

Benzo(a)pyrene 유도 DNA 손상에 대한 Genistein과 청국장추출물의 보호효과

송은정 · 김현표 · 허문영[#]

강원대학교 약학과

(Received July 23, 2008; Revised September 12, 2008)

Protective Effect of Genistein and Korean Fermented Soybean (Chungkookjang) Extract against Benzo(a)pyrene Induced DNA Damage in HepG2 Cells

Eun Jeong Song, Hyun Pyo Kim and Moon Young Heo[#]

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract — Chungkookjang (CKJ) is a fermented soybean product and one of favorite traditional foods in Korea. In this study, the alcoholic extract from Korean fermented soybean (CKJ) and its one of major flavonoids, genistein were evaluated for their protective effect against B(a)P induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells. CKJ extract and genistein decreased B(a)P-induced cell cytotoxicity. CKJ extract inhibited DNA single strand breaks evaluated by single cell gel electrophoresis. From RT-PCR study, it was revealed that CKJ extract decrease DNA damage induced in HepG2 cells expressing CYP1A1 and 1A2 by B(a)P. The metabolizing activities of CYP1A1 and CYP1A2, as measured by the 7-alkoxy resorufin O-deethylation (AROD) assay, showed that CKJ extract and genistein inhibited CYP1A1 and CYP1A2 activities. Genistein may contribute to these biological effects of CKJ extract at least in part. All these results indicate that CKJ extract and genistein may be useful for protection against B(a)P-induced cytotoxicity and DNA damage. Therefore, the alcoholic extract of Korean fermented soybean (CKJ) is suggested to be promising functional food which can prevent the cellular genotoxicity of dietary and lifestyle related carcinogens.

Keywords □ Korean fermented soybean, Chungkookjang, cytotoxicity, DNA damage, Comet assay, RT-PCR, CYP1A1, CYP1A2, enzyme catalytic assay

식품의 조리 및 가공을 통해 식품의 주성분인 탄화수소, 단백질, 지질 등이 분해되어 여러 가지 물질들이 생성된다. 이들 분해 생성된 물질 중에는 발암성을 나타내는 polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)와 heterocyclic amines(HCAs)이 있다.¹⁾ PAHs는 식품을 포함한 유기물을 고온으로 연소시킬 때 불완전 연소에 의해 생성된다. 국제암연구소(IARC)는 PAHs 중 benzo(a)pyrene[이하 B(a)P]의 경우 Group 1(human carcinogen)으로서, HCAs 중 tryptophane P-1(3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole)은 Group 2B(possible human carcinogen)로서 분류하고 있다.²⁾

특히 B(a)P는 식품 중에서는 불에 그을리거나 탄 부분에 함유된 대표적 식품발암물질로 DNA와 결합하여 유전적 손상을 줄

수 있으며 내분비계 장애까지도 초래할 수 있다.^{3,4)} 그러나 조리 가공된 식품 중 이들 발암성물질을 제거할 방법은 없으며 조리 방법을 개선하거나 이들이 다량 함유된 부분을 먹지 않은 식습관의 개선으로 다소나마 노출을 피할 수 있다.

이에 B(a)P의 DNA에 손상에 대한 청국장추출물과 genistein의 억제효과를 규명하기 위해 single cell gel electrophoresis (comet assay)를 사용하여 규명하였다. 한편, B(a)P에 대한 청국장추출물과 genistein의 억제효과 작용기전을 알기 위하여 CYP1A1, CYP1A2에 의한 mRNA 수준의 발현에 미치는 영향과 이들 생리활성물질들의 B(a)P 등에 의해 유도되는 효소 CYP1A1, CYP1A2의 활성에 미치는 영향을 연구하였다.

본 연구의 결과, 식품발암물질인 B(a)P로 인한 DNA 손상이 청국장 추출물과 genistein에 의하여 억제되었고, 이는 대사관련 효소발현 및 활성억제와 관련이 있음을 규명하였다. 향후 이러한 그 작용기전 이용하여 청국장을 가열조리 된 식품으로부터 섭취되는 식품발암물질의 화학적억제(chemopreventive agent)물질

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 033-250-6914 (팩스) 033-253-9647
(E-mail) myheo@kangwon.ac.kr

로서의 용도 개발에 응용하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에서 사용된 청국장추출물(CKJ extract)은 한국식품연구원에서 제공 받은 순창 청국장을 삼각플라스틱에 1 kg을 넣고 100% ethanol을 1 l 넣어 48시간 동안 실온에서 추출한 후 감압 여과 하여 여과액을 진공농축하여 사용하였다. 회수율은 약 7.5% 정도였다. Total RNA Extraction Kit는 Bio-Rad, PCR kit는 Promega사에서 구입하였고 primer는 Bioneer사를 통해 합성하였다. Benzo(a)pyrene, Genistein, α -naphthoflavone, β -naphthoflavone, Cytochrome P450 CYP1A1 isoenzyme, Cytochrome P450 CYP1A2 isoenzyme, NADP⁺, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, resorufin, 7-ethoxyresorufin, 7-methoxyresorufin, potassium phosphate, magnesium chloride는 Sigma사에서 구입하였다. 한편 본 실험에서 사용된 cell line은 HepG2 세포(HB-8065TM)로서 ATCC로부터 분양 받아 강원대 약대 유전독성 실험실에서 수시로 계대하여 실험목적에 맞게 배양하였다. 세포배양은 10% FBS, 2% L-glutamine, 2% Penicillin-streptomycin을 함유한 MEM를 사용하였다. 대부분의 세포배양시약은 Gibco 사제를 사용하였다.

