빗짚을 깔아둔 선반에 진열하여 메주를 띄웠다(40°C). 메주 성형 후 60일이 지난 뒤 햇빛에 말리고 물로 깨끗이 세척한 후 9회 죽염(Insanga, Hamyang, Korea)을 첨가한 20%의 소금물에 1:2(메주 : 소금물)의 비율로 항아리에 담았다. 4개월 후 간장과 된장을 분리하고 분리된 된장은 따로 항아리에 담아 1년간 발효시켰다. 메주를 이용하여 전통식으로 제조 후 1년을 발효하고 정제염이 첨가된 일반(노란콩)된장(commercial doenjang, CD)은 농협마트(Hamyang, Korea)에서 구입하였다.

이화학적 실험에 사용된 된장은 동결 건조하여 실험에 이용하였는데 시료를 -80°C, vacuum gauge 10(Sanwon Freezing Engineering Co., Busan, Korea)의 조건에서 일주일간 동결 건조한 다음 파쇄하여 가루로 만든 후 실험에 사용하였다.

pH, 아미노태 질소 및 암모니아태 질소 함량 측정

pH는 SevenEasy pH meter(8603, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정하였으며, 증류수로 10배 희석한 된장 시료를 사용해 실온에서 측정하였다. 아미노태 질소 함량 측정을 위해 10배 희석한 된장 시료 5 mL에 중성 formalin 용액 5 mL를 가한 후, 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 8.4가 될 때까지 적정하였다. 이때 소비된 0.1 N NaOH 용액의 mL 수를 formol법으로 계산하여 아미노태 질소 함량을 나타내었다(18).

암모니아태 질소 함량은 10배 희석한 된장 시료를 이용하

여 AM-505-Kit(Asan Pharmaceuticals, Hwaseong, Korea)에 의한 Indophenol법으로 측정하였다(19).

총 폴리페놀 측정

각각 된장의 총 폴리페놀 함량은 Dewanto 등(20)의 방법에 따라 Folin-Ciocalteu reagent가 시료의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 측정하였다. 동결 건조된 각각의 된장을 1.0 mg/mL 농도로 희석한 시료 2 mL에 2% Na₂CO₃ 용액 2 mL를 첨가한 후 2분간 실온에 방치하였다. 그리고 50% Folin-Ciocalteu reagent(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 2 mL를 가한 후 30분 동안 실온(20~25°C)에서 방치하여 반응을 시켰다. 반응 후 UV-VIS spectrophotometer(Jasco, Tokyo, Japan)를 이용하여 750 nm에서 흡광도 값을 측정하였으며, 표준물질로 gallic acid를 사용하여 표준곡선을 작성하였다. 총 폴리페놀 함량은 시료 L당 mg gallic acid equivalent(GAE)로 나타내었다.

된장 추출물의 제조

Pratt과 Birac(21)의 실험을 변형하여 추출물을 제조하였다. 된장을 동결 건조시킨 후 건조된 된장 시료를 파쇄하여 가루로 만든 뒤 시료에 20배(w/v)의 메탄올을 혼합하여 24시간 교반을 한 번 실행한 뒤 여과하고, 10배(w/v)의 메탄올을 혼합하여 24시간 교반을 한 번 더 실행한 뒤 여과하여 추출액을 얻었다. 추출액을 회전식 진공농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축해 추출물을 얻었으며, 이들을 dimethylsulfoxide(DMSO, Kanto Chemical Co., Tokyo, Japan)에 용해하여 적당한 농도로 희석한 후 각 실험에 사용하였다.

DPPH radical 소거 효과 측정

메탄올로 용해 희석한 150 μ M DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 100 μ L를 농도별로 준비된 시료 100 μ L에 가하여 96-well plate에 혼합해 30분간 실온에서 반응시킨 뒤, UV-VIS spectrophotometer(Jasco)로 537 nm에서 흡광도를 측정하였다. 메탄올 100 μ L를 대조군으로 하여 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다(22).

RAW 264.7 대식세포(정상세포)를 이용한 *in vitro* 된장 메탄올 추출물의 독성 측정

한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 RAW 264.7 세포를 분양받아 실험에 사용하였다. 세포 배양을 위해 DMEM medium(GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin, 10%의 fetal bovine serum(FBS)이 함유된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator(Model 3154, Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA)에서 배양하였다. 배지는 24시간마다 교환해주면서 일주일마다 계대 배양을 실시하며 실험에 사용하였다. 세포 배양을

위해 96 well plate에 well당 2.0×10^4 cells/mL로 분주하고, 24시간 후 배지를 버리고 sample을 일정 농도로 희석하여 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 48시간 후 배지로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 용액을 5 mg/mL의 농도로 희석한 후 well당 100 µL를 첨가하여 동일한 조건에서 4시간 동안 더 incubator에 배양한 다음, DMSO에 생성된 formazan을 녹여서 ELISA reader(model 680, Bio-Rad, Tokyo, Japan)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(23).

HT-29 인체 대장암세포에서의 *in vitro* 항암 효과 측정

MTT assay: 한국세포주은행에서 HT-29 인체 대장암세포를 분양받아 실험에 사용하였다. 암세포 배양을 위해 RPMI 1640 medium(GIBCO)에 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin, 10%의 FBS가 함유된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator(Model 3154, Forma Scientific Inc.)에서 배양하였다.

