

# 대두 사포닌이 Aflatoxin B<sub>1</sub>으로 유도된 세포돌연변이에 미치는 영향에 관한 연구

전혜승·성미경

숙명여자대학교 식품영양학과

## Effect of Soybean Saponins on Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced Mutagenicity

Jun, Hye-Seung · Sung, Mi-Kyung

Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

### ABSTRACT

Free radicals formed during the metabolism of environmental chemicals are known to induce mutagenicity, while different types of antioxidants suppress this event. The purpose of this study was to determine the antioxidative and antimutagenic effects of soybean saponins, and to examine the relationship between these two effects for the elucidation of mechanisms involved in the anticarcinogenicity of soybean saponins. Also, antioxidative and antimutagenic effects of soybean saponins were compared with those of known antioxidants. For the measurement of antioxidative capacity, soybean saponins, L-ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, and BHT at concentrations between 0.05 and 1.0mg/ml were tested for their ability to donate hydrogens and to reduce the formation of thiobarbituric substances(TBARS). Antimutagenic activity was examined using the Ames salmonella test system at concentrations of 600, 900 or 1200 $\mu$ g/ml. Study results showed soybean saponins and all of the other antioxidants tested possessed dose-dependent antioxidative activities. The ability of hydrogen-donation to DPPH was in the order of L-ascorbic acid> $\alpha$ -tocopherol>BHT>soybean saponins. TBARS formation was also inhibited by these compounds, in the order of BHT> $\alpha$ -tocopherol=L-ascorbic acid>soybean saponins. Soybean saponins and other antioxidants also showed antimutagenicity in a dose-dependent manner. Especially, soybean saponins and BHT were excellent antimutagenic compounds, inhibiting near 80% of the mutagenic effects at a concentration of 1200  $\mu$ g/ml. The correlation coefficients between antioxidative capacity and antimutagenicity for each compound was statistically significant at  $p < 0.05$ . These results indicate that soybean saponins possess antioxidative and antimutagenic capacities. Also, antimutagenicity of saponins and other antioxidants is partly due to their antioxidative activities. (*Korean J Nutrition* 32(1) : 110~117, 1999)

KEY WORDS : soybean · saponin · anticarcinogenicity · antioxidation · antimutagenicity.

### 서론

현대사회에서 암의 발생 및 그로 인한 사망율의 증가는 인류복지에 큰 위협이 되고 있다. 암의 발생은 약 75~80%가 환경요인에 의한 것으로 보고되었으며 그 중 약 30~40%가 식품에 의해 조절될수 있는 것으로 추정되고 있다<sup>1)</sup>. 암은 여러단계를 거쳐 발생하는 질병으로 크게 개시(initiation), 촉진(promotion) 및 진행(progression)의 세단계로 나뉜다. 즉 발암물질에 의해 세포변이가 일어나고 이러한 세포들의 수가 늘면서 촉진물질에 의해 비정상적인 세포분열이 일어났을 때 비로소 암조직이 형성되기 시작한다. 식품 중에 함유된 각종 성분들은 발암물질 또는 촉진물질로써 암화과정

(carcinogenesis)에 관여할 수 있는 반면 이를 저해하는 기능을 가지기도 한다.

암화과정의 개시단계에서 발생하는 세포돌연변이는 DNA의 산화적 손상에 의해 초래되고 원인물질은 대기오염성분, 흡연, 특정 항생제등 외인성 화학적 발암물질의 대사과정에 서뿐만 아니라 산소를 소비하는 정상적인 세포대사과정에서도 다량 생성되는 자유라디칼(Free radical)들이므로 보인다<sup>2)3)</sup>. 즉 친전자성을 띤 자유라디칼들은 세포내 DNA의 친핵성부위와 결합함으로써 세포변이를 일으키게 된다<sup>4)</sup>. 따라서 대사과정 중 자유라디칼 생성은 세포의 암화에 긴밀하게 연관되어 관여하는 것으로 보인다. Aflatoxin B<sub>1</sub>, benzo(a)pyrene, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MN-NG) 등은 대표적인 화학적 발암물질로 체내 해독화과정 중에 산화되어 자유라디칼을 형성한다. 이 이외에도 체

채택일 : 1998년 12월 24일

내 정상대사과정중 생성되는 자유라디칼로는 hydroxy 라디칼(OH<sup>·</sup>), singlet oxygen('O<sub>2</sub>), lipid peroxy 라디칼(LOO<sup>·</sup>), lipid alkoxy 라디칼(LO<sup>·</sup>) 등이 있는데 이들을 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이라 명명한다. 한편 이러한 자유라디칼들은 다단계 발암과정에서 개시 단계뿐 아니라 촉진단계 및 진행단계와도 관련되며 단백질 및 지질을 변형시켜 노화를 유발하는 것으로 보고되어 있다<sup>56)</sup>. 식품중에 존재하는 비타민 E, 비타민 C, 베타카로틴 등 각 중 항산화영양소들의 항암효과는 이러한 산화물의 생성 억제효과에 의한 것으로 보인다.

