



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

윤 현 근 교수지도

석사학위 청구논문

두류 추출물의 프로테아솜 활성억제 및
항암, 항산화에 관한 효과

2019

성신여자대학교 대학원

식품영양학과

민 수 영

두류 추출물의 프로테아솜 활성억제 및
항암, 항산화에 관한 효과

윤 현 근 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2018년 11월

성신여자대학교 대학원

식품영양학과

민 수 영

인 준 서

민수영의 석사학위 논문으로 인준함

2018년 11월

심사위원장 _____ (서명 또는 인)

심 사 위 원 _____ (서명 또는 인)

심 사 위 원 _____ (서명 또는 인)

성신여자대학교 대학원

논문개요

26S proteasome은 진핵세포의 세포질과 핵에서 발견되는데, apoptosis와 cell cycle, 면역 반응 등을 조절하는 역할을 한다. 암세포에서 26S proteasome에 의해 활성화형으로 변하게 되는 NF- κ B가 핵 안으로 들어가게 되면 apoptosis가 유도되지 않아 종양 세포 증식 및 확산의 문제를 야기하게 된다. 그렇기 때문에 26S proteasome의 활성 억제는 항암의 효과를 보일 수 있다. 따라서 본 실험에서는 우리나라 사람들이 많이 섭취하고 flavonoids와 triterpenoids가 많이 들어있다고 알려져 있는 두류 4종 (대두, 서리태, 적두, 렌틸콩) 의 항암 효과 및 항산화 효과를 확인해보기 위해 간암 세포인 HepG2 cell의 proteasome 역가 저해, 세포 증식과 cell cycle 및 apoptosis, 항산화능 평가, western blotting을 통한 NF- κ B 활성화 확인 실험을 진행하여 결과를 비교하고자 하였다. 세포 증식 실험 결과, 각 두류 추출물은 HepG2 cell에 독성을 보이지 않았으나, 대두와 서리태는 세포 증식률을 상승시켰다. ($p < 0.05$) 항산화 효과를 평가하기 위해 DPPH, ABTS, CAA assay를 이용하여 측정된 결과, 적두가 유의적으로 가장 높은 항산화능을 보였다. ($p < 0.05$) CE assay 및 CPIA assay를 이용해 proteasome 역가 억제율 (PIA) 을 측정된 결과, CE assay에서는 적두와 렌틸콩이 100 μ g/mL 농도에서 유의하게 높은 PIA를 보였고, CPIA assay에서는 대두와 서리태가 100 μ g/mL 농도에서 유의하게 높은 PIA를 보였다. ($p < 0.05$) 두류에 많이 들어있다고 알려져 있는 flavonoids와 triterpenoids를 몇 종류 선정하여 CE assay 및 CPIA assay를 이용해 PIA를 측정된 결과, CE assay에서는 대부분의 시료가 높은 PIA를 보였으나, CPIA assay에서는 flavonoids류에서 baicalein과 hispidulin이, triterpenoids류에서 celastrol, escin, platycodon D가 높은 PIA를 보였다. ($p < 0.05$) Cell cycle 분석 결과, 대두는 control에 비해 sub-G1기, G0/G1기,

S기, G2/M기에서 유의한 차이를 보였고, ($p < 0.05$) 서리태는 sub-G1기, G0/G1기에서 유의한 차이를 보였으며, ($p < 0.05$) 적두와 렌틸콩은 sub-G1기에서 유의한 차이를 보였다. ($p < 0.05$) Apoptosis 분석 결과, 모든 시료에서 control에 비해 apoptosis가 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 대두와 서리태, 적두, 렌틸콩의 NF- κ B 활성화를 확인한 결과, 대두는 1 μ g/mL을 처리했을 때, 적두는 10, 100 μ g/mL을 처리했을 때, 렌틸콩은 1, 10, 100 μ g/mL을 처리했을 때 NF- κ B의 활성이 유의하게 감소되었다. ($p < 0.05$) 서리태는 모든 농도에서 유의적인 차이를 보이지 않았다.

따라서 대두와 서리태, 적두, 렌틸콩은 천연 proteasome 저해제로서의 활용 가능성을 확인하였고, 특히 대두와 적두, 렌틸콩은 cell cycle arrest는 물론 NF- κ B의 활성화를 유의하게 감소시킴을 확인하였다. 또한 모든 두류 시료에서 항산화 효과를 확인하였고, 특히 적두에서 높은 항산화능을 확인하였으므로 강력한 항산화제로서의 적두의 활용 가능성을 확인하였다.

목 차

논문개요

I. 서론.....	1
II. 실험 재료 및 방법.....	13
1. 실험 재료.....	13
1.1. 세포 및 시약.....	13
1.2. 두류 시료.....	14
2. 실험 방법.....	15
2.1. 두류 추출물 준비.....	15
2.2. 세포 배양.....	15
2.3. 세포 독성 실험 (Cell cytotoxicity)	16
2.4. 세포 증식 실험 (Cell proliferation).....	17
2.5. 항산화능 측정 실험.....	18
2.5.1. DPPH assay.....	18
2.5.2. ABTS assay	18
2.5.3. Cellular Antioxidant Activity (CAA) assay	19

2.6. Proteasome 역가 측정 실험.....	20
2.6.1. Cellular Extract (CE) assay	20
2.6.2. Cellular Proteasome Inhibitory Activity (CPIA) assay.....	21
2.7. Cell cycle 분석.....	22
2.8. Apoptosis 분석	23
2.9. Western blotting	24
2.10. 통계처리	25
Ⅲ. 실험 결과 및 고찰	26
1. 두류에 따른 세포 독성.....	26
2. 두류에 따른 세포 증식.....	26
3. 두류에 따른 항산화능 측정	28
4. 두류에 따른 proteasome 역가 저해율 측정.....	30
4.1. 두류의 CE & CPIA assay 적용.....	30
4.2. 두류의 주요 flavonoids와 triterpenoids의 CE & CPIA assay 적용	30

5. 두류에 따른 cell cycle 분석.....	40
6. 두류에 따른 apoptosis 분석.....	49
7. 두류에 따른 NF- κ B 활성화 변화	58
IV. 결론	63
참고문헌	67
Abstract	75

List of Figures

Fig. 1. Structure of flavonoids. -Flavonols-	3
Fig. 2. Structure of flavonoids. -Flavanols-	4
Fig. 3. Structure of flavonoids. -Flavones-	5
Fig. 4. Structure of flavonoids. -Isoflavones-	6
Fig. 5. Structure of triterpenoids. -Tetracyclic triterpenoids-	7
Fig. 6. Structure of triterpenoids. -Pentacyclic triterpenoids (1) -	8
Fig. 7. Structure of triterpenoids. -Pentacyclic triterpenoids (2) -	9
Fig. 8. Effects of soybeans, black beans, adzuki beans, lentils extracts on cytotoxicity (a) and cell proliferation (b) in HepG2 cells.	27
Fig. 9. DPPH (a), ABTS (b) scavenging activity and CAA value (c) of soybeans, black beans, adzuki beans, lentils extracts.	29
Fig. 10. Proteasome inhibition activities of soybeans, black beans, adzuki beans, lentils extracts.	32
Fig. 11. Proteasome inhibition activities of selected flavonoids; flavonols.	33
Fig. 12. Proteasome inhibition activities of selected flavonoids; flavanols.	34
Fig. 13. Proteasome inhibition activities of selected flavonoids; flavones.	35
Fig. 14. Proteasome inhibition activities of selected flavonoids; isoflavones.	36
Fig. 15. Proteasome inhibition activities of selected triterpenoids; tetracyclic triterpenoids.	37
Fig. 16. Proteasome inhibition activities of selected triterpenoids; pentacyclic triterpenoids (1).	38

Fig. 17. Proteasome inhibition activities of selected triterpenoids; pentacyclic triterpenoids (2).	39
Fig. 18. Flow cytometric DNA content analysis of HepG2 cells treated with soybeans extract.....	41
Fig. 19. Cell population on cell cycle of HepG2 cells treated with soybeans extract.	42
Fig. 20. Flow cytometric DNA content analysis of HepG2 cells treated with black beans extract.....	43
Fig. 21. Cell population on cell cycle of HepG2 cells treated with black beans extract.	44
Fig. 22. Flow cytometric DNA content analysis of HepG2 cells treated with adzuki beans extract.....	45
Fig. 23. Cell population on cell cycle of HepG2 cells treated with adzuki beans extract.	46
Fig. 24. Flow cytometric DNA content analysis of HepG2 cells treated with lentils extract.	47
Fig. 25. Cell population on cell cycle of HepG2 cells treated with lentils extract.	48
Fig. 26. Flow cytometric apoptosis analysis of HepG2 cells treated with soybeans extract.	50
Fig. 27. Cell population on apoptosis of apoptosis of HepG2 cells treated with soybeans extract.....	51
Fig. 28. Flow cytometric apoptosis analysis of HepG2 cells treated with black beans extract.....	52

Fig. 29. Cell population on apoptosis of apoptosis of HepG2 cells treated with black beans extract.....	53
Fig. 30. Flow cytometric apoptosis analysis of HepG2 cells treated with adzuki beans extract.	54
Fig. 31. Cell population on apoptosis of apoptosis of HepG2 cells treated with adzuki beans extract.	55
Fig. 32. Flow cytometric apoptosis analysis of HepG2 cells treated with lentils extract.	56
Fig. 33. Cell population on apoptosis of apoptosis of HepG2 cells treated with lentils extract.....	57
Fig. 34. Effect of soybeans extract on TNF- α -induced NF- κ B activation. ...	59
Fig. 35. Effect of black beans extract on TNF- α -induced NF- κ B activation.	60
Fig. 36. Effect of adzuki beans extract on TNF- α -induced NF- κ B activation. .	61
Fig. 37. Effect of lentils extract on TNF- α -induced NF- κ B activation.	62

I. 서 론

두류는 세계적으로 많이 재배하는 작물 중의 하나로, 우리나라에서는 다양한 종류의 두류를 소비하고 있는데 두부, 된장, 두유 등의 식품을 만드는데 사용되고 있다. [1] 두류는 단백질과 지방 및 각종 미네랄과 비타민을 제공하는 주요 공급원인데, [2] 특히 우리 몸 속에서 다양한 생리활성에 도움을 주는 phytochemicals을 다량 포함하고 있다. [1, 2] 2010년부터 2015년간 우리나라 사람들의 구매빈도가 높았던 두류에는 대두, 서리태, 적두 (팥)이 있고, [3] 2014년 이후부터 수입 곡물 중 렌틸콩이 높은 수입량을 보였다. [4]

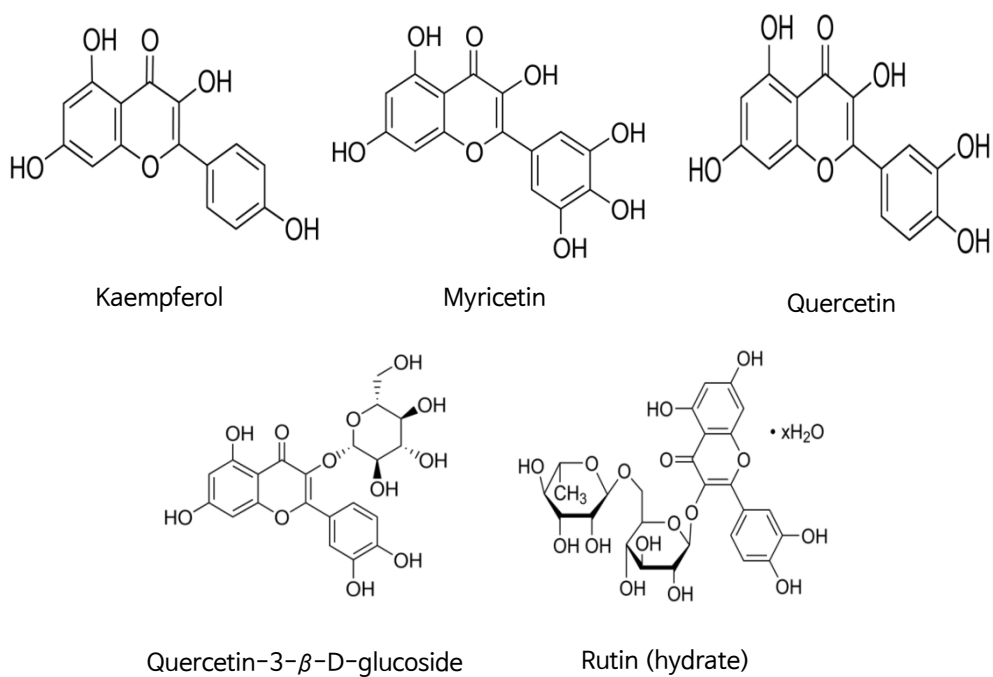
대두는 중국이나 우리나라 등 아시아의 지역에서 재배되어 두부, 된장과 같이 전통적인 식품에 이용되어왔으며, phytic acid, triterpenes, flavonoids, lignan 등이 많이 있어 [5] 항비만, 항당뇨, 골다공증 예방, 항암, 심혈관 질환 예방 등의 효과를 가지고 있다. [5, 6] 종피의 색이 검은색인 것은 서리태라고 분류하는데, angiotensin converting enzyme (ACE) 저해 효과, 항염, 암세포 증식 억제 효과 등이 있다. [6, 7] 적두는 극동 아시아가 원산지로서, 오래 전부터 해독, 이뇨, 배농의 약효가 있는 한방의 재료로도 사용되었으며, 혈압 강하, 항암, 항당뇨, 간 보호 효과 등을 가지고 있다. [8, 9] 렌틸콩에는 탄수화물, 단백질, 식이섬유, 비타민과 미네랄이 풍부하게 들어있고, [10] phytosterols, squalene, tocopherols, saponins, flavonoids, tannins, phytic acid, oligosaccharides와 같은 생리활성 물질이 다량 들어있다고 알려져 있으며, 항당뇨, 항산화, 항비만, 항균, 항암 효과 등을 가지고 있다. [10, 11]

Phytochemicals은 과일, 채소, 곡류 등에 들어있는 화학물질로, 외부 자극으로부터 스스로를 보호하기 위해 만들어내는 2차 대사산물을 일컫는다. [12] 이들은 여러 만성 질병의 위험을 줄여주는 것과 연관이 깊어 특히 항암작용에 도움이 있다고 알려져 있다. [12, 13] 이 중 두류에는 flavonoids와

triterpenoids가 많이 함유되어 있다. [14, 15]

Flavonoids는 phenolics를 대표하는 물질로, 과일, 채소, 꽃, 씨앗, 싹 등에서 발견될 수 있다. 기본적으로 2개의 aromatic ring (A, B ring) 이 3개의 탄소 (C ring) 로 연결되어있는 diphenylpropanes 구조 ($C_6-C_3-C_6$) 를 가지고 있다. [16, 17] 이 C ring 구조의 차이에 따라 flavonoids는 flavonols, flavanols, flavones, isoflavones 등으로 나눌 수 있다. (Figure. 1, 2, 3, 4) 대표적으로 알려져 있는 flavonoids의 기능은 암의 예방, 골흡수의 억제, 심보호 효과 등이 있다. [17] Triterpenoids는 isopentenyl pyrophosphate 중합체의 대사산물로, 30개 이상의 탄소로 이루어져있어 phytochemicals 중 가장 큰 물질이다. [18] Triterpenoids는 squalene의 고리화에 의해 생합성되는데, ring의 개수에 따라 tetracyclic triterpenoids, pentacyclic triterpenoids로 나눌 수 있다. (Figure. 5, 6, 7) [18, 19] Triterpenoids는 다양한 종류의 과일과 약초, 해조류에서 발견될 수 있으며 진통 완화, 항염, 항암, 항혈관신생의 효과를 보인다. [20] 이들 flavonoids와 triterpenoids는 공통적으로 26S proteasome 저해 효과가 있다고 보고되었다.

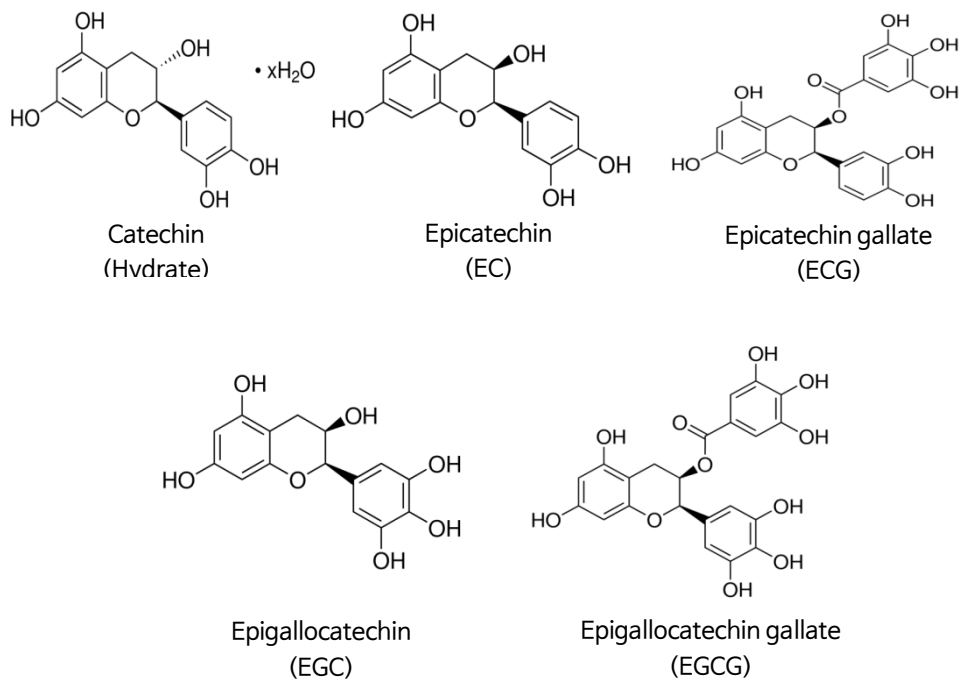
[Flavonoids]



Flavonols

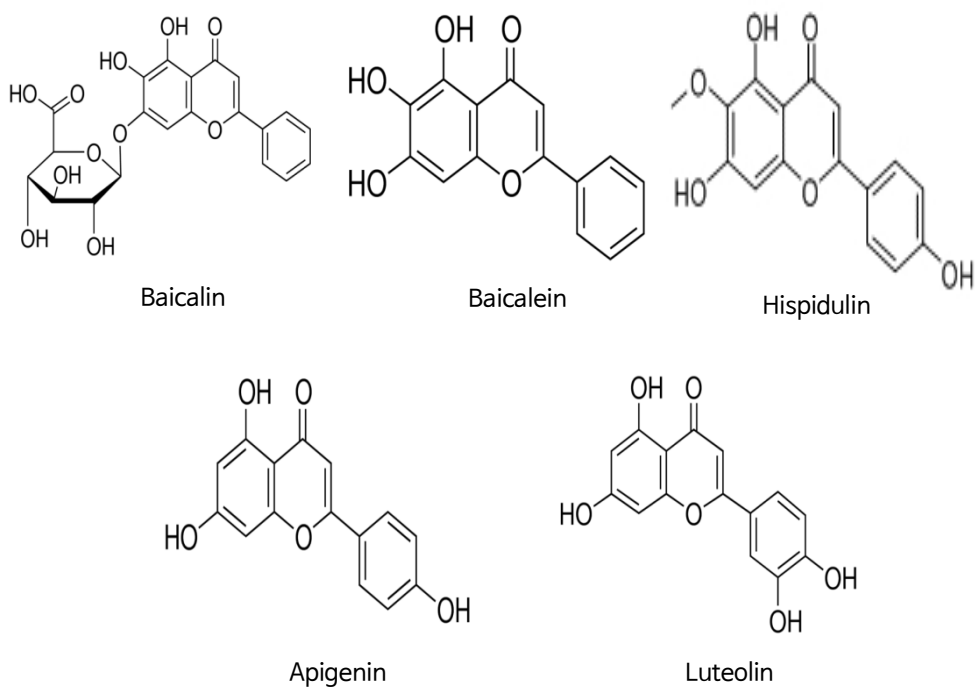
Fig. 1. Structure of flavonoids.