세포독성(MTT assay)

B(a)P의 세포독성에 대한 청국장추출물의 세포보호효과를 알아보기 위해 HepG2 세포를 사용하여 MTT법에 따라 microplate reader로 측정하였다. 96 well plate에 well당 cell은 25,000개로 하고 10% FBS 함유배지 80 μ l 중에서 24시간 배양하고 소정농도의 B(a)P 10 μ l과 검체 10 μ l를 각각 가했다. CO₂ incubator에서 45분 더 배양 후 MTT 시약 15 μ l를 가하고 4시간 후에 DMSO를 200 μ l를 가하여 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.⁵⁾

Alkaline single cell gel electrophoresis(Comet assay)

B(a)P의 유전독성을 평가하기 위해 comet assay로 실험하였다. DMSO에 녹인 B(a)P(최종농도 5×10^{-4} M)를 처리하였고, 청국장추출물과 genistein, α -naphthoflavone 등의 억제제와 CYP1A1의 유도물질인 β -naphthoflavone 등을 동시에 처리하여 산화적 손상과 억제효과를 평가하였다. HepG2 세포 1.5×10^6 개를 24 well에 심고, 24시간 후에 준비된 시료를 15 μ l 처리하였다. 45분 후 새로운 배지로 갈아주고 1시간 후 배양접시에 trypsin EDTA 500 μ l를 넣어 세포를 harvest한 후 1000 rpm으로 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 각각에 0.5% LMPA(low melting point agarose)를 200 μ l를 가해준 후 천천히 현탁하였

다. 0.65% NMPA(normal melting point agarose) 130 μ l를 미리 입혀 냉장고에서 굳힌 슬라이드를 꺼내어 커버슬라이드를 벗기고 LMPA와 혼합한 세포 들을 50 μ l씩 취하여 고르게 분포하도록 잘 떨어뜨린 후 다시 커버슬라이드를 덮은 뒤 냉장고에서 30분간 굳혔다. 다시 커버슬라이드를 벗기고 0.5% LMPA 130 μ l를 가한 뒤 냉장고에서 30분간 굳힌 후 커버슬라이드를 제거하고 lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 10% DMSO, 1% Triton X-100)에 담가서 60분간 빛을 차단한 채로 용해시켰다. 그 후 electrophoresis buffer(300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH 13)에 빛을 차단하여 20분간 담근 후 Electrophoresis apparatus에 슬라이드를 양극쪽으로 배열한 뒤 25 V, 300 mA에서 15분간 전기영동 하였다. 슬라이드를 꺼내어 0.4 M Tris(pH 7.5)에 30분간 담가 중화시킨 후 tray에 걸어 충분히 건조시킨 후 ethidium bromide(2 μ g/ml)를 20 μ l씩 각각에 고르게 떨어뜨린 후 커버슬라이드를 덮어 염색하였다. 515-560 nm의 excitation filter와 590 nm barrier filter를 이용하여 형광 현미경으로 관찰하였다. 이 때, 관찰은 image analyzer인 KOMET 5.5(Kinetic image, England)을 사용하여 슬라이드 당 50 cell을 측정하였다. Comet 시험의 데이터는 Olive tail moment(% DNA \times distance center of gravity of DNA in the tail, OTM)와 Tail length(distance between the head and the last DNA fragment, TL)로 나타내었다. 통계적으로 유의성을 검증하기 위해서 Student's t-test를 사용하였다.^{6,7)}

Total RNA isolation and RT-PCR for CYP1A1 and CYP1A2⁸⁾

6-well plate(5×10^6 cells/well)에 분주된 세포를 24시간 배양 후 B(a)P를 최종농도 5×10^{-4} M처리하였고, 청국장추출물과 genistein을 농도별로 B(a)P와 동시 처리하여 5시간 동안 배양 후 trypsin EDTA를 이용하여 cell을 harvest한 후 1000 rpm으로 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 버린 후 RNA는 제조사가 권고한 방법에 따라 Total RNA Extraction Kit(Bio-Rad)를 사용하여 추출하였다. 260 nm, 280 nm의 두 파장에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 계산하고 -70°C에 보관하였다. cDNA는 Gene Cyclor Thermal Cyclor(Biorad, Gerculis, CA)를 사용하여 42°C에서 50분, 99°C에서 5분 동안 RT 반응하여 합성하였다. 사용한 primer sequences는 다음과 같다.

Primers; β -actin: 5' CTACAATGAGCTGCTGCGTGTGG 3'

Primers; β -actin: 5' TAGCTCTTCTCCAGGGAGGA 3'

CYP1A1 : 5' TCTTTCTCTTCCCTGGCTATC 3'

5' CTGTCTCTTCCCTTCACTCT 3'

CYP1A2 : 5' GGAGGCCTTCATCCTGGAGA 3'

5' TCTCCCACTTGGCCAGGACT 3'

유전자들의 증폭은 β -actin 94°C 3분간 1 cycle, 94°C 20초,

52°C 20초, 72°C 40초의 조건에서 20~30 cycle로 수행되었고, CYP1A1은 94°C 3분 1 cycle, 94°C 20초, 49°C 20초, 72°C 40초의 조건에서 20~30 cycle, CYP1A2는 95°C 4분 1 cycle, 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 2분간 37 cycle로 수행되었다. 증폭 후 반응 혼합물 8~10 µl를 1.5% agarose gel에서 전기영동으로 분리하고, ethidium bromide로 20분 동안 염색하여 밴드를 확인하였다.