최근 수많은 역학연구와 실험연구를 통해 식물성식품 중에 함유된 다양한 비영양화합물들이 소유한 항암능이 보고된 바 있고 미국의 국립암연구소에서는 식품소재중 항암물질의 탐색을 시행한 결과 암을 예방할 수 있는 가능성이 가장 큰 다섯가지 식품을 제안한 바 있는데 그 중 한가지가 대두이다<sup>7)</sup>. 대두에는 사포닌, 아이소플라본, 트립신저해제 등 각 중 항암물질이 함유된 것으로 밝혀졌다. 특히 사포닌은 최근 대장암세포의 성장을 선택적으로 저해하는 효과가 있음이 증명되었는데<sup>58)</sup> 이는 암화과정의 촉진 또는 발달단계에서의 사포닌의 항암효과를 증명한 경우이다. 그러나 대두 사포닌이 개시단계에서도 효과가 있는지 즉, 세포돌연변이를 억제할 수 있는지에 관한 연구는 진행된 바 없다. 따라서 대두의 항암효과를 보다 체계적으로 규명하기 위해서는 암화과정의 각 단계에서 사포닌의 역할을 밝히는 것이 필요하리라 본다. 특히 최근 각종 사포닌의 항산화성에 관한 연구가 진행되면서<sup>10)</sup> 사포닌 함유식품이 자유라디칼들에 의한 세포변이를 억제할 수 있다는 가능성이 제시되고 있다.

따라서 본 연구의 목적은 대두가 가진 항암효과를 체계적으로 규명하기 위한 기초작업으로 대두사포닌의 항산화력 및 세포변이 억제효과를 측정하고 이들의 상관관계를 보는 데 있다. 동시에 대두 사포닌의 효과를 이미 잘 알려진 주요 항산화물질인 L-ascorbic acid, α-tocopherol 및 BHT의 효과와 비교분석하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 시료 조제

L-ascorbic acid, DL-α-tocopherol, linoleic acid, DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), SDS(sodium dodecyl sulfate), 2-thiobarbituric acid, trichloroacetic acid, EDTA, aflatoxin B<sub>1</sub>, DMSO(dimethyl sulfoxide), NADP, L-hisidine · HCl, bio-tin, sodium ammonium phosphate 등은 Sigma사(St. Louis, U.S.A.) 제품을

구입하여 사용하였고, bacto agar, nutrient broth는 Difco사(Grand Island, NY)제품을 사용하였다. 그 외 추출용매들은 분석용 특급시약을 이용하였다. 대두사포닌은 건조 대두 분말로부터 Wolf와 Thomas<sup>12)</sup>의 방법에 기초하여 추출, 사용하였다.

### 2. 전자공여능(Electron donating ability) 측정

수소공여능 측정은 Blios의 방법<sup>13)</sup>에 준하여 DPPH에 대한 전자공여능(EDA: electron donating ability)을 측정하여 환원력을 계산하였다. 즉 DPPH 20mg을 에탄올 150ml에 녹여 DPPH용액을 만든 후 이 용액 0.5ml에 0.05, 0.1, 0.5, 1.0mg/ml methanol의 농도로 제조한 시료 용액 0.5ml씩을 가하고 즉시 5초간 진탕시킨 다음 30분 동안 방치한 후 517nm에서 흡광도 변화를 측정하여 대조군에 대한 흡광도 차이로 전자공여능(EDA)을 계산하였다. 결과는 위의 실험을 4회 반복하여 평균과 표준편차로 나타내었다.

### 3. 자외선 조사에 대한 과산화지질 형성 억제능 검토

과산화지질 형성 억제능은 기질로서 linoleic acid를 사용하여 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 생성 저해효과를 측정하여 평가하였다. 즉 sodium lauryl sulfate 용액(0.8% w/v)에 linoleic acid를 0.1%(w/v)가 되도록 분산시킨다. 이 기질용액 0.8ml에 50mM Tris buffer 1.0ml, 0.1mM EDTA 0.1ml와 0.05, 0.1, 0.5, 1.0mg/ml methanol의 농도로 녹인 시료 0.1ml씩을 혼합하였다. 대조군에는 시료를 첨가하지 않은 메탄올을 0.1ml 가하였다. 과산화지질형성은 자외선 램프(40W)를 30cm거리에서 90분 조사하여 반응시킨다. 이 반응액에 0.44M trichloroacetic acid 0.5ml, 0.8%(w/v) 2-thiobarbituric acid 0.5ml을 가한 후 100℃에서 15분간 발색시키고 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도 증가에 대한 각각 반응군의 흡광도 증가의 비로 과산화지질 형성 억제능의 비율을 계산하였다. 결과는 위의 실험을 4회 반복하여 평균과 표준편차로 나타내었다.

### 4. 항돌연변이원성 실험

Salmonella mutagenicity test는 Maron과 Ames가 변형시킨 방법<sup>14)</sup>에 준하여 Salmonella typhimurium TA 100균주를 사용하여 시행하였다. Salmonella typhimurium TA 100균주는 실험직전 histidine 요구성, deep rough(rfa) 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하여 사용하였다. 항돌연변이 실험을 위한 S9-mix는 Aroclor 1254(Analabs Inc., U.S.A.)를 주사한 Sprague Dawley종 쥐로부터 간을 채취하여 준비하였다. 실험을 위해 멸균된 cap tube에 0.5ml의

4% S-9 mix, 0.1ml( $1\sim 2 \times 10^8$  cells/ml)의 균주, 돌연변이원으로 사용한 aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>) 50 $\mu$ l 및 추출시료 50 $\mu$ l를 넣어 가볍게 진탕한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 예비배양하였다. 각 시험관에 45 $^{\circ}$ C의 top agar 2ml씩을 붓고 3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양한 후 revertant 숫자를 세었다. 이때 첨가된 돌연변이원(AFB<sub>1</sub>)의 농도는 사용한 균주에 대하여 독성을 나타내지 않는 농도로써 1 $\mu$ g/plate로 하였고, 시료의 농도는 예비실험을 통하여 600, 900, 1200 $\mu$ g/plate로 결정하였으며, 시료의 항돌연변이능은 변이원 물질(AFB<sub>1</sub>)의 활성에 대한 시료의 억제율(inhibition rate)로 나타내었다.

