

Effect of Soybean Fallen Leaves Ethanolic Extract on Expression of Proteins Related to Antioxidant Activity and Cell Invasion

Chaeun Song, Su-Gyeong Lee, Sugyeong Hong, Zoon Ha Ryu, Moon-Moo Kim and Yunghee Oh*

Department of Chemistry, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received January 29, 2016 / Revised March 4, 2016 / Accepted March 5, 2016

Soybean leaves, a Korean edible plant material, have been reported to prevent the development of osteoporosis and breast cancer. Based on this rationale, soybean fallen leaves ethanolic extract (SBFL) was used for the experiment of cell invasion related to metastasis and antioxidant activity. The effect of SBFL on matrix metalloproteinases (MMPs) in human fibrosarcoma cells, HT1080 as well as its antioxidant activity was investigated in this study. The effect of SBFL on scavenging activity of reactive oxygen species was evaluated *in vitro* using lipid peroxidation assay, DPPH radical and reducing power assay. SBFL showed the positive effects on antioxidant activity, compared with vitamin C and vitamin E used as positive controls. Furthermore, SBFL showed cytotoxicity above 16 µg/ml in MTT assay. In particular, it was found that SBFL decreased the activation of MMP-9 stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and phenazine methosulfate (PMS). SBFL treatment increased the expression levels of *p*-FoxO-1 and SOD-1. Moreover, SBFL inhibited cell invasion stimulated by vascular endothelial growth factor (VEGF). These results indicate that SBFL could inhibit cell invasion related to the activation of MMP-9 and oxidative stress, suggesting that it could be available as a main ingredient for prevention of metastasis.

Key words : HT1080, MMP-9, *p*-FoxO-1, SOD-1, soybean fallen leaves

서론

활성산소는 생체내의 조직에 독성을 일으켜 인체의 노화와 질병을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 주로 hydroxyl radical, superoxide anion radical, 과산화수소 등의 자유기 형태로 존재하며 생체분자의 산화를 유발시킨다[4, 15]. 생체 내에서는 이러한 활성산소 종의 발생을 억제하기 위해 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase (GPx) 및 glutathione S-transferase (GST) 등이 산화방어기능이 특이적으로 작용하며, 활성산소의 홀 전자를 제거하여 산화적 스트레스로부터 인체를 보호하고 있다[2]. 최근에 활성산소는 세포의 기질에서 분해와 염증, 관절염, 심혈관 질환, 순환계 질환 그리고 암을 포함한 병리학적인 과정에서 중요한 역할을 담당하는 필수적인 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)와 매우 밀접한 연관이 있다[19, 21]. MMPs는 21가지 이상의 종류가 있다고 알려져 있으며 인체에서 암세포가 분열할 때에 발현과 활성이 증가한다고 알려져 있다[6]. 또한 MMPs는 세

포 외 기질의 구성성분인 collagen, elastin, laminin을 분해함으로써 종양세포의 성장, 전이, 신생혈관생성에도 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다[23]. MMPs가 과 발현되는 경우 정상 조직들을 빠르게 파괴되고, 암세포가 혈관을 타고 온몸을 순환하게 된다[30]. 특히, 기저막의 분해에 핵심적인 역할을 하는 MMP-2와 MMP-9의 활성은 암 세포의 침윤을 매개하고 세포외기질의 파괴를 하는 주된 원인으로 작용한다[28]. 암 발병을 억제하기 위해 암 치료제를 개발하는 타겟으로 MMPs의 억제에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다[8, 12, 18]. 최근에는 암 예방 및 치료를 위하여 천연자연에서 생물학적 활성 화합물 또는 기능성 식품을 찾는데 초점을 맞추고 있으며, 특히 식물로부터 생리활성 화합물을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중에서도 콩은 유방암, 전립선 암 그리고 만성염증질환 등 다양한 질병의 발생률을 줄이는데 영향을 미친다[3, 13]. 콩에 함유되어 있는 이소플라본 성분이 건강을 유지하는데 많은 기여를 한다고 알려져 있으며, 이소플라본이 인체 내에서 항산화 작용과 MMPs 발현을 감소시켜 암전이 활성을 억제한다[9, 14, 32]. 특히 콩잎에는 다른 식물에 비해 이소플라본이 다량 첨가되어있으며, 푸른 콩잎보다는 콩잎낙엽의 이소플라본 함량이 더 높게 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[24]. 그 뿐만 아니라 콩잎에는 항산화 활성에 관련되는 물질뿐만 아니라 glycine, serine, alanine, histidine도 다량 함유되어 있다[25, 29]. 현재까지 콩잎에 대한 연구는 광범위하게 진행되고 있지만, 콩잎낙엽의 화학물질과 생물학적인 활성의 연구는 미비한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 콩잎낙엽의 항산화

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1517, Fax : +82-51-890-2620

E-mail : yhoh@deu.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.