Alkoxyresorufin O-deethylase(AROD) assay⁹⁾

2.5pM cytochrome P450 isozyme, 1.3 mM NADP⁺, 3.3 mM glucose-6-phosphate, 0.4 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase, 3.3 mM magnesium chloride, CYP1A1의 경우 1 µg/ml 7-ethoxyresorufin, 100 mM potassium phosphate(pH 7.4) 농도가 되도록 reaction mixture를 만들었다. CYP1A2는 7-ethoxyresorufin 대신 7-methoxyresorufin을 넣었다. 각각의 test tube에 1,980 µl의 reaction mixture와 청국장추출물, genistein

농도별 sample을 20 µl씩 넣었다. 전체적인 부피를 줄여 96-well plate에 총 200 µl 넣은 후 20분간 37°C incubation 한 후 미세

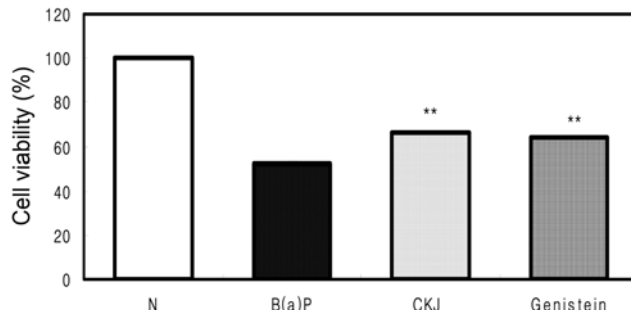


Fig. 1 – Cytoprotective effect of CKJ extract (100 µg/ml) and genistein (10 µg/ml) against 5×10⁻⁴M B(a)P-induced cytotoxicity. These experiments were run with triplicate wells and two independent experiments were conducted. **P<0.01, Significantly different from the positive control group by Student's *t*-test.

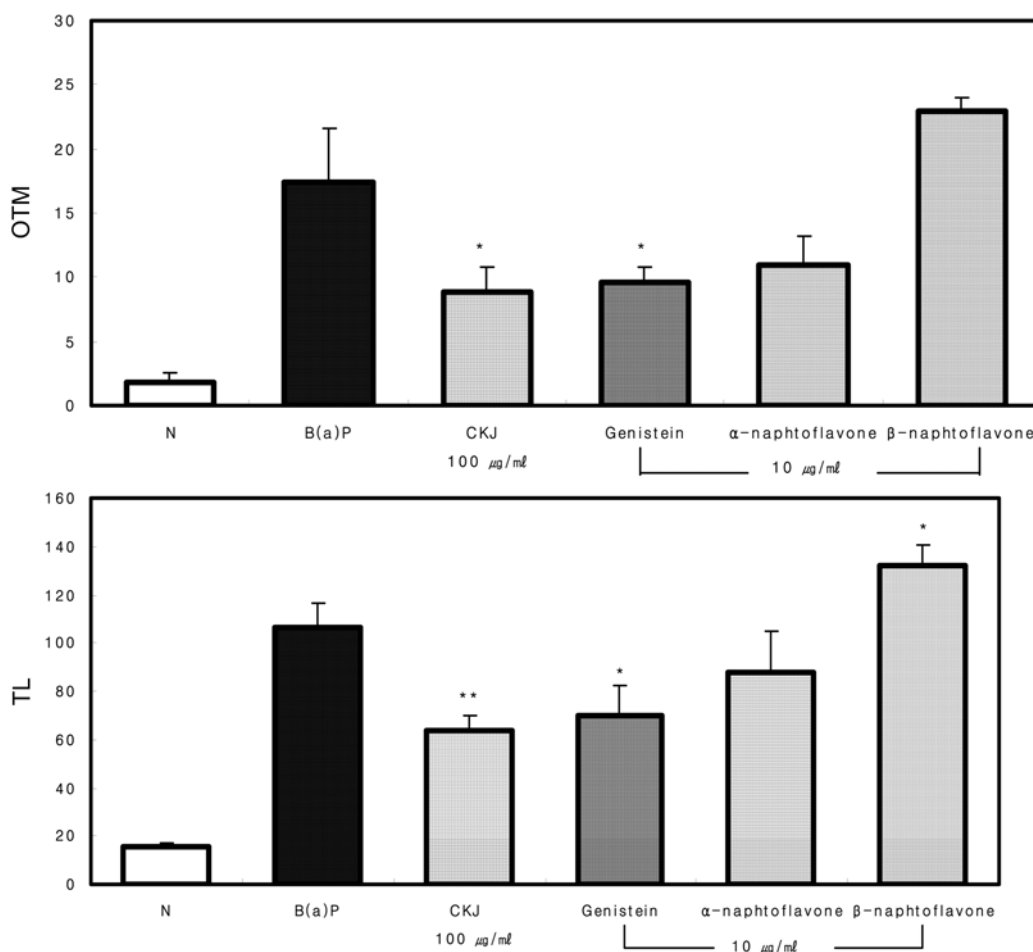


Fig. 2 – Inhibition of CKJ extract, genistein, α-naphtoflavone, and β-naphtoflavone on 5×10⁻⁴M B(a)P-induced DNA damage by comet assay. These experiments were run with three independent experiments. Bars represent the mean±SD. *: P<0.05, **: P<0.01, Significantly different from the positive control group by Student's *t*-test.

판형광분석기(microplate spectrofluormeter, Molecular Devices 사)를 사용하여 550 nm excitation, 586 nm emission에서 20분 동안 1분 간격으로 측정하여 fluorescence unit(RFU)로 나타내었다.