-Flavonols-



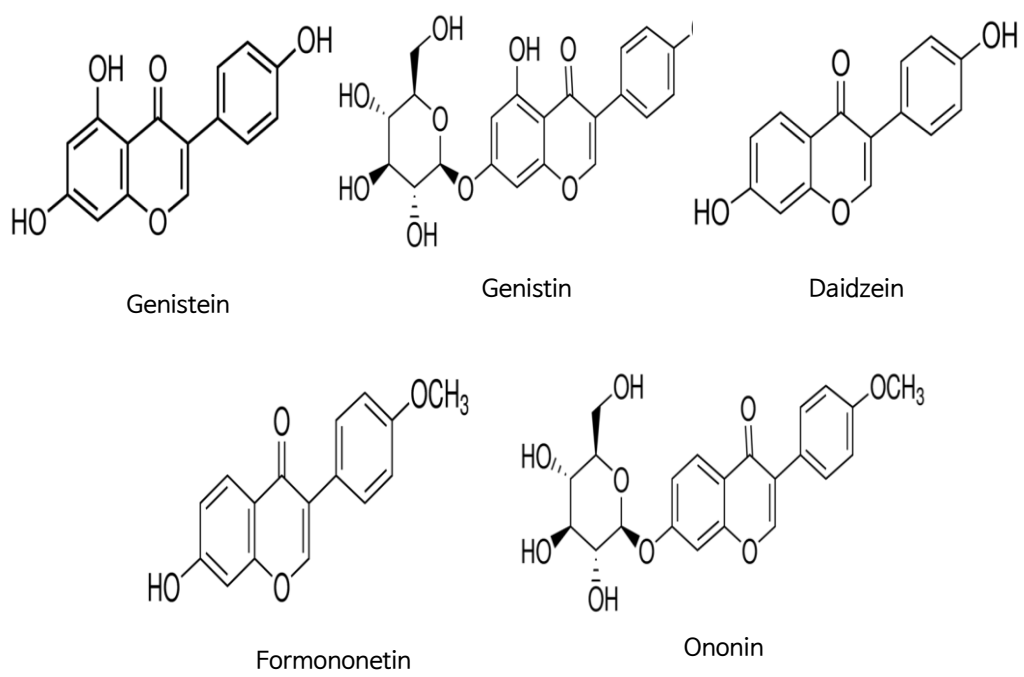
Flavanols

Fig. 2. Structure of flavonoids.
-Flavanols-



Flavones

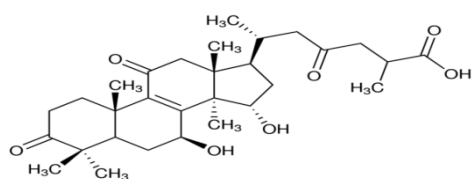
Fig. 3. Structure of flavonoids.
-Flavones-



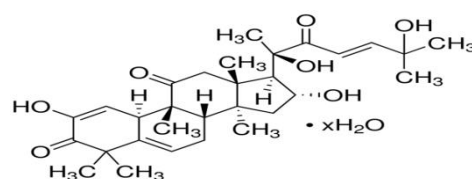
Isoflavones

Fig. 4. Structure of flavonoids.
-Isoflavones-

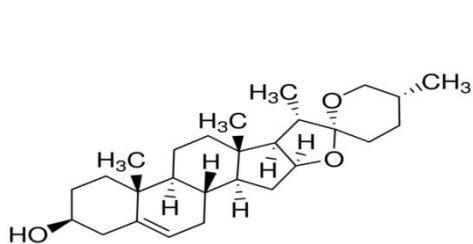
[Triterpenoids]



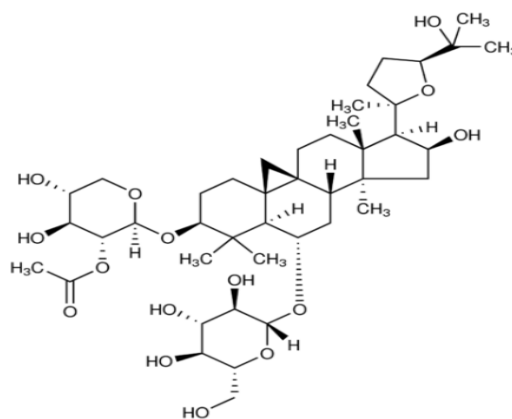
Ganoderic acid A



Cucurbitacin I
(Hydrate)



Diosgenin

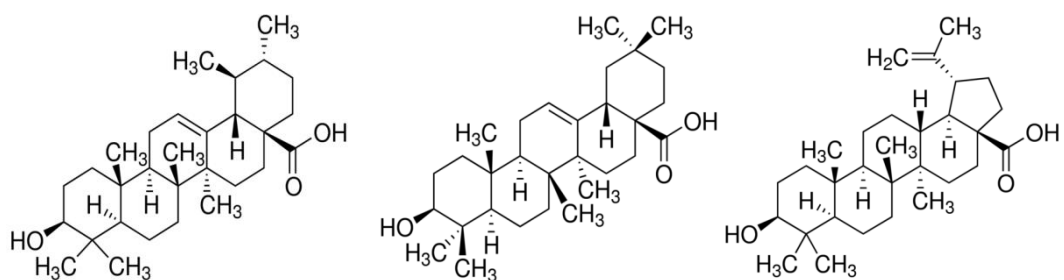


Astragaloside II

Tetracyclic triterpenoids

Fig. 5. Structure of triterpenoids.

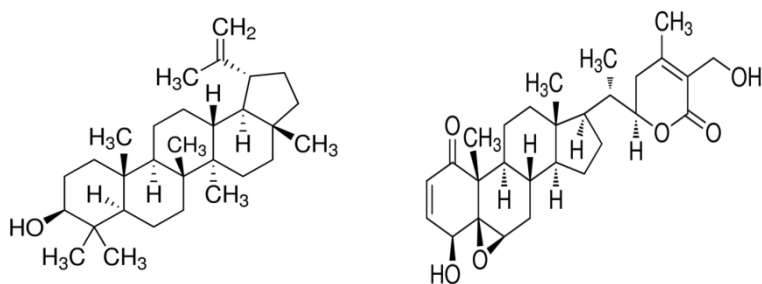
-Tetracyclic triterpenoids-



Ursolic acid

Oleanolic acid

Betulinic acid

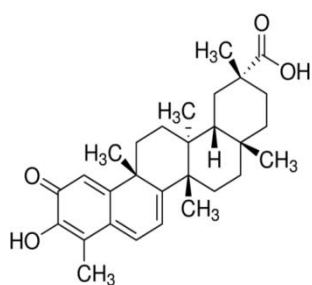


Lupeol

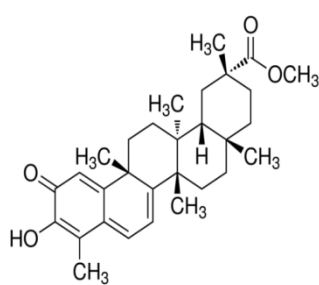
Withaferin A

Pentacyclic triterpenoids (1)

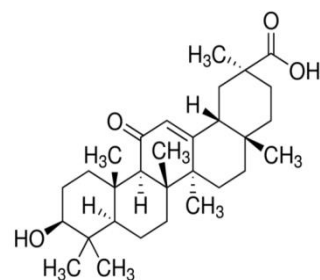
Fig. 6. Structure of triterpenoids.
-Pentacyclic triterpenoids (1)-



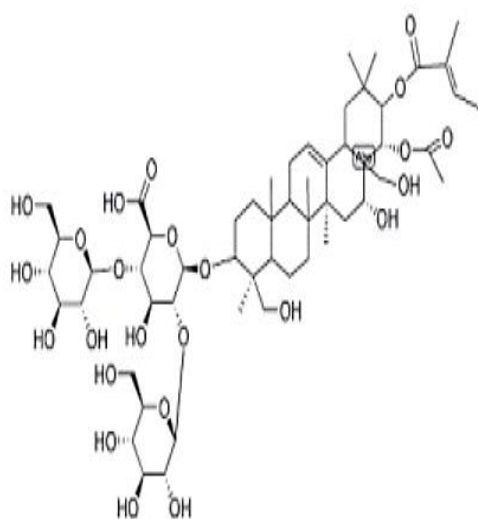
Celastrol



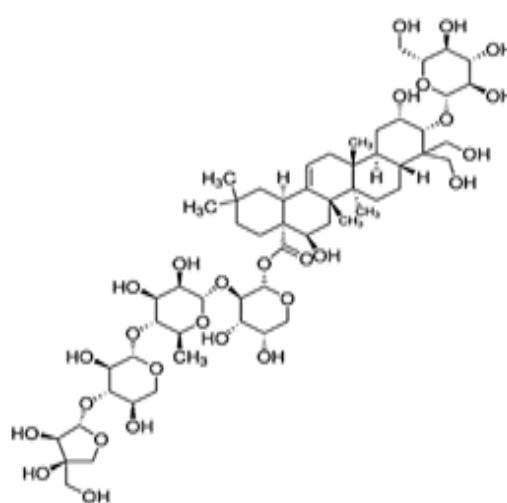
Pristimerin



18-β-Glycyrrhetic acid



Escin



Platycodon D

Pentacyclic triterpenoids (2)

Fig. 7. Structure of triterpenoids.
-Pentacyclic triterpenoids (2)-

26S proteasome은 non-lysosomal 단백질 분해 효소 복합체이다. [21] 26S proteasome에 의한 단백질 분해는 ubiquitin system에 의해 조절된다. (Ubiquitin-Proteasome System, UPS) UPS의 기질이 되는 단백질은 3번의 ubiquitylation cycle 과정을 통해서 polyubiquitylation 되어야 26S proteasome이 이를 인식하고, 단백질의 접힘 구조를 풀어 작은 peptide로 분해한다. [22, 23] 26S proteasome은 진핵세포의 세포질과 핵에서 발견되는데, NF- κ B의 활성화와 cell cycle을 조절하고 apoptosis, 면역 기전, 항원제시, 신호전달 등 다른 주요한 세포의 기능을 조절한다. [17, 22, 23] 26S proteasome에 의해 영향을 받는 이런 기전들은 암의 발생과 밀접한 연관이 있다.

NF- κ B는 전사 인자로, cytokine과 chemokine, growth factor 등과 관련된 유전자를 활성화시킨다. [21] NF- κ B는 p50과 p65로 이루어진 heterodimer에, inhibitory subunit인 I κ B가 결합된 형태인데, 26S proteasome은 전구체인 p105에서부터 p50을 만드는데 연관되어 있다. [18, 21] NF- κ B는 관련된 유전자의 활성을 조절하면서 다양한 면역 반응과 염증 반응을 조절한다. [24] 더 나아가 apoptosis를 억제하고 세포 증식과 세포 이동을 유발하는데, 이로 인해 종양 형성에 중요한 역할을 하게 된다. [21, 24, 25] NF- κ B는 세포질에서 I κ B와 결합되어 있기 때문에 핵 안으로 이동하지 못한다. 외부의 자극에 의해 I κ B의 phosphorylation이 일어나면 I κ B의 polyubiquitylation을 촉발시켜 I κ B가 26S proteasome에 의해 분해되는데, 이는 NF- κ B가 핵 안으로 이동하는 것을 촉진시킨다. [21, 26] 그러므로 NF- κ B 기능의 조절장애는 다양한 종류의 암을 야기할 수 있다. 또한 NF- κ B는 염증 질환과 자가면역질환, 패혈성 쇼크, 바이러스성 감염, 면역체계 장애, 신경퇴행성 질환 및 심장 질환과 관련이 있다.

Cell cycle 과정을 조절하는 것은 암의 발생을 조절하는 중요한 단계이다. 잦은 cell cycle 과정은 세포의 증식과 조절되지 않는 성장, 궁극적으로 암세포의 형성을 촉진시키는 결과를 발생시킨다. [21] Cyclins과 cyclin-dependent kinases (CDKs) 는 cell cycle의 진행을 조절하는데, cyclins과 CDKs의 기능 및 상호작용은 26S proteasome에 의해 조절된다. [21, 27] 종양 억제 기능을 가진

cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) p27에 의한 CDK 억제제는 cyclins D와 E의 활성을 감소시키고 G1/S기로의 진행을 제어한다. 이때 26S proteasome은 p27을 분해하는데 관여하는데, S-phase kinase protein 2 (Skp-2)는 p27를 ubiquitylation 시켜 26S proteasome에 의해 분해되도록 한다. 그에 따라 p27의 발현량이 줄어들어 cell cycle의 진행이 촉진돼 발암으로 이어지게 된다. [23] p27의 발현량이 줄어들게 되면 림프종암, 유방암, 폐암, 대장암, 전립선암, 난소암, 뇌암 등 다양한 종류의 암이 발견되는 경우가 많다. Cyclins A와 cyclins B도 26S proteasome에 의해 조절되는데, cyclins A와 cyclins B가 26S proteasome에 의해 분해되면 세포가 유사분열을 마치고 다음 cell cycle에 진입하게 되므로 발암으로 이어지게 된다. [21]

암은 비정상적인 세포의 조절되지 않는 성장과 확산의 특징을 가지고 있는데, 그러므로 apoptosis는 비정상적인 암세포의 사멸을 촉진할 수 있다. 그러나 암세포에서는 apoptosis 과정에 조절장애가 생겨 apoptosis가 억제되는 경우가 발생할 수 있다. 이 apoptosis를 조절하는데 관여하는 주요 인자들은 26S proteasome에 의해 조절된다. p53, Bax, NOXA와 같은 pro-apoptotic 인자들의 양은 26S proteasome을 억제했을 때 늘어난다. [21] 또한 Bcl-2나 IAP (inhibitor of apoptosis)와 같은 anti-apoptotic 인자들은 26S proteasome을 억제했을 때 발현량이 적어지게 되는데, [23] 이처럼 26S proteasome은 apoptosis를 억제해 암세포가 사멸되지 못하게 하여 발암으로 이어지게 한다.

26S proteasome에 대한 연구가 활발히 진행됨에 따라 MG-132, bortezomib, carfilzomib, CEP-18770 등 다양한 proteasome 억제제가 개발되었는데, 이 중 미국의 the Food and Drug Administration (FDA) 의 승인을 받은 proteasome 억제제는 bortezomib와 ixazomib가 있다. [21, 23] Bortezomib는 가장 잘 알려진 proteasome 억제제로, proteasome의 $\beta 5$ (chymotrypsin-like)-, $\beta 1$ (PGPH-like)-subunit의 기능을 직접적으로 억제해 I κ B를 안정화시켜 NF- κ B가 핵 안으로 이동하지 못하게 하는 기능을 가지고 있다. [28] Ixazomib는 oral proteasome 억제제로는 처음으로 FDA의 승인을 받았으며, proteasome과

결합하여 proteasome이 제 기능을 할 수 없게 만드는 기능을 가지고 있다. [29]
현재 이러한 proteasome 억제제는 항암제로써 치료에 사용되고 있다. [30]

26S proteasome의 활성 억제는 항암의 효과를 보일 수 있다고 할 수 있다. 하지만 여러 두류의 종류에 따른 26S proteasome 역가 저해율을 비교한 실험은 많이 진행되지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 사람들의 섭취 빈도가 높고 phytochemicals이 다량 함유되어 있다고 알려져 있는 두류 4종을 선정하여 항산화능과 proteasome 역가 저해율을 평가하고, 농도에 따른 NF- κ B 활성화와 cell cycle 및 apoptosis에 미치는 영향을 확인하여 proteasome inhibitor로서의 두류의 효과를 확인해보고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1.1. 세포 및 시약

인간 유래 간암 세포인 HepG2 cell (hepatocarcinoma cell) 은 한국세포주은행에서 분양 받아 세포 실험에 사용하였다. 세포 배양에 사용된 MEM 배지는 Hyclone에서 구입하였고 fetal bovine serum (FBS) 은 Welgene에서 구입하였다. no-phenol red MEM 배지는 Gibco에서 구입하여 사용하였고 trypsin-EDTA solution과 penicillin-streptomycin, phosphate-buffered saline (PBS), dimethyl sulfoxide (DMSO) 는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

세포 독성 실험과 세포 증식 실험에서 사용된 thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) 는 Sigma-Aldrich에서 구입하였고 isopropanol과 hydrochloric acid (HCl) 는 Duksan에서 구입하여 사용하였다.

두류의 항산화능 측정 실험에 사용된 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)와 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (ABAP), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), quercetin은 Sigma-Aldrich에서 구입하였고 L-ascorbic acid는 Daejung에서 구입하였다.

Proteasome 역가 측정 실험에서 사용된 MG-132와 proteasome substrate III (Suc-LLVY-AMC) 는 Calbiochem에서 구입하였고, 단백질 정량을 위해 사용한 DC Protein assay kit I은 Bio-Rad에서 구입하였다.

Cell cycle 및 apoptosis 분석에 사용된 Propidium iodine (PI) solution과 Annexin V, Annexin V binding buffer는 Sony biotechnology에서 구입하였고, Triton X-100과 Ribonuclear A from bovine pancreas (RNase) 는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

Western blot 실험에서 사용된 Tumor necrosis factor- α (TNF- α) 와 Aprotinin bovine, Leupeptin hydrochloride, Pepstatin A, DL-Dithiothreitol (DTT), Phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF), Igepal GA-630 (Igepal) 를 포함한 이 외의 시약들은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. Immobilon-P transfer membrane은 Millipore에서 구입하였다. 또한 primary antibody인 NF- κ B p65는 Santa cruz biotechnology에서 구입하였고, Anti-nucleolin은 Millipore에서 구입하였으며, secondary antibody인 Anti-mouse IgG (HRP-linked antibody) 와 Anti-biotin (HRP-linked antibody) 은 Cell signaling에서 구입하였다. Western blot detection kit인 ECL solution은 ELPIS-Biotech에서 구입하여 사용하였다.

1.2. 두류 시료

실험에 사용한 4가지 두류인 대두 (*Glycine max (L.) Merrill, yellow soybean*), 서리태 (*Glycine max (L.) Merr., Seoritae soybean*), 적두 (*Vigna angularis*), 렌틸콩 (*Lens culinaris Medik.*) 은 2016년 11월에 서울 수유시장에 위치한 지역 마트에서 구매하였다.

2. 실험 방법

2.1. 두류 추출물 준비

두류의 추출물을 얻기 위해서 선행 연구의 방법을 참고하였다. [31] 두류 25g을 측정하여 추출하기 하루 전에 증류수 200mL에 넣고 냉장고에서 불린다. 불린 두류를 80% acetone (v/v) 200g과 함께 5분간 blender로 갈아준 후 homogenizer (Tops, 대일랩서비스, Korea) 로 중간 속도에서 3분간 균질화시켰다. 이 때 두류의 변성을 방지하기 위해 ice box에서 실험을 진행하였다. 균질화를 거친 용액을 aspirator (A-3S, Eyela, Japan) 를 사용하여 filter paper (Whatsman no. 2) 로 여과시켰고, 그 후 회전 증발 농축기 (N-N Series, Eyela, Japan) 를 사용하여 water bath의 온도를 40-50°C로 유지하면서 대략 90% (5-10mL) 까지 증발시켜 농축액을 만들었다. 이렇게 만들어진 농축액에 총 부피가 15-20mL이 되도록 증류수를 첨가하여 -80°C freezer에서 하루 동안 보관한 다음 동결 건조기 (TFD Series, Ilshinbiobase, Korea) 를 사용하여 각각 대두 2.22g, 서리태 1.81g, 적두 1.01g, 렌틸콩 1.17g의 추출물을 얻었다. 두류 추출물은 실험에 사용하기 전까지 -20°C freezer에서 보관하였다.

2.2. 세포 배양

HepG2 cell은 MEM에 10% FBS와 1% antibiotics (penicillin-streptomycin) 을 첨가한 배지를 사용하여 T25 또는 T75 flask에 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator (371, Thermo, USA) 에서 배양하였다. 배지는 3-4일에 한 번씩 교체하였다.

2.3. 세포 독성 실험

세포 독성 실험을 수행하기 위해서 HepG2 cell을 5.5×10^4 cell/well의 농도로 96-well plate에 $100\mu\text{L}$ 씩 분주하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고 각각의 시료를 Free MEM 배지를 사용하여 0, 10, 30, 60, $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 희석한 다음, well 당 $100\mu\text{L}$ 씩 처리하고 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 Free MEM 배지를 사용하여 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 의 농도로 희석한 MTT solution을 well 당 $100\mu\text{L}$ 씩 처리한 다음 37°C , 5% CO_2 incubator에서 4시간 배양하였다. 4시간 후, MTT solution을 제거하지 않은 상태에서 MTT formazan 결정을 녹여내기 위해 acid-isopropanol (0.04N HCl in isopropanol) 을 well 당 $100\mu\text{L}$ 씩 첨가하고 waving shaker (CWS-250, JEIO TECH, Korea) 를 사용하여 실온에서 20시간 교반하였다. 20시간 후, microplate reader (Spectramax plus 384, Molecular devices, USA) 를 사용하여 590nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 다음의 식에 대입하여 세포 독성률을 계산하였다.

$$\text{Cell cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{control absorbance} - \text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \times 100$$

2.4. 세포 증식 실험

세포 증식 실험을 수행하기 위해서 HepG2 cell을 4×10^4 cell/well의 농도로 96-well plate에 $100\mu\text{L}$ 씩 분주하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고 각각의 시료를 Free MEM 배지를 사용하여 0, 10, 30, 70, $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 희석한 다음, well 당 $200\mu\text{L}$ 씩 처리하고 37°C , 5% CO_2 incubator에서 96시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 Free MEM 배지를 사용하여 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 의 농도로 희석한 MTT solution을 well 당 $100\mu\text{L}$ 씩 처리한 다음 37°C , 5% CO_2 incubator에서 4시간 배양하였다. 4시간 후, MTT solution을 제거하지 않은 상태에서 MTT formazan 결정을 녹여내기 위해 acid-isopropanol (0.04N HCl in isopropanol) 을 well 당 $100\mu\text{L}$ 씩 첨가하고 waving shaker를 사용하여 실온에서 20시간 교반하였다. 20시간 후, microplate reader를 사용하여 590nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 다음의 식에 대입하여 세포 증식률을 계산하였다.

$$\text{Cell proliferation (\%)} = \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \times 100$$

2.5. 항산화능 측정 실험

2.5.1. DPPH assay

DPPH radical을 이용하여 vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC)를 측정하는 방법은 선행연구를 참고하여 수행하였다. [32] 각각의 시료와 standard 물질로 사용할 L-ascorbic acid는 모두 50% (v/v) methanol을 용매로 하여 1mg/mL solution을 제조하였고, 80% (v/v) methanol을 용매로 하여 100 μ M DPPH radical solution을 제조하였다. 측정 시료 50 μ L를 DPPH radical solution 2.95mL에 첨가하고 잘 섞은 후 상온의 어두운 곳에서 30분간 반응시켰다. Control은 50% methanol 50 μ L를 DPPH radical solution 2.95mL에 첨가한 것을 사용하였고 blank는 50% methanol을 사용하였다. 반응한 시료를 잘 섞은 후 200 μ L씩 96-well plate에 옮겨 microplate reader를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid를 통해 얻은 표준곡선을 이용하여 각각의 시료 추출물 g당 mg vitamin C equivalent (VCE)를 산출하였다.

