

갈화에서 분리한 이소플라본의 항산화 및 세포보호효과

이경태[#] · 손일철 · 공은아 · 김동현 · 최승기* · 최종원** · 박희준***

경희대학교 약학대학 약학과, *분당차병원, **경성대학교 약학대학, ***상지대학교 응용식물과학부

(Received October 6, 1999)

Antioxidative and Cytoprotective Effects of Isoflavones Isolated from *Pueraria thunbergiana* Flowers

Kyung-Tae Lee[#], Il-Cheol Sohn, Eun-Ah Kong, Dong-Hyun Kim,
Seung-Ki Choi*, Jong-Won Choi** and Hee-Juhn Park***

College of Pharmacy, Kyung-Hee University, Seoul, 130-701,

*Cha General Hospital, Bundangu, Kyunggido 463-030,

**College of pharmacy, Kyung-Sung University, Pusan 680-736,

***Faculty of Applied Plant Sciences, Sangji University, Wonju, 220-702, Korea

Abstract — Antioxidative and cytoprotective effects of tectorigenin and glycitein isolated from the *Pueraria thunbergiana* and its derivative, genistein, were determined. Among these three compounds, tectorigenin and glycitein bearing 6-methoxyl groups in both isoflavones showed significant free radical scavenging activities on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and xanthine/xanthine oxidase (XOD) generating superoxide anion radical. Tectorigenin only showed a slight inhibitory effect on XOD. We further studied the inhibitory effects of these isoflavones on the lipid peroxidation in rat liver microsomes induced by enzymatic and non-enzymatic methods. Each of them exhibited inhibitory effect on both ascorbic acid/Fe²⁺ and ADP/NADPH/Fe⁺³-induced lipid peroxidation. Moreover, tectorigenin exhibited the highest protection of hydrogen peroxide damage on HepG2 and Vero cells among the three isoflavones, in the cytoprotective assay. It was suggested that the pattern of antioxidative and cytoprotective effect of isoflavones could be crucially changed by the aromatic substitution of oxygen-containing groups.

Keywords □ Genistein, glycitein, tectorigenin, isoflavone, antioxidant, hydrogen peroxide.

식물의 잎, 뿌리 및 열매 등에 함유된 특정 식물성 화합물은 발암을 저해하는^{1,2)} 효과로서 암을 예방하는 특성 때문에 많은 관심과 흥미를 가져왔다. 최근 이러한 화합물중의 하나인 이소플라보노이드는 특히 콩과 식물에 흔하게 존재하는 것으로 알려져 있으며 생리활성에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다.

많은 이소플라보노이드들로부터 항에스트로젠,³⁾ 항암 작용,⁴⁾ 항염증작용,⁵⁾ 심장보호효과,⁶⁾ 효소활성저해⁷⁾ 등의 생리 활성과의 연관성에 대한 연구가 보고되었다. 이

소플라보노이드 화합물들의 생리작용들은 항산화작용과의 연관성이 있는 것으로 추정되고 있다. 그러나 대부분의 연구는 주로 케니스테인의 항산화작용의 연구^{8,9)}에만 집중되어 있으며 상대적으로 다른 이소플라보노이드계 화합물들의 항산화적 특성에 대해서는 많이 알려져 있지 않다. 그 이유는 아마도 케니스테인에 관한 phytoestrogen으로서의 작용과 항종양활성의 연구사와 관련이 있는 듯하다.

Superoxide anion($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl free radical($\cdot OH$) 등을 통칭하여 활성산소(reactive oxygen species)라 부르는데 이들은 짧은 기간동안 매우 활성이 높게 작용하는 특징을

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-961-0860 (팩스) 02-966-3885

가지고 있다. 빛의 노출 및 철의 복용에 의하여 활성 산소가 증가하며, 이는 인체내 구성 성분인 지질, 단백질 및 DNA 등 여러 세포 성분에 영향을 미쳐 결국 질병을 야기하게 된다. 여러 질환 중 특히 암, 심혈관, 관절염 및 염증과 노화를 포함하는 퇴행성 질환^{10,11)}과도 밀접한 연관성이 확인되고 있다. 이러한 비정상적 변화에 대해 인체는 활성산소를 불활성화시키는 기전으로서 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase와 같은 효소적 기전과 metal chelator 등의 비효소적 기전이 알려져 있다.