결 과

청국장추출물 및 genistein의 세포독성억제효과

Fig. 1에서 B(a)P의 세포독성에 대한 청국장추출물 처리시 B(a)P 유도 세포독성을 유의성 있게 억제하였다. 청국장추출물 중의 함유성분인 genistein도 유의성 있게 세포독성을 억제하였다. 5×10^{-4} M B(a)P에 대해 100 $\mu\text{g/ml}$ 청국장추출물은 13.5%, 10 $\mu\text{g/ml}$ genistein은 11.2%의 세포독성보호효과를 각각 보였다. 따라서 청국장추출물과 genistein은 특정농도에서 B(a)P에 대한 세포독성보호효과가 있는 것으로 나타났다.

청국장추출물 및 genistein의 DNA 손상억제효과

B(a)P의 DNA 손상에 대한 청국장추출물과 genistein의 억제 효과 - Fig. 2는 5×10^{-4} M B(a)P에 의해 유도된 DNA 손상에 대한 효과를 OTM과 TL로 비교한 결과이다. OTM으로서 각각 B(a)P 단독(17.4), 청국장추출물(8.9, $p < 0.01$), genistein(9.6,

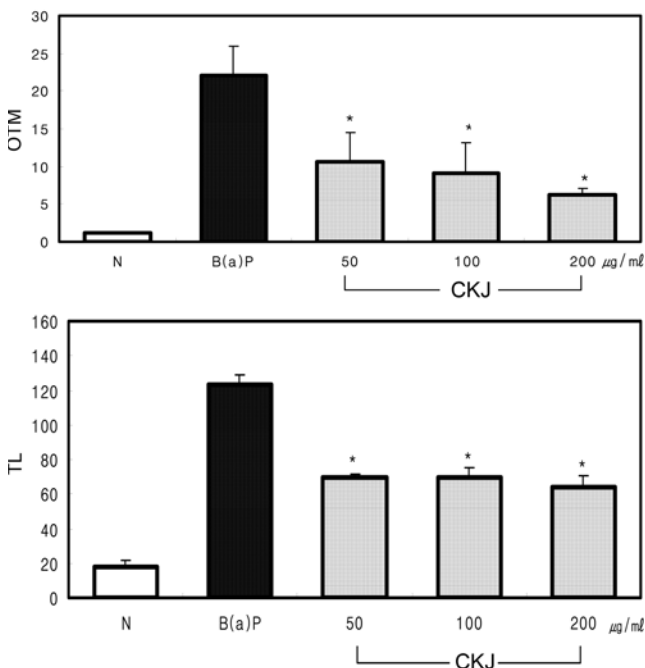


Fig. 3 - Concentration-dependent inhibition of CKJ extract on 5×10^{-4} M B(a)P-induced DNA damage by comet assay. These experiments were run with three independent experiments. Bars represent the mean \pm SD. * $P < 0.05$, Significantly different from the positive control group by Student's *t*-test.

$p < 0.05$)으로서 B(a)P에 의해 유도된 DNA손상에 대해 청국장추출물과 genistein이 억제효과를 보였고, 대조물질로 사용한 대사활성화제인 β -naphthoflavone(22.0, $p < 0.05$) 처리시 DNA 손상이 크게 증가한 것으로 나타났으며, 반대로 대사활성화억제제인 α -naphthoflavone(11.0) 처리시 DNA 손상이 감소하였다. 청국장추출물은 B(a)P 유도 DNA 손상에 대하여 유의성 있는 억제효과를 나타내었고 함유성분인 genistein도 유의성 있는 억제효과를 나타내었다. 이는 TL에서도 비슷한 경향으로 DNA 손상도를 나타내었다. 따라서 청국장추출물과 함유성분 genistein도 처리농도에서 유의성 있는 DNA 손상억제효과를 나타냈다.

DNA 손상에 대한 청국장추출물의 농도의존효과 - Fig. 3은 5×10^{-4} M B(a)P의 처리에 따른 손상에 대해 청국장추출물 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도처리 시 OTM 값으로 비교해 본 결과 각각 B(a)P 단독(22.0), 50 $\mu\text{g/ml}$ (10.7, $p < 0.05$), 100 $\mu\text{g/ml}$ (9.1, $p < 0.05$), 200 $\mu\text{g/ml}$ (6.3, $p < 0.05$)으로 유의성 있게 DNA 손상을 억제하였으며 농도의존적 경향을 나타내었다. TL보다 OTM에서의 결과가 더 농도의존적 억제 경향이 더 크게 나타났다. 따라서 청국장추출물과 genistein은 B(a)P 유도 DNA 손상을 농도의존적으로 감소시킨 것으로 나타났다.

CYP1A1과 CYP1A2의 RT-PCR

Fig. 4, 5에서 청국장추출물과 genistein을 B(a)P 함께 처리 시 CYP1A1과 CYP1A2에 의한 mRNA 수준의 발현에 미치는 영향을 나타내었다. 청국장추출물은 5×10^{-4} M B(a)P에 의한 CYP1A1의 발현을 억제시켰으며 1A2의 경우는 농도의존적 경향이 더 뚜렷하였다(Fig. 4). 또한 genistein도 CYP1A1과 CYP1A2에 대하여 억제효과를 나타내었으며 최대처리농도인 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 CYP1A1과 1A2의 발현을 크게 억제하였다(Fig. 5).