2.5.2. ABTS assay

ABTS radical을 이용하여 vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC)를 측정하는 방법은 선행연구를 참고하여 수행하였다. [32] 각각의 시료와 standard 물질로 사용할 L-ascorbic acid는 모두 50% (v/v) methanol을 용매로 하여 1mg/mL solution을 제조하였고, PBS를 용매로 하여 1mM ABAP, 2.5mM ABTS solution을 제조하였다. 1mM ABAP, 2.5mM ABTS solution은 68 $^{\circ}$ C water bath에서 투명한 청록색이 될 때까지 가열하여 ABTS radical solution을 만들었다. 측정 시료 20 μ L를 ABTS radical solution 980 μ L에 첨가하고 잘 섞은 후 10분간 어두운 곳에서 반응시켰다. Control은 50% methanol 20 μ L를 ABTS radical solution 980 μ L에 첨가한 것을 사용하였고 blank는 PBS를 사용하였다. 반응한

시료를 250 μ L씩 96-well plate에 옮겨 microplate reader를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid를 통해 얻은 표준곡선을 이용하여 각각의 시료 추출물 g당 mg vitamin C equivalent (VCE)를 산출하였다.

2.5.3. Cellular Antioxidant Activity (CAA) assay

세포 내 항산화능 측정 실험을 수행하기 위해 선행 연구의 방법을 참고하였다. [33, 34] HepG2 cell을 8 X 10⁴cell/well의 농도로 96-well plate에 100 μ L씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고 각각의 시료를 Free MEM 배지를 사용하여 농도 별로 희석한 다음, well 당 100 μ L씩 처리하였고 25 μ M DCFH-DA를 함께 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 동안 반응시켰다. Control은 quercetin을 농도 별로 희석하여 처리하였고 blank는 HBSS를 사용하였다. 1시간 후, 4 $^{\circ}$ C에서 130 rcf로 5분간 원심분리한 다음 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척하고 다시 4 $^{\circ}$ C에서 130 rcf로 5분간 원심분리하여 PBS를 제거하였다. HBSS를 사용하여 600 μ M로 희석한 ABAP를 well 당 100 μ L씩 첨가한 즉시 37 $^{\circ}$ C로 온도를 설정한 multiple microplate reader (Spectramax M5/M5^e, Molecular devices, USA)를 사용하여 485nm excitation, 538nm emission에서 60분간 2분 간격으로 형광을 측정하였다. CAA unit은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{CAA unit} = 100 - (\int SA / \int CA) \times 100$$

($\int SA$ = sample area, $\int CA$ = control area)

CAA unit을 이용해 EC 50 값을 구하고 (CompuSyn program, version 1.0), EC 50 값을 통해 시료 100g 당의 μ mol quercetin equivalent을 산출하였다.

2.6. Proteasome 역가 측정 실험

2.6.1. Cellular extract (CE) assay

기존의 방법인 세포질 추출물을 이용한 proteasome 역가 측정 실험을 수행하기 위해서 선행 연구의 방법을 참고하였다. [31] HepG2 cell을 8×10^4 cell/well의 농도로 6-well plate에 1mL씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고 차가운 PBS로 2회 세척한 다음, ice box 위에서 cell scraper를 사용하여 세포를 떼어내고 4°C에서 130 rcf로 5분간 원심분리하였다. Cell pellet에 차가운 RIPA buffer [50mM tris (pH 7.4), 1% IGEPAL, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 1mM NaF] 150 μ L를 첨가하여 현탁액을 만들고 ice box에 5분마다 vortexing하면서 20분간 방치한 다음, 4°C에서 12,000 rcf로 15분간 원심분리하였다. 상층액인 세포 추출물은 따로 모아서 실험에 사용하기 전까지 -80°C freezer에서 보관하였다.

세포 추출물은 DC-Protein assay kit I를 사용하여 단백질 정량을 수행하고 단백질 50 μ g을 96-well black plate에 분주하고 각각의 시료를 reaction buffer [20mM tris-HCl (pH 7.8), 0.5mM EDTA, 0.035% SDS]를 사용하여 0, 1, 10, 100 μ g/mL의 농도로 희석한 다음, well 당 50 μ L씩 처리하였다. Positive control은 MG-132를 10 μ M의 농도로 희석하여 처리하였고 negative control은 DMSO를 1%의 농도로 희석하여 처리하였다. 그 후 reaction buffer를 사용하여 100 μ M로 희석한 proteasome substrate III를 well 당 150 μ L씩 첨가한 즉시 37°C로 온도를 설정한 multiple microplate reader를 사용하여 380nm excitation, 460nm emission에서 60분간 2분 간격으로 형광을 측정하였다.

2.6.2 Cellular proteasome inhibitory activity (CPIA) assay

세포 내 proteasome 역가 측정 실험을 수행하기 위해서 선행 연구의 방법을 참고하였다. [35] HepG2 cell을 8×10^4 cell/well의 농도로 96-well plate에 $100\mu\text{L}$ 씩 분주하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고 각각의 시료를 Free MEM 배지를 사용하여 0, 1, 10, $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 희석한 다음, well 당 $50\mu\text{L}$ 씩 처리하였다. Positive control은 MG-132를 $10\mu\text{M}$ 의 농도로 희석하여 처리하였고 negative control은 DMSO를 1%의 농도로 희석하여 처리하였다. 시료 처리 후 37°C , 5% CO_2 incubator에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 후, 4°C 에서 130 rcf로 5분간 원심분리한 다음 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척하고 다시 동일한 조건에서 원심분리하여 PBS를 제거하였다. no-phenol red MEM 배지를 사용하여 $100\mu\text{M}$ 로 희석한 proteasome substrate III를 well 당 $50\mu\text{L}$ 씩 첨가한 즉시 37°C 로 온도를 설정한 multiple microplate reader를 사용하여 380nm excitation, 460nm emission에서 60분간 2분 간격으로 형광을 측정하였다.

2.7. Cell cycle 분석

HepG2 cell을 1×10^6 cell/well의 농도로 6-well plate에 1mL씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척하였다. 그 후 각각의 시료를 Free MEM 배지를 사용하여 0, 1, 10, 100 μ g/mL의 농도로 희석한 다음, well 당 1mL씩 처리하고 (2 well/treatment) 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 48시간 후, trypsin-EDTA solution을 이용해 세포를 떼어내고 4°C에서 130 rcf로 5분간 원심분리하여 cell pellet을 얻었다. 차가운 PBS로 cell pellet을 2회 세척 후 70% ethanol에 현탁시켜 fixation 과정을 -20°C에서 overnight동안 진행하였다. Overnight 후 PBS로 2번 세척한 다음 PBS 100 μ L에 현탁시켰다. 현탁시킨 용액에 0.1% Triton X-100, 200 μ g/mL RNase를 첨가하고 상온의 어두운 곳에서 30분간 반응시켰다. 30분 후, PI (0.5mg/mL) 10 μ L를 첨가하고 어두운 곳에서 ice box에 꽂아두고 15분간 반응시켰다. 반응시킨 후 PBS로 1회 세척하고, 염색된 cell pellet에 PBS 0.8mL을 넣어 현탁시킨 다음 cell strainer (SPL) 로 filtering을 거친 후, flow cytometry (LE-SH800ZE, Sony corporation, Japan)를 이용하여 488nm excitation에서 cell cycle을 분석하였다.

2.8. Apoptosis 분석

HepG2 cell을 5.5×10^5 cell/well의 농도로 6-well plate에 1mL씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척하였다. 그 후 각각의 시료를 Free MEM 배지를 사용하여 0, 1, 10, 100 μ g/mL의 농도로 희석한 다음, well 당 1mL씩 처리하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. Single staining control로 사용할 sample은 65°C로 15분간 가열하여 apoptosis를 일으키도록 하였다. 48시간 후, trypsin-EDTA solution을 이용해 세포를 떼어내고 4°C에서 130 rcf로 5분간 원심분리하여 cell pellet을 얻었다. 차가운 PBS로 cell pellet을 1회 세척 후 Annexin V binding buffer 200 μ L를 첨가하여 현탁시키고, Annexin V 5 μ L와 PI (0.5mg/mL) 10 μ L를 첨가하여 어두운 곳에서 ice box에 꽂아두고 15분간 반응시켰다. 반응시킨 후 PBS 0.6mL을 넣어 현탁시킨 다음 flow cytometry를 이용하여 405/488nm excitation에서 apoptosis를 분석하였다.

2.9. Western blotting

Western blot analysis를 이용하여 두류 추출물에 따른 NF- κ B 활성화 억제 효과를 측정하기 위해 HepG2 cell을 1×10^6 cell/well의 농도로 6-well plate에 1mL씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척하였다. 그 후 각각의 시료를 Free MEM 배지를 사용하여 0, 1, 10, 100 μ g/mL의 농도로 희석한 다음, well 당 1mL씩 처리하고 (2 well/treatment) 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척하고 10ng/mL의 농도로 희석한 TNF- α 를 넣어주어 1시간동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 반응시켰다. 반응시킨 후 세포들을 회수하여 cytoplasm extract와 nuclear extract를 얻었다.

세포는 차가운 PBS 1mL씩 2회 세척하고 ice box 위에서 cell scraper를 사용하여 세포를 떼어내고 4°C에서 130 rcf로 5분간 원심분리하였다. Cell pellet에 차가운 hypotonic buffer [10mM HEPES-KOH (pH 7.8), 10mM KCl, 2mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 0.2mM NaF, 0.2mM Na₃VO₄, 0.4mM PMSF, 1mM DTT, 1 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL pepstatin] 400 μ L를 첨가하여 현탁액을 만들고 ice box에 15분간 방치한 후 10% Igepal을 첨가하여 15초간 강하게 vortexing하였다. 그 다음 4°C에서 12,000 g로 3분간 원심분리하여 얻은 상층액은 cytoplasm extract로, 따로 모아서 -80°C freezer에서 보관하였다.

상층액을 제거하고 남은 pellet은 PBS로 1회 세척하고 차가운 high-salt extraction buffer [50mM HEPES-KOH (pH 7.8), 50mM KCl, 300mM NaCl, 0.1mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 0.2mM NaF, 0.2mM Na₃VO₄, 0.4mM PMSF, 1mM DTT, 1 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL pepstatin] 50 μ L를 첨가하여 4°C에서 waving shaker로 30분간 교반하여 핵막을 깬 후, 4°C에서 12,000 g로 30분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이 상층액은 nuclear extract로, 사용하기 전까지 -80°C freezer에서 보관하였다.

Nuclear extract는 단백 정량 후 시료들의 단백질 양을 동일하게 조절하여 2X sample buffer와 1:1로 섞어 전처리하였다. 전처리한 시료들은 10% (w/v) SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 전기영동한 후 PVDF transfer membrane으로 단백질을 이동시켰다. Transfer가 끝난 membrane은 blocking solution (5% skim milk in 0.1% PBST)으로 실온에서 1시간 동안 교반하며 blocking한 후, NF- κ B p65 (1:250), anti-nucleolin (1:10000)을 4°C에서 overnight동안 교반하여 primary antibody를 붙여주었다. 그 후 0.1% PBST로 5분씩 3회 세척하였고 secondary antibody인 Anti-mouse IgG (1:2000), Anti-biotin (1:2000)을 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 다시 0.1% PBST로 5분씩 3회 세척, 0.1% TBST로 10분씩 1회 세척 후 ECL solution을 처리하여 NF- κ B와 nucleolin band를 얻어 정량하였다. 단백질의 발현 수준은 nucleolin에 맞추어 조정하였으며 정량은 Image Lab (Bio-Rad, USA) 프로그램을 이용하였다.

2.8. 통계처리

본 실험의 결과는 적어도 3번 반복하여 평균±표준편차로 나타내었고, 실험 결과는 SPSS software version 22 프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 실시함으로써 실험군과 대조군 간의 차이에 대한 통계적 유의성을 확인하였고, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후분석을 수행하였다.

Ⅲ. 실험 결과 및 고찰

1. 두류에 따른 세포 독성 (Cell cytotoxicity)

시험하고자 하는 시료를 농도 별로 세포에 24시간 처리하였을 때, 세포 독성이 10% 이상이면 급성 독성을 보인다고 간주하였다. 따라서 세포 독성을 보이지 않는 시료의 최대 농도를 확인하기 위해 실험을 진행하였다. 세포 독성 실험 결과, 대두, 서리태, 적두, 렌틸콩 추출물을 0-100 μ g/mL의 농도로 HepG2 cell에 처리하였을 때 모든 농도에서 세포 독성률이 10% 미만으로 확인되었다. (Figure 8a) 이 결과를 통해 대두, 서리태, 적두, 렌틸콩은 세포에 급성 독성을 거의 미치지 않음을 확인하였고 0-100 μ g/mL 범위의 농도에서 실험을 진행하기로 결정하였다.

2. 두류에 따른 세포 증식 (Cell proliferation)

시험하고자 하는 시료를 농도 별로 세포에 96시간 처리하였을 때, 처리한 시료에 따라 세포의 증식률에 변화가 있는지 확인하기 위해 실험을 진행하였다. 세포 증식 실험 결과, 적두, 렌틸콩 추출물의 다양한 농도에서는 세포 증식에 아무런 영향을 끼치지 않았으나, 대두, 서리태에서는 control군에 비해 세포 증식률이 유의적으로 소폭 상승하였다. ($p < 0.05$) (Figure 8b)

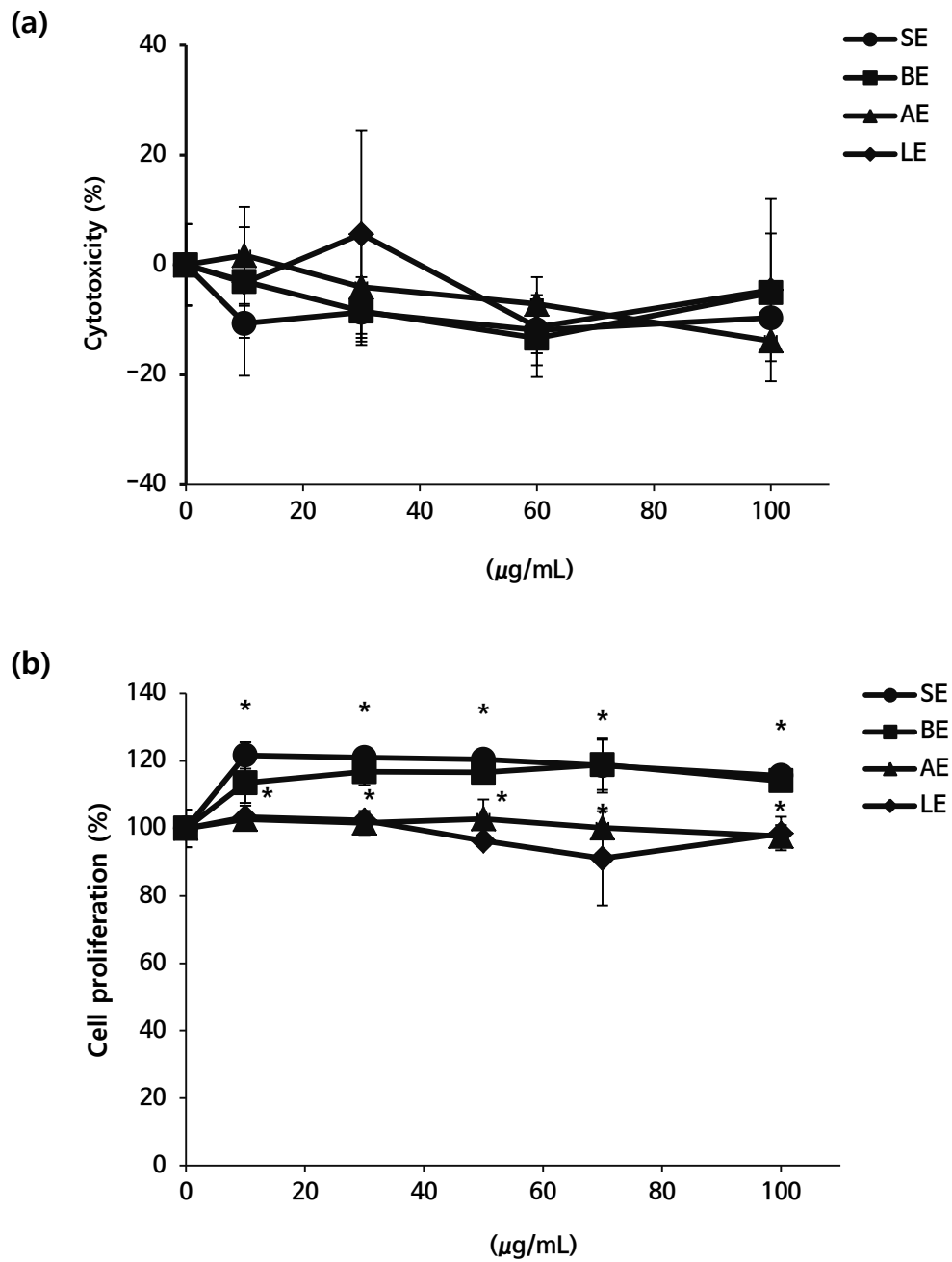


Fig. 8. Effects of soybeans, black beans, adzuki beans, lentils extracts on cytotoxicity (a) and cell proliferation (b) in HepG2 cells. SE; soybeans extract, BE; black beans extract, AE; adzuki beans extract, LE; lentils extract. An asterisk (*) indicates significant difference in cell proliferation compared to the control ($p < 0.05$).

3. 두류에 따른 항산화능 평가

대두, 서리태, 적두, 렌틸콩의 항산화능을 평가하기 위해 3가지 실험을 수행하였다. (Figure 9a, b, c) DPPH assay의 결과, 적두가 171.98 ± 7.07 mg VCE/g extract로 가장 높은 항산화능을 보였으며, 렌틸콩 (108.53 ± 6.96 mg VCE/g extract), 서리태 (40.42 ± 3.77 mg VCE/g extract), 대두 (11.12 ± 7.45 mg VCE / extract) 순으로 항산화능을 보였다. ($p < 0.05$) ABTS assay의 결과에서도 적두가 168.04 ± 2.75 mg VCE/g extract로 가장 높은 항산화능을 보였으며, 렌틸콩 (79.35 ± 3.44 mg VCE/g extract), 서리태 (51.98 ± 2.43 mg VCE/g extract), 대두 (44.18 ± 8.04 mg VCE/g extract) 순으로 항산화능을 보였다. ($p < 0.05$) 또한 세포 내에서의 항산화능을 확인할 수 있는 CAA assay의 결과에서도 적두가 91.74 ± 39.94 μ mole quercetin/100g legume으로 가장 높은 항산화능을 보였으며, 렌틸콩 (71.56 ± 18.04 μ mole quercetin/100g legume), 서리태 (32.15 ± 1.82 μ mole quercetin/100g legume), 대두 (17.2 ± 2.64 μ mole quercetin/100g legume) 순으로 항산화능을 보였다. ($p < 0.05$)

3가지의 실험 결과 모두에서 동일한 경향을 보이고 있는데, 가장 높은 항산화능을 보이는 적두에는 radical 소거능이 뛰어난 항산화제로 알려진 proanthocyanidins과 같은 polyphenols이 풍부하게 들어있다. [36] 렌틸콩 또한 tocopherols 및 polyphenols의 함량이 높다고 알려져 있으며, [37] 서리태는 검은 종피를 가지고 있어 대두보다 anthocyanin 함량이 높다고 알려져 있다. [14] 이 phytochemicals들은 활성산소의 생성을 억제하거나 소거하는 능력이 뛰어나 항산화 효과를 보이는 것으로 보고되고 있기 때문에, 이들의 함량이 높은 적두, 렌틸콩, 서리태가 대두보다 높은 항산화능을 보이는 것으로 추측된다.