배양한 세포는 96 well plate에 well당 2.0×10^4 cells/mL로 분주하였다. 24시간 후 배지를 제거한 후 sample을 일정 농도로 희석 후에 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양이 끝나면 배지로 5 mg/mL의 MTT 용액을 기존의 배지는 제거한 후 well당 100 µL를 첨가한다. 샘플은 세포를 배양했던 조건에서 4시간 동안 incubator에서 배양한 다음, DMSO를 100 µL 첨가하였다. MTT로 cell에 형성된 formazan을 DMSO로 녹여 보라색을 띠게 한 뒤 ELISA reader(model 680, Bio-Rad)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(23).

RT-PCR을 이용한 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2, p21, p53, cyclin D1, Bcl-2의 mRNA 발현 분석: HT-29 인체 대장암세포를 위와 동일한 방법으로 배양하여 6 well plate

에 well당 1.5×10^6 cells/mL로 분주하고 된장 추출물을 배지에 일정 농도를 희석하여 암세포에 처리한 후 상층액을 모아 원심분리기(1,200 rpm, 3 min, 4°C)로 세포와 배지를 분리하였다. 6 well plate에 부착된 세포는 Trizol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후 Oligo dT primer(Invitrogen Co.)와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 µg의 RNA를 reverse transcription(역전사) 하여 ssDNA로 만들었다. 만들어진 cDNA를 주형으로 이용하여 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2, p21, p53, cyclin D1, Bcl-2 유전자를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 특정 유전자 부위를 증폭하였다. Internal control은 housekeeping 유전자인 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 이용하여 이들의 발현 정도를 비교하였고, 각 유전자의 primer sequence는 Table 1에 표기하였다. PCR은 automatic Bioneer thermocycler(Bioneer, Daejeon, Korea)로 증폭시키고, 증폭된 DNA 산물들을 2% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide(EtBr, Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 SPSS(v18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다. P 값이 5% 미만일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

Table 1. Primer sequences of inflammation, cell cycle and apoptosis related genes used for RT-PCR in HT-29 cells

Gene name		Sequence
TNF- α	Forward	5'-CGGAGTCCGTCGGGCAGGT-3'
	Reverse	5'-GCTGGGTAGAGAATGGATGAACA-3'
IL-6	Forward	5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT-3'
	Reverse	5'-AGGGAAGGCCGGTGGTTGT-3'
COX-2	Forward	5'-GAATCATTACCAGGCAAATTG-3'
	Reverse	5'-TCTGTACTGCGGGTGAACA-3'
p21	Forward	5'-CTCAGAGGAGGCGCCATG-3'
	Reverse	5'-GGGCGGATTAGGGCTTCC-3'
p53	Forward	5'-GCTCTGACTGTACCACCATCC-3'
	Reverse	5'-CTCTCGGAACATCTCGAAGCG-3'
Cyclin D1	Forward	5'-GAGGAGCAGCTCGCCAA-3'
	Reverse	5'-CTGTCAAGGTCCGGCCAGCG-3'
Bcl-2	Forward	5'-CAGCTGCACCTGACG-3'
	Reverse	5'-GCTGGGTAGGTGCAT-3'
GAPDH	Forward	5'-TGACGCTGGACCAATCAG-3'
	Reverse	5'-ACCTCATTGGACTGCATAGC-3'

Table 2. pH, amino-type nitrogen, and ammonium nitrogen contents in doenjang samples

	CD ¹⁾	SD	BD
pH	5.6±0.1 ^a	5.2±0.1 ^b	5.6±0.1 ^a
Amino type nitrogen (mg%)	754.1±11.3 ^c	833.5±18.6 ^b	1,022.0±2.8 ^a
Ammonium nitrogen (mg%)	1.4±0.0 ^b	6.5±0.1 ^a	6.4±0.2 ^a

¹⁾CD: commercial doenjang, SD: soybean doenjang, BD: black soybean doenjang.

Means with the different letters (a-c) in the same row are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

결과 및 고찰

된장의 발효 특성

pH, 아미노태 및 암모니아태 질소 함량: Table 2에서 보는 바와 같이 pH는 CD군과 BD군이 5.6 ± 0.1 이었고, SD군은 5.2 ± 0.1 을 나타내었다. 보통 pH는 발효기간이 오래될수록 낮아지는데 발효기간이 많이 차이가 나지 않아 CD군과 BD군 간의 차이는 보이지 않았다. 하지만 같은 발효기간임에도 SD군은 5.2를 나타내었는데, 이는 일반적인 된장의 pH에 벗어나지 않는 범위로 적절한 품질 상태를 보인다고 할 수 있다(4).

아미노태 질소 함량의 경우 CD군이 754.1 ± 11.3 mg%, SD군이 833.5 ± 18.6 mg%, BD군이 $1,022\pm 2.8$ mg/%로 나타났다. Kim 등(24)의 연구에 의하면 아미노태 질소 함량은 한 달 동안 숙성했을 시 463 mg%를 나타내었다고 한다. 식품공전상 된장의 아미노태 질소 함량의 규격은 160 mg% 이상이므로 모든 시료는 적절한 품질을 가지고 있는 된장으로 볼 수 있다.

암모니아태 질소 함량의 경우 CD군은 1.4 ± 0.0 mg%, SD군은 6.5 ± 0.1 mg%, BD군은 6.4 ± 0.2 mg%로 나타났다. Kim 등(25)의 연구에 따르면 14가지의 시판 된장을 조사했을 때 암모니아태 질소 함량은 1.11~29.25 mg%로 나타났다. 그리고 식품공전상 된장의 암모니아태 함량은 400 mg% 이하인 것을 고려할 때 모든 시료는 적절한 품질을 가지고 있다고 생각된다.

