

Genistein이 햄스터 난소세포의 항산화효소활성과 발현에 미치는 영향

김민혜 · 김안근[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received February 12, 2007; Revised February 20, 2007)

Effect of Genistein on Activity and Expression of Antioxidant Enzyme in Hamster ovary cells

Min Hye Kim and An Keun Kim[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — Reactive oxygen species (ROS) are produced in the metabolic process of oxygen in cells. The superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) in cells systemize the antioxidant enzymes to control the oxidative stress. Genistein is one of the isoflavonoids, and its role in controlling cellular oxidative stress is presently the active issue at question. In this study, we analyzed genistein-induced survival rates of the CHO-K1 cells, activities of antioxidant enzymes, ROS levels, and expression levels of antioxidant enzyme genes in order to investigate the effect of genistein on cellular ROS production and antioxidative systems in CHO-K1 cells. As results, the survival rate of cells was decreased as the dose of genistein increases (12.5~200 μ M). Genistein increased cellular ROS levels, while it reduced total SOD activities and the expression of CuZnSOD. In conclusion, we suggest that genistein may induce oxidative stress via down-regulation of SOD.

Keywords □ genistein, reactive oxygen species, antioxidant enzyme activity, antioxidant enzyme expression

유기체는 변화하는 내부, 혹은 외부 환경에서 살아남기 위해 끊임없이 적응해야 한다. 호기성 생물은 산소를 전자 수용체로 하는 호흡을 통해 에너지를 획득하며 대사과정의 부산물로 hydroxyl radicals(OH \cdot), superoxide anion(O $_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide(H $_2$ O $_2$)와 nitric oxide(NO)를 포함하는 반응성이 매우 큰 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생산한다.^{1,2)} O $_2^{\cdot-}$ 와 OH \cdot 는 활성이 매우 강하여 분자적 손상과 세포 피사를 야기하고 특히 hydroxyl radicals은 무차별적인 반응으로 세포내부에 심한 손상을 일으킨다. 따라서 산소는 호기성 생물의 생존에 필수적이지만 환원된 형태로는 유기체에 가장 강력한 독성 물질로 작용하는 양면성을 가지고 있다. ROS는 거의 모든 세포 내부기관의 일상적인 대사 과정의 결과물로 발생하고 있기 때문에 각각의 기관은 산화적 스트레스의 중요한 표적이 된다.³⁾

최근 연구들은 산화적 스트레스가 다양한 질병과 환경적 세포 손상에 공통요인임을 지적하고 있다. 또한 이러한 다양한 생물

학적 그리고 비생물학적 스트레스가 ROS에 의한 것이 규명되고 있다. 예를 들어 살충제, 제초제, 생체이물질, 살균제, 흡연, 오존, 방사선 등의 수많은 화학독성 요인들은 유리 라디칼과 기타 활성산소종의 발생을 통해 유해한 작용을 나타내는 것으로 보고 되고 있다.⁴⁾

이러한 산화적 스트레스를 최소화 하기 위해 호기성 유기체들은 항산화제와 같은 비효소적 방법으로 ROS를 제거하거나 효소적 방어계인 항산화효소인 superoxide dismutase(SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase(GPx) 등이 직접적으로 라디칼을 제거하여 활성이 낮은 형태로 이들을 전환시킨다.⁵⁾ SOD는 free radical인 superoxide anion을 hydrogen peroxide로 전환시킨다. SOD 반응에 의해 생성된 hydrogen peroxide는 더욱 반응성이 큰 hydroxyl radical로 전환될 위험이 있다. 그렇지만 이렇게 생성된 hydrogen peroxide는 peroxisomes에도 존재하고 또한 간 세포와 적혈구에 풍부한 catalase에 의해 O $_2$ 와 H $_2$ O로 전환되며 또한 세포질과 미토콘드리아에 존재하는 GPx에 의해서 H $_2$ O로 무독화 된다.^{6,7)}

Isoflavonoid는 콩류에만 고유하게 포함된 특이적인 phenolic 화합물이다.⁸⁾ 콩은 세계적으로 널리 소비되고 있고 특히 아시아

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9566 (팩스) 02-710-9871
(E-mail) akkim@sookmyung.ac.kr

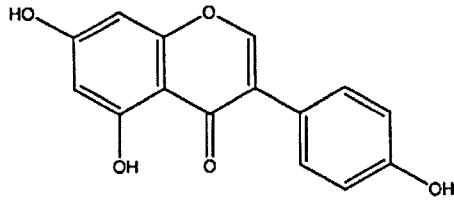


Fig. 1 - Structure of genistein.