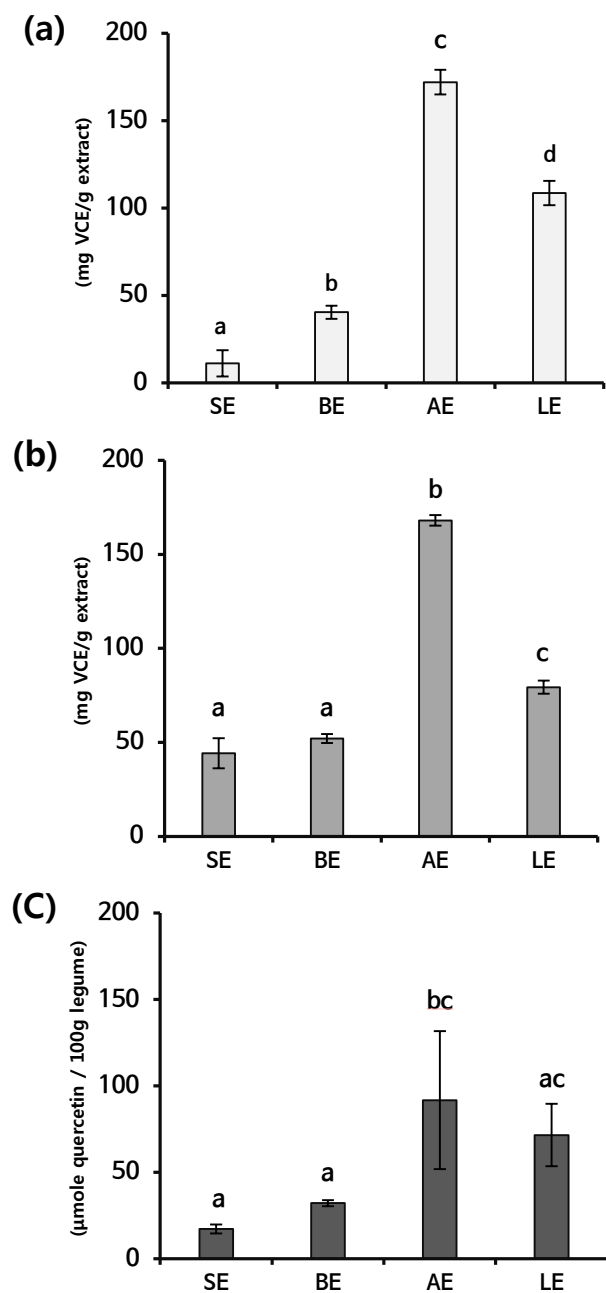


Fig. 9. DPPH (a), ABTS (b) scavenging activity and CAA value (c) of soybeans, black beans, adzuki beans, lentils extracts. SE; soybeans extract, BE; black beans extract, AE; adzuki beans extract, LE; lentils extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

4. 두류에 따른 proteasome 역가 저해율 측정

4.1. 두류의 CE & CPIA assay 적용

대두, 서리태, 적두, 렌틸콩의 proteasome 역가 저해율을 평가하기 위해 CE assay (*in vitro*), CPIA assay (*in vivo*)의 2가지 실험에서 시료를 100 μ g/mL의 농도로 처리하여 결과를 비교하였다. (Figure 10) CE, CPIA assay로 두류의 PIA를 측정된 결과, 대두, 서리태와 적두, 렌틸콩에서 서로 다른 경향을 보였다. ($p < 0.05$) 대두, 서리태는 CE assay의 결과에서는 proteasome을 억제하는 효과를 보이지 않았으나 CPIA assay의 결과에서는 proteasome 억제 효과를 보였다. 반면에 적두, 렌틸콩은 CE assay의 결과에서는 proteasome을 억제하는 효과를 보였으나 CPIA assay의 결과에서는 proteasome 억제 효과를 보이지 않았다. 이는 각각의 두류가 포함하고 있는 phytochemicals이 다르고, 세포막을 통과할 때 차이를 보이기 때문에 proteasome 역가 저해율이 다르게 나타나는 것이라고 추측할 수 있다.

Cell proliferation 실험의 결과, 대두와 서리태에서 세포 증식률이 소폭 상승한 이유는 이처럼 억제된 proteasome이 cell growth와 관련된 pathway에 영향을 미쳤기 때문이라고 추측할 수 있다.

4.2. 주요 flavonoids와 triterpenoids의 CE & CPIA assay 적용

두류는 flavonoids와 triterpenoids가 많이 함유되어 있는 대표적인 식품이다. 잘 알려진 flavonoids와 triterpenoids를 몇 가지 선정하여 구조 별로 분류하고 이들의 proteasome 억제 저해율을 평가하기 위해 CE, CPIA assay 방법을 이용해 시료를 100 μ M의 농도로 처리하여 결과를 비교하였다. (Figure 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17)

26S proteasome 역가 저해율 측정 결과, flavonoids류에서는 baicalein과

hispidulin, triterpenoids류에서는 celastrol, escin, platycodon D가 CPIA value가 높게 측정되었다. 대부분의 시료가 CE assay의 결과에서는 control에 비해 유의적으로 높은 효과를 보였으나, CPIA assay의 결과에서는 control과 비슷하거나 그보다 떨어지는 수치를 보였다. ($p < 0.05$) 이처럼 CE value와 CPIA value에서 차이가 나는 것은 시료마다 세포막을 통과하는 정도가 다르기 때문이라고 추측할 수 있다. 또한 CE value보다 CPIA value가 낮게 측정된 것은 시료가 세포막을 제대로 통과하지 못하여 proteasome의 활성을 막지 못한 것으로 추측할 수 있다.

Flavonols류의 quercetin과 그의 배당체인 quercetin-3- β -D-glucoside에서 CE, CPIA assay 결과의 차이가 발생했는데, 이는 배당체의 경우, hydroxyl group의 수가 더 많아 세포막을 통해 잘 흡수되지 못하기 때문이다. [38] 마찬가지로 다른 flavonoids류에서도 hydroxyl group이 더 많은 물질은 낮은 역가 저해율을 보였다. 또한 OH기가 몇 번째 탄소와 연결되어있는가도 시료가 세포막을 통과하는 데에 영향을 끼칠 수 있다. 여러 flavonoids의 proteasome 억제효과를 실험한 논문에서는 C-4'에 OH기가 연결되어있는 flavones이 proteasome을 억제하는 데에 영향을 미친다고 보고하였다. [39] 마찬가지로 Flavones류의 CE, CPIA assay 결과에서도 C-4'에 OH기가 연결되어 있는 hispidulin이 높은 proteasome 억제효과를 보임을 확인할 수 있었다.

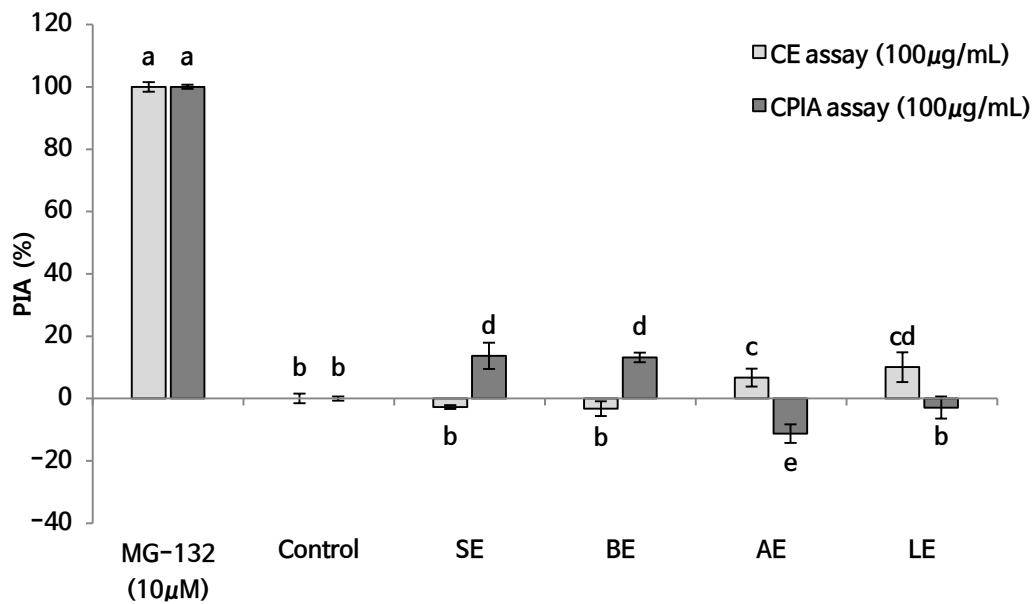


Fig. 10. Proteasome inhibition activity of soybeans, black beans, adzuki beans, lentils extracts.

PIA; proteasome inhibition activity, CE; cell extract proteasome activity, CPIA; cellular proteasome inhibition activity, SE; soybeans extract, BE; black beans extract, AE; adzuki beans extract, LE; lentils extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

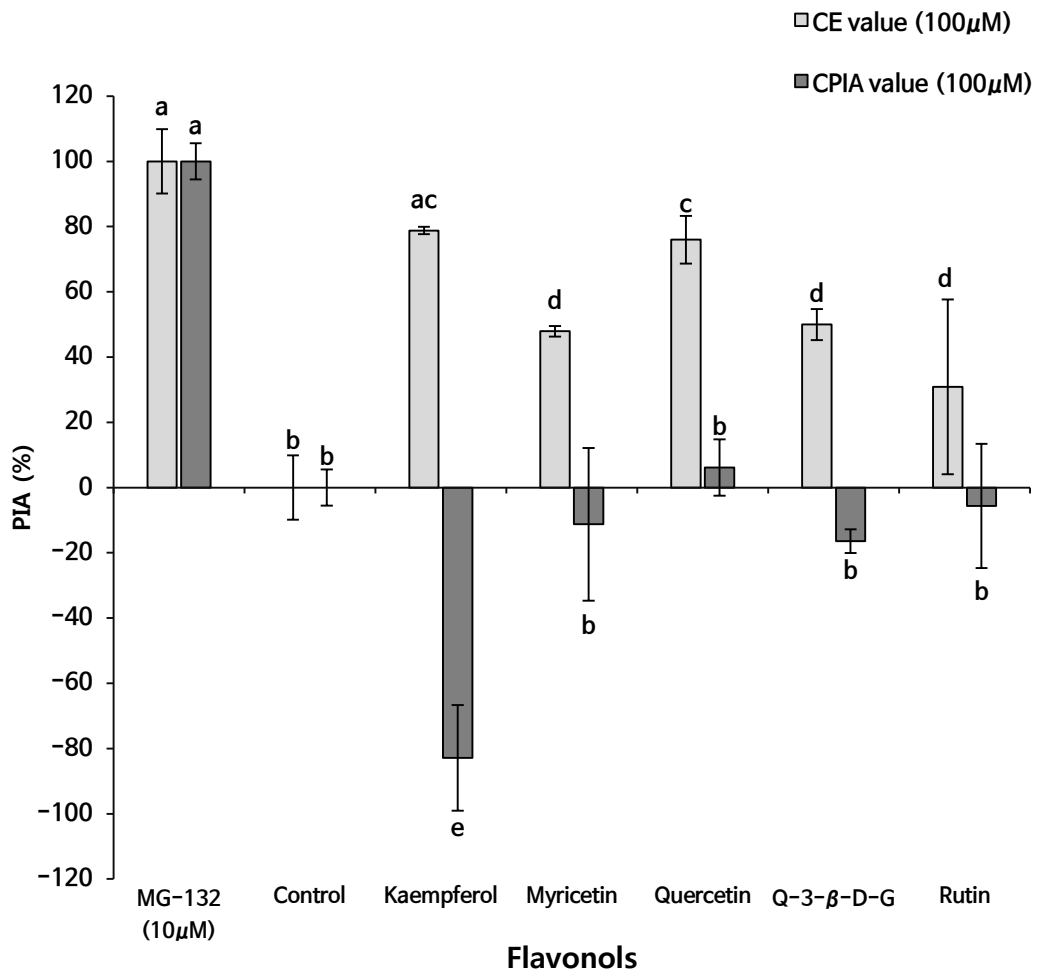


Fig. 11. Proteasome inhibition activities of selected flavonoids; flavonols. PIA; proteasome inhibition activity, CE; cell extract proteasome activity, CPIA; cellular proteasome inhibition activity, Q-3-β-D-G; quercetin-3-β-D-glucoside. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

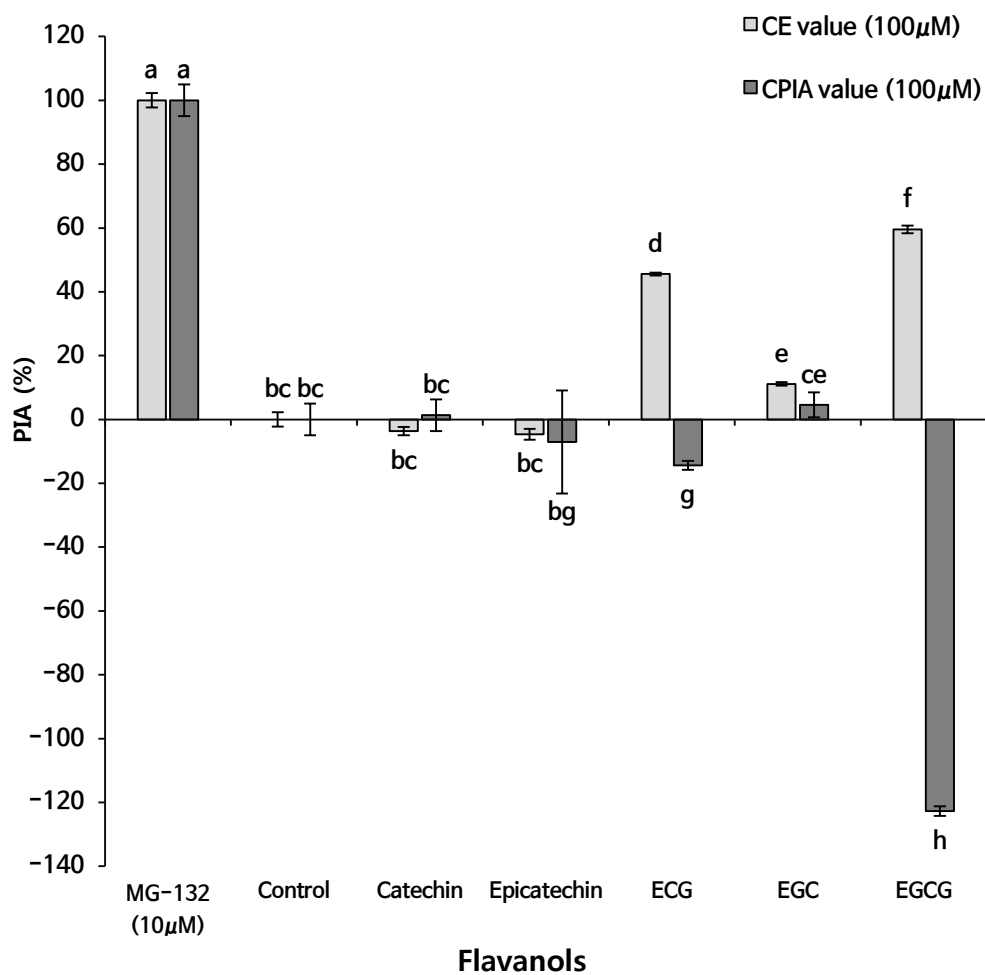


Fig. 12. Proteasome inhibition activities of selected flavonoids; flavanols. PIA; proteasome inhibition activity, CE; cell extract proteasome activity, CPIA; cellular proteasome inhibition activity, ECG; epicatechin gallate, EGC; epigallocatechin, EGCG; epigallocatechin gallate. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

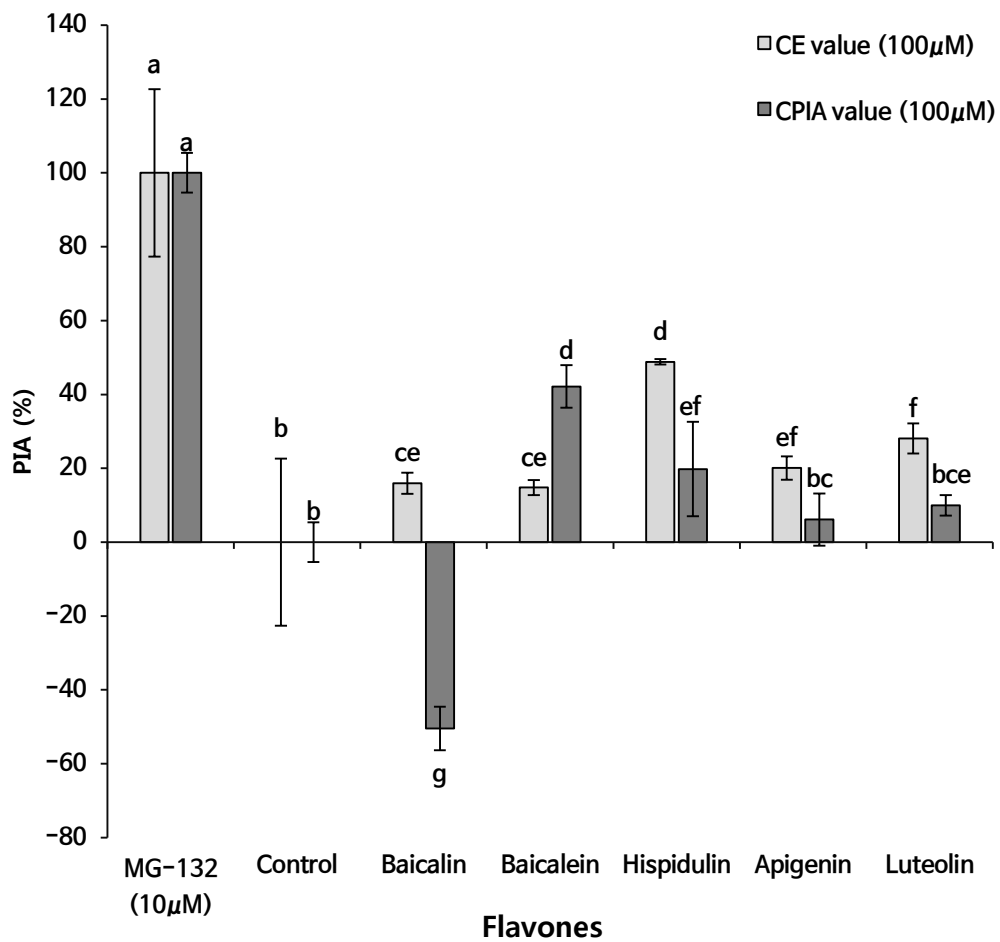


Fig. 13. Proteasome inhibition activities of selected flavonoids; flavones. PIA; proteasome inhibition activity, CE; cell extract proteasome activity, CPIA; cellular proteasome inhibition activity. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

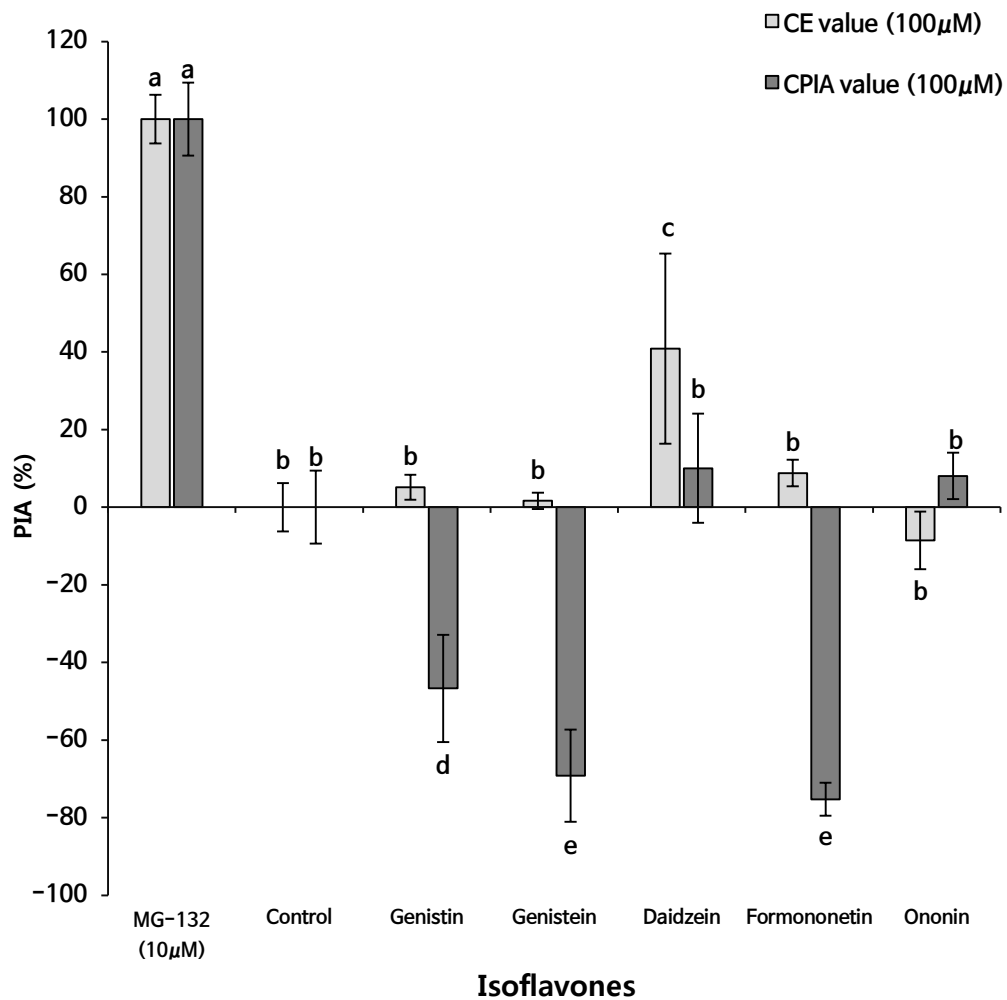


Fig. 14. Proteasome inhibition activities of selected flavonoids; isoflavones. PIA; proteasome inhibition activity, CE; cell extract proteasome activity, CPIA; cellular proteasome inhibition activity. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