본 실험에 사용된 이소플라본의 화학구조식은 Fig. 1에서 나타내었는데 이들 구조식으로부터 텍토리제닌의 구조는 케니스테인의 C-6에 OCH₃기가 결합되어 있으며 글리시테인은 케니스테인의 C-5의 OH기가 없는 대신 C-6에 methoxy기가 결합되어 있다.

참(*Pueraria thunbergiana*, Leguminosae)의 꽃이 약용 부위가 되는 갈화(Puerariae Flos)의 이소플라보노이드 성분으로 tectorigenin, kakkalide, irisolidone, genistein, daidzein 등이 알려져 있고¹²⁻¹⁵⁾ 저자 등¹⁶⁾에 의해 glycitein, tectoridin, glycitin, 6"-O-xylosyl-tectoridin과 6"-O-xylosylglycitin이 분리되어 보고된 바 있다. Kinjo 등¹⁷⁾은 *Pueraria lobata*의 꽃에서 soyasaponin I과 kakkasaponin III를 보고 한 바 있다. Soyasaponin I, soyasaponin βg, soyasaponin Ab 및 glycyrrhizin에는 세포보호효과가 알려져 있고¹⁸⁾ soyasaponin I과 kudzusaponin SA에는 간 보호활성이 알려져 있다.¹⁹⁾ 이와 같이 *Pueraria*속 식물의 세포 보호효과와 유사한 생리활성에 관한 연구는 주로 이들 사포닌에 관하여 연구가 이루어졌다. 그러나, 실제로는

갈화가 갈근에 비해 이소플라보노이드를 더 많이 함유하고 있음은 저자들의 식물 화학적 분리과정에서 알 수 있었다. 갈화에서의 이소플라보노이드는 배당체로 더 많이 존재하나 연구자들의 예비실험에서는 이들 배당체의 항산화효과가 없음을 확인함으로써 갈화의 비당체인 글리시테인과 텍토리제닌, 그리고 구조에서 유사성을 보이는 케니스테인과의 항산화활성 및 세포보호활성을 비교하고자 하였다.

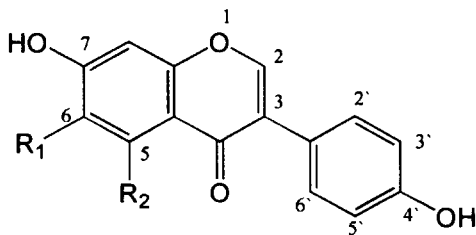
간보호, 항당뇨, 항체양 등과 밀접히 관련이 있는 생약성분의 세포보호작용이 최근 생약연구의 경향으로 이러한 세포보호작용은 주로 항산화작용과 관련된 것으로 인식되고 있다. 그러므로, 본보에서는 유사한 이소플라본계 화합물들이 갖는 항산화 및 세포보호작용 등의 생리활성과 화학구조를 비교하여 상관성을 설명하고자 한다.

실험방법

시약 - MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), XOD(xanthine oxidase), xanthine, ADP, NADPH, TBA(2-thiobarbituric acid), genistein, caffeic acid, allopurinol, mesna등은 Sigma사에서 구입하였으며 RPMI 1640과 FBS는 Gibco에서 구입하였다. 텍토리제닌과 글리시테인은 전보¹⁶⁾에 따라 분리한 것을 사용하였다.

흰쥐 간 마이크로솜 분획 - 흰쥐 마이크로솜 분획은 Kiso 등의 방법²⁰⁾을 따랐다. 흰쥐를 24시간 절식시킨 후 복대동맥을 통해 0.9% ice-cold NaCl 용액으로 관류하여 혈액을 완전히 제거하였다. 간을 적출하여 가위로 잘게 잘라 1.15% KCl 용액을 사용하여 호모게나이즈로 균질화시킨 후 1.15% KCl로 4배 희석하였다. 800×g, 4°C에서 20분간 원심 분리한 후 다시 상등액을 취해 105,000×g에서 60분간 원심분리 하였다. 침전물을 취하여 동량의 1.15% KCl액으로 현탁하였으며 단백질 정량은 Bradford법²¹⁾으로 측정하였다.