총 폴리페놀 측정

된장의 총 폴리페놀 함량 측정 결과는 Fig. 1과 같다. CD군이 19.7 ± 0.6 mg/L, SD군이 18.4 ± 0.8 mg/L, BD군이 26.6 ± 0.4 mg/L를 나타내었다. BD군이 CD군과 SD군보다 높은 폴리페놀 함량을 나타내었는데, 이는 검정콩 종피의 총 페놀화합물 양이 노란콩 종피의 총 페놀화합물 양보다 많아 이러한 결과가 나온 것으로 생각된다(16). 또한 이러한 총 페놀화합물의 양으로 인해 각 된장마다 다른 항산화 및 항암 활성을 보일 것으로 생각된다. 콩 발효식품에는 gallic acid, protocatechin, catechin 등의 페놀화합물이 있는 것으로 알려져 있고(26), 검정콩 종피에는 anthocyanin, gallic acid, protocatechin, catechin 등의 함량이 노란콩에 비해 많은 것으로 알려져 있다(15,16).

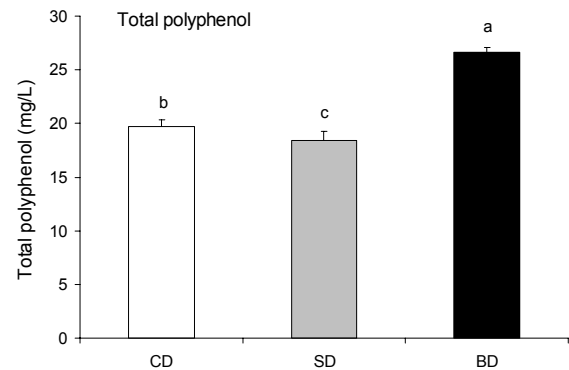


Fig. 1. Total polyphenol contents in doenjang samples. CD, commercial doenjang; SD, soybean doenjang; BD, black soybean doenjang. Means with the different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

DPPH 소거 효과 측정

된장의 DPPH 소거 효과의 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 농도가 증가함에 따라 DPPH 소거 활성은 증가하였으며, 모든 시료군에서 항산화 활성을 보였고 그중 BD군이 모든 농도에서 가장 높은 항산화 활성을 보였다(0.5 mg/mL: $12.2\pm 1.2\%$, 1 mg/mL: $26.4\pm 0.4\%$, 1.5 mg/mL: $30.9\pm 1.1\%$, 2 mg/mL: $48.4\pm 0.8\%$). 1.5 mg/mL 농도에서 검정콩 된장은 CD나 SD보다 항산화 효과를 가지는 것으로 나타났다($P<0.05$). 하지만 노란콩 된장인 CD와 SD는 비슷한 결과를 나타내었다.

된장을 메탄올로 추출하였을 때 대두 속의 항산화 물질인

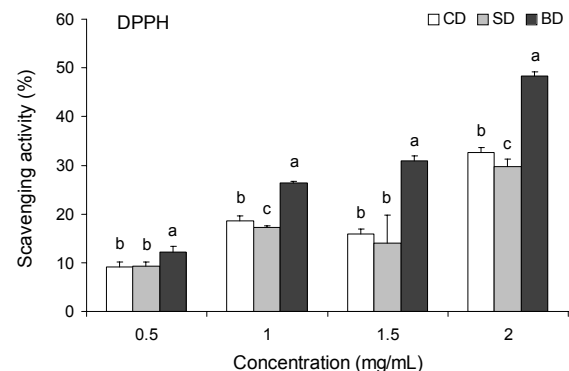


Fig. 2. DPPH scavenging activities of doenjang extracted samples. CD, commercial doenjang; SD, soybean doenjang; BD, black soybean doenjang. Means with the different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P<0.05$) in the same concentration by Duncan's multiple range test.

토코페롤, 페놀산, 아이소플라본 및 대두 및 곡류 등의 분해에 의하여 생성된 아미노산, 펩타이드 성분들, 그리고 용출된 총 페놀화합물과 melanoidin 종류의 항산화 물질이 나오는 것으로 알려져 있으며(2), 그 추출물은 항산화성을 가진다는 보고가 있다(2). 따라서 된장 추출물이 DPPH 소거 효과를 냈다고 볼 수 있으며, 앞서 실험한 폴리페놀의 함량을 볼 때 BD군이 높은 폴리페놀 함량을 보였고 따라서 BD군이 가장 높은 DPPH 소거 활성을 보인 것으로 생각된다.

정상세포(RAW 264.7 cell)를 이용한 된장 메탄올 추출물의 *in vitro* 독성 측정

된장 추출물의 농도별 독성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. RAW 264.7 cells는 식품 추출물의 독성 여부를 확인할 때 자주 이용되는 세포이다(27). 된장추출물의 0.1~0.5 mg/mL의 농도까지는 RAW 264.7 cells의 증식이 억제되지 않았다. 하지만 1 mg/mL의 농도에서는 CD군이 81±3.2%, SD군은 7.4±0.4%, BD군은 7.3±0.5%의 cells만 살아남았다. 따라서 0.1~0.5 mg/mL의 농도까지는 정상세포에 특별한 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