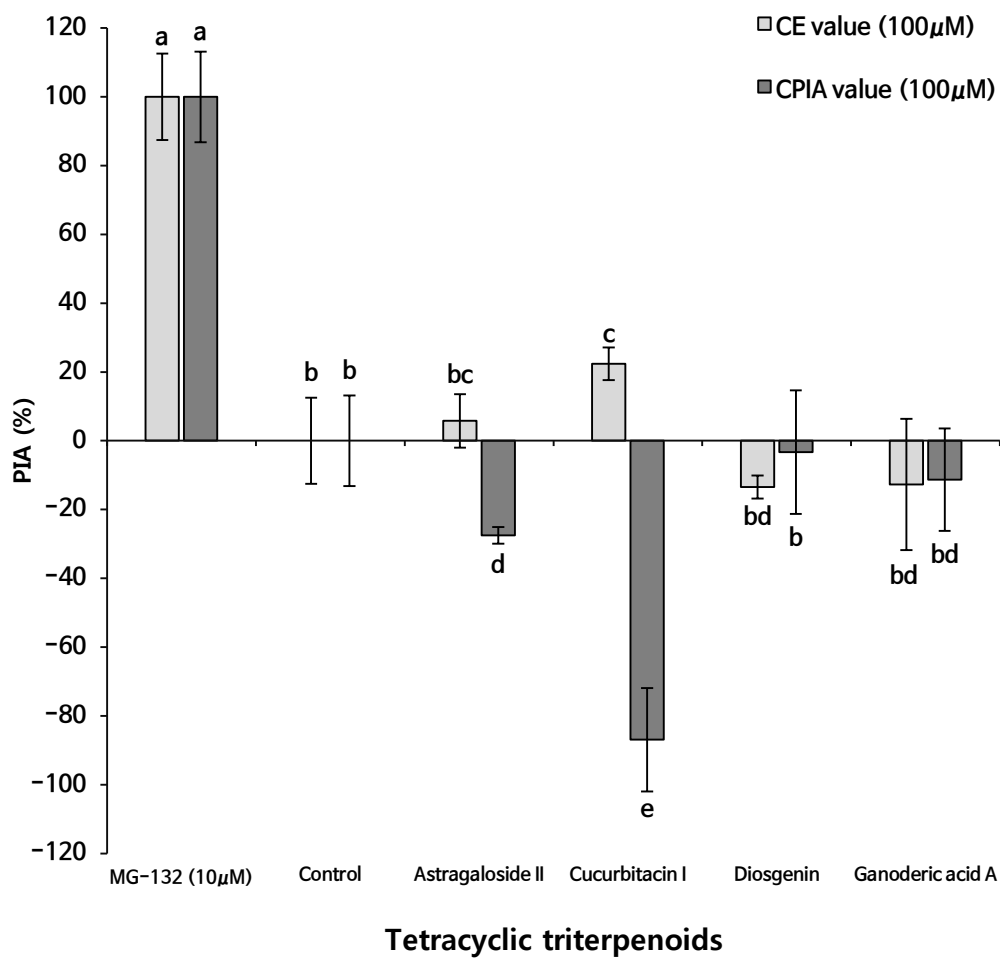


Fig. 15. Proteasome inhibition activities of selected triterpenoids; tetracyclic triterpenoids. PIA; proteasome inhibition activity, CE; cell extract proteasome activity, CPIA; cellular proteasome inhibition activity. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

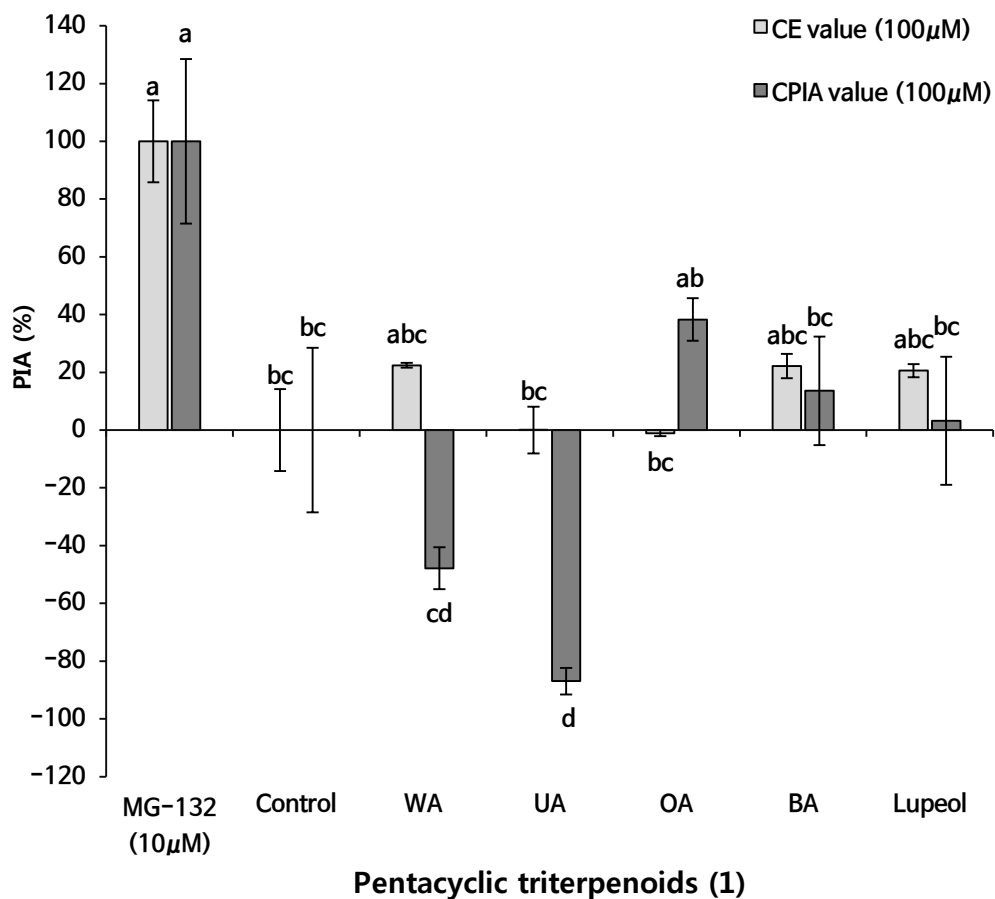


Fig. 16. Proteasome inhibition activities of selected triterpenoids; pentacyclic triterpenoids(1).

PIA; proteasome inhibition activity, CE; cell extract proteasome activity, CPIA; cellular proteasome inhibition activity, WA; withaferin A, UA; ursolic acid, OA; oleanolic acid, BA; betulinic acid, Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

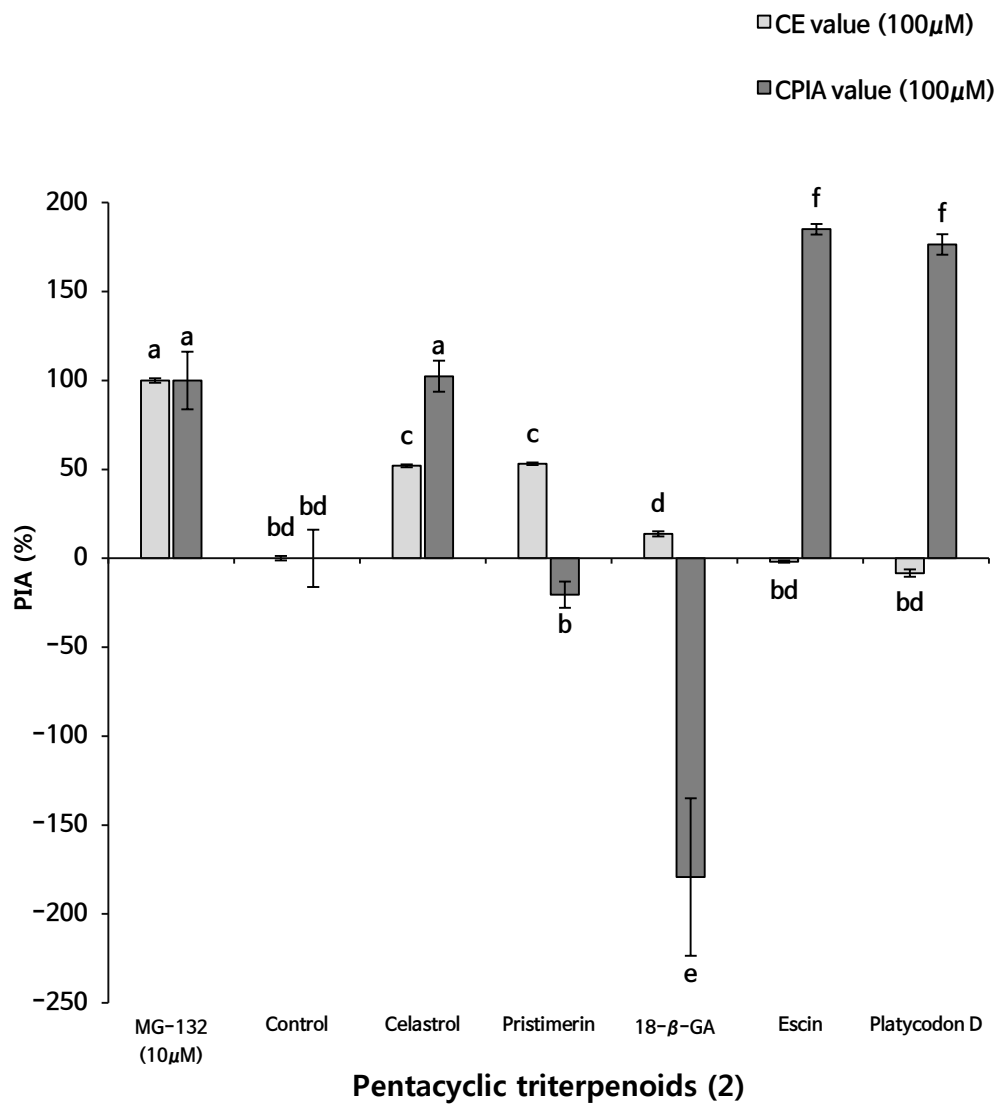


Fig. 17. Proteasome inhibition activities of selected triterpenoids; pentacyclic triterpenoids(2)

PIA; proteasome inhibition activity, CE; cell extract proteasome activity, CPIA; cellular proteasome inhibition activity, 18-β-GA; 18-β-glycyrrhethinic acid. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

5. 두류에 따른 cell cycle 분석

두류 추출물이 cell cycle에 미치는 영향을 확인하기 위해, flow cytometry를 사용하여 48시간동안 농도별로 각각의 두류 시료를 처리한 HepG2 cell의 cell cycle을 분석하였다. (Figure. 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25) 대두는 control과 비교했을 때 1, 10, 100 μ g/mL의 농도에서 S기와 G2/M기가 유의적으로 감소하였고, ($p < 0.05$) 10, 100 μ g/mL의 농도에서 sub-G1기가 유의적으로 증가하였으며, ($p < 0.05$) 1 μ g/mL의 농도에서 G0/G1기가 유의적으로 상승하는 결과를 나타내었다. ($p < 0.05$) 서리태는 control과 비교했을 때 1, 10, 100 μ g/mL에서 농도-의존적으로 sub-G1기가 유의적으로 증가하였고, ($p < 0.05$) 10 μ g/mL에서만 S기가 유의적으로 감소하였으며, ($p < 0.05$) 100 μ g/mL에서만 G0/G1기가 유의적으로 감소하는 결과를 나타내었다. ($p < 0.05$) 적두와 렌틸콩은 control과 비교했을 때 1, 10, 100 μ g/mL에서 sub-G1기가 유의적으로 증가하였으나, ($p < 0.05$) 다른 구간에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

두류 추출물을 처리하였을 때 cell cycle에 변화가 생긴 것은 두류에 들어있는 flavonoids와 triterpenoids에 의해 영향을 받아 cyclin D1과 cyclin E의 발현을 억제하여 G0/G1 phase arrest를 유발한 것으로 생각된다 [40]. S기와 G2/M기가 감소한 이유도 G0/G1기에서 arrest가 발생하였기 때문에 cell cycle의 진행이 막힌 것으로 생각할 수 있다. 또한 sub-G1기는 DNA의 양이 2배가 되지 않는 구간을 의미하는데, 그렇기 때문에 sub-G1기가 발견된 것은 apoptosis의 가능성을 생각할 수 있기 때문에 중요한 발견이라고 볼 수 있다.

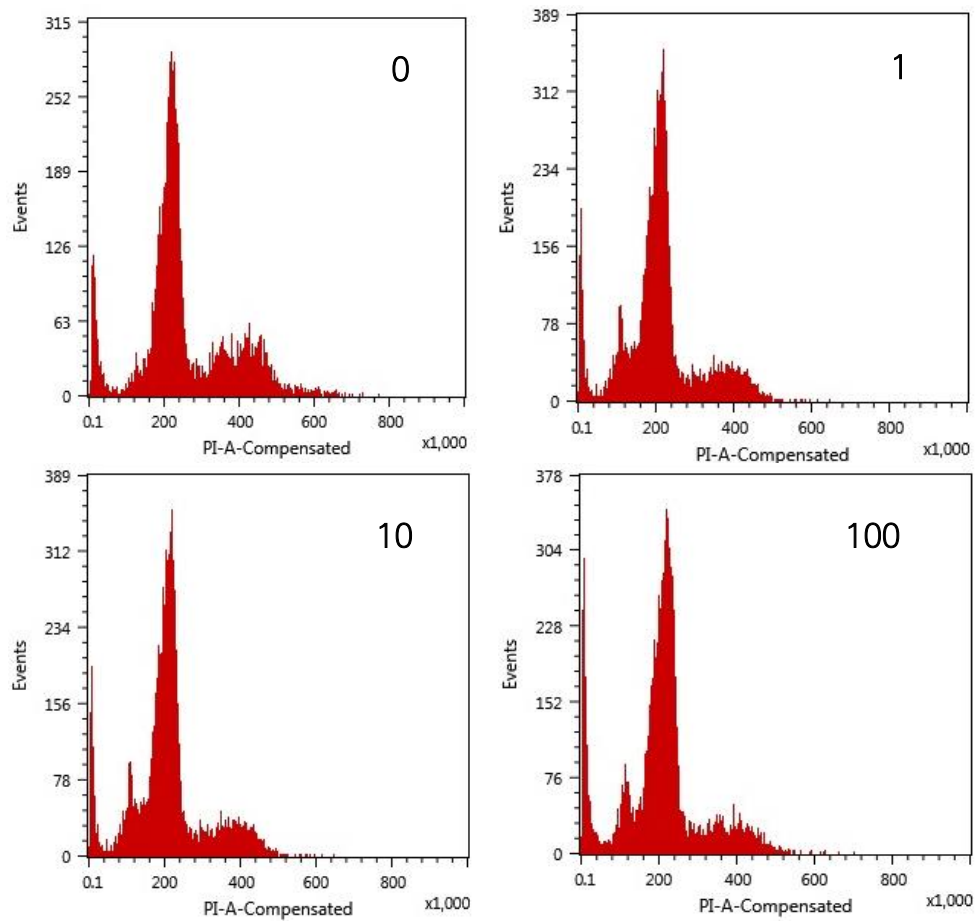


Fig. 18. Flow cytometric DNA content analysis of HepG2 cells treated with soybeans extract. HepG2 cells were treated with soybeans extract (0, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48h and stained with PI.

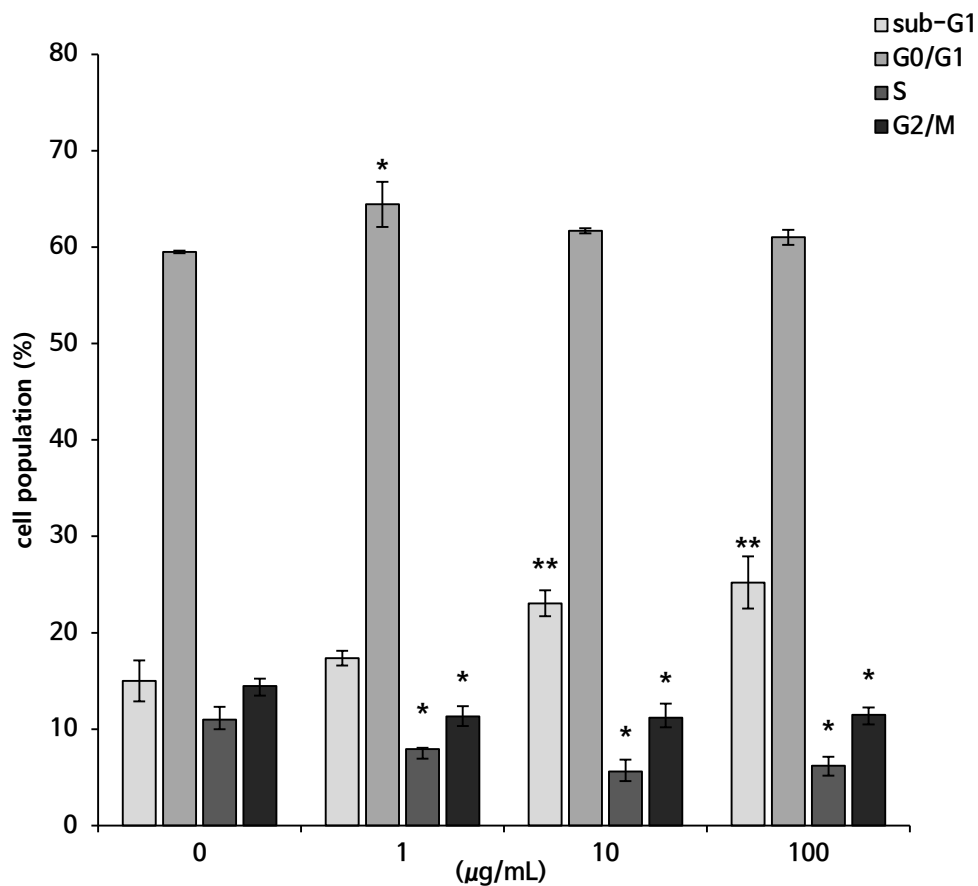


Fig. 19. Cell population on cell cycle of HepG2 cells treated with soybeans extract. HepG2 cells were treated with soybeans extract (0, 1, 10, 100 µg/mL) for 48h and the cell cycle was quantified. An asterisk (*) indicates significant differences in cell cycle compared to the control ($p < 0.05$).