국가들에서 그 소비가 집중되어 있다. 이러한 아시아 국가들의 콩의 소비는 노화에 의한 산화관련질환이나 암의 발생 빈도를 낮추는 것과 관련 있는 것으로 알려져 있다. 많은 역학연구에서 유방암, 전립선암, 심혈관계 질환 그리고 동맥경화증 등의 발생이 감소하는 효과와 콩의 소비와의 관련이 입증된 바 있다.⁹⁻¹⁴⁾ Genistein은 가장 대표적인 isoflavonoid의 하나로서 에스트로젠 호르몬과의 구조적 유사성으로 인해 에스트로젠 수용체와 상호작용하는 것으로 알려져, phyto-estrogen으로 불리우기도 한다.⁸⁾

우리나라는 isoflavonoid의 주요 공급원인 콩의 소비가 세계적으로 높은 국가이고, 특별히 최근 isoflavonoid의 에스트로젠 유사작용이 규명됨에 따라 여성들에게 그 섭취가 권장되는 추세이며 특히 여성 특이적 장기인 난소세포에서의 genistein과 관련된 연구는 더욱 의미 있는 것이라 생각된다.

본 실험에서는 특별히 여성들에게 유방암에 유익한 성분으로 알려진 isoflavonoid인 genistein이 암세포가 아닌 정상 난소세포에서 ROS level 및 관련된 항산화효소의 활성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 이를 연구하기 위해 설치류의 난소 상피세포인 chinese hamster ovary-K1(CHO-K1) 세포를 사용하여 세포 생존율, 항산화 효소의 활성, ROS level, 항산화 효소의 유전자 발현 정도를 검토하여 약간의 지견을 얻었으므로 보고하고자 한다.

실험 방법

시약 및 기기

세포주는 Chinese hamster ovary(CHO-K1)을 American typeculture collection(ATCC)에서 구입하였다.

RPMI 1640 powder medium, antibiotics(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 µg/ml streptomycin sulfate), trypan blue는 Gibco BRL life Technologies Inc.제품을 사용하였고, fetal bovine serum(FBS)는 BioWhittakerTM, protease inhibitor cocktail tablets은 Roche, MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide], bicinchnic acid protein assay kit, β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form(βNADPH), glutathione reduced form, hematoxylin는 Sigma Co.에서, easy-blue total RNA extraction kit,

100 bp ladder, power cDNA synthesis kit, i-Taq DNA polymerase, AMV reverse transcriptase는 iNtRoN Biotechnology Inc.에서 구입하여 사용하였다. ELISA reader는 Bio-Tek instrument Inc., cytofluor 2350 plate reader는 Millipore, Bedford, MA, USA제품을 사용하였다.

CHO-K1 세포배양

Chinese hamster ovary로부터 유래된 CHO-K1 cell은 ATCC (American type culture collection)으로부터 분양 받았다. 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 항생제(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 µg/ml streptomycin sulfate), 1 mM sodium pyruvate를 포함하는 RPMI 1640 배지를 배양액으로 하여 37°C, humidified 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 25 cm³ tissue culture flask나 75 cm³ tissue culture flask에서 계대 배양하였고 confluent되었을 때 cell dissociation solution을 처리하여 실험에 이용하였다.

시료의 조제

Genistein을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 뒤 0.2 µm pore size syringe filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 실험에 이용하기 직전에 DMSO의 최종농도가 0.1% 이하가 되도록 RPMI 1640 세포배양 배지로 희석하여 사용하였다.

세포 생존율 측정

CHO-K1 cells suspension을 1×10⁵ cells/ml의 농도로 96-well plate의 well 100 µl씩 가하여 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 sample을 농도별로 처리 하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 5 mg/ml MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)을 50 µl가하고 4시간 동안 배양기에 방치하였다. 이 후 상층액을 제거하고 DMSO를 well당 100 µl씩 넣어 1분간 shaking하여 formazan을 완전히 용해시킨 후 ELISA plate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁴⁾

항산화 효소의 활성 측정

시료의 처리와 단백질 정량 - 3×10⁶ cells/ml의 CHO-K1 cell suspension을 100π tissue culture dish에 가하였다. 배양기에서 24시간 동안 안정화 시킨 후 genistein 및 다른 항산화제를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. Culture dish에서 배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 농도별 sample을 얻고 상층액을 제거한 pellet에 lysis buffer 1 ml을 가하였다. Lysis buffer를 가한 각각의 sample을 14,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리한 후 상층액만을 취하여 enzyme assay sample로 사용하였다. Sample protein의 정량은 bovine serum albumin(BSA)을 standard로 사용하여 BCA(bicinchnic acid) protein assay를 하였다.¹⁵⁾

Superoxide dismutase(SOD)의 활성 측정 - SOD 활성 측정은 hematoxylin을 이용한 Martin의 방법¹⁶⁾을 사용하였다. Hematoxylin은 자연상태에서 붉은색인 hematin으로 자가 산화한다. 이러한 과정에 SOD가 관여하면 자동산화를 억제하게 된다. 0.1 mM EDTA가 함유된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5) 1 ml에 각각의 sample을 50 μ 씩 가하고 5분 동안 예비양시켰다. 여기에 5 mM hematoxylin을 30 μ 를 가한 후 phosphate buffer를 blank로 하여 UV/visible spectrophotometer를 사용해 568 nm에서 흡광도를 측정하였고 5분 후 다시 흡광도의 변화를 측정하였다.