5. 통계처리

항산화 인자의 항산화능 및 항돌연변이 실험의 결과는 SAS program을 이용하여 각 실험군별로 평균과 표준편차에 대한 ANOVA검정을 하였다. 유의성이 있는 경우에는 Duncan's multiple range test로 다시 군 간의 유의성 검

정을 하였고, 각 항산화 인자의 항산화능과 항돌연변이능 사이의 상관관계는 spearman's rank correlation coefficient(r)로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 대두 사포닌 및 각종 항산화인자들의 전자공여능 및 지질 과산화억제 효과

본 연구에서는 대두 사포닌의 항산화능을 주요 항산화물질들과 비교, 평가하기 위해 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)에 대한 전자공여능과 자외선조사에 의한 지질과산화물 형성 억제능을 측정하였다.

DPPH 분자내의 질소는 쉽게 전자를 받아들임으로써 항산화성 물질과 반응하여 본래의 짙은 자색을 잃어버리는 성질을 가진다. 본 연구결과 대두 사포닌과 각종 항산화물질들의 DPPH에 대한 전자공여능은 L-ascorbic acid >  $\alpha$ -tocopherol > BHT > 대두 사포닌의 순으로 나타났다(Fig. 1).

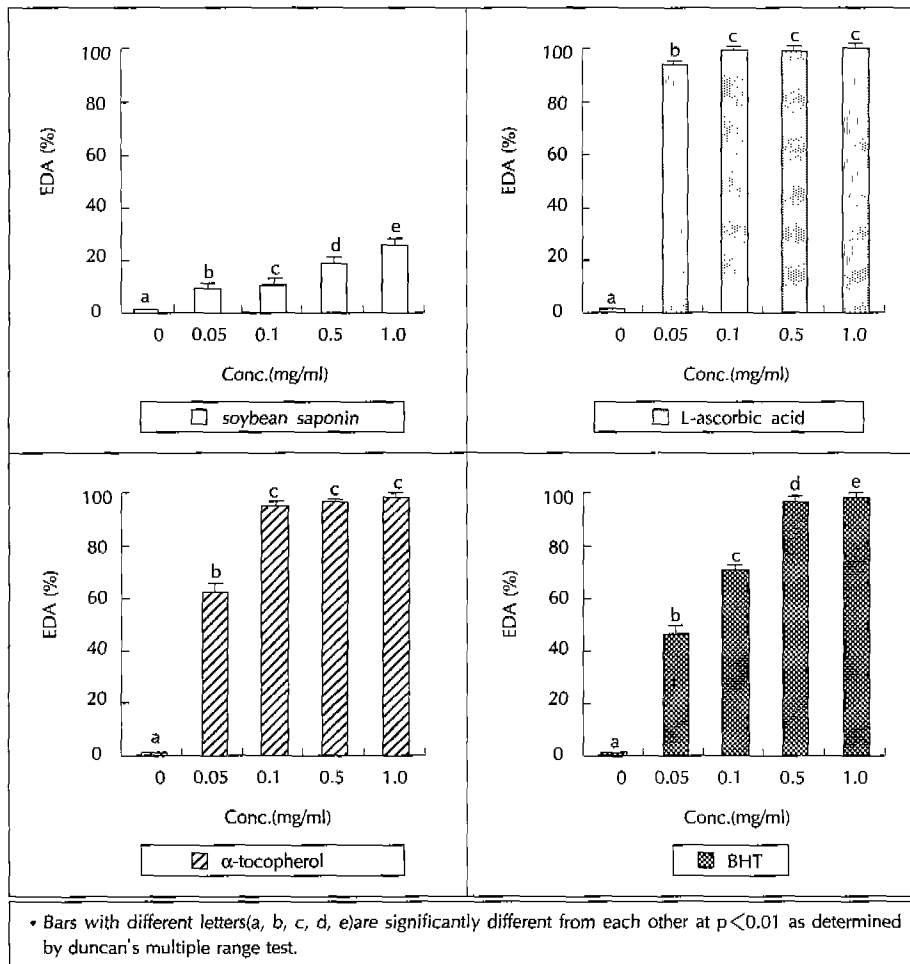


Fig. 1. Electron donating abilities(EDA) of soybean saponins and major antioxidants to DPPH radicals.

대두 사포닌은 0.5mg/ml에서 14.7%, 1.0mg/ml에서 24.6%로 사용농도에 의존적으로 대조군에 비해 그 항산화능이 유의하게 증가하였다( $p < 0.01$ ). L-ascorbic acid의 경우는 낮은 농도에서도(0.05mg/ml) 96%가 넘는 높은 수소공여능을 보여줌으로써 매우 효과적인 전자제공을 하는 것으로 나타났다.  $\alpha$ -tocopherol과 BHT의 경우도 0.5mg/ml농도에서 90%가 넘는 높은 수소공여능을 보였고 모든 군에서 시료의 농도가 증가할수록 대조군에 대한 전자공여능이 유의적으로 증가함을 볼 수 있었다( $p < 0.01$ ).