HT-29 인체 대장암 세포에서 *in vitro* 항암 효과 측정

MTT assay: 된장 추출물의 농도별 암세포 성장 억제에

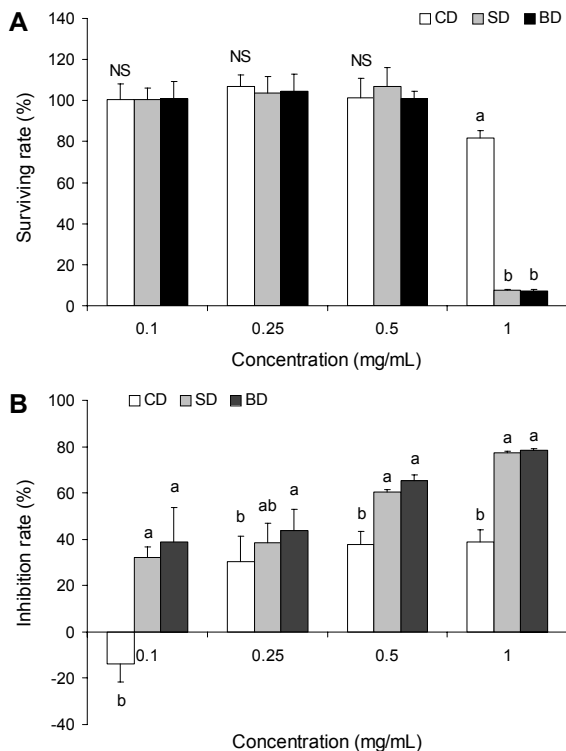


Fig. 3. Anti-proliferative activities of doenjang extracted samples on normal RAW 264.7 (A) and HT-29 human cancer cells (B). CD, commercial doenjang; SD, soybean doenjang; BD, black soybean doenjang. Means with the different letters (a,b) above the bars are significantly different ($P < 0.05$) in the same concentration by Duncan's multiple range test. NS: not significant.

대한 결과는 Fig. 3과 같다. CD군의 0.1 mg/mL 농도를 제외하고 모든 시료와 농도에서 대장암 세포의 성장을 억제하였다. BD군이 0.1 mg/mL 농도에서 38.8±14.7%, 0.25 mg/mL 농도에서 43.7±9.2%, 0.5 mg/mL 농도에서 65.5±2.4%, 1 mg/mL 농도에서 78.3±0.9%의 억제율로 시료 중 가장 높은 성장 억제 효과를 보였다.

SD군은 0.1 mg/mL 농도에서 32.1±4.5%, 0.25 mg/mL 농도에서 38.4±8.6%, 0.5 mg/mL 농도에서 60.4±1.0%, 1 mg/mL 농도에서 77.3±0.9%의 억제율로 BD군보다 조금 낮은 성장억제 효과를 보였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다.

CD군은 0.1 mg/mL 농도에서 -13.8±7.7%, 0.25 mg/mL 농도에서 30.3±10.8%, 0.5 mg/mL 농도에서 37.9±5.7%, 1 mg/mL 농도에서 38.7±5.3%로 가장 낮은 성장억제 효과를 보였다($P < 0.05$). 0.5 mg/mL의 농도에서 비교할 때 BD와 SD는 효과가 크지만 비슷한 결과값을 보였고, CD는 통계적으로 낮은 수치를 보였다($P < 0.05$).

SD군의 경우 CD군에 비해 총 폴리페놀의 함량은 적었고 DPPH 소거 효과에서는 비슷한 수치를 나타내었으나 MTT assay에서 CD군에 비해 높은 항암 효과를 나타내었는데, 이는 죽염을 사용하여 된장을 담았기 때문으로 생각된다(5). CD군의 경우 정제염을 이용하여 된장을 담았는데 Yoon (28)의 연구에서는 된장 제조 시 사용한 소금의 종류에 따라 암세포 성장억제 효과를 관찰했을 때 죽염을 첨가한 된장에서 가장 높은 암세포 성장억제 효과를 관찰하였다. 따라서 이러한 결과가 나온 것으로 생각된다. BD군의 경우 SD군에 비해 다소 높은 항암 효과를 나타내었는데, 이는 검정콩에 함유된 안토시아닌과 총 페놀화합물의 양에 의해 높은 암세포 성장억제 효과를 낸 것으로 생각된다(14).

RT-PCR을 이용한 TNF- α , IL-6, COX-2의 mRNA

발현 분석: TNF- α , IL-6와 COX-2의 mRNA 발현을 측정하였다(Fig. 4). BD군은 Con군과 CD, SD군에 비해 TNF- α , IL-6와 COX-2의 mRNA 발현이 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$). 대장암 세포에 죽염으로 만든 된장을 처리하였을 때 다른 소금으로 만든 된장에 비해 대장암 세포의 TNF- α , IL-6와 COX-2의 발현이 억제된 것을 볼 수 있다(5). 이러한 차이는 죽염의 미네랄 중 K, Mn, Fe, P의 함량이 정제염과 천일염에 비해 많아 이러한 cytokines 유전자의 발현에 영향을 준 것으로 생각된다(29). 또한 안토시아닌은 inflammatory pathway를 조절하는 것으로 알려져 있다(30). 그러므로 TNF- α , IL-6의 발현의 감소는 BD군이 Con군이나 CD, SD군에 비해 염증성 사이토카인의 유전자 발현 단계를 조절하여 이들 사이토카인의 생성을 억제할 수 있음을 의미한다.