Catalase(CAT)의 활성 측정 - CAT의 활성 측정은 hydrogen peroxide의 분해를 따라 감소하는 흡광도를 측정하는 Aebi 방법을 이용하였다.⁶⁾ 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 30% H₂O₂를 넣어 10.5 mM substrate solution(A240=0.5)을 만든다. 이 substrate solution 1 ml에 각 sample 50 μ 를 가한 후 43.6 M⁻¹cm⁻¹의 extinction coefficient를 사용하여 UV/visible spectrophotometer로 240 nm에서 phosphate buffer를 blank로 하고 30초마다 1분 동안 흡광도를 측정하였다.

Glutathione peroxidase(GPx)의 활성 측정 - GPx의 활성은 Paglia와 Valetine의 방법에 의해 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.⁷⁾ GPx의 반응 동안 glutathione(GSSG)은 GSH의 일정 농도에 대해서 제공되는 과잉의 glutathione reductase(GR)에 의해 환원되며 이때 reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)의 산화를 관찰하였다. 0.4 M Tris-HCl(pH 7.2) buffer 2.625 ml에 0.04 M GSH 75 μ l, 0.075 mM H₂O₂ 0.1 ml, 6 mM NADPH 0.1 ml을 각각 넣은 후 5분간 예비양시켰다. 여기에 각각의 sample을 가하여 UV/visible spectrophotometer로 340 nm에서 흡광도를 측정하고 5분 후 다시 흡광도를 측정하였다.

활성산소종 측정

CHO-K1 cell suspension을 96 well plate에 각 well당 2 \times 10⁴ cells로 가한 후 24시간 동안 배양하였다. 시료를 농도별로 처리한 후 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해준다. 상온에서 50 μ M 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)를 처리한 후 cytofluor 2350 plate reader를 이용하여 5분 간격으로 측정하였다. DCF-DA는 세포 투과성 염료로 ROS의 세포 내 변화를 볼 때 일반적으로 사용된다. 이 화합물은 H₂O₂나 superoxide에 의해 산화될 때 형광을 나타낸다. 산화된 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)의 형광장은 485 nm의 excitation wavelength와 530 nm의 emission wavelength에서 측정하였다.¹⁷⁾

Total RNA isolation과 reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)

3 \times 10⁶ cells/ml의 CHO-K1 cell suspension을 150 π tissue

Table I - Sequences of primers and RT-PCR conditions

Gene	Primer sequence	Annealing (°C)	Product size (bp)
<i>β-actin</i>	Forward	52.5	250
	Reverse		
<i>CuZnSOD</i>	Forward	60	335
	Reverse		
<i>MnSOD</i>	Forward	55	240
	Reverse		
<i>GPx</i>	Forward	65	431
	Reverse		
<i>CAT</i>	Forward	55	357
	Reverse		

culture dish에 가하였다. 배양기에서 24시간 동안 안정화 시킨 후 sample을 24시간 배양하였다. Culture dish에서 배지를 제거하고 차가운 PBS로 2번 세척한 후 easy blue를 1 ml 가한 후 scraper를 이용해 cell을 모아 1.5 ml tube에 넣었다. 여기에 200 μ l의 chloroform을 가하여 4°C, 12000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상층부만 취하였다. 취한 상층부와 동량의 isopropanol을 가한 후 4°C, 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 pellet만 남기고 상등액을 제거하였다. 70% EtOH로 RNA pellet을 세척하여 4°C, 12000 rpm에서 1분 동안 원심분리한 후 상등액을 제거하고 pellet을 건조하였다. 여기에 DEPC water를 30 μ l를 가하였다. 이렇게 만들어진 total RNA는 240/260 nm의 흡광도 비율 측정을 통해 확인 및 정량 하였다.

Total RNA는 cDNA power synthesis kit을 사용하여 complementary DNA(cDNA)로 역전사 시켰다. PCR법에 의해 DNA를 증폭시키기 위해 역전사 된 cDNA는 각각 다른 antioxidative enzyme primer와 함께 PCR 증폭을 하였다. Cycling 조건과 primer의 sequence는 Table I과 같다. 증폭된 RT-PCR 산물은 1.5% agarose gel로 전기영동을 한 후, ethidium bromide 염색으로 검출하였다.

통계처리

본 연구의 그래프와 표의 모든 수치는 각 실험 횟수에 대한 평균과 표준오차로 표시하였으며, 모두 triplicate set로 세 차례 이상 수행하였다. 각 sample의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student t-test를 시행하여 계산하였다.