Linoleic acid의 산화는 다가불포화지방질의 산화를 측정하는 모델로서 다양한 물질의 항산화능을 연구하는데 널리 사용된다<sup>15)</sup>. 즉 linoleic acid는 자외선조사 등에 의해 생성된 자유라디칼과 반응하여 지질라디칼(lipid alkoxyl radical,  $LO\cdot$ )을 형성하고 이는 다시 산소와 쉽게 결합하여 과산화지질 라디칼(lipid peroxy radical,  $LOO\cdot$ )을 생성한다. 지질과산화 측정에는 TBA(thiobarbituric acid) test가 주로 이용되는데, 2-thiobarbituric acid는 지방산의

산화생성물인 malonaldehyde와 산성조건에서 축합하여 붉은 색소를 형성한다. 특히 linoleic acid 또는 arachidonic acid등의 다가불포화지방산은 생체막내의 인지질에 많이 함유되어 있어 생체막내의 과산화지질 형성을 주도하며 이는 세포의 DNA 손상과 밀접한 관련을 갖는다<sup>16)</sup>. 대두 사포닌 및 각종 항산화 인자의 자외선 조사에 의한 지질과산화 형성 억제능을 살펴본 결과, 농도별(0.05, 0.1, 0.5, 1.0mg/ml)로 시료를 첨가하였을 때 농도 의존적으로 과산화지질의 형성이 억제된 것을 볼 수 있었다(Fig. 2). 대두 사포닌의 경우 1.0mg/ml 첨가시 대조군에 비해 지질과산화형성을 60%억제하는 것으로 나타났다.  $\alpha$ -tocopherol과 L-ascorbic acid의 경우 1.0mg/ml 첨가시 대조군에 비해 지질의 과산화형성을 각각 71.2%, 68.5% 억제하였으며 BHT의 경우 1.0mg/ml 첨가시 대조군에 비해 지질과산화를 78.2% 억제하는 것으로 나타났다. 같은 농도에서 지질산화억제능을 비교해 본 결과 BHT >  $\alpha$ -tocopherol = L-ascorbic acid > 대두 사포닌 순으로 유의적인 차이를 볼 수 있었다( $p < 0.01$ ). 특히 대두

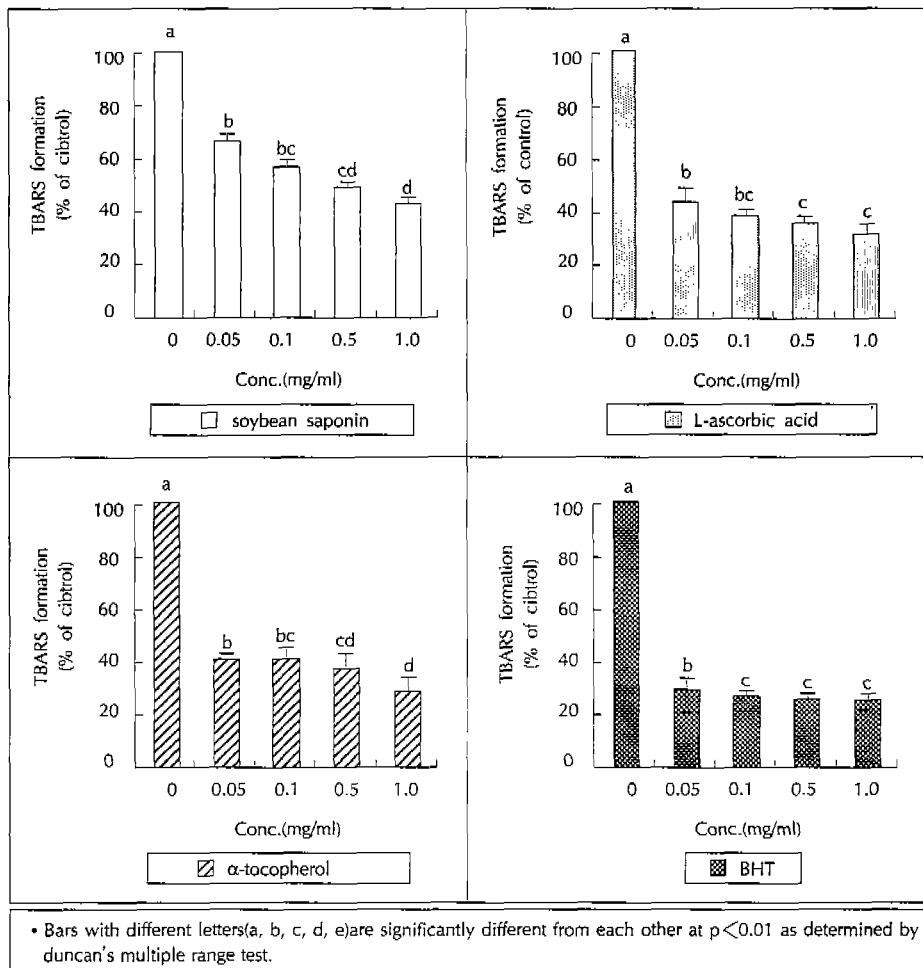


Fig. 2. Inhibitory effect of lipid peroxidation induced by U.V. radiation by soybean saponins and major antioxidants.

사포닌은 과산화지질형성 억제능이 다른 항산화인자들과 유사한것으로 나타났다.

지금까지 보고된 대두 사포닌에 의한 과산화물질 형성 억제능은 그 실험결과가 일치하지 않아 보다 체계적인 연구의 필요성이 있어왔다<sup>17)</sup>. 최근 대두가 나타내는 항산화 효과는 사포닌 내의 aglycone에 결합된 DDMP(2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one)에 의한 것임이 밝혀졌고<sup>18)</sup>, 주요 대두 사포닌인 soyasaponins I, II, III, IV 와 V는 모두 DDMP를 소유하고 있는 것으로 나타났다<sup>19)</sup>. 실제로 1mg/ml 농도의 이들 사포닌은 superoxide dismutase 17.1units 만큼의 superoxide 소거능을 소유한 것으로 보고되었다<sup>20)</sup>. 본 연구에서는 대두에서 추출한 사포닌 혼합체의 DPPH에 대한 수소공여능과 과산화지질 억제능을 실험한 결과 유의한 항산화능을 나타내었다. 그 효과는 사용된 다른 항산화물질들보다는 약하게 나타났는데 그 원인 중 일부는 항산화능이 제각기 다른 사포닌 혼합물을 사용하였기 때문인 것으로 보인다. 즉 각각의 사포닌에 의한 항산화성 등의 생리활성은 사포닌 내에 당분자들의 숫자와 이들이 aglycone과 결합된 위치 등에 의해 영향을 받아 그 효과가 매우 다양한 것으로 보고된 바 있다<sup>21)</sup>.