대장암 발현에서 COX-2는 매우 중요한 부분을 담당하고 있는 유전자로, COX-2를 억제시키는 물질을 rat에게 투입하면 azoxymethane으로 유도된 rat의 이상함물점(aberrant crypt foci ACF)과 폴립의 형성에 영향을 주는 것으로 알려

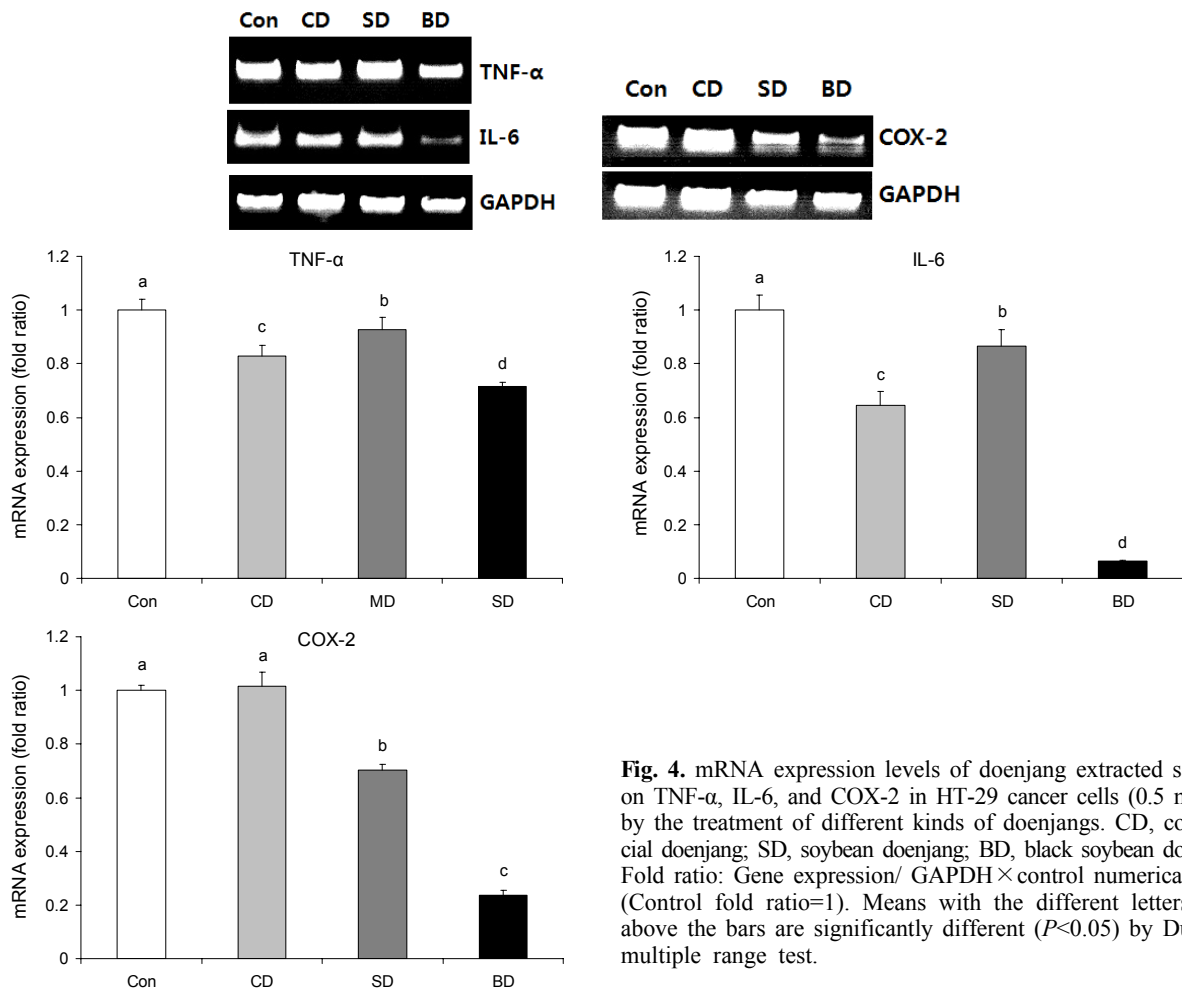


Fig. 4. mRNA expression levels of doenjang extracted samples on TNF- α , IL-6, and COX-2 in HT-29 cancer cells (0.5 mg/mL) by the treatment of different kinds of doenjangs. CD, commercial doenjang; SD, soybean doenjang; BD, black soybean doenjang. Fold ratio: Gene expression/ GAPDH \times control numerical value (Control fold ratio=1). Means with the different letters (a-d) above the bars are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

져 있다(31). 대식세포에서 사이토카인, TNF- α , lipopolysaccharide와 같은 자극은 염증 반응의 전사인자인 NF- κ B를 활성화시키며, 그 결과 COX-2를 발현시켜 nitric oxide와 PGE₂를 생성하여 염증을 일으킨다(32). 또한 COX-2는 염증성 자극에 의해 단시간에 유도되어 발현되며, 염증상황 아래에서 증폭되어 대식세포, 단핵세포 등에 존재하는 효소로 염증, 통증, 발열 등과 관련이 깊은 것으로 알려져 있고, 이로 인해 염증에서 발현되는 암과 관련된 유전자로 알려져 있다(33). 따라서 BD군이 Con군이나 CD, SD군에 비해 염증관련 유전자 발현 단계를 조절하여 염증반응을 억제할 수 있음을 의미하며, 대장암의 증상완화에 효과적일 수 있다고 말할 수 있다.

대장암을 유발한 쥐에게 검정콩 외피를 섭취하였을 때에 노란콩에 비해 대장조직에서 COX-2의 발현을 억제시켰는데(34), 검정콩의 안토시아닌으로 인해 이를 억제하는 것으로 보고되었다(15).