결 과

세포생존율

CHO-K1에서 genistein의 농도별 세포 생존율을 알아보기 위

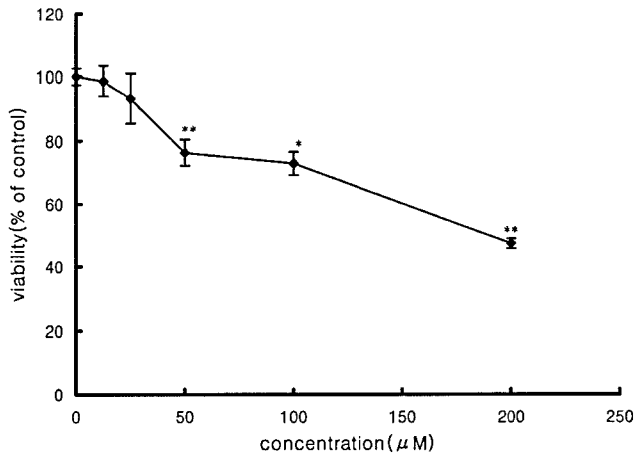


Fig. 2 – Cell viability of CHO-K1 cells after treatment with genistein. The cells were exposed to various concentrations of genistein for 24 hr. Percentage of cell viability was determined by using MTT assay. Results are expressed as percentage of control. Values are means \pm SD and were obtained from three different experiments. * P <0.005, ** P <0.001 vs. controls.

해 MTT assay를 실행하였다. 배양 기간은 2일로 고정하였으며 genistein의 농도는 12.5~200 μ M 범위에서 실험을 시행하였다. Genistein은 낮은 농도(12.5 μ M)에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으나(98.7%) 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 농도 의존적으로 감소하여 200 μ M에서는 세포 생존률이 47%로

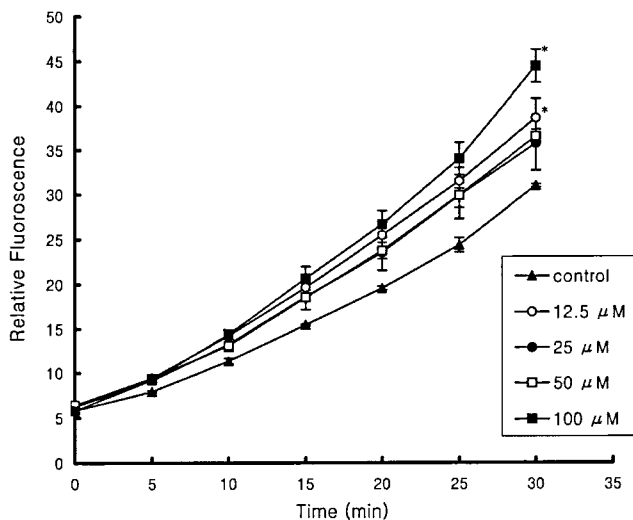


Fig. 3 – Measurement of reactive oxygen species (ROS) level after genistein treatment. CHO-K1 cells (2×10^4 /well) were incubated with genistein at various concentration and then 200 μ l DCFH-DA (50 μ M) was added as a substrate for ROS. After incubation for 30 min. ROS levels were measured by spectrofluorometer (excitation : 485 nm, emission : 530 nm). Results are expressed as average of triplicate samples with \pm SD, * P <0.005 compared with control at 30 min.

저하되었다. Genistein의 농도가 100 μ M일 때 세포 생존률이 73%였으므로 이 농도를 최고 농도로 하여 실험을 시행하였다 (Fig. 2).

Reactive oxygen species(ROS) level에 미치는 영향

활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 O_2 가 전자 전달계에 의해 H_2O 까지 환원되어 가는 중에 전자(e^-) 한 개씩에 의해 순차적으로 환원되면서 생성되는 OH^\cdot , O_2^\cdot , H_2O_2 등의 과생물로, 과잉 생성될 경우 세포의 퇴화를 촉진시키며, DNA의 돌연변이를 유발해 다양한 종류의 암을 비롯한 난치질환의 근원이 된다. 이에 따라 CHO-K1에서 genistein이 세포내 ROS 발생에 미치는 영향을 조사하기 위해 ROS level을 측정하였다. 그 결과, genistein을 12.5, 25, 50, 100 μ M 을 처리하였을 때 ROS level이 증가함을 알 수 있었다. 특히, genistein 최고 농도 100 μ M에서 control에 대비 43.6%(P <0.01)가 증가하였다(Fig. 3).

항산화 효소 활성에 미치는 영향

항산화 효소계는 산화적인 스트레스로부터 생체를 보호하는 중요한 역할을 하며 SOD, GPx, CAT 등은 유해한 활성산소를 제거하는 대표적인 항산화 효소이다. 이들 항산화 효소들이 genistein의 농도에 따라 효소 활성에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 genistein을 다양한 농도로 처리하여 SOD, GPx, CAT의 활성 변화를 측정하였다. Genistein 50, 100 μ M에서 SOD활성이 각각 control 대비 52%, 69%으로 유의적으로 감소하였다(Fig. 4). CAT(Fig. 5)와 GPx(Fig. 6)에서는 유의적인 변화가 없었다.