MTT에 의한 세포 생존율 측정²²⁾ - 96well plate에 24시간 배양한 세포에 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 각각의 well에 H₂O₂ 100 μl 및 여러 농도의 이소플라본 100 μl 를 첨가하여 45분간 배양한 후 상등액을 제거하고 PBS로 2번 세척한 후 배지 200 μl 를 주입하여 다시 24시간 배양하였다. 배양액 속에 5



Isoflavones		
Genistein :	R ₁ =H	R ₂ =OH
Glycitein :	R ₁ =OCH ₃	R ₂ =H
Tectorigenin :	R ₁ =OCH ₃	R ₂ =OH

Fig. 1 - Structures of the plant-derived isoflavonoids included in this study.

mg/ml MTT시약 50 μ l 을 가하여 4시간 배양 후 상등액을 제거하고 DMSO 50 μ l 를 첨가한 후 540 nm에서 ELISA Reader로 흡광도를 측정하였다. 세포독성(Cytotoxicity index: CI)은 다음과 같은 식으로 계산하여 %로 나타내었다.

$$C.I.(%) = \left(1 - \frac{\text{sample O.D}}{\text{control O.D}}\right) \times 100$$

DPPH 활성 측정²³⁾ - 60 μ M DPPH 500 μ l와 시료 용액 500 μ l를 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험군으로 DPPH 대신 에탄올을 사용하였으며 대조군으로는 시료 대신 물을 사용하였을 때를 100%로 하여 DPPH radical 소거 정도를 %로 구했다.

Superoxide anion radical 측정²³⁾ - 0.05M Na₂CO₃ (pH 10.2) 900 μ l에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 1.5 μ g/ml BSA, 0.75 mM NBT 50 μ l를 각각 첨가하였다. 여러 농도의 이소플라본 시료 50 μ l와 XOD (0.1 μ g/ml) 50 μ l를 가해 반응을 정지시킨 후 560 nm에서 흡광도로 측정하였다.

XOD 활성 측정²³⁾ - 0.1 M 인산완충액(pH 7.5) 600 μ l, 시료 50 μ l를 가하여 25°C에서 10분간 방치시킨 후 0.1 mM xanthine 용액 300 μ l를 첨가하여 다시 25°C에서 30분간 반응을 정지시키고 295 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 대신 완충액을 첨가한 대조군의 흡광도를 100%로 하여 XOD 저해도를 %로 계산하였다.

흰쥐 간 마이크로솜에서 지질 과산화 측정 - 흰쥐 간을 사용한 지질과산화 측정의 효소적 및 비효소적 방법은 Kiso 등의 방법²⁰⁾을 일부 수정하여 사용하였다.

1) Ascorbic Acid/Fe²⁺ 유도 지질 과산화법(비효소적 방법)-100 mM KCl 390 μ l, Tris-HCl(45 mM, pH 8.0) 390 μ l, 시료 용액 50 μ l, 마이크로솜 분획(20 μ g/ml) 50 μ l에 ascorbic acid(10 mM)와 FeSO₄(0.5 mM)를 각각 10 μ l를 가한 후 37°C에서 20분간 방치하였다. 4°C에서 반응을 정지시킨 후 반응물에 2% SDS 400 μ l, 20% acetic acid 완충액(pH 3.5) 750 μ l, 0.8% TBA(2-thiobarbituric acid) 750 μ l를 가하여 95°C에서 1시간 가열한 후 n-buthanol/pyridine (15:1) 2 ml를 가하여 잘 흔들어진 뒤 1520 g에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 실험에는 시료대신 증류수

를 첨가하여 이때의 흡광도를 100%로 하여 저해 정도를 %로 나타내었다.

2) ADP/NADPH/Fe³⁺ 유도 과산화지질법(효소적 방법)-100 mM KCl 390 μ l, 45 mM Tris-HCl(pH 8) 390 μ l, 시료 50 μ l, 마이크로솜 분획(20 mg/ml) 50 μ l에 20 mM ADP 50 μ l, 1 mM NADPH 50 μ l, 2 mM FeCl₃ 10 μ l를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1)항과 같은 방법을 사용하여 흡광도를 측정하였다.