RT-PCR을 이용한 p21, p53, cyclin D1, Bcl-2의 mRNA 발현 분석: p21, p53, cyclin D1과 Bcl-2의 발현 결과는 Fig. 5와 같다. BD군은 Con군과 CD군에 비해 p21과 p53의 mRNA 발현이 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$).

Cyclin D1은 SD군이 가장 낮은 발현을 나타내었다($P < 0.05$). 하지만 BD군도 Con군과 CD군에 비해 낮은 cyclin D1의 발현을 나타내었다($P < 0.05$). p21은 DNA 손상에 의한 종양억제 유전자 p53에 의해 조절을 받으며, 이는 세포주기 전반에서 세포증식을 억제하는 세포주기와 연관된 가장 중요한 조절인자로 알려져 있다. 또한 여러 cyclin/CDK complex를 억제하여 세포 각 주기에 작용하는 광범위한 inhibitor이며 p53의 하위 target effector로 알려져 있다. p53은 암세포 생성을 억제하는 유전자로 알려져 있으며 인체조직에 발생하는 절반 이상의 암종에서 변형되어 나타나는 것으로 밝혀져 있다(35). 대장암이 발현된 쥐에서 죽염으로 만든 된장이 다른 소금으로 만든 된장에 비해 p21, p53의 발현이 높아졌다고 한다(36). 또한 안토시아닌은 p53을 조절하여 apoptosis를 유도하고(37), 정상세포에는 영향을 끼치지 않지만 암세포에는 p21, p53과 cyclin D1을 조절하여 암세포 활성을 억제한다고 한다(38). 따라서 BD군에서 p21과 p53의 발현이 증가한 것과 cyclin D1의 발현이 줄어든 것은 된장 속의 죽염과 안토시아닌에 의해 암세포 증식을 억제하였다고 생각한다.