한편 본 연구에서 사용된 두가지 실험체계에서 각종 항산화물질들에 의한 항산화능의 차이를 살펴보면 L-ascorbic acid는 수소공여능이 뛰어난 반면 BHT와  $\alpha$ -tocopherol은 과산화지질 형성 억제능이 우수하였다. 즉 L-ascorbic acid의 경우 DPPH에 대한 수소공여능 측정에서는 가장 효과적인 라디칼 scavenger로 작용한 반면 지질을 이용한 비극성 반응계에서는 BHT나  $\alpha$ -tocopherol의 효과보다 그 과산화지질 형성 억제능이 떨어지는 것으로 나타났다. 이는 ascorbic acid가 극성에 친화력을 갖기 때문에 비극성 반응계에서보다는 수용액상의 반응계에서 생성되는 자유 라디칼을 보다 효과적으로 소거하기 때문인 것으로 보인다. 한편 지질의 과산화 반응 체계에서는 ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol이 공존할 경우 과산화지질 라디칼의 제거

는 먼저  $\alpha$ -tocopherol이 담당하여 수소를 제공한 후  $\alpha$ -tocopherol 라디칼이 되고 ascorbic acid는 이로부터  $\alpha$ -tocopherol을 재생시키는 것으로 알려져 있다<sup>22,23)</sup>. 특히 최근의 연구들<sup>24-26)</sup>에서  $\alpha$ -tocopherol의 항산화작용은 유전자변이를 저해하는 물질로 중요하게 다루어지고 있다. BHT는 butylphenol 유도체의 일종으로 tocopherol 및 기타의 polyphenol화합물들과 같이 지질과산화물의 생성을 억제하는 물질로 많이 사용되고 있는데 라디칼 반응을 정지시킴과 동시에 자신은 안정한 형태로 전환된다. 한편 Carubelli등<sup>27)</sup>의 보고에 따르면 2-acetylaminofluorene으로 유도된 간암 발생과정에서 BHT는 활성화된 2-acetylaminofluorene을 안정화시킴으로써 간암 형성을 억제하는 것으로 나타났다.

대두 사포닌은 수용액 상의 반응계에서 생성되는 라디칼의 소거보다는 지질의 alkoxy 라디칼이나 peroxy 라디칼의 소거에 더 효과적으로 작용하는 것으로 사료된다. 본 반응계는 위에서 기술한 바와 같이 emulsified lipid system을 이용하여 친수기, 친유기를 모두 지니는 대두사포닌의 계면 활성이 과산화지질형성 억제효과에 깊이 관여한 것으로 보인다. 고지방 식이를 하는 쥐에게 대두사포닌을 경구로 공급하였을 때 과산화물질로 유래된 쥐 간의 손상과 hyperlipidemia가 저해되었다는 연구결과<sup>28)</sup>가 보고된 바 있으며, Nishida등<sup>29)</sup>은 대두 사포닌이 쥐 간 microsome내의 라디칼에 의한 지방산화를 저해시킨다고 보고함으로써 대두 사포닌의 항산화효과를 증명한 바 있다. 또한 대두 사포닌은 CCl<sub>4</sub>로 유도한 간세포독성을 저해하는 것이 *in vitro*에서 증명되었다<sup>40)</sup>. 이렇듯 *in vivo*나 *in vitro*에서 증명된 대두사포닌의 간세포에 대한 보호작용기전중 일부는 대두 사포닌의 라디칼소거능에 기인한 것으로 보인다.

## 2. 대두 사포닌 및 각종 항산화인자가 *Salmonella typhimurium* TA100에 대한 aflatoxin B<sub>1</sub>의 돌연변이 유발성에 미치는 효과

Aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)은 *A. flavus* 와 *A. parasiticus*에 의

**Table 1.** Inhibition rate(%) of soybean saponins and major antioxidants on the mutagenicity induced by aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>, 1 $\mu$ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA 100

Conc.( $\mu$ g/ plate)	Treatment	Inhibition rate(%)			
		Soybean saponin	L-ascorbic acid	$\alpha$ -tocopherol	BHT
Positive control (AFB <sub>1</sub> only)					0 <sup>z</sup>
600		52.0 $\pm$ 1.0 <sup>by</sup>	32.1 $\pm$ 6.9 <sup>cy</sup>	39.4 $\pm$ 4.9 <sup>bcy</sup>	77.7 $\pm$ 5.9 <sup>ay</sup>
900		64.0 $\pm$ 2.8 <sup>bx</sup>	43.0 $\pm$ 3.5 <sup>dy</sup>	53.6 $\pm$ 5.0 <sup>cx</sup>	83.6 $\pm$ 0.4 <sup>ax</sup>
1200		81.4 $\pm$ 2.9 <sup>bw</sup>	62.6 $\pm$ 3.7 <sup>cx</sup>	73.5 $\pm$ 3.4 <sup>bw</sup>	94.4 $\pm$ 2.2 <sup>ax</sup>

• Means with different letters(a, b, c, d) within a row are significantly different from each other at p<0.01 as determined by Duncan's multiple range test.

• Means with different letters(w, x, y, z) within a column are significantly different from each other at p<0.01 as determined by Duncan's multiple range test.