실험결과

항산화활성은 유리기소거효과 및 지질과산화 억제 작용으로 평가하였으며 세포에서의 H₂O₂에 대한 이소플라본류의 세포보호효과를 세포독성으로 관찰 하였다.

DPPH 유리기 소거 효과 - 텍토리게닌과 글리시테인의 IC₅₀는 각각 46.9 μ M와 278.5 μ M로서 비슷한 활성을 보인 반면 게니스테인은 최고 2 mM 농도에서도 저해 효과를 보이지 않았다. 반면 대조약물인 mesna는 40 μ M에서 50%의 저해 효과를 보임으로서 이소플라본류의 DPPH 유리기 소거효과는 대조약물인 mesna에 비해 약한 유리기 소거작용을 보여주었다. 텍토리게닌과 글리시테인의 구조는 C-5의 OH기의 존재 유무에서만 차이가 난다. 반면, 게니스테인은 5-OH기가 존재하는 대신에 6-OCH₃기가 없는 것으로서 DPPH에 의한 유리기 소거작용에서 6-OCH₃기가 중요하게 작용하고 있음을 보여주었다.

Superoxide anion radical 형성에 미치는 영향 - XOD에 의해 형성되는 superoxide anion의 생성저해의 결과는 Table I에 나타내었다. 시험한 화합물 중 텍토리게닌과 글리시테인의 IC₅₀는 각각 79.8 μ M과 70.2 μ M을 보여주고 있으나 게니스테인은 432.8 μ M로서 매우 약한 활성을 보였다. 대조약물인 caffeic acid는 1.86 μ M에서 50%의 저해율을 보였다.

XOD 활성 저해효과 - Superoxide anion의 유리기 소거작용이 XOD 활성 저해작용에 의한 것임을 확인하기 위해 실험한 결과 5,7-dihydroxy-6-methoxy기를 가지는 텍토리게닌만이 488 μ M 농도에서 50% 저해작용을 보여주고 있으며 글리시테인과 게니스테인은 최고 2 mM 농도에서도 전혀 저해효과가 나타나지 않았다. 반면 대조약물로 사용한 allopurinol의 IC₅₀는 0.88 μ M이었다.

Table I – Inhibitory effects on the activity of XOD and on superoxide anion radical generation

Compound	IC ₅₀ (μM)	
	XOD activity	Superoxide anion radical generation
Caffeic acid		1.86
Allopurinol	0.62	
Tectorigenin	488.0	79.8
Glycitein	>2000	70.2
Genistein	>2000	432.8

Table II – Inhibitory effects on ascorbic acid/Fe²⁺ and ADP/NADPH/Fe³⁺ induced lipid peroxidation in rat liver microsomes

Compounds	IC ₅₀ (μM)	
	Ascorbic acid and Fe ²⁺	ADP/NADPH/Fe ³⁺
Caffeic acid	3.65	4.64
Tectorigenin	13.33	21.37
Glycitein	12.11	40.24
Genistein	15.79	24.52

흰쥐 마이크로솜에서 지질과산화 저해 작용 – Ascorbic Acid/Fe²⁺ 유도에 의한 비효소적 방법과 ADP/NADPH/Fe³⁺ 유도에 의한 효소적 방법으로 지질과산화가 일어나는 흰쥐 마이크로솜에 이소플라본 화합물들을 첨가함으로써 malondialdehyde(MDA) 형성의 저해를 관찰하였다(Table II). 비효소적 지질과산화 저해작용에서 모든 시료의 IC₅₀가 10~20 μM범위에서 관찰되었으나 대조약물인 caffeic acid보다 저해율이 낮았다. ADP/NADPH/Fe³⁺ 효소유도 지질과산화 저해에서 텍토리게닌과 게니스테인의 IC₅₀는 비슷하게 관찰되었으나, 글리시테인은 두 배정도 저해율이 낮았다.

H₂O₂ 및 시료들의 세포독성 – 시료인 이소플라본 화합물들이 세포독성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포를 45분간 배양하여 MTT 분석법으로 측정된 결과 최고 700 μM까지 두 세포 모두에서 뚜렷한 세포독성을 보이지 않았다. H₂O₂만을 첨가하여 배양하였을 때 Vero 세포 및 HepG2 세포에서 각각 2.5 μM에서 41.7% 및 1.7 μM에서 53.5%의 생존율이 45분간 배양에서 확인되었다. 이러한 세포독성이 오직 H₂O₂에 기인함을 확인하기 위하여 catalase(25 U/ml)와 배양한 결과 두 세포모두에서 생존율은 95% 이상 회복됨으로서 H₂O₂만이 세포에 손상을 주는 것을 확인하였다(Table III).