효능과 더불어 암전이 관련 생물학적인 활성에 관한 연구가 진행되었다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 제조

실험에 사용된 *Glycine max*의 콩잎낙엽은 경남 거창군 남상면 둔동리 동령마을에서 10월 중순경 수확된 것을 구입하였다. 콩잎낙엽 에탄올추출물을 하기와 같은 방법으로 추출하여 얻을 수 있다. 먼저, 콩잎낙엽을 흐르는 물에 깨끗이 세척한 다음 자연 건조한다. 세척·건조된 상기 콩잎낙엽을 각각 에탄올과 1:10의 중량 %비로 혼합하여 3회 반복하여 추출한 다음, 이 추출물을 여과한 후, 여과된 여액을 회전식 Heidolph 진공 농축기(Tokyo, Japan)를 이용하여 용매를 증발시켜 농축된 추출물을 얻었다. 다시 이 추출물을 Eyela 동결건조기(Schwabach, Germany)로 동결 건조하여 분말 형태의 콩잎낙엽 에탄올추출물을 얻는다. 분말형태의 콩잎낙엽 에탄올추출물을 dimethyl sulfoxide를 이용하여 일정한 농도로 희석하여 사용하였다. 세포배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA, penicillin / streptomycin / amphotericin (각각 10,000 U/ml, 10,000 µg/ml 및 2,500 µg/ml), fetal bovine serum (FBS) 시약은 Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, Scotland, UK)로 부터 구입하였다. HT1080 세포는 American Type of Culture Collection (Manassas, VA, USA) 기관에서 구입하였다. MTT reagent, gelatin, agarose 와 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 및 기타 시약은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 로 부터 구입하였다.

DPPH radical assay

Brand-Williams [16] 실험방법을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 SBFL의 소거능력을 측정하였다. 시험농도의 SBFL을 DPPH 용액을 가하여 10 sec 동안 잘 혼합한 다음, 실온에서 30 min 동안 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 함량은 시료 첨가 군과 대조 군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

환원력 Assay

Oyaizu의 방법에 따라 측정하였다[22]. 시료 1 ml에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충용액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 ml씩 차례로 가하여 교반한 후 50°C의 수욕상에서 20 min 동안 반응시켰다. 여기에 10% TCA 용액 1 ml를 가하여 13,500×g에서 15 min 동안 원심 분리하여 얻은 상등액 1 ml에 증류수 및 ferric chloride 각 1 ml를 가하여 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 10 µg/ml vitamin C를 사용하였다. 시료의 환원력은 시료 첨가군과 대조

군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

In vitro 지질과산화에 대한 항산화 활성

SBFL을 12.5, 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 농도로 linoleic acid emulsion과 혼합한 후에 0.8 mM H₂O₂ 및 0.8 mM FeSO₄를 혼합한 용액을 5 hr 동안 반응 후 0.4% TBA를 첨가하고 95°C에서 2 hr 반응시킨 다음 실온에서 10 min 동안 반응 시켰다. 그 다음 15:1 비율의 n-butanol: pyridine 용액을 500 µl 첨가하고 1,000×g에서 10 min 동안 원심분리 한 후 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정 하여 지질과산화 정도는 시료 첨가 전후의 흡광도 비를 %값으로 환산하여 나타내었다. 양성 대조군으로 1,000 µg/ml vitamin E를 사용하였다.

세포배양

HT1080 세포는 5% CO₂ 및 37°C에서 95% 이상의 습도를 유지한 배양기에서 5% fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 100 µg/ml penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다.

MTT assay

HT1080 세포는 5% CO₂ 및 37°C에서 95% 이상의 습도가 유지되는 배양기에서 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 10,000 U/ml penicillin/10,000 µg/ml streptomycin을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다. Hansen의 방법에 따라 HT1080세포에 대한 SBFL의 세포독성을 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)방법을 이용하여 측정하였다[11].

Gelatin zymography

MMP-2 및 MMP-9 활성은 FBS를 첨가하지 않은 DMEM배지에서 배양한 HT1080 세포에 SBFL을 처리한 후 실험을 수행하였다. 50 µg/ml의 총 단백질을 함유하는 세포배양액을 1.5 mg/ml gelatin을 포함하는 비환원조건 10% polyacrylamide gels를 이용하여 전기영동 하였다. Gelatin이 분해된 bands는 청색배경에 투명한 band로 나타난다. Band의 진하기는 MMPs의 활성에 비례하여 나타나는데 이는, LAS3000Rimage analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 관찰하였다.

