


Inhibitory Effects of Soyasaponins on Antigen-induced Degranulation in RBL-2H3 Cells

Seung Hwan Yang · Jung A Lee · Jae Yeon Lee · Eun-Kyung Ahn · Tai-Sun Shin · Chigen Tsukamoto · Gyuhwa Chung* · Joo-Won Suh* 

Soyasaponin의 RBL-2H3 세포에서 탈과립화 억제 효과

양승환 · 이정아 · 이재연 · 안은경 · 신태선 · 쨌깁 쨌카모토 · 정규화* · 서주원*

Received: 1 July 2015 / Accepted: 5 August 2015 / Published Online: 30 September 2015

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2015

Abstract Soyasaponins are glycosylated, which gives rise to a wide diversity of structures and functions. We evaluated for inhibitory effects of 4 soyasaponins on antigen-induced degranulation in RBL-2H3 Cells. 4 soyasaponins had shown dose-dependently inhibited histamine and β -hexosaminidase.

Keywords allergic reaction · β -hexosaminidase · degranulation · RBL-2H3 Cells · soyasaponins

S. H. Yang and J. A. Lee contributed equally.

S. H. Yang · J.-W. Suh
Center for Nutraceutical and Pharmaceutical Materials, Myongji University, Yongin, Gyeonggi 449-728, Republic of Korea

J. A. Lee · J. Y. Lee · E.-K. Ahn
Bio-center, Gyeonggi Institute of Science and Technology Promotion, Suwon, Gyeonggi 443-270, Republic of Korea

T.-S. Shin
Division of Food & Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea

C. Tsukamoto
Department of Applied Biological Chemistry, Iwate University, Morioka, Iwate 020-8550, Japan

G. Chung
Department of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550-749, Republic of Korea

J.-W. Suh
Division of Bioscience and Bioinformatics, Myongji University, Gyeonggi 449-728, Republic of Korea

*Corresponding authors
(J.-W. Suh: jwsuh@mju.ac.kr; G. Chung: chung@chonnam.ac.kr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

현대사회의 서구화된 식생활과 생활환경의 변화, 각종 환경 오염 증가 그리고 유전적 요인 등의 복합적인 원인에 의해 알레르기 질환이 해마다 증가하고 있다(Ebo 등, 2001; Alma 등, 2008). IgE가 관여하여 일어나는 제 1형 과민반응은 즉시형 알레르기 반응으로 불리우며, 아토피 피부염, 천식, 알레르기 비염 등을 포함하는 가장 흔한 만성 면역계 질환이다. 비만세포는 대부분의 알레르기 질환에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다. 알레르기 반응은 IgE가 비만세포의 표면 수용체(high-affinity receptor for IgE, Fc ϵ RI)와 결합되어 있어 알레르기 원인물질인 항원이 재차 유입되게 되면 비만세포 표면의 고친화성 IgE 수용체(Fc ϵ RI)에 항원이 결합하게 된다. 이때 비만세포가 활성화가 되면 비만세포의 탈과립이 유도되어 과립내 존재 하던 히스타민, 사이토카인 그리고 케모카인과 같은 알레르기 유발 물질들이 세포 밖으로 분비되어 알레르기 반응을 일으키게 된다(Huang 등, 2008; Toshio, 2012).

그러므로 탈과립 억제를 통한 비만세포 활성화 조절은 알레르기 반응의 예방과 치료에 중요한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

콩은 우리나라뿐만 아니라 전세계적으로 다양한 전통 및 가공식품으로 이용되고 있으며, 단백질, 지방 등의 함량이 높고 isoflavone 및 soyasaponin 같은 생리활성물질들이 다량 함유되어 있다. 콩의 대표적 생리활성 물질로 isoflavone 이 많이 알려져 있으나, 최근 콩에 함유된 soyasaponin의 혈중 콜레스테롤 감소효과, 항산화활성, 항바이러스, 간독성 물질제거, 항종양활성, 면역증진 효과 등 여러 생리활성 기능이 밝혀지면서 신규 식의 약 소재로 많은 주목을 받고 있다.

콩 종실에 포함된 soyasaponin은 품종, 재배연도, 재배지역 및

성숙기에 따라서 건물 중 기준으로 0.66.5%가 함유되어 있으며, 부위별로 볼 때 자엽에 0.20.3%, 배아에 약 2% 함유된 것으로 알려져 있다.