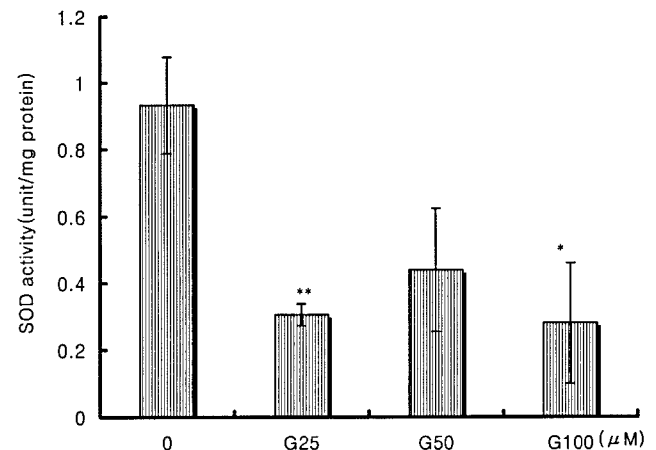


Fig. 4 – Effect of genistein on superoxide dismutase (SOD) activities in CHO-K1 cells. The cells were exposed to various concentrations of genistein for 24 hr. The genistein-treated cells and control cells were harvested and protein was isolated from the cells. Absorbance of each enzyme sample was read at 568 nm. Results are expressed as average of triplicate samples with \pm SD. * P <0.005, ** P <0.001 compared with control.

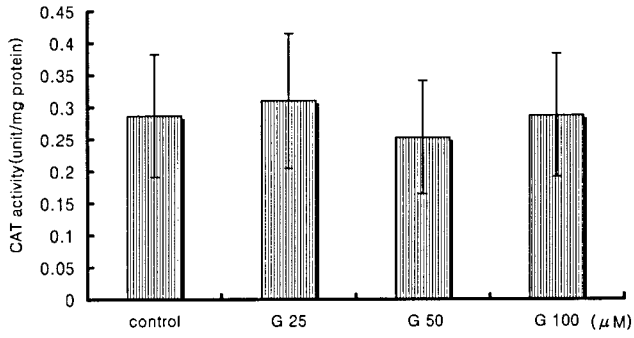


Fig. 5 – Effect of genistein on catalase (CAT) activities in CHO-K1 cells. The cells were exposed to various concentrations of genistein for 24 hr. The genistein-treated cells and control cells were harvested and protein was isolated from the cells. Absorbance of each enzyme sample was read at 240 nm. Results are expressed as average of triplicate samples with ±SD.

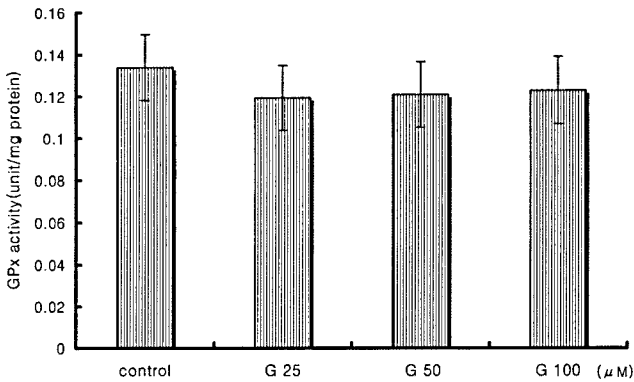


Fig. 6 – Effect of genistein on glutathione peroxidase (GPx) activities in CHO-K1 cells. The cells were exposed to various concentrations of genistein for 24 hr. The genistein-treated cells and control cells were harvested and protein was isolated from the cells. Absorbance of each enzyme sample was read at 340 nm. Results are expressed as average of triplicate samples with ±SD.

유전자 발현에 미치는 영향

CHO-K1에 genistein을 처리하였을 때 항산화 효소들의 활성 변화를 확인할 수 있었다. 이에 따라 유전자 수준에서 SOD, GPx, CAT 발현량을 조사하기 위해 RT-PCR을 실행하였다. Genistein의 25, 50, 100 μM에서 유전자 발현을 조사한 결과 CuZnSOD의 발현이 control 대비, 100 μM에서 46%(P<0.05)(Fig. 7)의 감소율을 보였다. MnSOD(Fig. 8), CAT(Fig. 9), GPx(Fig. 10)에서는 유의적인 감소를 보이지 않았다.