Cell invasion assay

Rehydration된 8 µm pore size polycarbonate membrane이 도포된 insert에 serum free medium에 부유된 HT1080 세포를 300 µl 넣고 바깥쪽 chamber에 10% FBS를 함유한 medium을 500 µl처리하여 membrane의 바깥 chamber에는 세포의 침투를 유도하는 영양분이 풍부한 환경을 조성하였다. HT1080 세포에 양성대조군인 VEGF를 100 ng/ml의 농도로 처리하고 SBFL을 농도 별로 처리한 뒤 37°C에서 24시간 배양하였다.

그 후 침투되지 않은 세포를 제거한 뒤 cell stain solution으로 침투된 membrane 바깥쪽 세포를 염색하였다. 염색된 세포를 수를 정량화 하기 위하여 10% acetic acid에 녹여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot analysis

HT1080세포에 용출 완충용액(50 mM Tris - HCl, pH 7.5, 0.4% Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 80 µg/ml leupeptin, 3 mM NaF and 1 mM DTT)을 첨가하여 4°C에서 30 min 동안 처리하였다. 10 µg의 세포 용출액을 10% Tris - HCl gel에서 전기영동 후 단백질을 전기적으로 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 그 다음 10% skim milk를 nitrocellulose membrane에 전 처리하고 목적 단백질을 대한 1차 항체(anti-MMP- 2, anti-MMP-9, anti-TIMP-1, anti-p-FoxO-1, anti-SOD-1, anti-SOD-3, anti-Keap-1, anti-Glutathione reductase, anti-Nrf2, anti-beta-actin)를 처리한 다음 2차 항체를 처리 후, chemiluminescent ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 목적단백질을 검출하였다. Western blot의 band는 LAS 3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를

이용하여 관찰하였다.

통계처리

각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 그 결과를 얻어 각각의 시료농도에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료 농도군에 대한 유의 차 검정은 대조군과 비교하여 Student's t test 한 후 $p < 0.05$ 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

결 과

SBFL의 DPPH radical 소거활성, 환원력 및 지질과산화 억제효과

SBFL이 생체 내에서 발생하는 산화적 스트레스에 어떠한 효과를 나타내는지 조사하기 위하여 DPPH radical 소거활성, 환원력 및 지질과산화억제 실험을 수행하였다. DPPH radical 소거활성 실험에서 사용된 DPPH radical은 항산화 물질을 받아 환원이 되고 흡광도 변화를 지표로 하여 산화억제 정도를 예측할 수 있다. Fig. 1A에서 보는 바와 같이 양성 대조군으로 사용된 100 µg/ml vitamin C의 처리군에서는 65%의 소거능