Soyasaponin은 비배당체(aglycone)인 soyasapogenol A, B, E 및 DDMP(2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4Hpyran-4-one)과 이들이 부착되는 당에 의하여 다양하게 분류 된다. Soyasaponin은 크게 A, B, E 계열로 구분되며, A계열을 Aa, Ab, Ad, Ae, Af로, B계열은 DDMP가 부착된 α g, β g, β a, γ g, γ a와 DDMP가 부착되지 않은 Ba, Bb, Bb', Bc로, E계열은 Bd와 Be로 구분한다. 하지만, 학자들에 따라 조금씩 다르게 명명되기도 한다.

A계열 soyasaponin은 종실의 배 부분에만 존재하고 항 영양적 요소로 콩가공식품의 쓴맛, 떫은맛 등의 불쾌한 맛을 나타내고 소화율을 감소시키는 원인으로 알려져 있다. B계열 soyasaponin은 배와 자엽에 존재하고, 콩이 나타내는 대부분의 생리활성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, B계열 soyasaponin 중에서도 DDMP 사포닌이 중요하게 평가되고 있다(Yang 등, 2015).

콩 배아에 다량 함유되어있는 isoflavone, soyasaponin, 불포화지방산이 떫고 쓴맛과 더불어 콩 특유의 비린내를 유발, 기호성을 저하시키므로 식품제조업체에서는 목적에 따라 종피와 배아를 제거하고 자엽으로만 가공제품을 생산하기도 한다. 제품 생산과정에서 발생하는 콩 껍질 및 배아와 같은 부산물은 가축의 사료나 퇴비 등으로 활용되고 있으나 그 이용도가 극히 제한적이어서 대부분은 폐기물로 처리되어 추가적 비용을 발생시키고, 각종 환경오염을 유발하여, 사회적인 문제점으로 지적되고 있다.

따라서, 콩제품의 제조과정에서 발생하는 부산물 또는 폐액 등에서 isoflavone 또는 soyasaponin을 분리하여 산업소재화하고자 하는 각종 연구가 수행되었으나, 이 두 물질을 동시에 분리할 수 있는 방법을 제시하지는 못하였다.

따라서, 본 연구에서는 콩의 가공과정에서 발생하는 종피와 배아 등의 혼합 부산물로부터 배아를 별도로 분리하고, 이로부터 isoflavone과 soyasaponin을 동시에 분리할 수 있는 기술을 연구, 개발하였으며, 분리된 soyasaponin 4종(Aa, Ab, β g, DDMP)에 대한 생리활성 연구와 알레르기 반응에 중요한 역할을 하는 비만세포의 탈과립 억제 효과를 확인하였다.

본 실험에 사용한 4종의 soyasaponin은 잘 건조된 콩에서 껍질을 제거한 후 hypocotyl을 분리하여 분말화하였다. hypocotyl 분말 20 g에 80% methanol 200 mL을 가하고 24시간 동안 실온에 방치하여 saponin을 추출하였다. 추출물은 감압하에서 회전농축기를 사용하여 완전히 건조하고 이를 다시 증류수 200 mL과 butanol 200 mL 혼합용액에 완전히 녹여서 24시간 방치하였다. Butanol층을 물층에서 분리하여 회전농축기를 이용하여 완전히 건조하였다. 이들 시료는 30% acetonitrile에 용해하여 50 mL로 정용하고 0.20 μ m membrane filter로 여과 후 high-performance liquid chromatography (HPLC) 시료로 사용하였다.

HPLC는 Shimadzu LC-20AD pump, CTO-20AC oven, Sil-20AC auto-sampler, SPD-M20A photodiode array detector, CBM-20A system controller, FRC-10A fraction collector, LC Workstation software로 구성하여 saponin을 분리하였다. column은 ODS 계열의 Shim-pack Phenomenex (21.20×250 mm)를 사용하였다. 이동상은 A용액 acetonitrile과 B용액(30:70=acetonitrile:0.025% trifluoroacetic acid)를 사용하여 B용매를 0

분에서 90%으로 시작하여 50분에 50%으로 감소시키고 60분까지 50%를 유지한 후 60분에서 61분까지 90%로 증가시켜 15분간 유지하여 column을 95% B용액에 평형화였다. 이동상 유속은 7.0 mL/min로 조절하고 injection volume 200 μ L 주입하며 PDA detector의 파장은 209 nm를 사용하며 완전분리 유무는 SPD-M20A photodiode array detector를 이용하여 확인하였다.