고찰

호기성 생물은 산소를 전자 수용체로 하는 호흡을 통해 에너지를 획득하며 대사과정의 부산물로 hydroxyl radicals(OH),

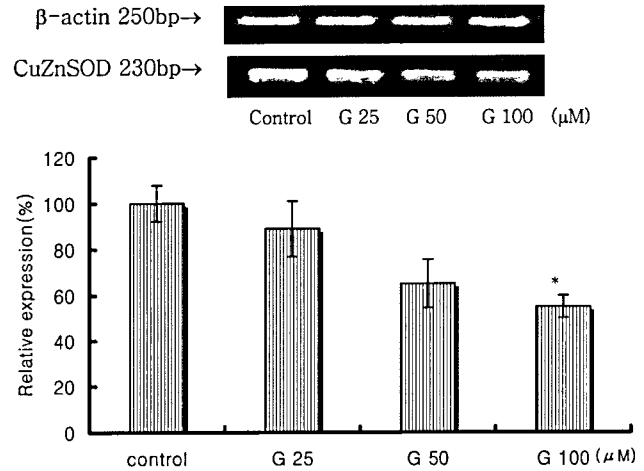


Fig. 7 – Copper zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) mRNA expression in CHO cells after genistein exposure. Ovary cells were exposed to various concentrations of genistein and then incubated for 24 hr. After culture, the cells were harvested and total RNA was examined by electrophoresis. RT-PCR was carried out with the same amount of cDNA under each conditions. PCR products were analyzed by 1.5% gel electrophoresis. Image was analyzed by Versadoc. Results are expressed as average of triplicate samples with ±SD, *P<0.005 compared with control.

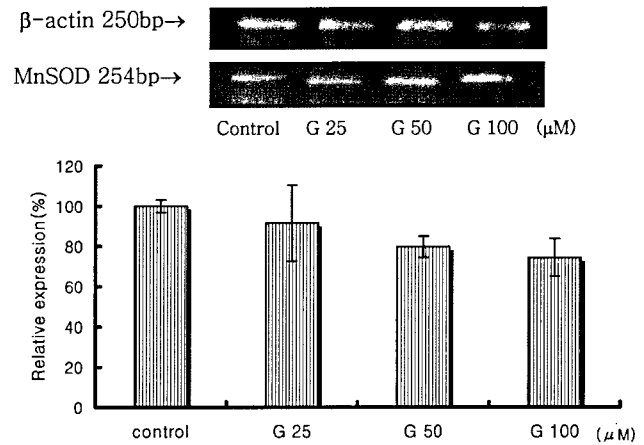


Fig. 8 – Manganese superoxide dismutase (MnSOD) mRNA expression in CHO cells after genistein exposure. Ovary cells were exposed to various concentrations of genistein and then incubated for 24 hr. After culture, the cells were harvested and total RNA was examined by electrophoresis. RT-PCR was carried out with the same amount of cDNA under each conditions. PCR products were analyzed by 1.5% gel electrophoresis. Image was analyzed by Versadoc. Results are expressed as average of triplicate samples with ±SD.

superoxide anion (O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂)와 nitric oxide(NO)를 포함하는 반응성이 매우 큰 reactive oxygen species(ROS)을 생산한다. ROS는 방사선, 염증, 공기 오염물질(O₃, NO₂), 담배연기, reperfusion injury, 허혈 등과 같은 비정상

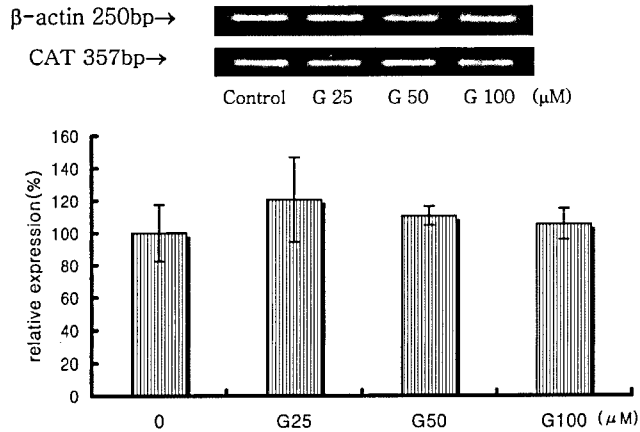


Fig. 9 – Catalase (CAT) mRNA expression in CHO cells after genistein exposure. Ovary cells were exposed to various concentrations of genistein and then incubated for 24 hr. After culture, the cells were harvested and total RNA was examined by electrophoresis. RT-PCR was carried out with the same amount of cDNA under each conditions. PCR products were analyzed by 1.5% gel electrophoresis. Image was analyzed by Versadoc. Results are expressed as average of triplicate samples with \pm SD.