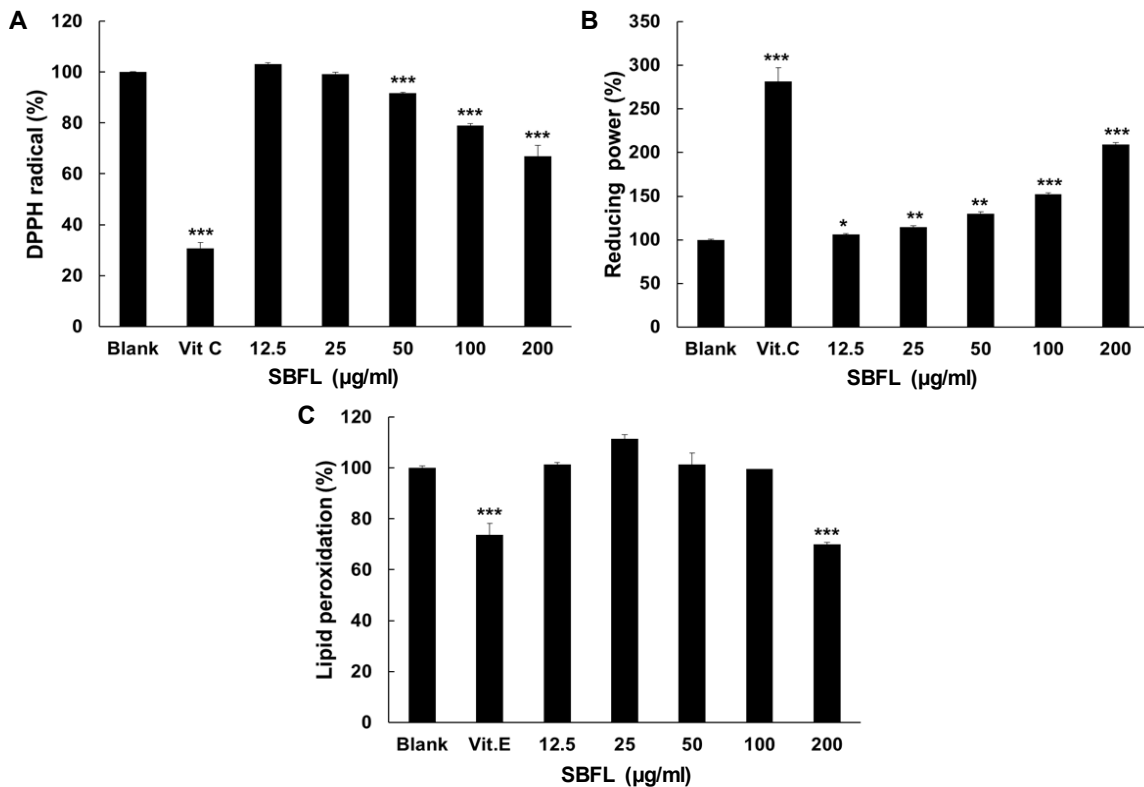


Fig. 1. The effect of SBFL on scavenging activities of free radical. (A) Scavenging activity of DPPH radical. Vitamin C at 100 µg/ml was used as a positive control in this experiment. (B) Reducing power of SBFL. Vitamin C at 10 µg/ml was used as a positive control. C. Inhibitory effect of SBFL on lipid peroxidation. Vitamin E at 1,000 µg/ml was used as a positive control. Lipid peroxidation was determined by TBARS. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

을 SBFL의 200 µg/ml에서 33%의 radical 소거능을 나타내었다. SBFL은 DPPH radical의 소거효과가 50 µg/ml 이상에서 농도에 비례하여 나타났다 Fig. 1B에서 보는 바와 같이 환원력 실험결과에서는 양성대조군으로 사용된 vitamin C가 10 µg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 181%의 환원력을 나타냈으며, SBFL은 100 µg/ml 농도에서 대조군에 비하여 50%의 환원력이 증가하였다. SBFL은 농도의존적으로 환원력이 증가하는 것으로 나타났다. Fig. 1C에서는 linolenic acid를 Fenton반응으로 발생시킨 hydroxyl radical에 노출시켰다. 먼저 hydroxyl radical에 의한 지질과산화 억제능을 확인하기 위하여 기존에 알려진 친유성 항산화제인 1,000 µg/ml의 vitamin E군에서는 대조군과 비교하여 29%의 지질과산화 억제효과를 나타내었으며, SBFL은 200 µg/ml 농도에서 대조군에 비하여 27%의 지질과산화 억제효과가 관찰되었다.

세포독성에 미치는 SBFL의 영향

SBFL이 세포에 독성을 미치는 정도를 결정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 본 실험에서는 HT1080세포를 사용하였으며 Fig. 2에서 보는 바와 같이 SBFL의 농도가 16 µg/ml 이상에서 농도가 증가함에 따라 세포의 독성이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 특히, SBFL은 64 µg/ml의 농도에서 공시험군에 비하여 세포 생존율의 저하되었기에 세포독성을 보였다.

PMA로 자극된 사람 HT1080 세포에서 SBFL의 MMP-9 활성 억제효과

세포 외 기질을 분해하는 MMP-9에 미치는 SBFL의 영향을 조사하기 위하여 gelatin zymography를 수행하였다. HT1080에 SBFL을 처리 한 후 PMA로 자극하여 72시간 동안 배양한 세포 상등액에서 MMP-9의 활성을 측정하였다. Fig. 3에서

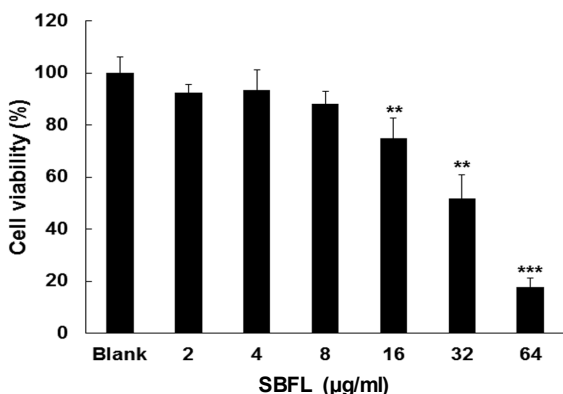


Fig. 2. Effect of SBFL on viability of HT1080 cells. HT1080 cells were treated with SBFL at 2, 4, 8, 16, 32 and 64 µg/ml and cell viability was determined using MTT assay after 24 hr. Data are given as means of values ±S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test. (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

보는 바와 같이 PMA로 자극한 실험에서는 SBFL이 농도의존적으로 MMP-9의 활성을 감소시키는 것으로 나타났다. 16 µg/ml의 SBFL 처리군에서는 MMP-9의 활성이 35%정도 감소하는 것으로 나타내었다.