**Table 2.** Correlation coefficients between antimutagenicity and antioxidative activity for soybean saponins and major antioxidants

	AMES <sup>3)</sup>			
	Soybean saponin	L-ascorbic acid	$\alpha$ -tocopherol	BHT
EDA <sup>1)</sup>	0.93**	0.77*	0.86**	0.89**
IR <sup>2)</sup>	0.93**	0.79*	0.80**	0.80**

<sup>1)</sup>EDA : Electron donating abilities(EDA) of soybean saponins and major antioxidants to DPPH radicals

<sup>2)</sup>IR : Inhibition effect(%) of lipid peroxidation by U.V. radiation of soybean saponins and major antioxidants

<sup>3)</sup>AMES : Inhibition rate(%) of soybean saponins and major antioxidants on the mutagenicity induced by AFB<sub>1</sub> in *Salmonella typhimurium* TA 100

\*p<0.05 \*\*p<0.01

해 생성되며 변이원성 및 발암성을 지닌 곰팡이독소로<sup>31,32)</sup> 특히 *Salmonella typhimurium* strains TA98과 TA100에 대하여 높은 변이원성을 지닌다.<sup>33,34)</sup> AFB<sub>1</sub>은 섭취 후 간의 특이적 microsomal system과 nuclear cytochrome P450 관련효소에 의해 대사적으로 활성화되어 매우 반응성이 강한 AFB<sub>1</sub>-8,9-epoxide로 전환된 후 단백질과 세포내 DNA의 N-7 guanine와 같은 세포내 거대분자의 친핵체중심에 쉽게 결합할수 있다<sup>35)</sup>.

*Salmonella typhimurium* TA100에서 간접돌연변이원인 AFB<sub>1</sub>에 대한 대두 사포닌 및 항산화인자들의 항돌연변이 효과를 비교 검토한 결과는 Table 1과 같다. *In vitro* system에서 간의 microsomal fraction으로 유도된 AFB<sub>1</sub>의 변이원성 활성은 plate당 1251.7±64.7 His<sup>+</sup> revertant colonies를 나타내었고, 항산화인자를 처리한 모든 균에서는 AFB<sub>1</sub>의 돌연변이 유발성이 유의적으로 저해되었다(p<0.01). 대두 사포닌의 경우 AFB<sub>1</sub>의 돌연변이 유발성을 저해하는 항돌연변이능은 매우 높은 것으로 나타나 600µg/plate에서는 대조군에 비해 revertants수가 50% 감소하였고 900µg/plate 농도에서는 64%, 1200µg/plate 농도에서는 81%까지 revertants수를 감소시켰다. 이러한 대두 사포닌의 돌연변이유발성의 저해효과는 L-ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol의 효과보다 훨씬 높은 것으로 나타났다. 한편 BHT의 경우도 항산화능 뿐 아니라 AFB<sub>1</sub>으로 유도된 세포의 돌연변이 유발성에 대한 저해효과도 매우 큰 것으로 나타났다. AFB<sub>1</sub>의 돌연변이 유발성의 감소는 본 실험에 사용된 항산화물질 모두에서 시료의 농도에 의존적으로 유의적인 차를 보였다(p<0.01).

본 연구에서는 이들이 갖는 항산화성이 항돌연변이성과 어떤 상관성을 갖는지를 보기 위해 Spearman's correlation coefficient 값을 구한 결과 모든 항산화인자에 있어 그들이 갖는 항돌연변이능은 항산화능과 유의한 상관관계를 나타냈다(Table 2). 특히 대두 사포닌은 그 상관도가 두

가지 항산화능 시험 모두에서 0.93으로 나타났고(p<0.001) BHT는 0.89와 0.80(p<0.01), L-ascorbic acid는 0.77과 0.79의(p<0.05),  $\alpha$ -tocopherol은 0.80과 0.86(p<0.01)의 상관성을 나타냈다. 따라서 본 연구에서 사용한 시료들의 항돌연변이능은 이들이 가진 항산화능에 그 상당부분이 기여된다고 할 수 있다. 그러나 연구 결과에서 나타난 것 처럼 대두 사포닌은 사용된 항산화물질들에 비해 그 항산화력은 떨어지는 반면 항돌연변이 효과는 가장 높게 측정되었다. 이 결과는 사포닌의 항돌연변이능은 항산화효과 이외의 또 다른 기전에 의해 일어나고 있음을 암시하고 이로써 사포닌이 소유한 생리활성을 매개하는 생화학적 기전이 다양함을 알 수 있다.

항돌연변이 작용기전은 다음의 세가지 측면에서 설명되어 질 수 있다. 첫째, 생체내로 유입된 화학적 발암물질은 세포 내에서 두단계의 무독화과정을 거치게 되는데 제 1단계는 지용성인 발암물질이 극성 물질로 전환되는 단계로 물질의 종류에 따라 산화반응 또는 환원반응을 거치게 된다. 이렇게 극성화된 물질은 제 2단계에서 glucuronidation, sulfation, methylation 등의 반응을 통해 수용성으로 전환된 후 배설되게 된다. 이때 제 1단계에서 진행되는 산화반응은 다양한 라디칼 형태의 활성화 산물들을 생성하여 DNA 손상을 초래하는데 항산화인자들은 이들을 DNA와 결합하지 못하도록 환원시키는 역할을 한다. 실제로 BHT와 같은 페놀화합물의 경우 benzopyrene 또는 aflatoxin의 활성화 산물과 직접 결합하거나 cytochrome P450유도를 통해 이들이 DNA와 결합하지 못하도록 하는 것으로 밝혀진 바 있다<sup>36)</sup>. 둘째로는 세포돌연변이를 일으킬 수 있는 지질과산화물의 생성을 억제하고 이는 생성된 과산화물에 의한 세포막 투과성변화를 저해하는 역할도 하게된다. 셋째, 화학발암물질의 활성화(제 1 단계) 및 무독화(제 2 단계)에는 다양한 효소가 관여하는데 각 종 항산화인자들은 이러한 효소를 활성화하여 발암물질의 배설을 간접적으로 촉진시킨다. 한편 항산화인자들은 생체내 실험에서도 항암효과를 나타내었는데 대두 사포닌의 경우 3% 수준으로 사료에 섞어 화학발암원인 azoxymethane을 투여한 쥐에게 먹인 후 대장암의 생성의 표지자인 aberrant crypt형성을 살펴본 결과 유의한 항암효과를 나타내었다<sup>37)</sup>. BHT의 경우에도 다양한 종류의 화학발암원을 투여한 동물에서 암조직의 생성을 억제하는 것으로 증명된 바 있다<sup>38)</sup>. 이상의 결과를 보면 대두의 항암작용은 대두사포닌이 소유한 항산화능이 깊게 관여하며 이는 생체내에서도 유효한 것으로 보여 암의 예방을 위한 식이인자로써 그 이용가능성이 제시되고 있다.