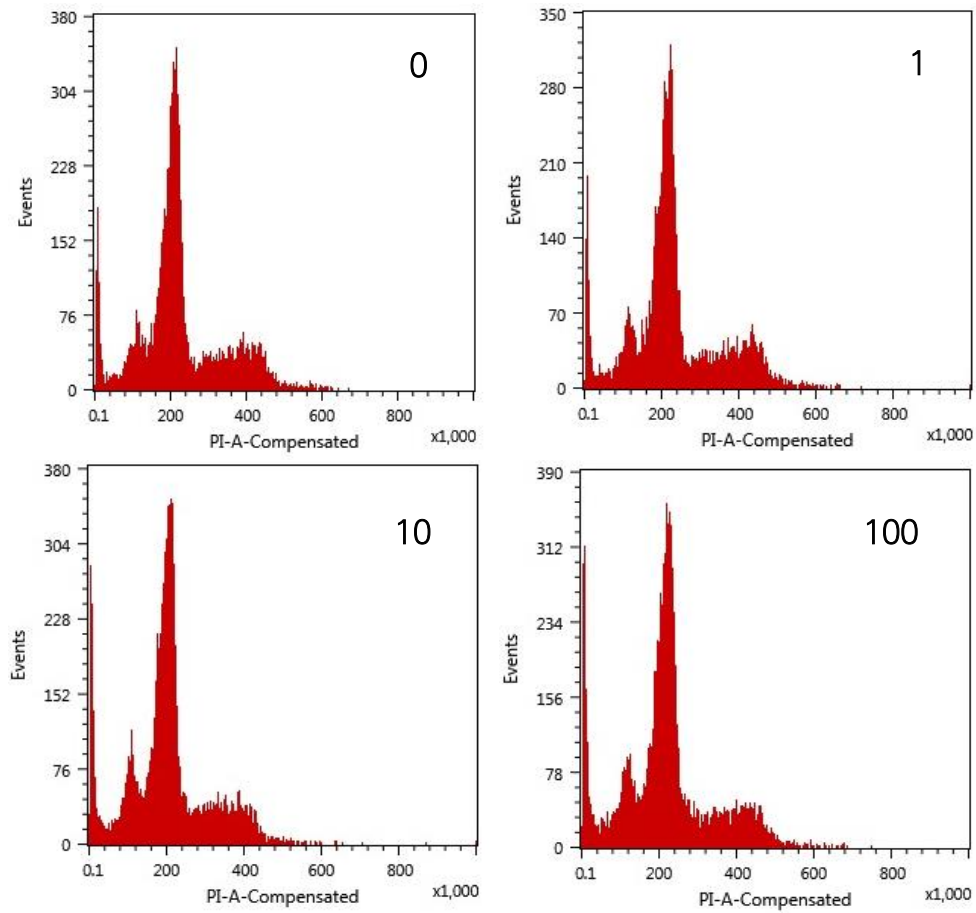


Fig. 20. Flow cytometric DNA content analysis of HepG2 cells treated with black beans extract. HepG2 cells were treated with black beans extract (0, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48h and stained with PI.

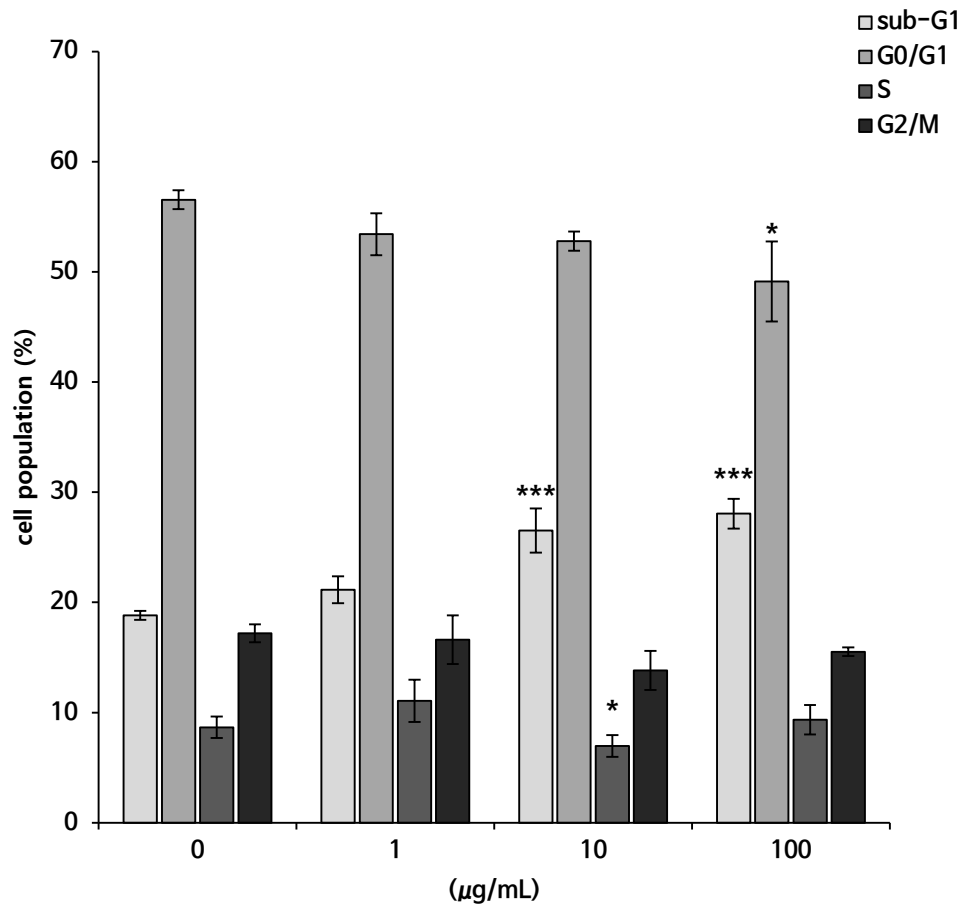


Fig. 21. Cell population on cell cycle of HepG2 cells treated with black beans extract. HepG2 cells were treated with black beans extract (0, 1, 10, 100 µg/mL) for 48h and the cell cycle was quantified. An asterisk (*, ***) indicates significant differences in cell cycle compared to the control ($p < 0.05$, $p < 0.001$).

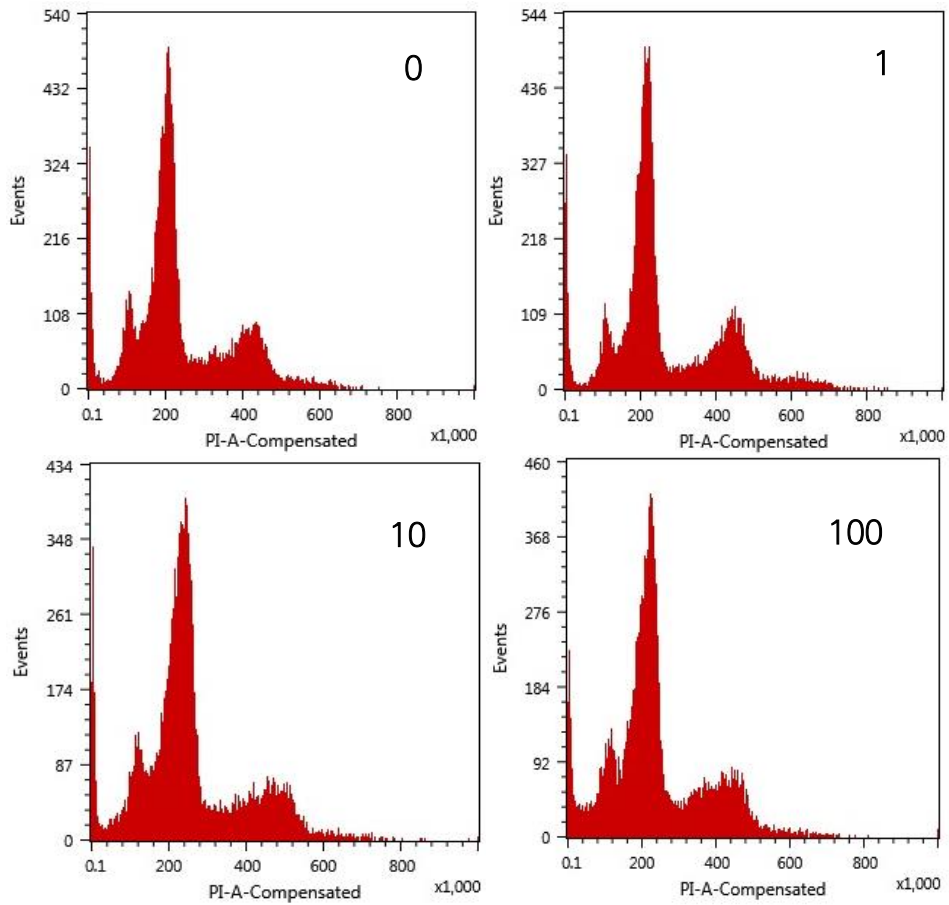


Fig. 22. Flow cytometric DNA content analysis of HepG2 cells treated with adzuki beans extract. HepG2 cells were treated with adzuki beans extract (0, 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$) for 48h and stained with PI.

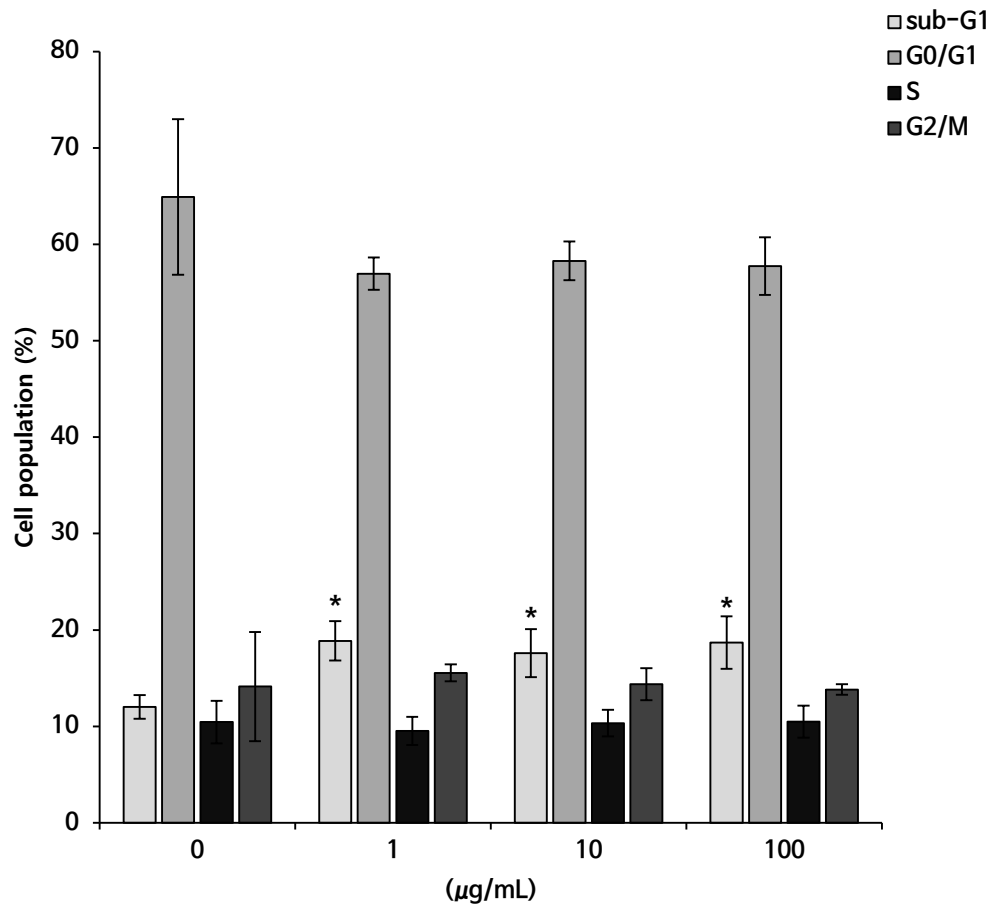


Fig. 23. Cell population on cell cycle of HepG2 cells treated with adzuki beans extract. HepG2 cells were treated with adzuki beans extract (0, 1, 10, 100 µg/mL) for 48h and the cell cycle was quantified. An asterisk (*) indicates significant differences in cell cycle compared to the control ($p < 0.05$).

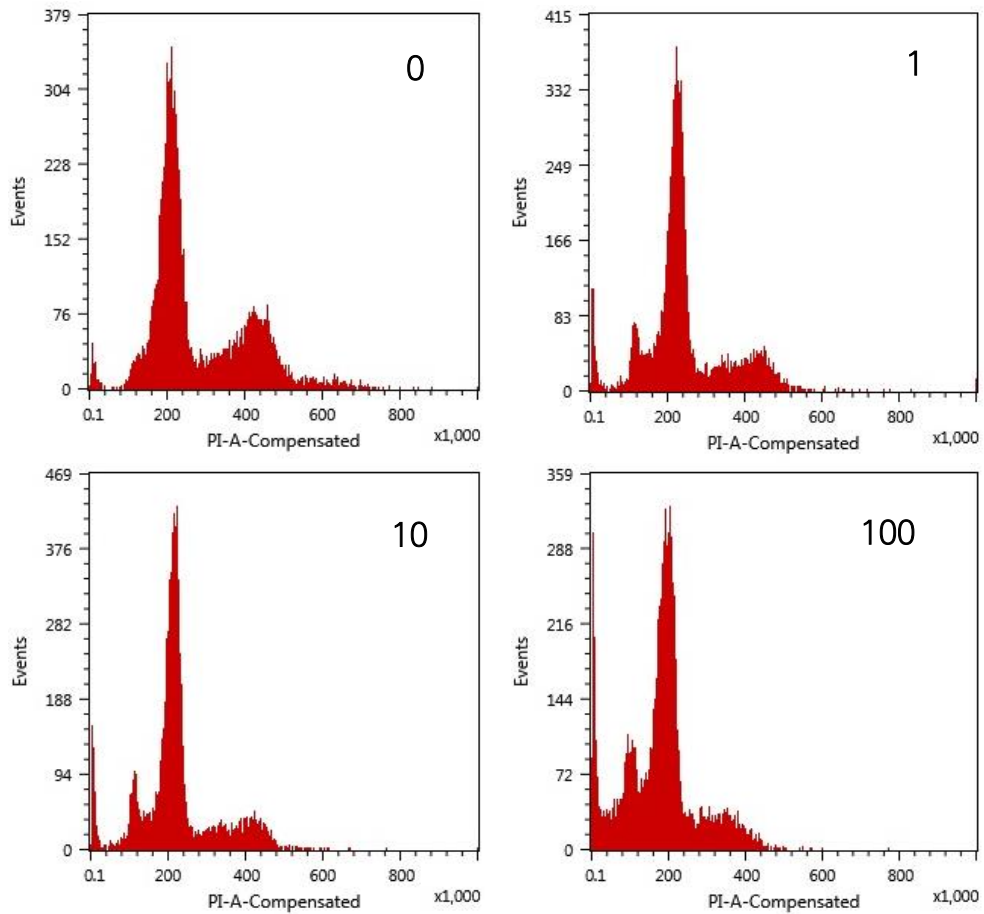


Fig. 24. Flow cytometric DNA content analysis of HepG2 cells treated with lentils extract. HepG2 cells were treated with lentils extract (0, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48h and stained with PI.

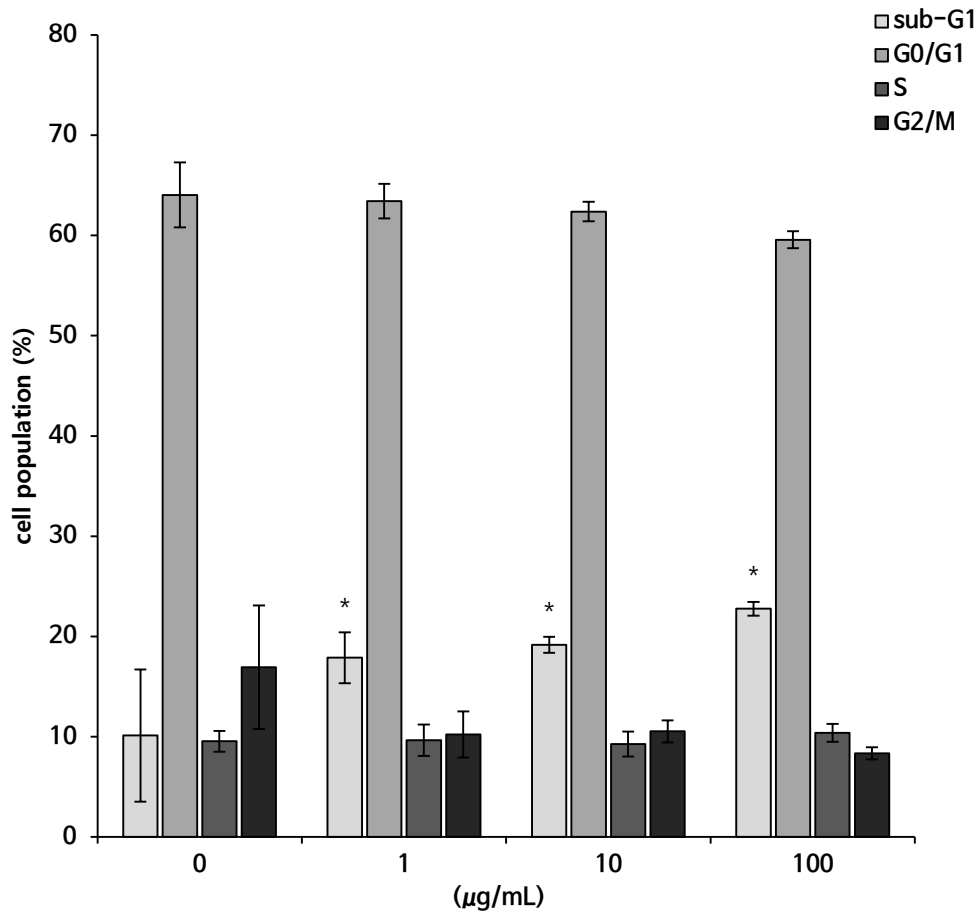


Fig. 25 Cell population on cell cycle of HepG2 cells treated with lentils extract. HepG2 cells were treated with lentils extract (0, 1, 10, 100 µg/mL) for 48h and the cell cycle was quantified. An asterisk (*) indicates significant differences in cell cycle compared to the control ($p < 0.05$).

6. 두류에 따른 apoptosis 분석

두류에 따른 cell cycle 분석에서 유의성을 보인 sub-G1기가 실질적으로 apoptosis가 유발되어 발생한 결과인지를 확인하기 위해, flow cytometry를 사용하여 48시간동안 농도별로 각각의 두류 시료를 처리한 HepG2 cell의 apoptosis를 분석하였다. (Figure. 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33) Apoptosis 분석 결과, 모든 시료에서 control에 apoptosis가 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 따라서 cell cycle 분석에서 발견된 sub-G1기는 apoptosis로 인한 경우가 아님을 확인하였다.

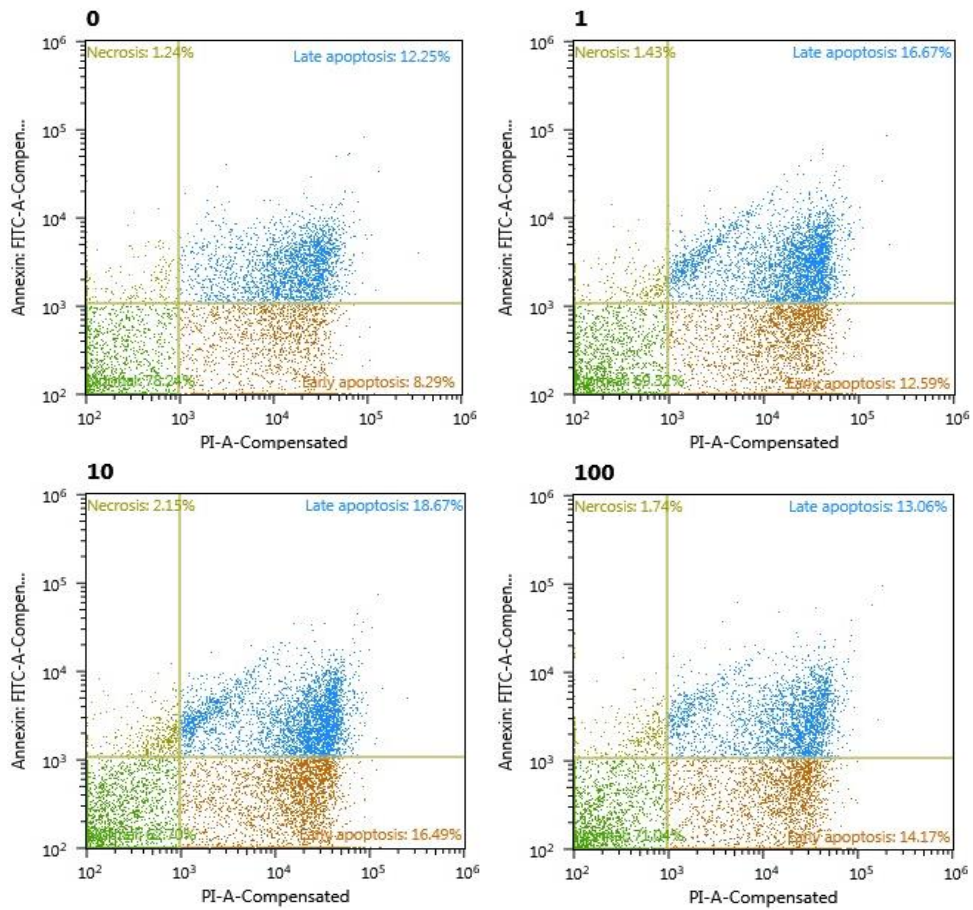


Fig. 26. Flow cytometric apoptosis analysis of HepG2 cells treated with soybeans extract. HepG2 cells were treated with soybeans extract (0, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48h and stained with PI and Annexin V-FITC.