SBFL의 HT1080세포의 세포침윤 억제효과

HT1080세포를 배양하여 SBFL의 세포 침윤 억제능을 조사하였다. 본 연구에서는 polycarbonate membrane 밖의 chamber에 10% FBS의 배양액을 처리함으로써 보다 영양분이 풍부한 환경을 조성하여 세포의 침투를 유도하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 대조군으로 사용한 100 ng/ml VEGF는 공시험군과 비교하였을 때 현저한 세포 침투효과가 증가되는 것을 보여주었다. SBFL은 32 µg/ml의 이상의 농도에서 세포 침윤 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

사람 섬 유아 육종세포에서 MMP-2, 9의 단백질 발현 억제효과

항산화와 암전이 실험에서 확인된 SBFL의 효과가 단백질 발현 수준에서 어떻게 조절되는지를 연구하기 위하여 western blot을 시행하였다. SBFL로 처리된 HT1080세포에 SBFL을 4, 8, 16, 32 µg/ml 농도로 1 hr 동안 전 처리 후 PMA로 자극하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 SBFL은 MMP-2의 발현은

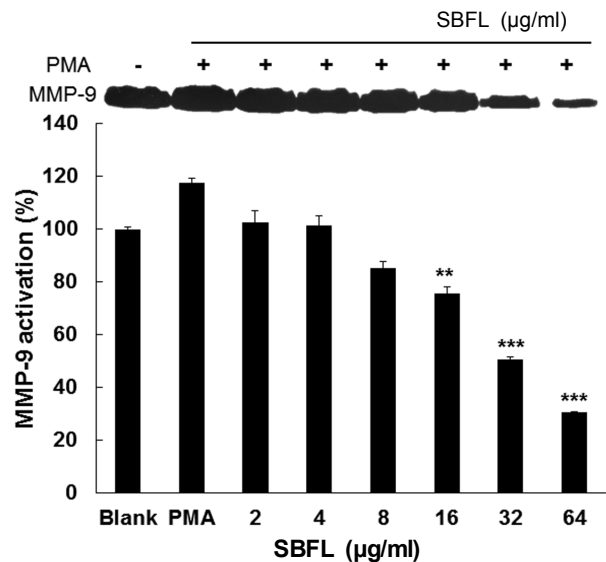


Fig. 3. Effect of SBFL on activities of MMP-9 in human HT1080 cells. HT1080 cells stimulated with 1 µg/ml of PMA to induce MMPs expression were treated with various concentrations of SBFL under serum-free conditions for 72 hr. MMP-9 activities in conditioned media were determined by gelatin zymography as described in the text. Data are given as means of values ±S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test. (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

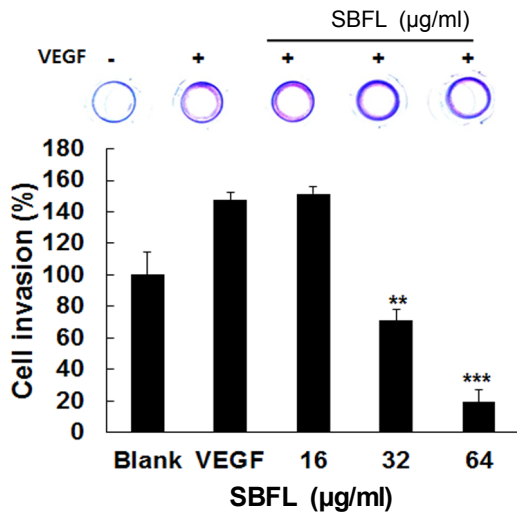


Fig. 4. Effects of SBFL on invasion of HT1080 cells. For invasion assay, lower and upper parts of transwells were coated with collagen and matrigel, respectively. HT1080 cells and various concentrations of SBFL were added. After 18 hr, cells on the bottom side of the filter were fixed, stained, and quantified. Data are given as means of values ±S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

증가시켰으나, MMP-9 및 TIMP-1의 단백질 발현에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 다음으로 항산화 효소의 발현을 조절하는데 중요한 전사인자 *p-FoxO-1*과 항산화 효소 중 하나인 SOD-1의 단백질 발현을 조사하였다. SBFL는 32 µg/ml의 농도에서 *p-FoxO-1*의 발현을 증가시켰고 항산화 효소 중에서 가장 중요한 SOD-1의 발현수준을 증가시켰다. 그러나 SBFL의 Nrf2 신호경로와 관련된 발현 수준에는 영향을 주지 않았다.