## 요약 및 결론

## Literature cited

본 연구에서는 대두가 가진 항암효과를 체계적으로 규명하기 위한 기초작업으로 대두사포닌의 항산화력과 그들이 갖는 항돌연변이능을 밝히고, 항산화력과 항돌연변이능의 상관관계를 측정하였다.

동시에 대두 사포닌의 효과를 이미 잘 알려진 주요 항산화물질인 L-ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol 및 BHT의 효과와 비교·분석하였다.

실험결과를 요약하면 다음과 같다.

1) DPPH에 대한 전자공여능을 이용한 항산화능 측정에서는 모든 군에서 시료 농도의 증가에 따라 대조군에 비해 전자공여능이 유의적으로 증가하였다( $p < 0.01$ ). 그 효과는 L-ascorbic acid >  $\alpha$ -tocopherol > BHT > 대두 사포닌의 순으로 나타났다.

2) TBA를 이용한 지질 과산화 형성 억제능은 모든군에서 농도의 증가에 따라 유의적으로 증가하였다( $p < 0.01$ ). 같은 농도에서 지질 산화 억제능을 비교해 본 결과 항산화력은 BHT >  $\alpha$ -tocopherol = L-ascorbic acid > 대두 사포닌순으로 나타났다.

3) Ames salmonella test system을 이용한 항돌연변이원성 실험에서는 BHT > 대두 사포닌 >  $\alpha$ -Tocopherol > ascorbic acid의 순으로 세포의 돌연변이가 억제되었으며, AFB<sub>1</sub>의 돌연변이 유발성의 감소는 모든군에서 시료의 농도에 의존적으로 유의적인 차를 보였다( $p < 0.01$ ). 대두 사포닌의 돌연변이 유발성의 저해효과는 L-ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol의 효과보다 훨씬 높은 것으로 나타났으며 BHT의 경우는 항산화능 뿐 아니라(AFB<sub>1</sub>)으로 유도된 세포의 돌연변이 유발성에 대한 저해효과도 매우 큰 것으로 나타났다.

4) Spearman's correlation coefficient값을 구하여 대두 사포닌과 각 종 항산화 인자의 항돌연변이능과 항산화능의 상관관계를 살펴본 결과, 모든 항산화 인자에서 그들이 갖는 항돌연변이능이 항산화능과 유의한 상관관계를 갖는 것을 볼수 있었다.

따라서 대두 사포닌 및 각 종 항산화물질들의 보고된 항암 효과는 그들이 가지는 항산화능에 관여되는 것으로 보이고 이들의 섭취는 암화과정의 개시단계인 세포돌연변이 유발을 억제하는 것으로 생각된다.

#### ■ Acknowledgements

This work was supported by a grant from Sookmyung Women's University.