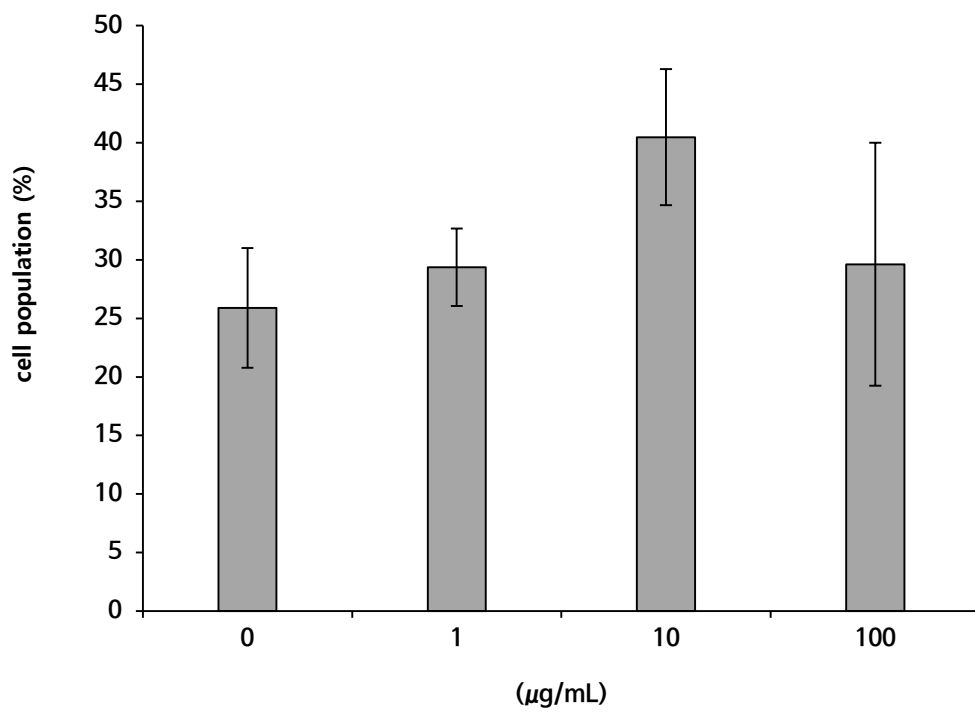


Fig. 27. Cell population on apoptosis of apoptosis of HepG2 cells treated with soybeans extract. HepG2 cells were treated with soybeans extract (0, 1, 10, 100µg/mL) for 48h and the apoptosis was quantified.

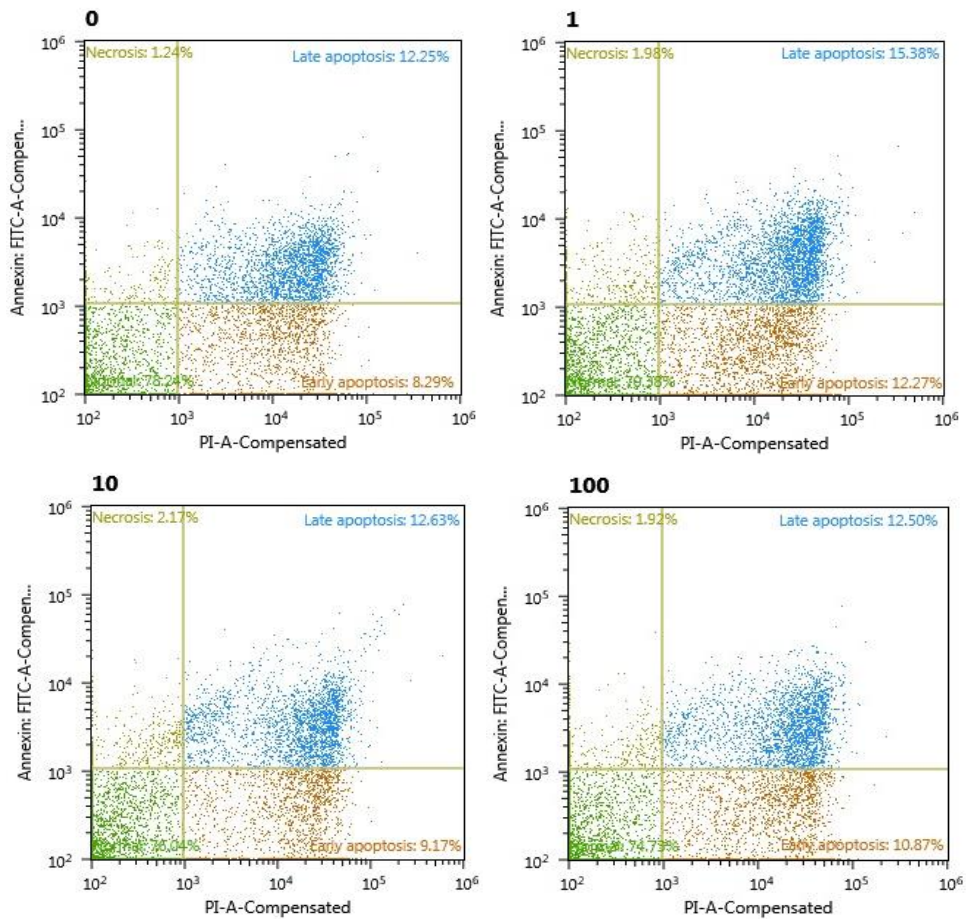


Fig. 28. Flow cytometric apoptosis analysis of HepG2 cells treated with black beans extract. HepG2 cells were treated with black beans extract (0, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48h and stained with PI and Annexin V-FITC.

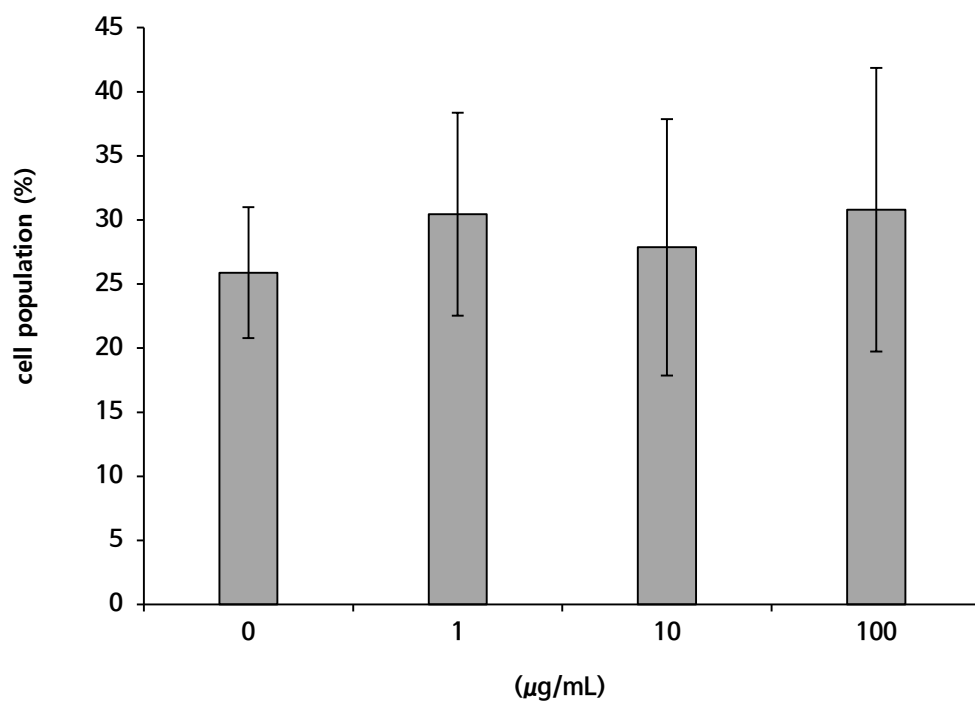


Fig. 29. Cell population on apoptosis of apoptosis of HepG2 cells treated with black beans extract. HepG2 cells were treated with black beans extract (0, 1, 10, 100µg/mL) for 48h and the apoptosis was quantified.

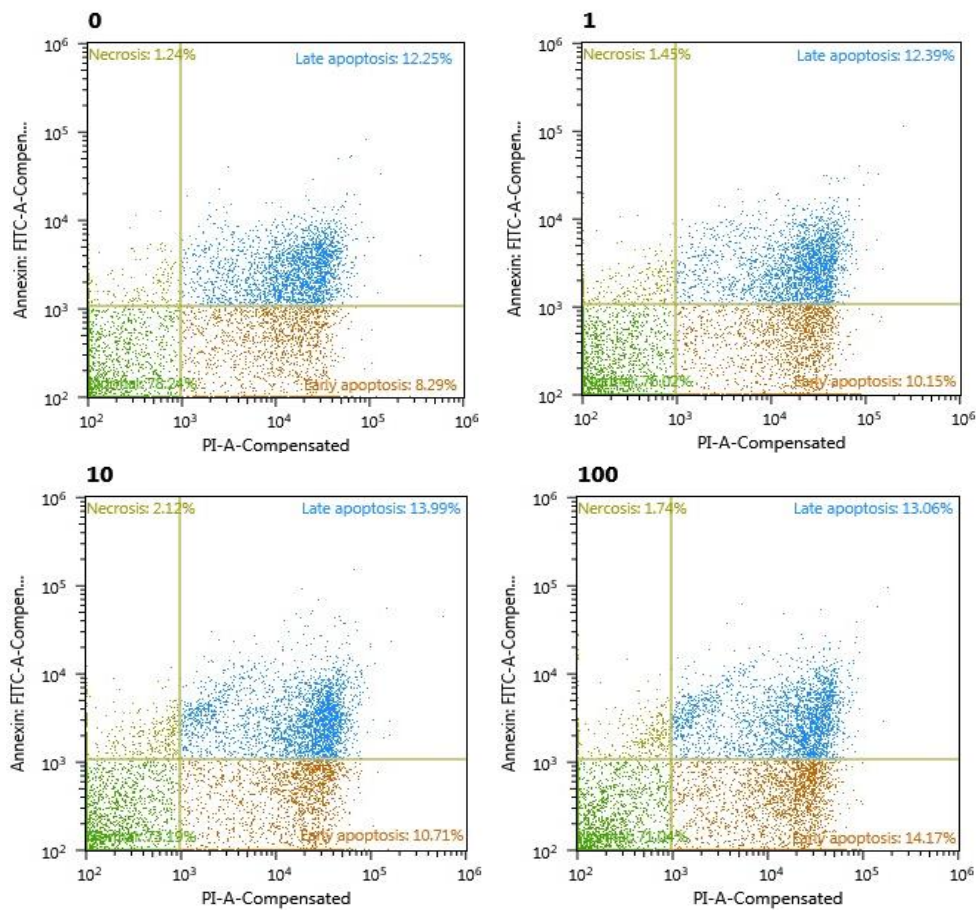


Fig. 30. Flow cytometric apoptosis analysis of HepG2 cells treated with adzuki beans extract. HepG2 cells were treated with adzuki beans extract (0, 1, 10, 100 μg/mL) for 48h and stained with PI and Annexin V-FITC.

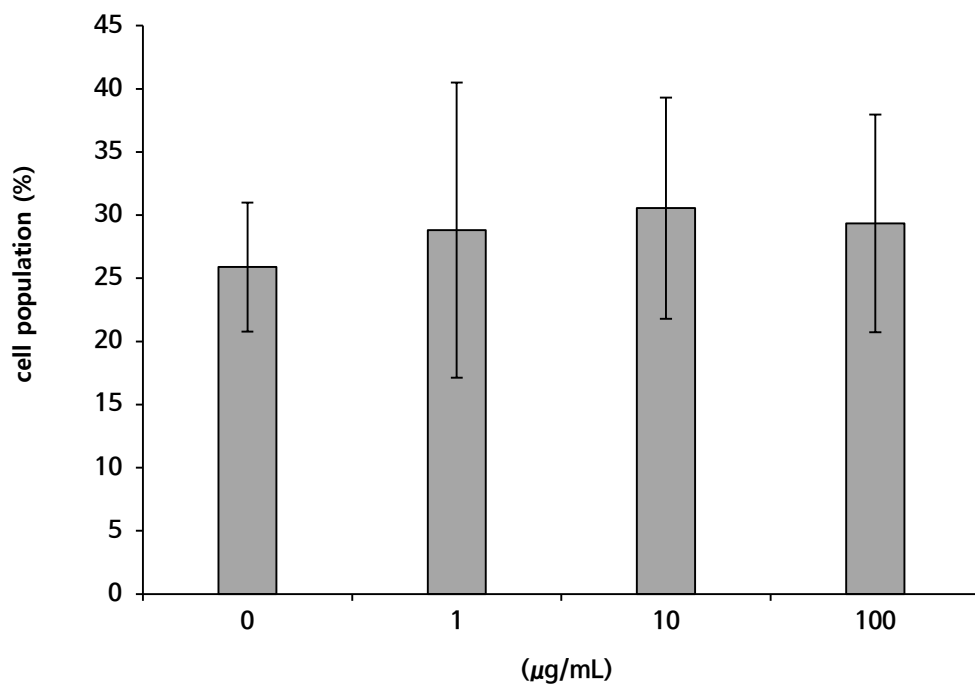


Fig. 31. Cell population on apoptosis of apoptosis of HepG2 cells treated with adzuki beans extract. HepG2 cells were treated with adzuki beans extract (0, 1, 10, 100 µg/mL) for 48h and the apoptosis was quantified.

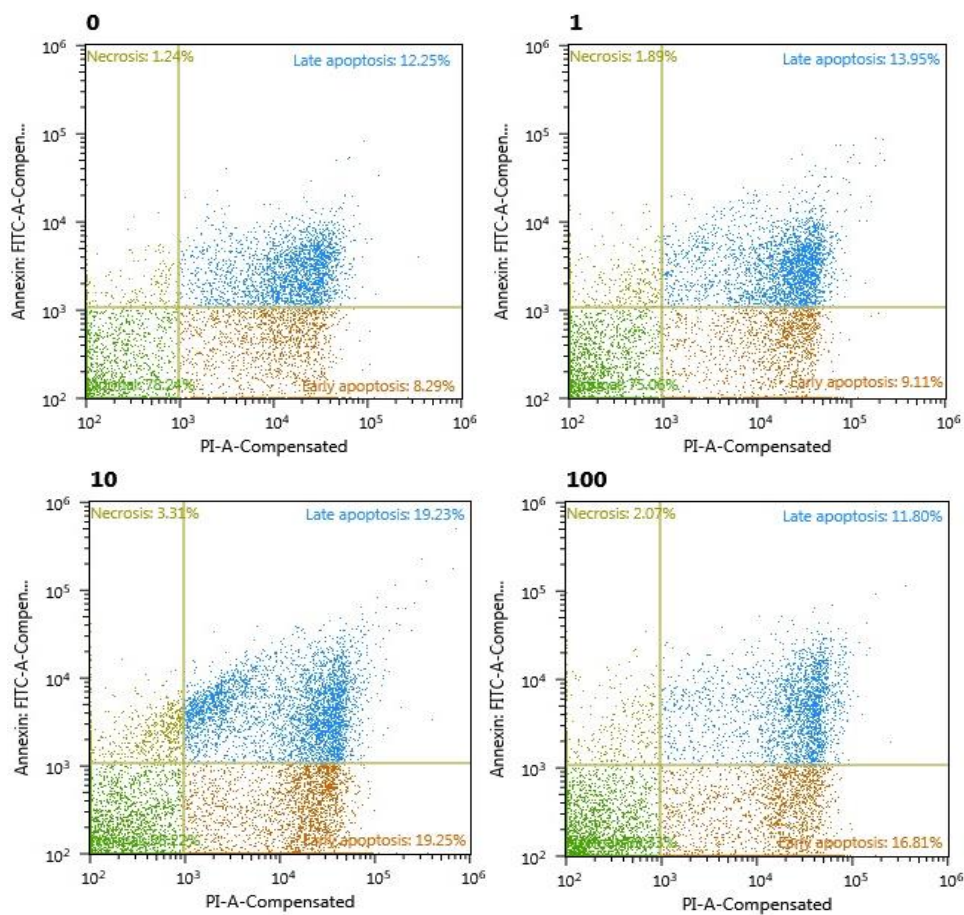


Fig. 32. Flow cytometric apoptosis analysis of HepG2 cells treated with lentils extract. HepG2 cells were treated with lentils extract (0, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48h and stained with PI and Annexin V-FITC.

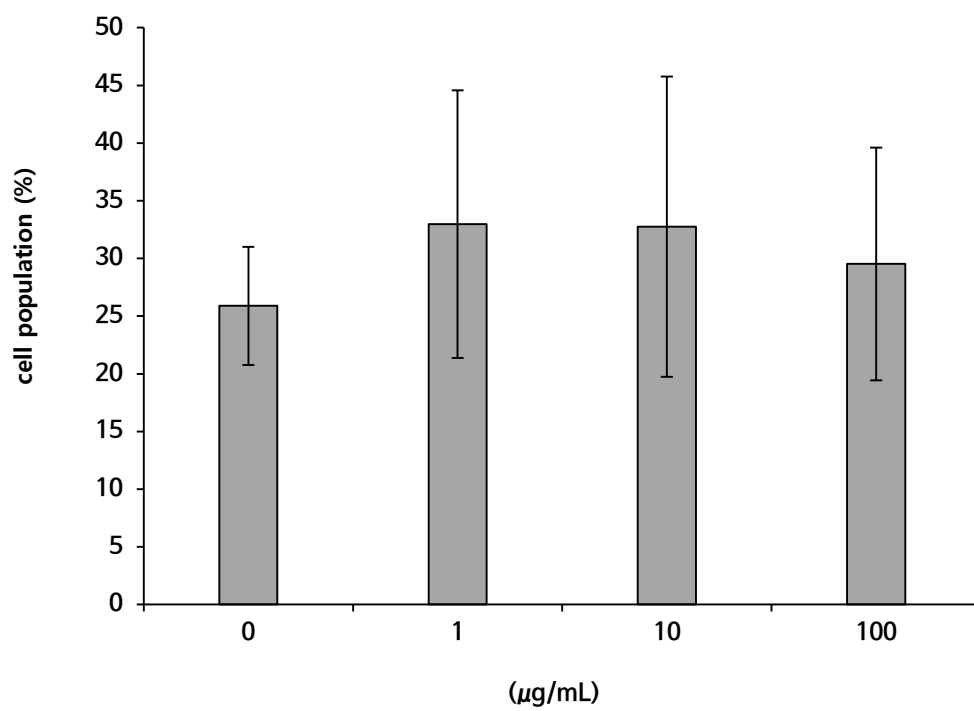


Fig. 33. Cell population on apoptosis of apoptosis of HepG2 cells treated with lentils extract. HepG2 cells were treated with lentils extract (0, 1, 10, 100µg/mL) for 48h and the apoptosis was quantified.

6. 두류에 따른 NF- κ B 활성화 변화

TNF- α 로 NF- κ B를 활성화시키는 모델을 사용하여 HepG2 cell에 대두와 서리태, 적두, 렌틸콩 추출물을 처리한 후 western blotting을 통해 NF- κ B의 활성화를 확인하였다. (Figure. 34, 35, 36, 37)

서리태는 모든 농도에서 positive control (시료 처리 X, TNF- α 처리 O)과 비교했을 때 유의한 차이를 보이지 않았으나, 대두는 positive control과 비교했을 때 1 μ g/mL의 농도에서만 유의적으로 NF- κ B의 활성이 감소되었다. ($p < 0.05$) 적두는 positive control과 비교했을 때 10, 100 μ g/mL의 농도에서 유의적으로 NF- κ B의 활성이 감소되었고, ($p < 0.05$) 렌틸콩은 positive control과 비교했을 때 1, 10, 100 μ g/mL의 농도에서 유의적으로 NF- κ B의 활성이 감소되었다. ($p < 0.05$)

이러한 결과를 통해 대두와 적두, 렌틸콩은 26S proteasome을 억제하여 cell cycle arrest를 유발하고 NF- κ B의 활성화를 억제하는 효과를 보임을 알 수 있었다. 서리태는 NF- κ B의 활성 억제 효과를 확인할 수 없었으나, 26S proteasome을 억제하고 cell cycle arrest를 유발하였기 때문에 항암의 효과를 확인할 수 있었다.