고 찰

식물성 추출물에 들어있는 페놀화합물은 산화스트레스로 발생하는 질병을 보호하고 체내의 산화와 항산화의 균형을 유지시켜주는 중요한 역할을 하는 천연항산화제로 알려져 있다. 항산화 관련 식물로부터 추출된 항산화제를 포함한 식품은 산화스트레스로부터 인체를 보호할 수 있다[5, 17]. 활성산소는 인체의 DNA, RNA 및 조직을 파괴하여 질병을 유발시키지만 한편으로는 세포 성장을 촉진하는 조절자로서의 역할을 수행한다고 보고되고 있다[10]. 본 연구에서는 SBFL이 인체에 미치는 항산화 효과를 조사한 결과 DPPH radical 소거활성과 환원력이 우수한 것으로 나타났다. 또한 OH radical를 이용한 지질과산화억제실험에서는 양성대조군인 vitamin E와 유사하게 억제하는 것을 볼 수 있었다. 현재 연구된 바로는 콩잎은 항산화 활성에 관련되는 성분인 vitamin A의 전구체인 카로테노이드, 항암성 물질로 알려져 있는 클로로필, 총 페놀 등의

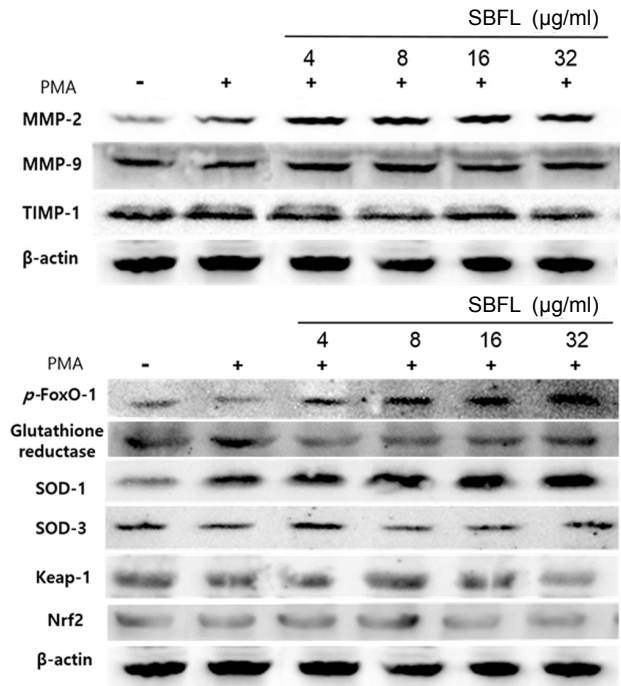


Fig. 5. Effect SBFL on protein expressions related to metastasis and antioxidant activity in HT1080 cells. Cells were treated with SBFL at 4, 8, 16 and 32 µg/ml prior to stimulation of cells with 1 µM PMA for 24 hr. Western blot analysis of cell lysates was performed using antibodies as indicated.

함량이 높다고 알려져 있다. 이러한 SBFL의 성분이 free radical을 소거하는데 영향을 끼친다고 볼 수 있다. 활성산소로부터 발생하는 질병들 중 하나인 암은 현재에도 치료하기 위해 많은 연구를 시도하고 있다. 다음으로는 암전이의 과정에서 중요한 요인으로 작용한다고 알려진 암세포 침윤[7]에 미치는 SBFL의 효능을 조사하기 위하여 HT1080세포를 이용하여 세포 침윤에 대한 효과를 평가하였다. 그 결과 VEGF를 처리한 군과 비교하였을 때 SBFL은 세포의 침윤을 억제하는 효과가 있었다. 이러한 세포 침윤은 암 전이와 밀접하게 관련 있다[1]. 암 발생 과정에서는 세포의 침윤뿐만 아니라 종양세포와 기질 상호작용도 핵심적인 역할을 하는데 그 상호작용에 MMP효소가 중요하게 관여하게 된다[20]. MMP는 세포 외 기질들을 분해시키는 효소들 중 하나이며 MMP는 인간, 설치류, 양서류의 특징이 되는 24가지 종류로 구성되어있다. MMP는 주로 상처회복, 대식세포 기능, 배란 등의 기능에 관여하며 다양한 생리학과 병리학 과정들에 영향을 미치며 종양전이, 류마티스 관절염, 위궤양, 동맥경화와 같은 지나친 분해에 의해 일어나는 질병들에 중요한 역할을 한다[6, 31]. 그 중 Human 암세포에 관여하는 MMP-9은 종양형성 과정에 핵심적인 역할을 하고 있다. 또한 MMP-9은 promoter 활성에 AP-1 (-533 bp, -71 bp), NF-kB (-600 bp), Sp-1 (-588 bp)의 결합이 중요한 요소로 작용하며 이러한 인자에 의해 발현이 조절된다