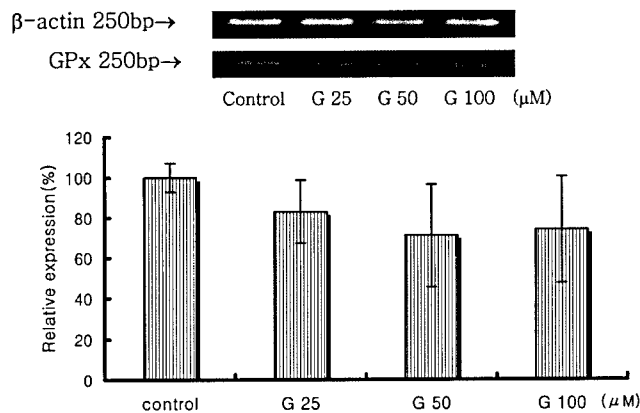


Fig. 10 – Glutathione peroxidase (GPx) mRNA expression in CHO cells after genistein exposure. Ovary cells were exposed to various concentrations of genistein and then incubated for 24 hr. After culture, the cells were harvested and total RNA was examined by electrophoresis. RT-PCR was carried out with the same amount of cDNA under each conditions. PCR products were analyzed by 1.5% gel electrophoresis. Image was analyzed by Versadoc. Results are expressed as average of triplicate samples with \pm SD.

적인 조건에서 과도하게 생산된다.^{4,18)} *In vivo*에서 ROS의 역할은 양면성을 가지고 있다. 긍정적인 측면은 생물학적으로 중요한 화합물의 합성, 세포내의 신호, 세포 성장의 조절, 식균작용, 에너지 생성에 관여한다. 부정적인 측면은 ROS로 인해 세포막의 지질, 조직의 protein 또는 효소, 탄수화물, DNA에 산화를 유발시켜 세포막의 손상, 단백질의 변형, DNA를 손상시킨다.¹⁾ 이

들 산화적 손상은 암, 노화, 관상동맥 심장 질환, 퇴행성 신경질환(파킨슨 병, 알츠하이머병) 등과 같은 다양한 질병을 유발시킨다.¹⁹⁻²¹⁾

Flavonoid는 페놀성 천연물 중 하나이며 다양한 위치의 수산기를 갖고 있는 구조적 특징으로 항산화와 관련된 연구가 매우 활발한 물질이다. 이것은 라디칼을 소거하고 항산화 효소활성에 영향을 미치는 항산화작용이 알려져 있는 반면²²⁻²⁴⁾ 라디칼 소거과정 중 이차 라디칼과 활성산소종 등의 pro-oxidant 분자를 생성해 내는 pro-oxidant 활성이 밝혀지고 있어^{25,26)} 이로 인한 다양한 질병 및 조직과 관련된 연구가 더욱 요구되어지는 물질이다.

Genistein은 flavonoid의 하위 그룹인 isoflavonoid의 대표적 물질의 하나로서 에스트로겐과의 구조적 유사성으로 여성 호르몬 관련 질환의 치료 및 보조제로 관심이 높아지고 있다.

본 연구에서는 genistein이 햄스터의 정상 난소세포에서의 ROS 발생과 관련된 기전을 살펴보고자 하였다.

Genistein을 햄스터 난소세포인 CHO-K1에 처리하여 생존율을 측정한 결과 약 70% 이상의 생존율을 보인 100 µM을 최고 농도로 하여 실험을 실행하였다(Fig. 3). Genistein이 세포내 ROS level에 미치는 영향을 조사한 결과, ROS가 control과 비교하여 유의성 있게 증가하는 것으로 나타났다. 이 산화적 스트레스 유발과 항산화 효소계의 연관성을 조사한 결과 genistein 처리시 SOD 효소활성의 감소되었고 CAT와 GPx의 활성은 영향을 받지 않았다. 항산화 효소계의 유전자 발현정도를 알아보기 위해 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 CuZnSOD의 유전자 발현이 저하되는 것을 알 수 있었다. 이것은 항산화효소 활성의 감소가 유전자 발현 저하에 의한 것임을 나타내는 결과라 할 수 있다.

콩류에 포함된 isoflavonoid의 에스트로겐 유사작용 및 난소, 전립선, 자궁암에 대한 항암 효과가 규명되면서 관심이 높아지고 있으며 우리식생활을 통해 흔히 섭취되는 물질임을 감안 할 때 이상의 실험 결과에서 보는 바와 같이 대표적인 isoflavonoid의 하나인 genistein이 정상 난소세포에서의 산화적 스트레스 유발은 주목할 만한 결과이다. 많은 질병에 유효하게 적용되어지는 genistein이지만 햄스터의 정상 난소세포에서는 오히려 산화적 스트레스를 주어 ROS의 level이 높아지는 것을 볼 때 정상적인 상태에서 genistein이 다량으로 장기간 섭취 할 경우 햄스터의 정상 난소세포에서는 오히려 산화적 스트레스를 일으키게 된다. 이를 보완 할 수 있는 항산화제의 첨가를 고려해 볼 때 앞으로 이와 관련된 연구가 많이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 genistein을 햄스터 난소세포인 CHO-K1에 처리하여 항산화효소 활성, ROS level, 항산화 효소의 발현을 측

정하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. Genistein은 CHO-K1의 세포내 ROS를 유의적으로 증가시켰다.