이소플라본류의 H₂O₂ 손상에 대한 보호작용을 연구하기 위하여 이소플라본 화합물과 H₂O₂를 45분간 동시에 배양하여 이소플라본을 처리하지 않은 대조군과의 생존율을 비교하였다. 텍토리게닌은 농도 의존적으로 대조군에 비해 유의성 있는 보호효과를 나타내었으며 350 μM의 경우 95% 이상의 세포보호효과가 2종 세포 모두에서 확인되었다. 게니스테인은 약한 보호작용이, 글리시테인은 전혀 보호작용이 관찰되지 않았다.

고 찰

이소플라본류의 생체내 많은 유의한 작용들에 관한 연구들과 항산화활성과의 연관성이 보고되고 있지만 이소플라본류의 유사한 구조를 가지고 있는 텍토리게닌과 글리시테인의 항산화효과를 게니스테인과 직접적으로 비교한 연구는 없었다. 본 연구는 유사한 이소플라본들인 글리시테인, 텍토리게닌과 게니스테인의 항산화 효과로서 유리기 소거, 지질과산화 억제작용 및

Table III – Cell viability incubated with isoflavones and H₂O₂ in HepG2 and Vero cells

Sample name incubated with cells	Dose (μM)	Cell viability (%)	
		Vero	HepG2
Tectorigenin + H ₂ O ₂	100	79.8 ± 6.5**	78.8 ± 4.9*
	350	95.2 ± 9.8**	99.6 ± 7.5**
Glycitein + H ₂ O ₂	100	59.6 ± 6.9	53.8 ± 3.8
	350	53.1 ± 2.6	50.5 ± 2.6
Genistein + H ₂ O ₂	100	53.8 ± 2.3	53.0 ± 4.2
	350	62.7 ± 5.4	72.7 ± 3.9
H ₂ O ₂	1.7		53.5 ± 6.5
	2.5	41.7 ± 5.6	
H ₂ O ₂ + catalase(2.5 U/ml)		99.2 ± 8.5	97.6 ± 7.9

Each value represents the mean ± S.E. (n=3). (*p<0.05, **p<0.01): Statistically significant compared with H₂O₂ control

H_2O_2 의 세포독성에 대한 catalase 유사효과를 관찰함으로써 비슷한 구조를 가진 이소플라본 화합물들의 구조-항산화활성의 상관관계를 설명하고자 하였다.

글리시테인과 텍토리게닌은 DPPH와 superoxide anion 유리기 소거활성을 보였으나 대조 약물인 mesna와 caffeic acid에 비해 약한 활성을 보였다. DPPH는 화학적으로 유도된 유리기로서 간단한 화학 반응에 따라 유리기 소거작용을 관찰하며, superoxide anion은 xanthine/XOD의 효소에 의한 superoxide 음이온을 소거하는 반응으로 글리시테인과 텍토리게닌은 이 두 실험에서 유리기 소거작용이 관찰되는 반면 게니스테인에서는 관찰되지 않았다. 게니스테인에서 유리기 소거활성이 관찰되지 않는 이유는 메타-치환하는 함산소 치환기를 갖기 때문인 것으로 추측된다. 따라서 텍토리게닌의 유리기 소거효과에서 알 수 있듯이 함산소 치환기의 오르도-치환이 유리기 소거효과에서 크게 기여하는 것으로 추정된다.

일반적으로 xanthine/XOD의 효소에 의한 superoxide 음이온 저해작용은 superoxide 음이온 소거작용과 XOD 효소 저해에 의해 나타난다. 시료 중 C-5, 6, 7에 함산소 치환기를 갖는 텍토리게닌만이 선택적으로 저해작용을 보였다. 텍토리게닌 400 μM 에서 $3.4 \times 10^{-3} U/ml$ (10 $\mu g/ml$)의 XOD 효소 농도에 저해 작용을 보였으나 대조약물인 allopurinol에 비해 활성이 낮았다. 이러한 연구결과는 텍토리게닌이 XOD 활성저해를 나타내며 상대적으로 글리시테인의 $\cdot O_2^-$ 생성 저해는 유리기 소거작용에 의한 것임을 보여준다.