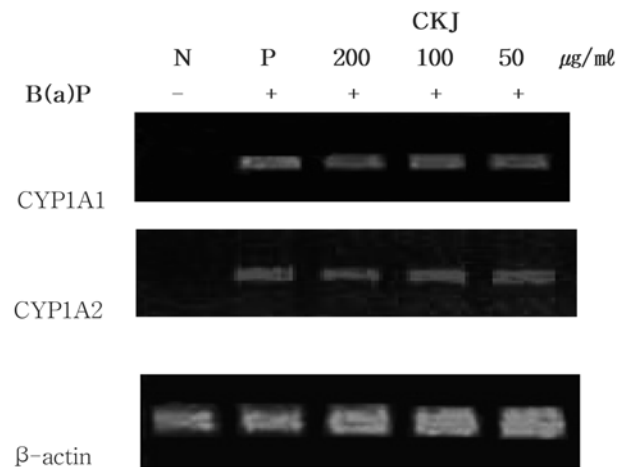


Fig. 4 - RT-PCR analysis of CYP1A1, CYP1A2 expression in HepG2 cells after being induced by 5×10^{-4} M B(a)P without or with CKJ extract. N: Solvent control, P: 5×10^{-4} M B(a)P

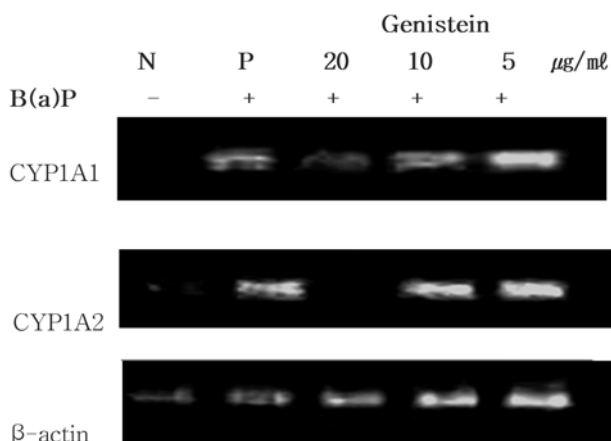


Fig. 5 - RT-PCR analysis of CYP1A1, CYP1A2 expression in HepG2 cells after being induced by 5×10^{-4} M B(a)P without or with genistein. N: Solvent control, P: 5×10^{-4} M B(a)P.

Alkoxyresorufin O-deethylase assay

Fig. 6, 7에는 청국장추출물과 genistein이 CYP1A1 및 CYP1A2의 활성화에 미치는 영향을 enzyme catalytic assay 결과로서 fluorescence unit(RFU)로 나타내었다. 청국장추출물과 genistein은 반응시간에 따라서 농도의존적으로 1A1 효소활성을 억제하였다(Fig. 6). 억제활성은 청국장추출물보다 genistein이 더

컸다. 한편 CYP1A2에 대해서는 청국장추출물과 함유물질 genistein은 반응시간에 따라서 농도의존적으로 활성을 억제하였으며 CYP1A2 억제활성은 CYP1A1에서처럼 청국장추출물보다 genistein이 더 컸다(Fig. 7).

고찰

조리 가공된 식품으로부터 발암물질들을 제거할 수 있는 기술이 없기 때문에 이들의 발암작용을 감소시킬 수 있는 modulator의 필요성이 커지고 있다. 최근 까지 식품발암물질들의 작용을 modulation하는 여러 가지 식품성분들도 알려지고 있다.¹⁰⁾ 양배추나 브로컬리에 함유된 Indole-3-carbinol(I3C)이 CYP1A1, 1A2를 억제시켜 IQ- 및 PhIP-induced DNA adduct 생성과 rat에서 aberrant crypt foci(ACF) 생성을 억제시켰다는 보고가 있다.¹¹⁻¹⁴⁾ 또한 plant polyphenol이 Ames test에서 HCA에 의한 변이원성을 억제시켰다¹⁵⁾ 하고 epigallo-catechin-3-gallate도 PhIP의 human CYP1A2-mediated activation을 억제시켰다는 보고¹⁶⁾가 있다. 따라서 CYP1A1이나 CYP1A2의 억제는 대사활성화조절에 의한 B(a)P 및 Trp-P-1 같은 PAH, HCA 화합물의 유전독성을 억제시킬 수 있는 중요한 target이 될 수 있다고 보여지고 있다.¹⁰⁾ 청국장은 한국의 전통식품으로서 최근 여러 가지 생물활성이