2. 항산화효소인 SOD의 활성이 저하되었으나 GPx나 Catalase의 활성에는 거의 변화가 없었다.

3. 항산화효소의 발현을 연구한 결과, CuZnSOD의 발현은 저하되었으나 MnSOD, GPx, Catalase의 발현은 control과 비교하였을 때 거의 영향이 없었다.

이상의 실험 결과, genistein이 햄스터 난소세포에서 산화적 스트레스를 유도하여 세포의 항산화효소계에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Borish, E. T. and Prior, W. A. : Venuugopal SDNA synthesis is blocked by cigarette tar-induced DNA single-strand breaks. *Carcinogenesis*. **8**, 1517 (1987).
- Machlin, L. J. and Bendich, A. : Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* **1**, 441 (1987).
- Halliwell, B. : Free radicals in biochemistry and medicine. *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine* **2**, 330 (1996).
- Scandalios, J. G. : Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Plainview, NY, USA.
- McCord, J. M. : Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity. *Reviews in Biochemical Toxicology* **1**, 109 (1979).
- Aebi, H. : Catalase *in vitro*. *Method in Enzymology* **105**, 93 (1984).
- Paglia, D. E. and Valentine, W. N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 158 (1967).
- Wuttke, W., Jarry, H., Becker, T., Schultens, A., Christoffel, V., Gorkow, C. and Seidlova-Wuttke, D. : Phytoestrogens Endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* **44(Suppl 1)**: S9-S20 (2003).
- Anderson, J. J. and Garner, S. C. : The effects of phytoestrogens on bone. *Nutr. Res.* **17(10)**, 1617 (1997).
- Dai, Q., Franke, A. A., Jin, F., Shu, X. O., Hebert, J. R., Custer, L. J., Cheng, J., Gao, Y. T. and Zheng, W. : Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **11**, 815 (2002).
- Dalais, F. S., Rice, G. E., Murkies, A. L., Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Jackson, C. J., Connelly, P. W., Parker, T., Faulkner, D., Vidgen, E., Cunnane, S. C., Leiter, L. A. and Josse, R. G. : Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 365 (2002).
- Jung, W., Yu, O., Lau, S. M., O'Keefe, D., Yamakoshi, J., Piskula, M. K., Izumi, T., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Obata, A. and Kikuchi M. Isoflavone aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *J. Nutr.* **130**, 1887 (2000).
- Yamamoto, S., Sobue, T., Kobayashi, M., Sasaki, S. and Tsugane, S. : Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 906 (2003).
- Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. and Boyd, M. R. : Tetrasodium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* **51**, 2515 (2003).
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76 (1985).
- Martin, J. P., Dailey, M. and Sugarman, E. : Negative and Positive ass superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **255(2)**, 329 (1987).
- Sattler, M., Winkler, T., Verma, S., Byrne, C. H., Shrikhande, G., Salgia, R. and Griffin, J. D. : Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. *Blood* **93**, 2928 (1999).
- Scandalios, J. G. : Oxidative stress - molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**, 995 (2005).
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C. and Núñez, de Castro, I. : Antioxidant enzymes and human disease. *Clin. Biochem.* **32**, 595 (1999).
- Mossman, B. T. and Marsh, J. P. : Evidence supporting a role for active oxygen species asbestos-induced toxicity and lung disease. *Environ Health Perspect* **81**, 91 (1989).
- Tniguchi, N. : Clinical significances of superoxide dismutases; Change in aging, diabetes, ischemia, and cancer. *Adv. Clin. Chem.* **29**, 51 (1992).
- Van Acker, S., Van Den Berg, D. J., Tromp, M., Griffioen, D. H., Bennekom, W. P. V., Van Der Vijgh, W. J. F. and Bast, A. : Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 331 (1996).
- Thompson, M. and Williams, C. R. : Stability of flavonoid complexes of copper (II) and flavonoid antioxidant activity. *Anal. Chim. Acta.* **85**, 375 (1976).
- Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C. and Rice-evans, c. : structural Dependence of Flavonoid Interactions with Cu²⁺

- ions: Implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* **330**, 1173 (1978).
- 25) Hodnick, W. F., Kalyanaraman, B., Pritsos, C. A. and Pardini, R. S. : The production of hydroxyl and semiquinone free radicals during the autoxidation of redox active flavonoids. *Basic. Life. Sci.* **49**, 149 (1988).
- 26) Roginsky, V. A., Barsukova, T. K., Remorova, A. A. and Bors, W. : Moderate antioxidative efficiencies of flavonoids during peroxidation of methyl linoleate in homogeneous and micellar solutions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**, 777 (1996).