유리기의 연쇄반응은 지질과산화를 유도시키는 것으로 많이 알려져 왔으며 연속하여 환귀 간 마이크로솜의 ADP/NADPH/ Fe^{3+} 로 유도된 효소적 지질과산화와 ascorbic acid/ Fe^{2+} 로 유도된 비효소적 지질과산화에 미치는 영향들을 연구하였다. 이소플라본인 텍토리게닌, 게니스테인 및 글리시테인에 의한 유의성있는 지질과산화 저해효과가 두 시험법 모두에서 확인되었으나 대조약물인 caffeic acid보다는 약하게 관찰되었다. 일반적으로 지질과산화 유도억제에 사용되는 효소적 또는 비효소적 유도에 의한 두 가지 방법의 시발물질로는 Fe^{2+} 또는 Fe^{3+} 의 금속 이온이며 또한 천연화합물의 경우에 방향족 수산기가 지질과산화에 가장 중요한 역할을 한다. 반면에 superoxide 음이온인 $\cdot O_2^-$ 는 XOD의 대사과정 결과 생성되는 활성산소이나 이는 매우 반응성이 작은 유리기로서 지질과산화과정에 직접

적으로는 관여하지 않는다. 이러한 관점에서 게니스테인, 글리시테인 및 텍토리게닌 모두 지질과산화의 억제작용이 있음을 확인하였으며 특히 ADP/NADPH/ Fe^{3+} 로 유도된 효소적 지질과산화에서는 5-OH기가 없는 글리시테인은 게니스테인과 텍토리게닌에 비해 활성이 약 두 배정도 감소를 보였다. Xiong 등²³⁾이 지질과산화 저해활성은 화합물중의 페놀성 수산기 수에 따름을 보고한 바 있다. 본 실험의 결과에서 글리시테인의 페놀성 수산기는 게니스테인과 텍토리게닌의 페놀성 수산기에 비해 숫적으로 적게 가지므로 효소적 유도에 의한 지질과산화 저해활성이 다른 두 화합물의 경우보다 약하게 나타난 이유의 일부를 파악할 수 있었다.

글리시테인에는 C5-OH기가 없으므로 효소유도 지질과산화 저해작용이 약함을 보였으며 C5-OH는 C7-OH기에 비해 지질과산화 억제 작용에 중요한 역할을 하는 것은 Arora 등²⁴⁾의 보고와 일치하였다. 이소플라본류의 지질과산화 억제활성에서 C5-OH기의 존재가 중요함은 5-hydroxy-4-keto system의 관능기 구성과 관련이 있는 것으로 추측된다. 반면 B-환의 C-4' 수산기는 이소플라본의 항산화활성에 매우 중요한 역할을 하며 이 수산기가 OCH_3 기로 치환되면 항산화효과 및 지질과산화 억제가 사라지는 것이 보고되었다.²⁵⁾ 이는 이소플라본류 수산기에서 C-4'위치의 수산기가 매우 중요하며 상대적으로 C5-OH위치는 중간정도이며 C7-OH는 아무런 영향을 미치지 않음을 시사하고 있다.²⁵⁾

담배 흡연의 대사과정에서 생성되는 H_2O_2 는 세포내 자동산화와 세포독성을 통하여 산화적 세포 손상에 관여함이 보고²⁶⁾되었으며 많은 연구자들은 음식 중의 성분과 유리기 소거제 등을 사용하여 H_2O_2 유도 세포독성 저해를 연구하여왔다. 암세포 및 정상세포에 대한 H_2O_2 에 의한 세포독성에서 차이는 확인되지 않았으며 시료 중 텍토리게닌은 강한 H_2O_2 에 의한 포유동물 간 암세포 및 정상 원숭이 신장세포의 세포독성에 보호작용을 보이므로 catalase mimic 효과를 보였다. 유사 화합물 중 게니스테인은 약한 활성을 보였으나 글리시테인에서는 활성을 관찰할 수 없었다. 따라서, 이소플라본류의 세포보호작용의 발현을 위해서는 C5-OH기는 필수적이며 C6- OCH_3 기는 그 활성을 증가시키는 것으로 추측된다. 즉, C5-OH가 없이 C6- OCH_3 기가 결합되어 있다면 이 이소플라본은 세포보호작용이 없으리라 추정되며 이는 글리시테인의 현 실험결과가 보

여주고 있다.