고 알려져 있다[26]. 본 연구에서 SBFL의 MMP-9의 활성과 그에 따른 발현 정도를 조사한 결과 SBFL은 PMA에서 자극된 MMP-9의 활성을 억제하였다. 현재 콩의 사포닌 성분은 MMP-2와 MMP-9을 억제하고 TIMP-2의 생성은 증가시킨다는 연구된 바가 있다[3]. 이 연구 결과는 SBFL이 MMP-2와 MMP-9의 생성을 조절할 것이라고 사료된다. 하지만 SBFL은 암전이 관련 단백질인 MMP-2와 MMP-9의 발현에는 영향이 없었다. 한편, 항산화 효소 발현에 미치는 효과를 조사한 결과 p-FoxO-1의 발현을 증가시켰고 항산화 효소 중에서 가장 중요한 SOD-1의 발현수준을 증가시켰다. 그러므로 SBFL은 세포 내에서 산화적 스트레스를 감소시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 최근 연구에서는 콩에 있는 펩타이드 성분이 높은 항산화 활성뿐만 아니라 항암활성이 있다고 보고되었다[27]. MMP-9의 활성화를 억제하고 항산화 효소인 SOD-1의 발현을 증가시켜 산화적 스트레스를 감소시키고 동시에 세포 침윤을 억제하여 암 전이를 예방할 수 있는 잠재적인 하나의 생리활성 소재로의 가능성을 제시하고 있다.

감사의 글

이 논문은 2015학년도 동의대학교 연구년 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Bhatia, M., McGrath, K. L., Di Trapani, G., Charoentong, P., Shah, F., King, M. M., Clarke, F. M. and Tonissen, K. F. 2015. The thioredoxin system in breast cancer cell invasion and migration. *Redox Biol.* **8**, 68-78.
- Borrello, S., Seccia, A., Galeotti, T., Bartoli, G., Farallo, E. and Serri, F. 1984. Protective enzymes in human epidermal carcinomas and psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* **276**, 338-340.
- Creemers, E. E., Cleutjens, J. P., Smits, J. F. and Daemen, M. J. 2001. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction a new approach to prevent heart failure? *Circul. Res.* **89**, 201-210.
- Deby, C. and Goutier, R. 1990. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 399-405.
- Duthie, G. and Crozier, A. 2000. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr. Opin. Lipidol.* **11**, 43-47.
- Egeblad, M. and Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161-174.
- Fidler, I. J. 1970. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.* **45**, 773-782.
- Furuya, S., Takayama, F., Mimaki, Y., Sashida, Y., Satoh, K. and Sakagami, H. 2000. Cytotoxic activity of saponins from *Camassia leichlinii* against human oral tumor cell lines. *Anticancer Res.* **21**, 959-964.
- Galis, Z. S. and Khatri, J. J. 2002. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis the good, the bad, and the ugly. *Circul. Res.* **90**, 251-262.
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E. and Pelicci, P. G. 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 722-728.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203-210.
- Heilmann, J., Calis, I., Kirmizibekmez, H., Schühly, W., Harput, S. and Sticher, O. 2000. Radical scavenger activity of phenylethanoid glycosides in FMLP stimulated human polymorphonuclear leukocytes: structure-activity relationships. *Planta Med.* **66**, 746-748.
- Hendrich, S., GuiJuan, W., HsiaoKuang, L., Xia, X., BeeYen, T., HueiJu, W., Murphy, P. and Papis, A. 1998. Isoflavone metabolism and bioavailability. *Kor. J. Food Cook. Sci.* **1998**, 211-230.
- Human bioavailability of soy bean isoflavones: influences of diet, dose, time, and gut microflora. Functional foods for disease prevention I. Fruits, vegetables, and teas. Symposium sponsored by the Division of Agricultural and Food Chemistry at the 213th National Meeting of the American Chemical Society, San Francisco, California, USA, April 13-17, 1997.; 1998. American Chemical Society.
- Homan, R., Grossman, J. E. and Pownall, H. 1991. Differential effects of eicosapentaenoic acid and oleic acid on lipid synthesis and secretion by HepG2 cells. *J. Lipid Res.* **32**, 231-241.
- Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H. and Itakura, Y. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.* **60**, 417-420.
- Ji, L. L. 1993. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Medi. Science Sports Exer.* **25**, 225-231.
- Kim, E. J., Ahn, S. Y., Nam, G. W., Lee, H. K., Moon, S. J., Kim, Y. M., Oh, M. S., Kim, N. S., Chang, I. S. and Park, S. K. 2006. The anti-aging effects of the cosmetic products containing the needles of red pine on human skin. *Kor. J. Herbology* **21**, 25-31.
- Kohn, E. C., Jacobs, W., Kim, Y. S., Alessandro, R., Stetler-Stevenson, W. G. and Liotta, L. A. 1994. Calcium influx modulates expression of matrix metalloproteinase-2 (72-kDa type IV collagenase, gelatinase A). *J. Biol. Chem.* **269**, 21505-21511.
- Liotta, L. A. and Kohn, E. C. 2001. The microenvironment of the tumour - host interface. *Nature* **411**, 375-379.
- Nagase, H. and Woessner, J. F. 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 21491-21494.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction--antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* **44**, 307-315.
- Roy, R., Yang, J. and Moses, M. A. 2009. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic

- targets in human cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5287-5297.
24. Ryu, S. H., Lee, H. S., Lee, Y. S. and Moon, G. S. 2005. Contents of isoflavones and antioxidative related compounds in soybean leaf, soybean leaf jangachi, and soybean leaf kimchi. *Kor. J. Food Cook. Sci.* **21**, 433-439.
 25. Ryu, S. H., Lee, H. S., Lee, Y. S. and Moon, G. S. 2005. Contents of Isoflavones and Antioxidative Related Compounds in Soybean Leaf, Soybean Leaf Jangachi, and Soybean Leaf Kimchi. *Kor. J. Food Cook. Sci.* **21**, 433-439.
 26. Sato, H. and Seiki, M. 1993. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* **8**, 395-405.
 27. Singh, B. P., Vij, S. and Hati, S. 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* **54**, 171-179.
 28. Stetler-Stevenson, W. G. 1990. Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **9**, 289-303.
 29. Stutte, C. A. and Park, H. 1973. Effects of Nitrogen Sources on PRE-point and Free amino acids in Soybean Leaves different in Phosphorus Sensitivity. *Kor. J. Soil Sci. Fertil.* **6**, 239-244.
 30. Westermarck, J. and Kähäri, V. M. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* **13**, 781-792.
 31. Westermarck, J., Li, S., Jaakkola, P., Kallunki, T., Grénman, R. and Kähäri, V. M. 2000. Activation of fibroblast collagenase-1 expression by tumor cells of squamous cell carcinomas is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase-2. *Cancer Res.* **60**, 7156-7162.
 32. Zheng, G. and Zhu, S. Antioxidant effects of soybean isoflavones: CABI Publishing: Wallingford, UK, 1999:433-439.

초록 : 항산화 및 암전이 관련 단백질의 발현에 미치는 콩잎낙엽 에탄올 추출물의 영향

송채은 · 이수경 · 홍수경 · 류준하 · 김문무 · 오영희*
(동의대학교 화학과)

콩잎은 골다공증 및 유방암 발생을 예방한다고 널리 보고되고 있다. 이를 바탕으로 콩잎낙엽 에탄올 추출물 (SBFL)을 제조하여 암 전이와 관련 있는 세포침윤에 대한 효과를 조사하기 위하여 섬유아육종세포(HT1080)에서 SBFL이 항산화와 matrix metalloproteinases (MMPs)에 미치는 영향을 분석하였다. 본 연구에서 활성산소의 소거 효과에 대한 SBFL효과는 DPPH radical, 환원력 및 지질과산화실험으로 평가되었다, 본 연구에서 SBFL은 양성 대조군으로 사용된 vitamin C 및 vitamin E와 비교 시 우수한 항산화 효과를 보여주었다. 다음으로 SBFL의 세포 독성을 측정하기 위하여 MTT assay를 수행한 결과 16 µg/ml 이상의 농도에서 세포독성을 보여주었다. SBFL은 gelatin zymography 실험에서 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 혹은 phenazine methosulfate (PMS)로 자극된 암 전이에서 중요한 MMP-9의 활성을 감소시켰다. 특히 SBFL은 단백질 발현 실험에서 SOD-1, p-FoxO-1의 발현을 증가시켰다. 더욱이 vascular endothelial growth Factor (VEGF)로 자극된 세포 침윤이 SBFL처리에 의하여 억제되는 것으로 나타났다. 이러한 연구결과를 바탕으로 SBFL은 뛰어난 항산화 효과는 산화적 스트레스를 감소시키고 MMP-9의 활성과 세포침윤을 억제시켜 암 전이의 예방을 위한 유효성분으로 이용될 수 있다는 것을 암시하고 있다.