Saponin 조성물의 HPLC 분석은 Shimadzu LC-20AD pump, CTO-20AC oven, Sil-20AC auto-sampler, SPD-M20A photodiode array detector, CBM-20A system controller, FRC-10A fraction collector, LC Workstation software로 구성하여 saponin을 분리하였다. Column은 ODS 계열의 Shim-pack Phenomenex (21.20×250 mm)를 사용하였다. 이동상은 A용액 acetonitrile과 B용액(30:70=acetonitrile:0.025% trifluoroacetic acid)를 사용하여 B용매를 0분에서 90%으로 시작하여 50분에 50%으로 감소시키고 60분까지 50%를 유지한 후 60분에서 61분까지 90%로 증가시켜 15분간 유지하여 column을 95% B용액에 평형화였다. 이동상 유속은 7.0 mL/min로 조절하고 injection volume 200 mL 주입하며 PDA detector의 파장은 209 nm를 사용하며 완전분리 유무는 SPD-M20A photodiode array detector를 이용하여 확인하였다(Fig. 1).

분리된 4종의 soyasaponin의 RBL-2H3 세포에서 세포 생존율 및 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay를 실시하였다. RBL-2H3 세포를 96 well plate에 1×10^4 /well 세포수로 분주하여 soyasaponin 4종을 각각 농도별(0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mM)로 24시간 처리하여 세포 생존율을 측정된 결과 soyasaponin 4종 모두 모든 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다(Supplementary Fig. 1). β -Hexosaminidase는 천식이나 알레르기 비염과 같은 알레르기 반응에 의해 비만세포나 호염구의 과립 안에 저장되어 있던 히스타민을 세포 밖으로 분비하므로 탈과립의 측정 지표로 많이 사용되며 알레르기 억제물질의 생리활성 측정에 유용하게 이용되고 있다(Galli 등, 2005; Xia 등, 2014). 항원-항체 반응에 의한 β -hexosaminidase 분비에 미치는 영향을 확인하기 위하여 ATCC (American Type Culture Collection, USA)에서 구입한 RBL-2H3 세포를 15% Fetal Bovine Serum을 포함하는 MEM 배지를 넣고 37°C 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 2×10^5 /well의 세포수로 24시간 배양 후 상등액을 제거하고 anti-DNP IgE (25 ng/mL)로 4시간 동안 감작한 후 PIPES 완충용액(25 mM PIPES, 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 40 mM NaOH, 5.6 mM glucose, 0.1% BSA)으로 세척하고 10분 동안 반응시켰다. soyasaponin을 25, 50, 그리고 100 mM 농도로 20분간 처리 후 50 ng/mL DNP-BSA를 20분간 반응시킨 후 얼음 위에 두어 반응을 정지시켰다. 탈과립에 의해 세포 밖으로 분비된 β -hexosaminidase 양을 측정하기 위해 96 well plate에 상등액과 1 mM p-니트로페닐- β -D-글루코사미나이드를 동량으로 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 0.1 M citrate buffer를 넣어 반응을 종결시켰다. β -Hexosaminidase 분비에 미치는 soyasaponin의 효과를 IC₅₀값으로 확인해 본 결과 soyasaponin Aa는 94.01 mM, soyasaponin Ab는 54.36 mM, soyasaponin bg는 56.66 mM, soyasaponin DDMP는 38.15 mM로 soyasaponin 4종 중 soyasaponin DDMP가 비만세포의 탈과립 억제 효능이 가장 우수한 것으로 나타났다. 대조군으로 사용한 ketotifen fumarate (Morikawa 등, 2010; Hong과 Oh, 2012)의 IC₅₀값은 38.77 mM로 나타났다.