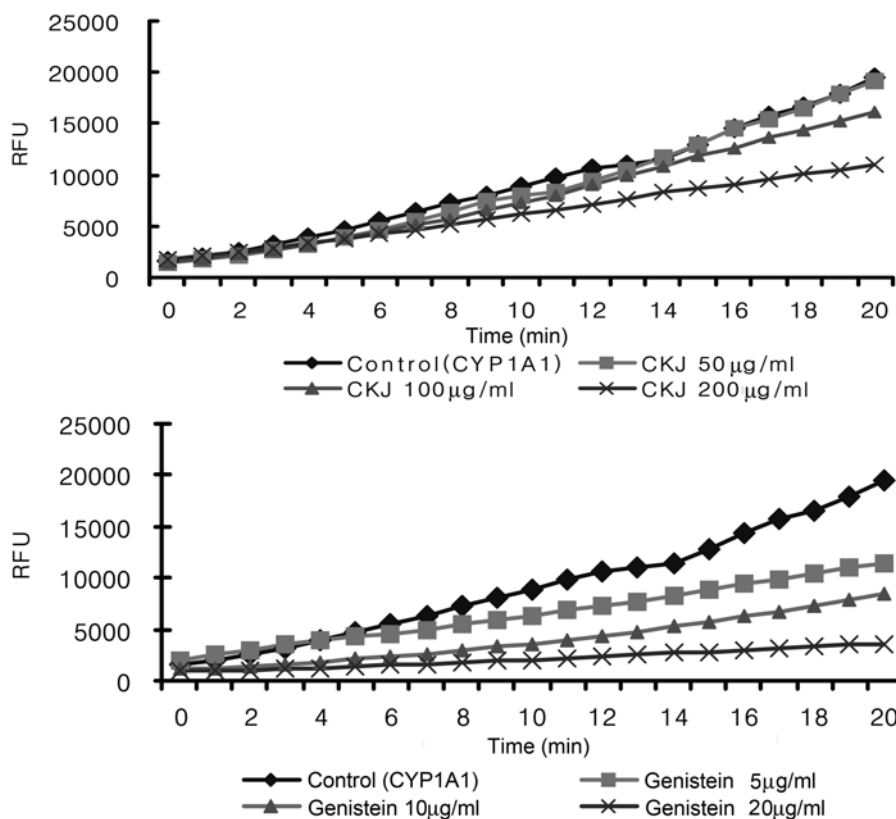


Fig. 6 - Time- and concentration-dependent effects of CKJ and genistein on catalytic activity of CYP1A1.

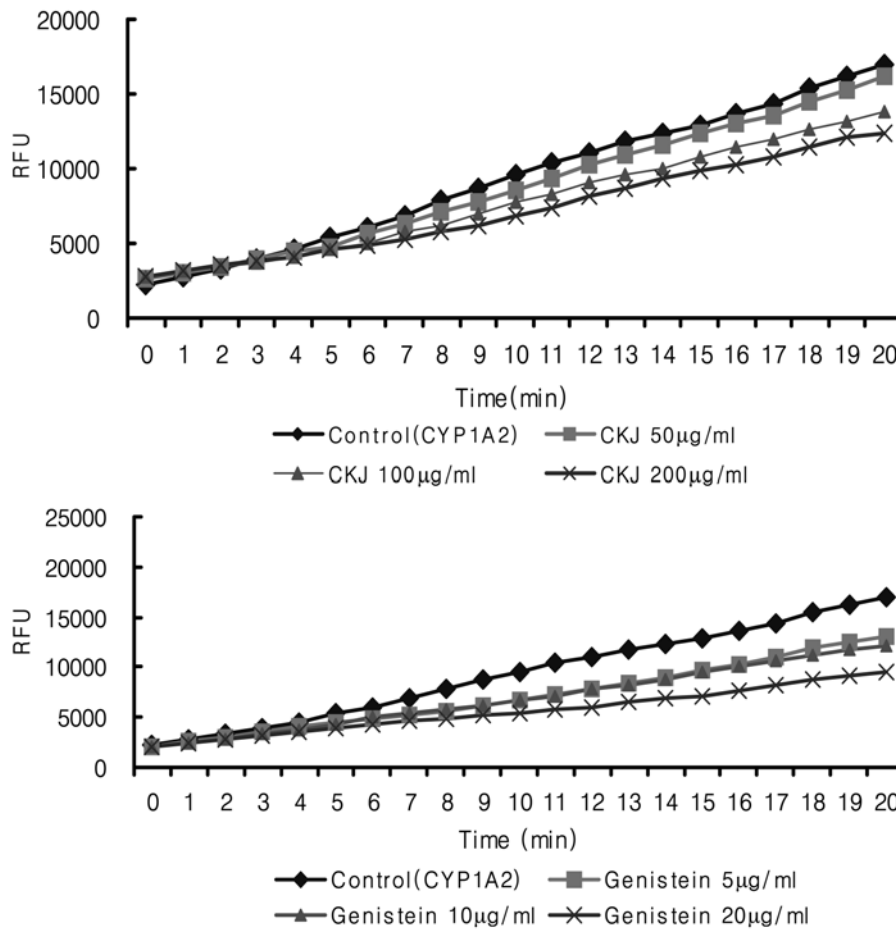


Fig. 7 – Time- and concentration-dependent effects of CKJ and genistein on catalytic activity of CYP1A2.

과학적으로 규명되고 있다. 그동안 청국장의 항산화, 항미생물, 혈압강하, 항당뇨효과 등이 알려져 있으며¹⁷⁻²²⁾ isoflavones(e.g. genistein, daidzein)이 항산화성분으로 알려져 있다.^{23,24)} 본 연구에서 청국장추출물 및 genistein은 B(a)P에 유도된 세포독성에 대한 청국장추출물과 genistein의 보호 효과를 알 수 있었다. 또한 B(a)P에 유도된 DNA 손상에 대해 청국장추출물과 genistein의 강한 억제력을 확인할 수 있었으며, 청국장추출물은 50, 100, 200 µg/ml 농도에서 유의성 있게 농도의존적으로 DNA 손상을 감소시켰다. B(a)P과 청국장추출물, genistein을 함께 처리하여 CYP1A1, CYP1A2의 mRNA 수준에서 발현을 억제하였다. 또한 genistein은 농도의존적 억제경향이 컸으며 20 µg/ml 처리하였을 때 발현을 크게 억제하였다. CYP1A1 및 CYP1A2 효소의 활성화에 대한 청국장추출물과 genistein의 활성조절시험에서는 청국장추출물과 genistein은 반응시간에 따라서 농도의존적으로 CYP1A1, CYP1A2 효소활성을 억제하였다. 청국장추출물보다 genistein의 억제활성이 더 높은 것을 볼 수 있었다.