이상의 실험결과를 종합하면 항산화효과가 보고된 게니스테인은 유리기 소거작용에서는 전혀 작용을 보이지 않는 반면 우수한 지질과산화 억제 작용 및 H₂O₂에 의한 세포독성 보호작용이 관찰되었다. 게니스테인은 phytoestrogen으로서 지질대사에 중요하게 관여되고 있음이 잘 알려져 있을 뿐만 아니라²⁷⁾ protein tyrosine kinase 억제제로서 항종양활성이 있음도 널리 알려져 있다.²⁸⁾ 본 연구로부터 게니스테인의 지질대사에서 지질과산화 억제효과에 따른 세포보호효과가 중요히 관계함을 시사하였다. 최근 활성산소와 관련한 암 연구가 진행되고 있으나 게니스테인의 항종양활성은 직접적인 protein tyrosine kinase에 대한 억제작용에 기인하고 유리기 소거효과와는 아무런 관련이 없음도 시사되고 있다. 텍토리게닌은 유리기 소거, 지질과산화 억제 및 세포보호작용 모두 뚜렷한 항산화작용을 나타내었다. 이에 따라 텍토리게닌은 게니스테인과 유사한 항종양활성을 발현할 가능성이 기대되고, 유리기 소거효과를 동시에 가지고 있으므로 성인병 예방제로서 게니스테인과는 독립적인 효과를 나타낼 것이 기대된다. 이 실험에서 추가적으로 알 수 있는 사실은 이소플라본의 경우에 활성산소의 동태에 따른 세포의 손상은 직접적인 유리기 소거효과보다도 지질과산화의 억제과정에 의해 더 크게 차단되는 것으로 풀이된다.

그러므로, 갈화의 세포보호효과는 구성성분인 사포닌에 의한 결과일 수도 있으나 이소플라본계 성분들에 의해 크게 영향을 받을 것으로 추측된다. 사포닌의 세포보호효과가 lipoxigenase의 억제작용에 의함을 시사하는 보고가 있다.²⁹⁾ 다른 경우에 지질과산화는 heme에 의해서도 촉매된다고 한다.³⁰⁾ 그렇다면 갈화의 경우에 사포닌과 이소플라본의 병용투여에 의해 지질과산화 억제효과와 세포보호효과가 상승적으로 나타날 가능성이 있는 것으로 풀이되므로 이에 관한 깊은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

문 헌

- Messina, M. J., Persky, V., Setchell, K. D. and Barnes, S. : Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr. Cancer* **21**, 113 (1994).
- Messina, M. and Messina, V. : Increasing use of soyfoods and their potential role in cancer prevention. *J. Am. Diet. Assoc.* **91**, 836 (1991).
- Cassidy, A., Bingham, S. and Setchell, K. : Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soybean products. *Br. J. Nutr.* **74**, 587 (1995).
- Peterson, G. and Barnes, S. : Genistein inhibits both estrogen and growth factor stimulated proliferation of human breast cancer cells. *Cell Growth Differ.* **7**, 1345 (1996).
- Yamamoto, S., Shimizu, K., Oonishi, I., Hasebe, K., Takamura, H., Inoue, T., Muraoka, K., Tani, T., Hashimoto, T. and Yagi, M. : Genistein suppresses cellular injury following hepatic ischemia/reperfusion. *Transplant Proc.* **28**, 1111 (1996).
- Anthony, M. S., Clarkson, T. B., Hughes, C. L. Jr., Morgan, T. M. and Burke, G. L. : Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J. Nutr.* **126**, 43 (1996).
- Yamashita, Y., Kawada, S. and Nakano, H. : Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids genistein and orobol. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 737 (1990).
- Cai, Q. and Wei, H. : Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutr. Cancer* **25**, 1 (1996).
- Wei, H., Wei, L., Frenkel, K., Bowen, R. and Barnes, S. : Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. *Nutr. Cancer* **20**, 1 (1993).
- Regnstrom, J., Nilsson, J., Tornvall, P., Landou, C. and Hamsten, A. : Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* **16**, 1183 (1992).
- Gey, K. F., Puska, P., Jordan, P. and Moser, U. K. : Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 326 (1991).
- Kurihara, T. and Kikuchi, M. : Studies on the constituents of flowers V. On the components of flowers of *Pueraria thunbergiana* Benth. (2). Isolation of a new isoflavone glycoside. *Yakugaku Zasshi* **95**, 1283 (1996).