- 1) Watson RR, Leonard TK. Selenium and vitamin A, E and C : Nutrients with cancer prevention properties. *J Am Diet Assoc* 86 : 505-510, 1986
- 2) Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging : 8-hydroxy-2-deoxy-guanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 4533-4537, 1990
- 3) Choi YS. Effect of dietary vitamin E on biochemical composition of male rats in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. MVM Thesis, Kyungpook National University, Korea, 1992
- 4) Miller EC. Some current perspectives on chemical carcinogenesis in human and experimental animals. Presidential Address. *Cancer Res* 38 : 1479-1496, 1978
- 5) Hayakawa M, Torii K, Sugiyama S, Tanaka M, Ozawa T. Age associated accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm. *Biochem Biophys Res Commun* 179 : 1023-1029, 1991
- 6) Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362 : 709-715, 1993
- 7) Kwon TW. Kong keonkang yeohaeng. Sungha Press, 1995
- 8) Sung MK, Kendall CWC, Koo M, Rao AV. Effect of soybean saponins and gypsophilla saponin on growth and viability of colon carcinoma cells in culture. *Nutr Cancer* 23 : 259-270, 1995
- 9) Kim SE. Inhibitory effect of soybean saponins on aflatoxin B<sub>1</sub>-induced mutagenicity and colon adenocarcinoma cell growth. M.H.E. Thesis, Sookmyung Women's University, Korea, 1998
- 10) Santiago LA, Hiramatsu M, Mori A. Japanese soybean paste miso scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidation. *J Nutr Sci Vitaminol* 38 : 297-304, 1992
- 11) Deng H, Zhang J. Anti-lipid peroxidative effect of ginsenoside Rb<sub>1</sub> and Rg<sub>1</sub>. *Chinese Med J* 104 : 395-398, 1991
- 12) Wolf WJ, Thomas BW. Thin layer and anion exchange chromatography of soybean saponin. *J Am Oil Chem Soc* 47 : 86-90, 1970
- 13) Blios MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181 : 1199-1200, 1958
- 14) Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut Res* 113 : 173-215, 1983
- 15) Torel J, Cillard J, Cillard P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* 25 : 383-385, 1986
- 16) Cerutti PA, Emerit I, Amstad P. In : Weinstein IB, Vogel HJ, eds. Genes and proteins in oncogenesis, pp.55-67, Academic Press, New York, 1983
- 17) Kang SS. Triterpenoid saponin. Seoul university Press, 1996
- 18) Kudou S, Tonomura M, Tsukamoto C, Uchida T, Yoshikoshi M, Okubo K. Structural elucidation and physiological properties of genuine soybean saponins. In : Huang MT, Osawa T, Ho CT, Rosen RT, eds. Food Phytochemicals for Cancer Prevention I, pp.340-348, ACS Press, Washington DC, 1994
- 19) Kudou S, Tonomura M, Tsukamoto C, Uchida T, Sakabe T, Tamura N, Okubo K. Isolation and structural elucidation of DDMP-conjugated soyasaponins as genuine saponins from soybean seeds. *Biosci Biotech Biochem* 57 : 546-550, 1993
- 20) Yoshiki Y, Okubo K. Active oxygen scavenging activity of DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one)saponin in soybean seed. *Biosci Biotech Biochem* 59 : 1556-1557, 1995
- 21) Sung MK. Anticarcinogenic properties of soybeans. *Soybean Digest* 13 : 19-31, 1996
- 22) Bendich A, Polito D, Gabriel E, Machlin LJ. Interaction of dietary vitamin C and vitamin E on guinea pig immune responses to mitogens. *J Nutr* 114 : 1588-1593, 1984
- 23) Ginter E. Interaction between vitamins C and E and cytochrome P 450. In : Miquel J, Quintanilha AT, Weber H, eds. Handbook of Free

- radicals and antioxidant in biomedicine, Vol II, pp.95-104, CRC Press, 1989
- 24) Ames BN, Hollstein MC, Cathcart R. Lipid peroxidation and oxidative damage to DNA. In : Yagi K, ed. Lipid peroxides in biology and medicine, pp.339-351, Academic Press, New York, 1982
  - 25) Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227 : 375-381, 1985
  - 26) Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Rindahl M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review, *Mutation Res* 195 : 137-149, 1988
  - 27) Carubelli R, Graham SA, McCay. Effect of dietary butylated hydroxytoluene on nuclear envelope cytochrome P450 during the initiation and promotion stages of hepatocarcinogenesis. *Nutr Cancer* 18 : 59-62, 1992
  - 28) Ohminami H, Kimura Y, Okuda H, Arichi S, Yoshikawa M, Kitagawa I. Effect of soyasaponins on liver injury induced by highly peroxidized fat in rats. *Planta Med* 50 : 440-441, 1984
  - 29) Nishida K, Ohta Y, Araki Y, Ito M, Nagamura Y, Ishiguro I. Inhibitory effects of "group A saponin" and "group B saponin" fractions from soybean seed hypocotyls on radical-initiated lipid peroxidation in mouse liver microsomes. *J Clin Biochem Nutr* 15 : 175-184, 1993
  - 30) Miyao H, Arai T, Udayama M, Kinjo J, Nohara T. Kaikasaponin III and soyasaponin I, major triterpene saponins of *abrus cantoniensis*, act on GOT and GPT : influence on transaminase elevation of rat liver cells concomitantly exposed to CCl<sub>4</sub> for one hour. *Planta Med* 64 : 5-7, 1998
  - 31) Carrillo MC, Carnovale CE, Monti JA. Effect of aflatoxin B<sub>1</sub> treatment in vivo on the in vitro activity of hepatic and extrahepatic glutathione S-transferase. *Toxicol Lett* 50 : 107-116, 1990
  - 32) Liu L, Massey TE. Bioactivation of aflatoxin B<sub>1</sub> by lipoxygenases, prostaglandin H synthase and cytochrome P450 monooxygenase in guinea-pig tissues. *Carcinogenesis* 13 : 533-539, 1992
  - 33) Jorgensen KV, Clayton JW, Price RL. Evaluation of aflatoxin B<sub>1</sub> mutagenesis : addition of glutathione and glutathione S-transferase to the *Salmonella* mutagenicity assay. *Environ Mutagen* 9 : 411-419, 1987
  - 34) Larson P, Tjalve H. Distribution and metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Carcinogenesis* 14 : 1-6, 1993
  - 35) Groopman JD, Hasler JA, Trudel LJ, Pikul A, Donahue PR, Wogan GN. Molecular dosimetry in rat urine of aflatoxin-N<sup>7</sup>-guanine and other aflatoxin metabolites by multiple monoclonal antibody affinity chromatography and immunoaffinity / high-performance liquid chromatography. *Cancer Res* 52 : 267-274, 1992
  - 36) Williams GM, Tanaka T, Maeura Y. Dose-related inhibition of aflatoxin B<sub>1</sub> induced hepatocarcinogenesis by the phenolic antioxidants, butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Carcinogenesis* 7 : 1043-1050, 1986
  - 37) Koratkar R, Rao AV. Effect of soya bean saponins on azoxymethane-induced preneoplastic lesions in the colon of mice. *Nutr Cancer* 27 : 206-209, 1997
  - 38) Kahl R. Protective and adverse biological actions of phenolic antioxidant. In : Sies H, ed. Oxidative stress : oxidants and antioxidants, pp. 245-273, Academic Press, New York, 1991