Apigenin과 chrysin이 B(a)P 유도 DNA strand break와 adduct 생성을 CYP1A1 저해에 의해 억제시켰고 quercetin은

CYP1A2 저해에 의해 억제시켰다는 보고 있다.²⁵⁾ 또 다른 보고에 의하면 quercetin이 CYP1A1 억제에 의하여 B(a)P 유도 DNA adduct 생성²⁶⁾ 및 대사활성화²⁷⁾를 억제하였다. Flavones, flavonols 등 flavonoid가 Trp-P2 유도 DNA 손상을 억제하였으며, Trp-P2 유도 Ames test에서 CYP1A1 억제를 통하여 antimutagenic effect²⁸⁾ 나타내었다. Genistein과 daidzein이 mouse hepatoma cell에서 B(a)P의 CYP1A1 대사를 억제,²⁹⁾ human mammary epithelial cell에 glutathione S-transferase system의 조절작용에 의한 유전독성을 억제,³⁰⁾ genistein과 daidzein이 TCDD 유도 CYP1A1 발현과 활성을 억제, CYP1A1 mediated DNA와 B(a)P의 공유결합을 억제하였다.²⁹⁾ 한편, 청국장과 같이 한국 된장의 추출물과 genistein, genistin 등 함유성분들의 Ames assay에서의 aflatoxin B1이나 MNNG 유도 mutagenicity 등에 대한 억제효과가 있음이 보고된 바 있다.³¹⁾

본 연구에서 사용한 청국장추출물 중의 genistein과 daidzein 함량은 각각 1.5 mg/g과 2.0 mg/g 수준이었다.³²⁾ 따라서 결과에서 나타난 여러 연구를 종합해볼 때 청국장추출물과 함유 isoflavone 화합물 중의 하나인 genistein은 CYP1A1 및 CYP1A2 대사효소

발현억제효과와 효소활성억제효과 기전으로 유전독성억제효과를 나타내고 있는 것으로 판단된다. 그러나 이와 함께 대사과정 중 발생하는 프리라디칼의 소거능을 비롯한 항산화활성에 의한 유전독성억제효과도 배제할 수는 없다. 따라서 본 연구결과, 청국장 또는 청국장추출물이 가열처리된 단백질 식품 섭취 시 불가결하게 인체로 섭취되는 PAHs과 HCAs과 같은 식품발암물질의 발암작용을 예방하여 사람의 genomeic instability(게놈 불안정성)을 방어할 수 있는 암 예방물질로서의 가능성이 있을 것이라 판단된다.

결 론

본 연구에서는 발암물질인 B(a)P로 인한 세포독성, DNA 손상에 대한 청국장추출물과 genistein의 보호효과를 이용하여 암화학예방요법제(cancer chemopreventive agent) 개발을 목적으로 실험해본 결과 이들이 식품발암물질들에 대하여 세포독성과 DNA 손상을 억제하였으며, 이는 대사활성화효소발현 및 활성 억제에 의해 유전독성을 감소시켰으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. B(a)P에 유도된 세포독성에 대해 청국장추출물과 genistein이 세포독성보호효과를 나타내었다.

2. B(a)P에 유도된 DNA 손상에 대해 청국장추출물과 genistein의 강한 억제력을 확인할 수 있었으며, 청국장추출물은 유의성 있게 농도의존적으로 DNA 손상을 감소시켰다.

3. B(a)P에 의해 발현된 CYP1A1, CYP1A2의 mRNA를 청국장추출물과 genistein이 억제하였다.

4. 청국장추출물과 genistein은 반응시간에 따라서 농도의존적으로 CYP1A1, CYP1A2 효소활성을 억제하였다. 청국장추출물보다 genistein의 효소의 억제활성이 더 높았다.

이와 같은 결과를 종합하여 볼 때, genistein 함유 청국장추출물이 게놈 불안정성(genomic instability)을 일으키는 polycyclic aromatic hydrocarbon(PAHs)과 같은 식품의 가열조리로부터 생성될 수 있는 발암물질에 대하여 CYP1A1, 1A2 효소발현억제와 활성억제기전을 가진 암예방물질로서의 활용가능성이 있을 것이라 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 한국과학재단(KOSEF)의 Biofoods Research Program과 post-BK21 project(2006)의 지원을 받았으며 강원대학교 종합약학연구소의 일부 지원(2007)을 받았음을 밝히는 바이다.