Soyasaponin의 각 농도별 억제율은 Table 1에 나타냈으며 농

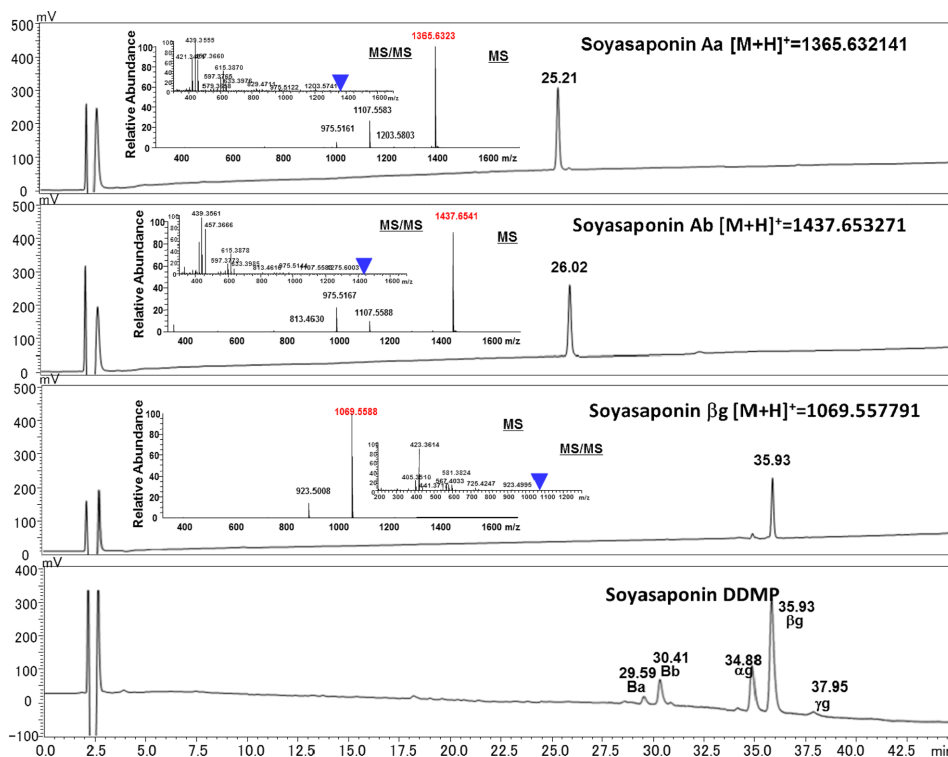


Fig. 1 Chromatogram of soybean hypocotyl; solid peaks present fraction cuts. 1, Aa; 2, Ab; 3, bg; 4, DDMP.

도 의존적으로 억제 효과를 보였다. 또한 알레르기 즉시반응의 지표인 탈과립에 대한 억제효과를 확인하기 위해 탈과립 후 유리되는 대표물질인 histamine 분비능을 측정하였다. β-Hexosaminidase assay 측정과 동일한 방법으로 histamine 분비를 유도한 후 상등액 25 mL와 0.1 N HCl 22.5 mL, 60% HClO₄ 2.5 mL를 혼합하여 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액 40 mL를 취해 5 N NaOH 25 mL, *n*-butanol 500 mL와 NaCl 0.06 g을 넣고 진탕하여 원심 분리하였다. 분리된 Butanol층에 0.1 N HCl 용액과 *n*-heptan을 넣어 원심분리를 통해 물층을 얻고, 얻어진 물층에 다시 1 N NaOH와 OPT (*o*-phthaldialdehyde) 용액을 혼합하여 37°C에서 반응시킨 후 3N HCl 용액을 넣고 반응하여 fluorometer (Victor³, perkin Elmer, USA)를 통해 360 nm (excitation)와 450 nm (emission)에서 형광값을 측정하였다(Kwon과 Song, 2012). 4종의 soyasaponin이 histamine 분비에 미치는 영향을 확인해 본 결과 soyasaponin