Bcl-2는 BD군이 Con군과 CD, SD군에 비해 가장 낮은

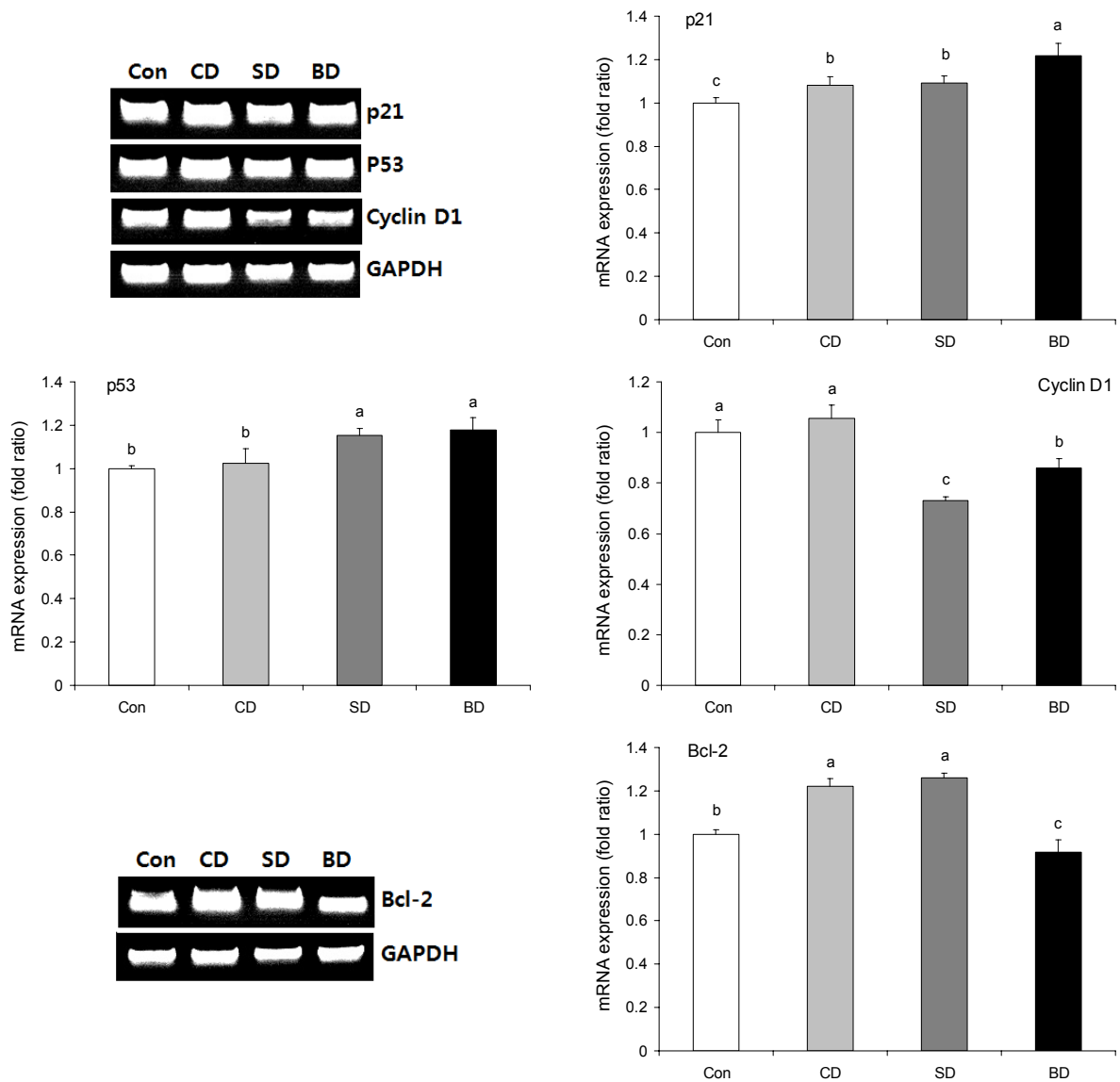


Fig. 5. mRNA expression levels of doenjang extracted samples on p21, p53, cyclin D1, and Bcl-2 in HT-29 cancer cells (0.5 mg/mL) by the treatment of different kinds of doenjangs. CD, commercial doenjang; SD, soybean doenjang; BD, black soybean doenjang. Fold ratio: Gene expression/ GAPDH×control numerical value (Control fold ratio=1). Means with the different letters (a-d) above bars are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

발현을 보였다. Bcl-2 family에 속하는 유전자는 apoptosis를 직접적으로 유발하거나 억제하는 데 관여하며, 그들 사이의 상대적인 유전자 발현의 양적 차이에 의해 apoptosis 유발 여부가 결정된다(39). 대장암이 유도된 쥐에서 죽염으로 만든 된장을 먹인 쥐가 다른 소금으로 만든 된장을 먹인 쥐보다 Bcl-2의 mRNA 발현이 낮아졌다고 한다(35). 하지만 본 실험에서는 CD군과 SD군이 Con군에 비해 mRNA의 발현이 증가되었다. 그리고 BD가 Con에 비해 낮아진 것은 검정콩의 안토시아닌에 의해 발현이 억제된 것으로 생각되며, 안토시아닌이 HCT-116 인체 결장암 세포의 Bcl-2 발현을 낮추는 것으로 연구되어 있다(40).

따라서 된장을 담을 때 어떤 종류의 재료를 사용했는지에

따라 된장의 항암 기능성이 달라진다고 볼 수 있으며, 검정콩 된장에 대한 *in vivo* 실험과 발효기간을 달리한 검정콩 된장에 관련된 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

시료 된장의 pH, 아미노태, 암모니아태 수치는 각 군 간 특별한 차이는 보이지 않았다. 검정콩 된장이 가장 높은 폴리페놀 농도, DPPH를 이용한 항산화 효과를 보였다. 된장 추출물은 0.1~0.5 mg/mL 범위까지는 RAW 264.7 cells의 증식을 억제하지 않았으며, HT-29를 이용한 MTT에서 BD군이 가장 높은 암세포 성장 억제율을 보였다. HT-29에서

pro-inflammatory cytokine인 TNF- α , IL-6와 염증관련 인자 COX-2의 mRNA 발현은 시료 처리군에서 대조군에 비해 낮은 수치를 나타냈으며 BD군에서 가장 낮은 수치를 보였다($P < 0.05$). 세포 증식에 관여하는 p21, p53과 cyclin D1의 mRNA 발현은 p21과 p53가 BD군에서 발현이 증가하였고, cyclin D1은 BD군에서 낮아졌다. Apoptosis 관련 유전자인 Bcl-2는 BD군이 가장 낮은 발현을 보였다. 이상의 결과로 BD군은 CD, SD군에 비해 높은 폴리페놀 농도, 항산화 효과, 대장암세포에서 pro-inflammatory cytokines과 세포 증식에 관여하는 유전자 등을 조절한다. 이 결과는 아마도 서목태 된장의 높은 총 페놀화합물의 양과 안토시아닌의 함량으로 얻어진 결과로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 NCEED(인하대학병원 국가지정 소화기질환 의료제품 유효성평가 서비스센터)의 지원으로 이루어졌음에 감사를 드립니다.