참고문헌

1) Sugimura, T. : Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*

- 21(3), 387 (2000).
- 2) IARC : Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. France, Lyon (1993).
- 3) Davis, D. L., Bradlow, H. L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D. G. and Anton-Culver, H. : Medical hypothesis : xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ. Health Perspect.* **101**, 3727 (1993).
- 4) Bui, Q. Q., Tran, M. B. and West, W. L. : A comparative study of the reproductive effects of methadone and benzo(a)pyrene in the pregnant and pseudopregnant rat. *Toxicology* **42**, 195 (1986).
- 5) Cole, S. P. : Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **17**, 259 (1986).
- 6) Sing, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. : A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184 (1988).
- 7) Olive, P. L., Banath, R. E. and Durand, R. E. : Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiat. Res.* **122**, 86 (1990).
- 8) Yang, S. P. and Raner, G. M. : Cytochrome P450 expression and activities in human tongue cells and their modulation by green tea extract. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **202**, 140 (2005).
- 9) Burke, M. D., Thompson, S., Weaver, R. J., Wolf, C. R. and Mayer, R. T. : Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **48**(5), 923 (1994).
- 10) Dashwood, R. H. : Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutat. Res.* **511**(2), 89 (2002).
- 11) Xu, M., Schut, H. A. J., Bjeldanes, L. F., Williams, D. E., Bailey, G. S. and Dashwood, R. H. : Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline?DNA adducts by indole-3-carbinol: dose-response studies in the rat colon. *Carcinogenesis* **18**, 2149 (1997).
- 12) He, Y. H., Smale, M. H. and Schut, H. A. : Chemopreventive properties of indole-3-carbinol (I3C): inhibition of DNA adduct formation of the dietary carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), in female F344 rats. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **27**, 42 (1997).
- 13) Guo, D., Schut, H. A. J., Davis, C. D., Snyderwine, E. G., Bailey, G. S. and Dashwood, R. H. : Protection by chlorophyllin and indole-3-carbinol against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Carcinogenesis* **16**, 2931

- (1995).
- 14) Schut, H. A. and Dashwood, R. H. : Inhibition of DNA adduct formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) by dietary indole-3-carbinol (I3C) in the mammary gland, colon, and liver of the female F344 rat. *Ann. New York Acad. Sci.* **768**, 210 (1995).
 - 15) Yen, G. C., Duh, P. D. and Hung, Y. L. : Contributions of major components to the antimutagenic effect of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl.). *J. Agric. Food Chem.* **49**, 50004 (2001).
 - 16) Hernaez, J., Xu, M. and Dashwood, R. H. : Effects of tea and chlorophyllin on the mutagenicity of N-hydroxy-IQ: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation, and degradation/scavenging of the active metabolites. *Environ. Mol. Mutagen* **30**, 468 (1997).
 - 17) Kim, J. I., Kang, M. J. and Kwon, T. W. : Antidiabetic effect of soybean and Chongkukjang. *Korea Soybean Society* **20**, 44 (2003).
 - 18) Kim, S. H., Yang, J. L. and Song, Y. S. : Physiological functions of Chongkukjang. *Food Industry and Nutr.* **4**(2), 40 (1999).
 - 19) Cho, Y. J., Ch, W. S., Bok, S. K., Kim, M. U., Chun, C. S. and Choi, U. K. : Production and separation of anti-hypertensive peptide during Chunggugjang fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **43**, 247 (2000).
 - 20) Kang, S. M., Lee, C. S., Yoo, C. K. and Seo, W. S. : Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from ChungGukJang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 507 (1998).
 - 21) Kim, Y., Cho, J. Y., Kuk, J. H., Moon, J. H., Cho, J. I., Kim, Y. C. and Park, K. H. : Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacilluslicheniformis* isolated from fermented soybean, Chungkook-Jang. *Curr. Microbiol.* **48**, 312 (2004).
 - 22) Yang, J. L., Lee, S. H. and Song, Y. S. : Improving effect of powders of cooked soybean and chongkukjang on blood pressure and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Kor. J. Food Nutr.* **32**, 899 (2003).
 - 23) Anthony, M. S., Clarkson, T. B. and Williams, J. K. : Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 1390S (1998).
 - 24) Barnes, S., Sfakianos, J., Coward, L. and Kirk, M. : Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues. *Adv. Exp. Med. Biol.* **401**, 87 (1996).
 - 25) Lautraite, S., Musonda, A. C., Doehmer, J., Edwards, G. O. and Chipman, J. K. : Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis* **17**(1), 45 (2002).
 - 26) Kang, Z. C., Tsai, S. J. and Lee, H. : Quercetin inhibits benzo[a]pyrene-induced DNA adducts in human Hep G2 cells by altering cytochrome P-450 1A1 gene expression. *Nutr. Cancer.* **35**(2), 175 (1999).
 - 27) Schwarz, D., Kisselev, P. and Roots, I. : CYP1A1 genotype-selective inhibition of benzo[a]pyrene activation by quercetin. *Eur. J. Cancer* **41**(1), 151 (2005).
 - 28) Kanazawa, K., Yamashita, T., Ashida, H. and Danno, G. : Antimutagenicity of flavones and flavonols to heterocyclic amines by specific and strong inhibition of the cytochrome P450 1A family. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**(5), 970 (1998).
 - 29) Shertzer, H. G., Puga, A., Chang, C., Smith, P., Nebert, D. W., Setchell, K. D. and Dalton, T. P. : Inhibition of CYP1A1 enzyme activity in mouse hepatoma cell culture by soybean isoflavones. *Chem. Biol. Interact.* **123**(1), 31 (1999).
 - 30) Steiner, C., Peters, W. H., Gallagher, E. P., Magee, P., Rowland, I. and Pool-Zobel, B. L. : Genistein protects human mammary epithelial cells from benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and 4-hydroxy-2-nonenal genotoxicity by modulating the glutathione/glutathione S-transferase system. *Carcinogenesis* **28**(3), 738 (2007).
 - 31) Park, K. Y., Jung, K. O., Rhee, S. H. and Choi, Y. H. : Antimutagenic effects of doenjang (Korean fermented soy paste) and its active compounds. *Mutat. Res.* **523**, 43 (2003).
 - 32) Kim, N. Y., Song, E. J., Kwon, D. Y., Kim, H. P. and Heo, M. Y. : Antioxidant and antigenotoxic activities of Korean fermented soybean. *Food Chem. Toxic.* **46**, 1184 (2007).