Aa는 25 μM에서 62.42%, 50 mM에서 62.95%, 100 mM에서 69.18%의 억제 효능을 보였고 soyasaponin Ab는 25 mM에서 2.15%, 50 mM에서 58.85%, 100 mM에서 70.83%의 억제 효능을 보였다. 또한 soyasaponin bg는 25 mM에서 1.53%, 50 mM에서 57.94%, 100 mM에서 76.52%의 억제 효능이 있었고 soyasaponin DDMP 의 경우 25 mM에서 73.8%, 50 mM에서 74.79%, 100 mM에서 79.40%로 억제 효과를 보였고 농도의존적으로 유의성 있는 결과를 나타내었다. 그리고 β-hexosaminidase assay 효능과 마찬가지로 soyasaponin 4종 중 soyasaponin DDMP 가 histamine 분비 억제 효과 또한 가장 우수한 것으로 나타났다(Fig. 2). 대조군으로 사용한 ketotifen fumarate는 25 mM에서 47.34%, 50 mM에서 77.91%, 100 mM에서 81.50%로 나타났다. 이러한 결과를 통하여 soyasaponin 4종은 RBL-2H3 세포에서 세포독성이 없으며 β-hexosaminidase와 histamine 분비를 억제함으로써 항알레르기 효능을 가지는 것으로 사료된다.

Table 1 The inhibitory effect of soyasaponin on release of β-hexosaminidase from RBL-2H3 cells

	Inhibition (%)			IC ₅₀ (μM)
	25 μM	50 μM	100 μM	
Soyasaponin Aa	21.13±2.10	26.62±6.81**	53.21±3.68**	94.01
Soyasaponin Ab	28.49±1.72*	54.11±2.19**	74.89±4.71**	54.36
Soyasaponin βg	29.51±2.72**	44.26±8.06***	79.59±1.46***	56.66
Soyasaponin DDMP	43.68±9.39***	56.35±4.23***	75.26±5.17***	38.15
Ketotifen	41.44±3.50***	68.17±3.70***	94.54±0.85***	38.77

Data are expressed as mean ± SD, where **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 was considered statistically significant.