REFERENCES

- Kwak EJ, Park WS, Lim SI. 2003. Color and quality properties of *doenjang* added with citric acid and phytic acid. *Korean J Food Sci Technol* 35: 455-460.
- Kim MH, Im SS, Yoo YB, Kim GE, Lee JH. 1994. Antioxidative materials in domestic Meju and Doenjang: 4. Separation of phenolic compounds and their antioxidative activity. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 792-798.
- Kim MJ, Rhee HS. 1990. Studies on the changes of taste compounds during soy paste fermentation. *Korean J Soc Food Sci* 6: 1-8.
- Jeong JK. 2012. Improvement of quality and probiotic effect of meju and doenjang prepared with mixed starter cultures. *PhD Dissertation*. Pusan National University, Busan, Korea. p 141-151.
- Shim JH, Park ES, Kim IS, Park KY. 2015. Antioxidative and anticancer effects of doenjang prepared with bamboo salt in HT-29 human colon cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 524-531.
- Jeong JK, Chang HK, Park KY. 2012. Inhibitory effects of meju prepared with mixed starter cultures on azoxymethane and dextran sulfate sodium-induced colon carcinogenesis in mice. *J Carcinog* 11: 13.
- Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. 1993. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: anti-tumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem* 41: 1961-1967.
- Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm* 2007: 45673.
- Ungar Y, Osundahunsi OF, Shimoni E. 2003. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 51: 4394-4399.
- Guo JM, Xiao BX, Liu DH, Grant M, Zhang S, Lai YF, Guo YB, Liu Q. 2004. Biphasic effect of daidzein on cell growth of human colon cancer cells. *Food Chem Toxicol* 42: 1641-1646.
- Lim SY, Park KY, Bae MS, Kim KH. 2009. Effect of doenjang with black soybean on cytokine production and inhibition of tumor metastasis. *J Life Sci* 19: 264-270.
- Son JH, Choung MG, Choi HJ, Jang UB, Son GM, Byun MW, Choi C. 2001. Physiological effect of Korean black soybean pigment. *Korean J Food Sci Technol* 33: 764-768.
- Liao HF, Cou CJ, Wu SH, Khoo KH, Chen CF, Wang SY. 2001. Isolation and characterization of an active compound from black soybean [*Glycine max* (L.) Merr] and its effect on proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Anticancer Drugs* 12: 841-846.
- Kwon SH, Ahn IS, Kim SO, Kong CS, Chung HY, Do MS, Park KY. 2007. Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins. *J Med Food* 10: 552-556.
- Khan HMS, Akhtar NAVEED. 2012. Determination of antioxidant activity and total anthocyanin. *Asian J Chem* 24: 2829-2830.
- Žilić S, Akillioğlu HG, Serpen A, Perić V, Gökmen V. 2013. Comparisons of phenolic compounds, isoflavones, antioxidant capacity and oxidative enzymes in yellow and black soybeans seed coat and dehulled bean. *Eur Food Res Technol* 237: 409-418.
- Hangen L, Bennink MR. 2002. Consumption of black soybeans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutr Cancer* 44: 60-65.
- Park SK, Seo KI, Shon MY, Moon JS, Lee YH. 2000. Quality characteristics of home-made doenjang, a traditional Korean soybean paste. *Korean J Soc Food Sci* 16: 121-127.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 28: 25-30.
- Dewanto V, Wu X, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 4959-4964.
- Pratt DE, Birac PM. 1979. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J Food Sci* 44: 1720-1722.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Park KT, Kim MY, Chun SS. 2009. Quality characteristics of Korean wheat wet noodles with pomegranate cortex powder. *Korean J Culinary Res* 15: 128-136.
- Kim HL, Lee TS, Noh BS, Park JS. 1999. Characteristics of the stored samjangs with different doenjangs. *J Korean Food Sci Technol* 31: 36-44.
- Kim YS, Kim JY, Choi HS. 2011. Quality characteristics of commercial rice soybean paste. *Korean J Food Preserv* 18: 853-858.
- Cho KM, Hong SY, Math RK, Lee JH, Kambiranda DM, Kim JM, Islam SMA, Yun MG, Cho JJ, WJ Lim WJ, Yun HD. 2009. Biotransformation of phenolics (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the fermentation of *cheonggukjang* by *Bacillus pumilus* HY1. *Food Chem* 114: 413-419.
- Hong Y, Park S, Yoon BY, Choi BD, Choi YJ. 2011. Screen of functional activity of polysaccharide and glycosaminoglycan from sea hare (*Aplysia kurodai*) by cell line. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 14-19.
- Yoon HH, Kim IC, Chang HC. 2012. Growth inhibitory effects of *Doenjang*, prepared with various solar salts, on can-

- cer cells. *Korean J Food Preserv* 19: 278-286.
29. Zhao X. 2011. Anticancer and antiinflammatory effects of bamboo salt and *Rubus coreanus* Miquel bamboo salt. *PhD Dissertation*. Pusan National University, Busan, Korea. p 65-75.
 30. Prasad S, Phromnoi K, Yadav VR, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. *Planta Med* 76: 1044-1063.
 31. Watanabe K, Kawamori T, Nakatsugi S, Wakabayashi K. 2000. COX-2 and iNOS, good targets for chemoprevention of colon cancer. *Biofactors* 12: 129-133.
 32. Cosme R, Lublin D, Takafuji V, Lynch K, Roche JK. 2000. Prostanoids in human colonic mucosa: effects of inflammation on PGE₂ receptor expression. *Hum Immunol* 61: 684-696.
 33. Kim KB, Lee EG, Choi OH, Song CH, Jeong JM. 2007. Inhibitory effects of phyto-extract mixture (PEM381) on type I allergic reaction. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 155-162.
 34. Kim JM, Kim JS, Yoo H, Choung MG, Sung MK. 2008. Effects of black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seed coats and its anthocyanidins on colonic inflammation and cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *J Agric Food Chem* 56: 8427-8433.
 35. Pietenpol JA, Stewart ZA. 2002. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181-182: 475-481.
 36. Shim JH. 2015. The colon cancer preventive effect of bamboo-salt doenjang in C57BL/6J mice. *MS Thesis*. Pusan National University. Busan, Korea. p 68-70.
 37. Lazzè MC, Savio M, Pizzala R, Cazzalini O, Perucca P, Scovassi AI, Stivala LA, Bianchi L. 2004. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis* 25: 1427-1433.
 38. Wang LS, Stoner GD. 2008. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett* 269: 281-290.
 39. Park DH, Lee ST, Jun DY, Lee JY, Woo MH, Kim KY, Seo MC, Ko JY, Woo KS, Jung TW, Kwak DY, Nam MH, Kim YH. 2014. Comparative evaluation of antioxidant activities of ethanol extracts and their solvent fractions obtained from selected miscellaneous cereal grains. *J Life Sci* 24: 26-38.
 40. Shin DY, Lee WS, Lu JN, Kang MH, Ryu CH, Kim GY, Kang HS, Shin SC, Choi YH. 2009. Induction of apoptosis in human colon cancer HCT-116 cells by anthocyanins through suppression of Akt and activation of p38-MAPK. *Inter J Oncol* 35: 1499-1504.