- 13) Kurihara, T. and Kikuchi, M. : Studies on the constituents of Flowers. I. On the components of flower of *Pueraria thunbergiana* Benth. *Yakugaku Zasshi* **93**, 1201 (1973).
- 14) Kurihara, T. and Kikuchi, M. : Studies on the constituents of flowers VI. On the components of flowers of *Pueraria thunbergiana* Benth. (3). *Yakugaku Zasshi* **96**, 1486 (1996).
- 15) Hwang, B. Y., Gu, T. H., Lee, J. H., Roh, J. S., Lee, K. S. and Lee, J. J. : Inhibition of inflammatory mediators by sesquiterpenes from *Ligularia fischerii*. The 29th annual meeting of the Korean Society of *Pharmacognosy*, 72 (1998).
- 16) Park, H. J., Park, J. H., Moon, J. O., Lee, K. T., Jung, W. T., Oh, S. R. and Lee, H. K. : Isoflavone glycoside from the flower of *Pueraria thunbergiana*. *Phytochemistry* **51**, 147 (1999).
- 17) Kinjo, J., Takeshita, T., Abe, Y., Terada, N., Yamashita, H., Yamasaki, M., Takeuch, K., Murakami, K., Tomimatsu, T. and Nohara, T. : Studies on the constituents of *Pueraria lobata*. IV. Chemical constituents in the flowers and leaves. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 1174 (1988).
- 18) Yoshikoshi, M., Yoshiki, Y., Okubo, Y., Seto, K. and Sasaki, Y. : Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblasts. *Planta Med.* **62**, 252 (1996).
- 19) Arao, T., Udayama, M., Kinjo, J., Nohara, T., Funakoshi, T. and Kojima, S. : Preventive effects of saponins from *Puerariae Radix* (the root of *Pueraria lobata* Ohwi) on in Vitro immunological injury of rat primary hepatocyte cultures. *Biol. Pharm. Bull.* **20**, 988 (1997).
- 20) Kiso, Y., Tohkin, M., Hikio, H., Hattori, M., Sakamoto, T. and Namba, Y. : Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin. *Planta Med.* **50**, 298 (1984).
- 21) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 22) Kim, J. I., Park, J. H., Park, H. J., Choi, S. K. and Lee, K. T. : Induction of differentiation of the human histocytic lymphoma cell line U-937 by hypericin. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 41 (1998).
- 23) Xiong, Q., Kadota, S., Tani, T. and Namba, T. : Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1580 (1996).
- 24) Arora, A., Nair, M. G. and Strasburg, G. M. : Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 133 (1988).
- 25) Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S. and Wang, Y. : Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **208**, 124 (1995).
- 26) Nakayama, T., Kodama, M. and Nagata, C. : Generation of hydrogen peroxide and superoxide anion radical from cigarette smoke. *Gann.* **75**, 95 (1984).
- 27) Kapiotis, S., Hermann, M., Held, I., Seelos, C., Ehringer, H. and Gmeiner, B. M. : Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 2868 (1997).
- 28) Koroma, B. M. and Juan, E. Jr. : Inhibition of protein tyrosine phosphorylation in endothelial cells: relationship to antiproliferative action of genistein. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 35 (1997).
- 29) Ohtsuki, K., Nakamura, S., Shimoyama, Y., Shibata, D., Munakata, H., Yoshiki, Y. and Okubo, K. : A 96-kDa glycyrrhizin-binding protein (gp96) from soybeans acts as a substrate for casein kinase II, and is highly related to lipoxigenase 3. *J. Biochem.* **118**, 1145 (1995).
- 30) Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. and Rodwell, V. W. : *Harper's Biochemistry* 24th ed., Appleton & Lange, U.S.A., p151 (1993).