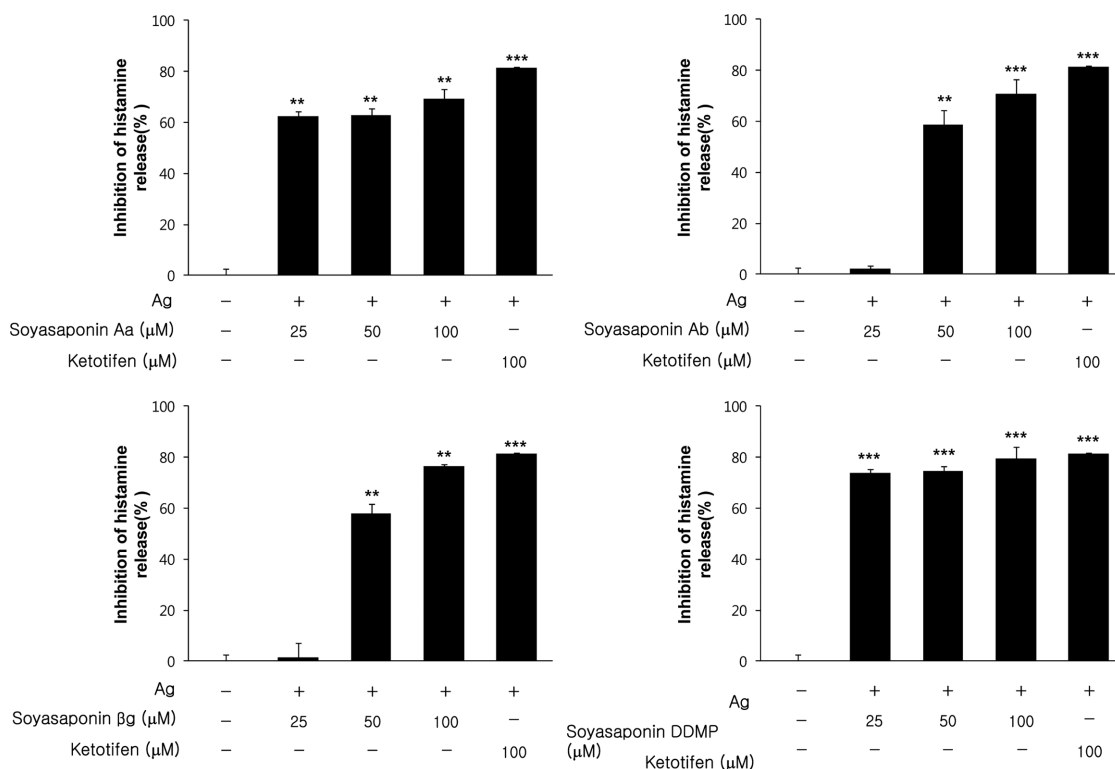


Fig. 2 Effect of soyasaponin on the histamine release in RBL-2H3 cells. Cells were grown on 24 well plates (2×10^5 cells/well) and sensitized overnight with 25 ng/mL of DNP-specific IgE. The IgE-sensitized cells were pre-incubated and then exposed to the compounds for 1hr. After incubation, cells were stimulated with 50 ng/mL of DNP-BSA for 1hr. The fluorescence intensity was measured with excitation at 360 nm and emission at 450 nm with a fluorometer. Data are expressed as mean \pm SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ was considered statistically significant.

초 록

본 연구에서는 콩의 배축(hypocotyls)에서 분리된 4종의 soyasaponin (Aa, Ab, βg, DDMP)에 대해 RBL-2H3 세포를 이용하여 항알레르기 활성을 확인하고자 하였다. RBL-2H3 세포에서 soyasaponin 화합물들의 세포독성을 확인해 본 결과, 4종 모두 세포독성이 없었고 β-hexosaminidase assay를 통해 비만세포의 탈과립 억제 효능을 확인해 본 결과 대조군으로 사용한 Ketotifen fumarate (IC_{50} : 38.77 mM)와 비교하여 4종 모두 β-hexosaminidase 억제 효능이 있는 것을 확인하였다. 또한, soyasaponin 화합물들은 RBL-2H3 세포에서 탈과립 후 유리되는 대표적인 물질인 histamine의 분비 억제에도 효능이 있음을 확인하였고 이 중 Soyasaponin DDMP가 가장 효능이 우수한 것으로 판단된다.

Keywords 베타-헥소사미니다아제 · 소야사포닌 · 알레르기 반응 · 탈과립화 · RBL-2H3 세포

감사의 글 본 연구는 농촌진흥청 연구사업 (세부과제번호: PJ01128901)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

Alma JN, Ferdi E, Leon MK, Johan G, Frans PN, and Frank AR (2008) Mechanisms of allergy and asthma. *Eur J Pharmacol* **585**, 354–60.

- Ebo DG and Strvens WJ (2001) IgE-mediated food allergy-extensive review of the literature. *Acta Clin Belg* **56**, 234–47.
- Galli SJ, Nakae S, and Tsai M (2005) Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* **6**, 135–42.
- Hong SS and Oh JS (2012) Inhibitors of antigen-induced degranulation of RBL-2H3 cells isolated from wheat bran. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **55**, 69–74.
- Huang H, Tong X, Deng H, Fu L, and Zhang R (2008) Inhibition of the antigen-induced activation of RBL-2H3 cells by gab2 siRNA. *Cell Mol Immunol* **5**, 433–8.
- Kwon HS and Song CH (2012) Effect of *Scutellaria barbata* pharmacopuncture extract on degranulation and inflammatory mediator release in RBL-2H3 cells. *Korean J Acupunct* **29**, 406–20.
- Morikawa T, Xu F, Matsuda H, and Yoshikawa M (2010) Structures of novel norstilbene dimer, longusone A, and three new stilbene dimers, longusols A, B, and C, with antiallergic and radical scavenging activities from Egyptian natural medicine *Cyperus longus*. *Chem Pharm Bull* **58**, 1379–85.
- Toshio T (2012) Efficacy of Flavonoids for patients with Japanese Cedar Pollinosis. *Current Insights in Pollen Allergens* **103**, 1–22.
- Xia S, Jiang J, Shim DW, Kim TK, Kang TB, and Lee KH (2014) Anti-allergic effect of ethanolic extract of *Flos Sophora japonica* L. on Ca^{++} ionophore stimulated murine RBL-2H3 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **43**(3), 349–54.
- Yang SH, Ahn EK, Lee JA, Shin TS, Tsukamoto C, Suh JW et al. (2015) Soyasaponins Aa and Ab exert an anti-obesity effect in 3T3-L1 adipocytes through downregulation of PPAR α . *Phytother Res* **29**(2), 281–7.