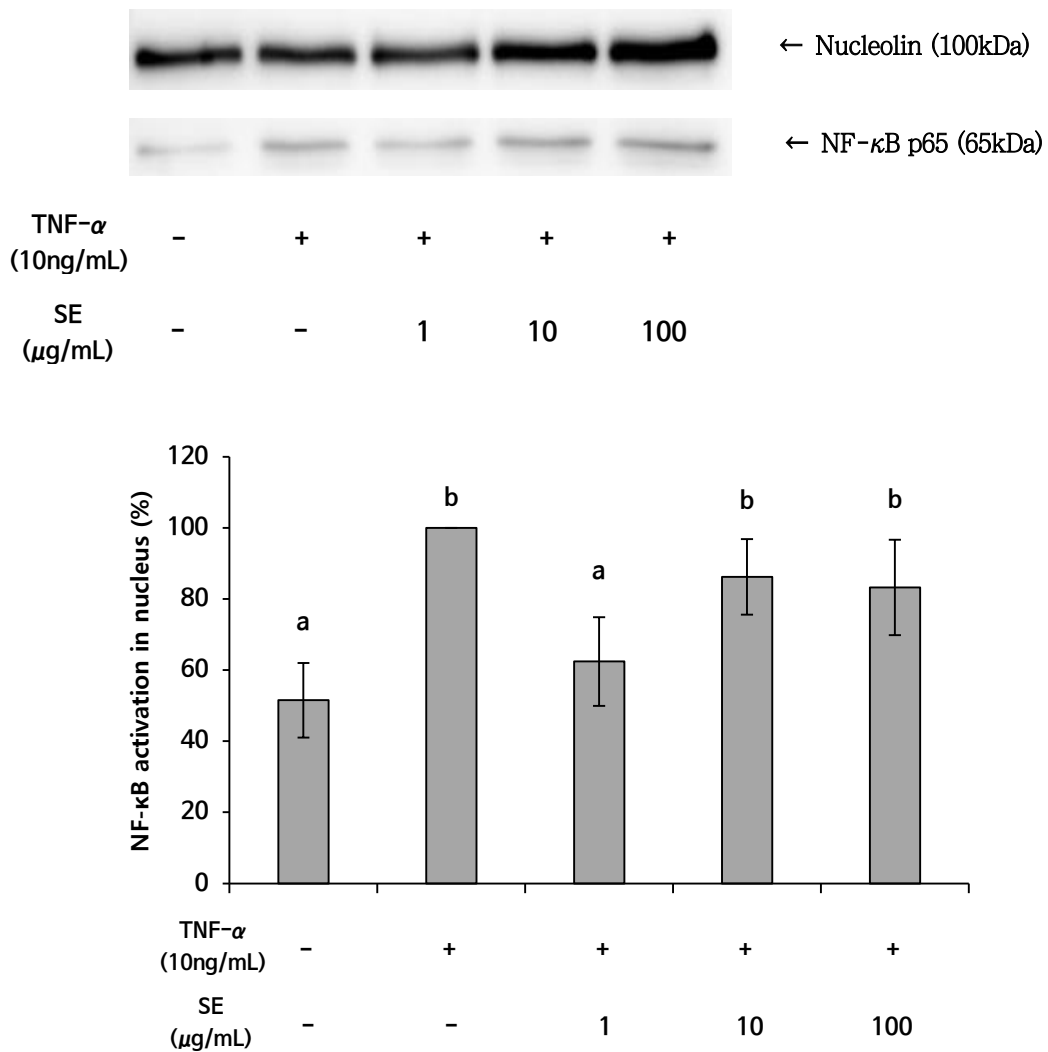


Fig. 34. Effect of soybeans extract on TNF- α -induced NF- κ B activation. HepG2 cells were incubated in medium with soybeans extract (1, 10, 100 μ g/mL) for 24h followed by TNF- α treatment (10ng/mL) for 1h. Nuclear extracts were assessed by western blotting using antibody to NF- κ B p65. SE; soybeans extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

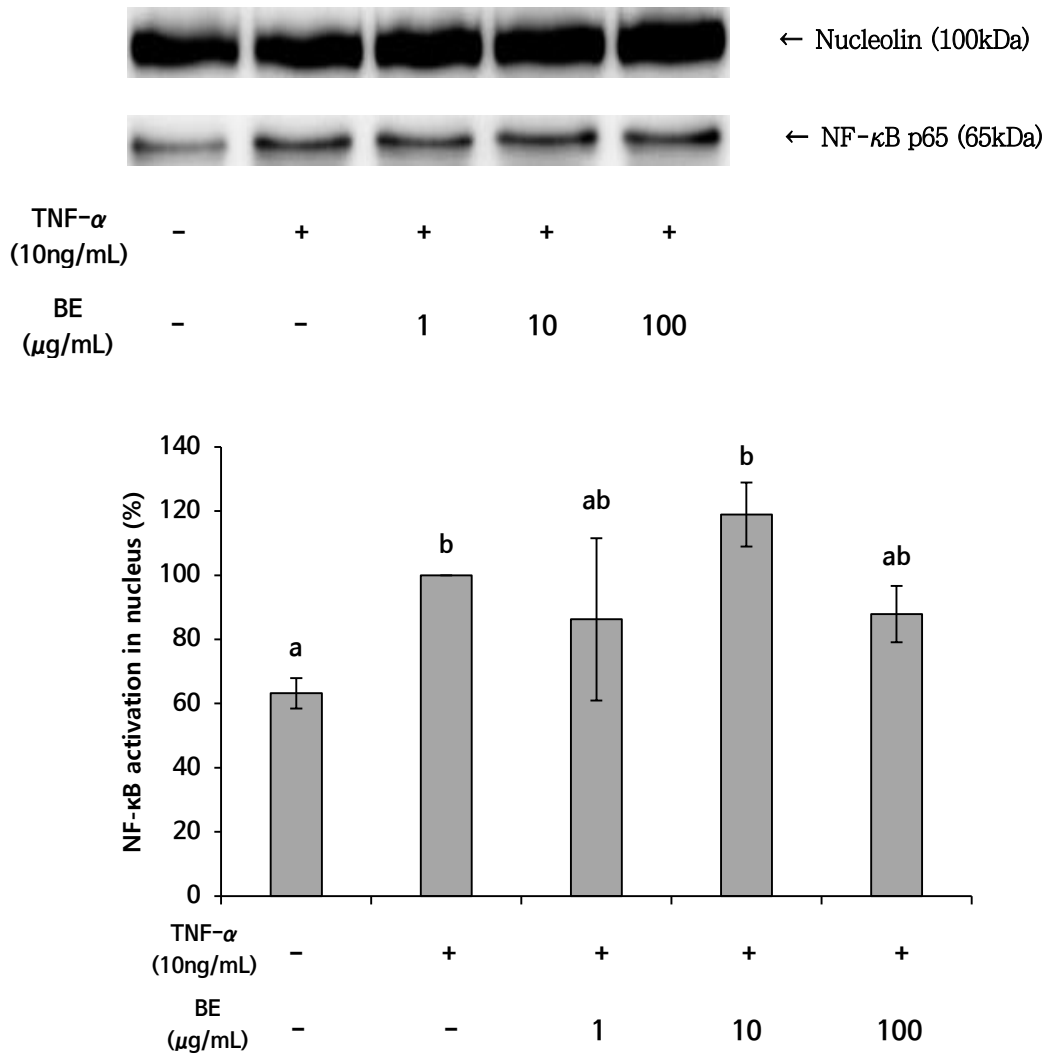


Fig. 35. Effect of black beans extract on TNF- α -induced NF- κ B activation. HepG2 cells were incubated in medium with black beans extract (1, 10, 100 μ g/mL) for 24h followed by TNF- α treatment (10ng/mL) for 1h. Nuclear extracts were assessed by western blotting using antibody to NF- κ B p65. BE; black beans extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

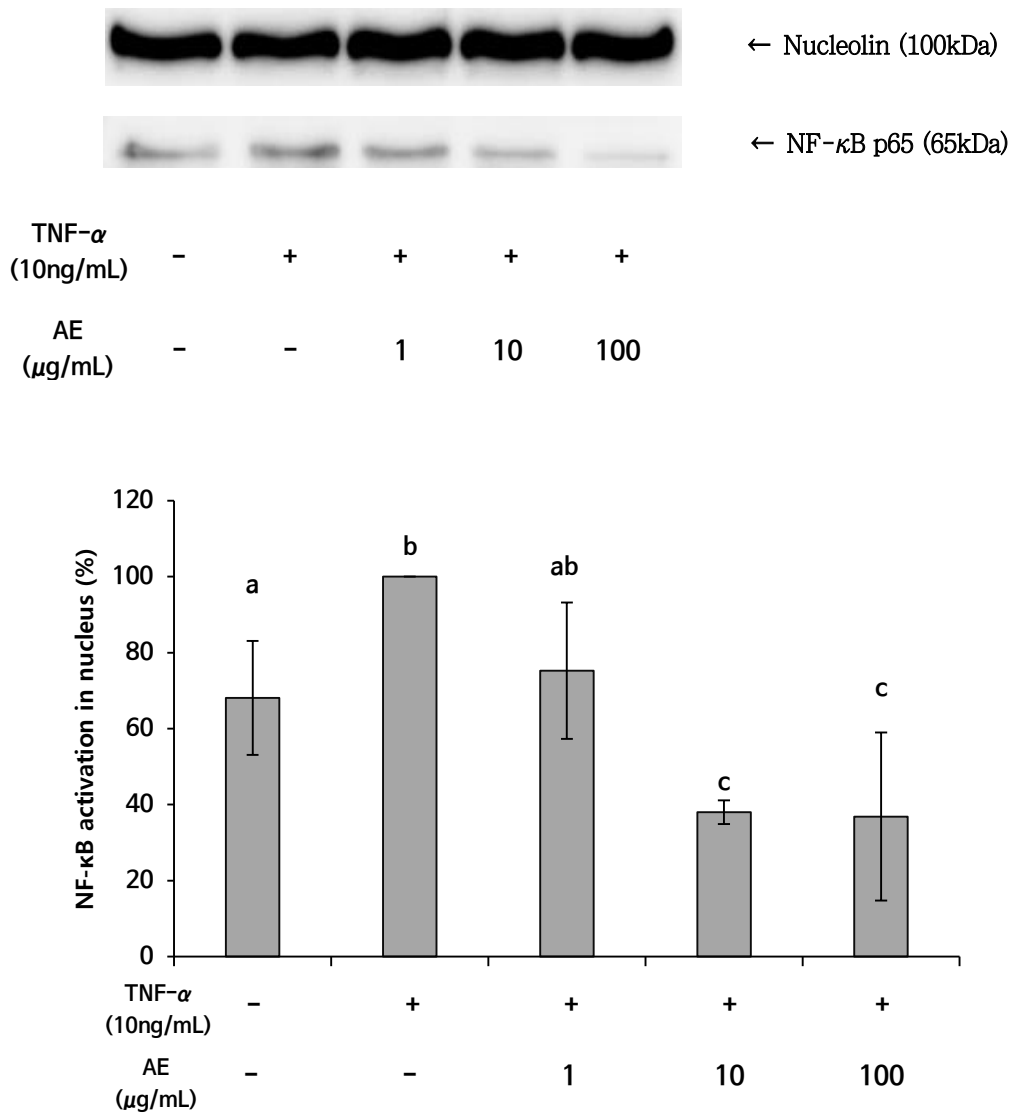


Fig. 36. Effect of adzuki beans extract on TNF- α -induced NF- κ B activation. HepG2 cells were incubated in medium with adzuki beans extract (1, 10, 100 μ g/mL) for 24h followed by TNF- α treatment (10ng/mL) for 1h. Nuclear extracts were assessed by western blotting using antibody to NF- κ B p65. AE; adzuki beans extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

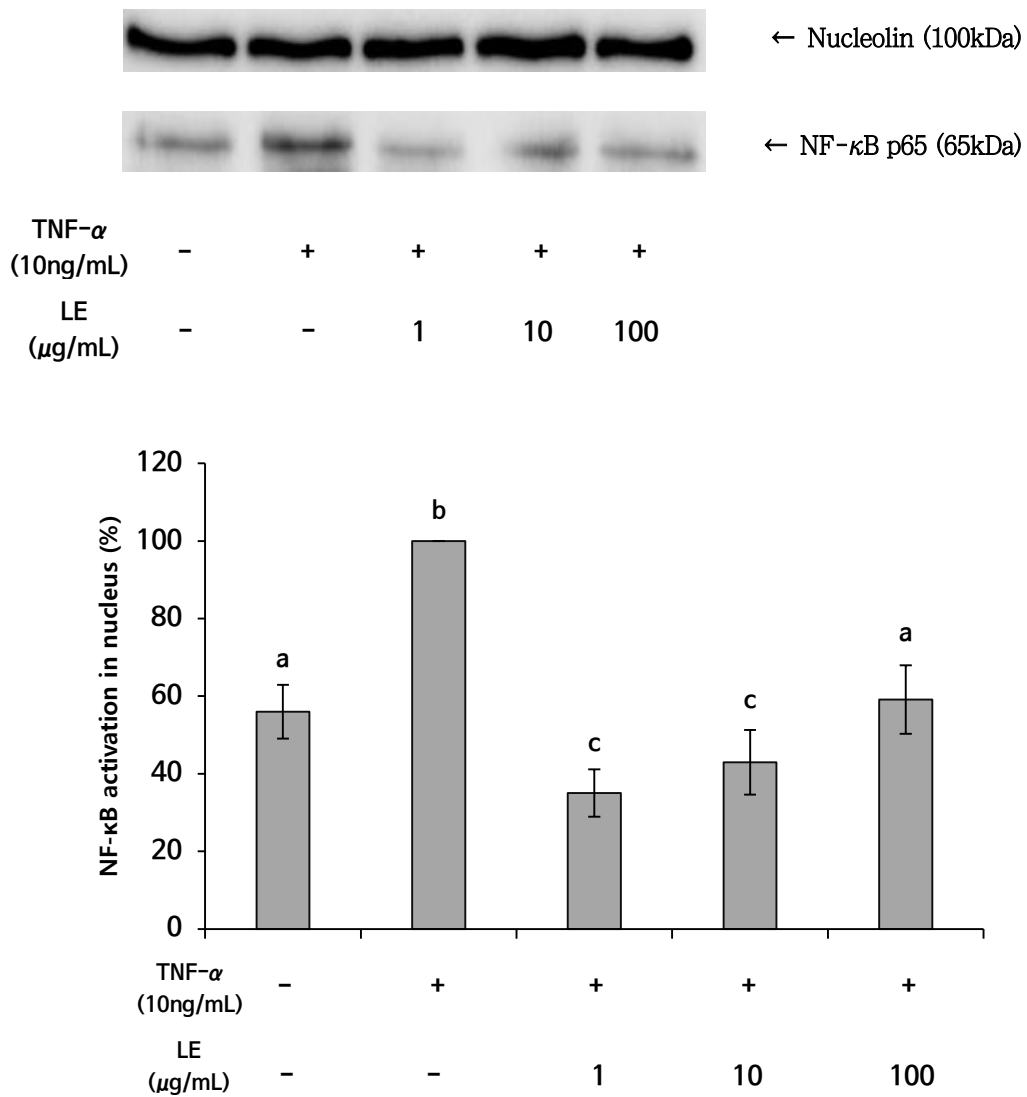


Fig. 37. Effect of lentils extract on TNF- α -induced NF- κ B activation. HepG2 cells were incubated in medium with lentils extract (1, 10, 100 μ g/mL) for 24h followed by TNF- α treatment (10ng/mL) for 1h. Nuclear extracts were assessed by western blotting using antibody to NF- κ B p65. LE; lentils extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

IV. 결 론

1. 각 두류 추출물은 HepG2 cell에 급성 독성을 미치지 않았다.

HepG2 cell에 대두, 서리태, 적두, 렌틸콩을 100 μ g/mL 이내의 다양한 농도로 처리하였을 때, 모든 농도에서 세포 독성률이 10% 미만으로 확인되었다. 이는 네 종류의 두류가 시험한 농도에서 세포에 급성 독성을 보이지 않음을 의미한다.

2. 적두, 렌틸콩 추출물은 HepG2 cell의 증식에 영향을 미치지 않았으나, 대두, 서리태 추출물은 세포 증식률을 증가시켰다.

세포 독성 실험 결과를 통해 확인한 급성 독성을 보이지 않는 농도 범위에서 대두, 서리태, 적두, 렌틸콩을 처리하여 세포 증식 실험을 하였을 때, 적두와 렌틸콩은 세포 증식에 영향을 끼치지 않는 것을 확인하였고 대두, 서리태는 control과 비교하였을 때 세포 증식률이 상승한 것을 확인하였다. 이는 억제된 proteasome이 cell growth에 관련한 pathway에 영향을 미쳤기 때문이라고 추측할 수 있으며, 또한 두류가 가지고 있는 항산화능에 의한 상쇄 효과라고 추측할 수 있다.

3. 각 두류 추출물은 항산화능을 보였으며, 특히 적두 추출물은 높은 항산화능을 보였다.

대두, 서리태, 적두, 렌틸콩의 항산화능을 평가하기 위해 DPPH, ABTS, CAA assay의 세 가지 실험을 진행한 결과, 네 가지 시료 중에서 적두가 가장 높은 항산화능을 보이고 렌틸콩, 서리태, 대두의 순으로 항산화능을 보였다. 이는 두류에 들어있는 phytochemicals로 인해 활성산소의 생성이 억제되었거나 소거되었을 가능성을 추측

할 수 있다. 특히 적두가 가장 높은 항산화능을 보인 것은 항산화 효과를 보이는 대표적인 물질인 proanthocyanidin의 높은 함유량에 의한 것이라고 추정된다.

4. 대두, 서리태는 CPIA assay 결과에서 proteasome 활성 억제를 보였고, 적두, 렌틸콩은 CE assay 결과에서 proteasome 활성 억제를 보였다.

대두, 서리태, 적두, 렌틸콩의 proteasome 활성 억제를 평가하기 위해 CE, CPIA assay의 두 가지 실험을 진행한 결과, 대두, 서리태는 CPIA assay로 실험했을 때 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 control과 비교하여 유의적으로 높게 나타났고 ($p < 0.05$), 적두, 렌틸콩은 CE assay로 실험했을 때 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 control과 비교하여 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 두류 시료에 따라 CE, CPIA assay의 결과값이 다르게 측정된 이유는 각각의 두류에 포함된 flavonoids와 triterpenoids의 종류와 그 함량이 달라 세포막을 통과하는 정도에 차이가 생기기 때문이라고 사료된다. CPIA assay에서 효과를 보였던 대두, 서리태는 세포 내로 적용이 가능한 천연 proteasome 저해제로서의 가능성을 엿볼 수 있었다.

5. 대부분의 flavonoids와 triterpenoids는 CE assay 결과에서 proteasome 활성 억제를 보였으나, CPIA assay 결과에서는 proteasome 활성 억제를 보이지 않았다.

두류에 많이 포함되어있다고 알려진 flavonoids와 triterpenoids 몇 종류를 선정하여 CE, CPIA assay를 통해 proteasome 활성 억제 효과를 평가한 결과, flavonoids류에서는 baicalein과 hispidulin, triterpenoids류에서는 celastrol, escin, platycodon D가 control과 비교해 유의적으로 높은 CPIA value를 나타내었다 ($p < 0.05$). 대부분의 시료에서 CE assay에서는 control보다 높은 수치를 나타냈으나 CPIA assay에서는 동일한 경향을 보이지 않았는데, 이는 각 성분마다 구조의 차이가 있어 세포막을 통과하는 정도가 다르기 때문이라고 추측된다. CE assay에

서는 효과를 보였으나 CPIA assay에서는 효과를 보이지 않은 성분들은 추후에 세포막을 더 잘 통과할 수 있게 하여 bioavailability를 높이도록 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

6. 모든 두류 추출물은 HepG2 cell에서 cell cycle arrest를 유발하였다.

대두, 서리태, 적두, 렌틸콩이 cell cycle에 미치는 영향을 분석했을 때, 대두는 모든 구간에서 control과 유의한 차이를 보였고, 서리태는 sub-G1기와 G0/G1기, S기에서 control과 유의한 차이를 보였으며, 적두와 렌틸콩은 sub-G1기에서 control과 유의한 차이를 보여 cell cycle arrest를 유발함을 확인하였다 ($p < 0.05$). 이는 두류에 포함된 flavonoids와 triterpenoids에 의해 proteasome의 활성이 억제되고 그에 따라 cell cycle arrest가 발생하였을 것이라고 생각된다.

7. Cell cycle 분석 시 유의한 차이를 보였던 sub-G1기는 apoptosis로 인하여 발견된 것은 아니었다.

Cell cycle 분석에서 유의한 차이를 보였던 sub-G1기가 apoptosis로 인해 발견된 것인지 확인해보기 위해 apoptosis를 분석했을 때, 모든 두류 추출물에서 control에 비해 apoptosis가 증가하는 경향은 보였으나 유의한 차이는 보이지 않았다. 따라서 sub-G1기의 유의한 차이는 apoptosis로 인해 발생한 것은 아님을 확인할 수 있었다.

8. 대두, 적두, 렌틸콩은 NF- κ B의 활성화를 감소시켰다.

대두와 서리태, 적두, 렌틸콩이 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 확인한 결과, 대두 1 μ g/mL을 처리하였을 때, 적두는 10, 100 μ g/mL을 처리하였을 때, 렌틸콩은

1, 10, 100 μ g/mL을 처리하였을 때 positive control과 비교하여 유의적으로 NF- κ B의 활성화가 감소된 것을 확인하였다 ($p < 0.05$).

따라서, 대두, 서리태, 적두, 렌틸콩이 flavonoids와 triterpenoids에 의해 뛰어난 항산화능을 보이고, 특히 대두와 적두, 렌틸콩은 proteasome 활성을 억제하고 cell cycle arrest를 유발하고 NF- κ B의 활성화를 감소시킨 실험 결과를 통해 항암 효과 및 항산화 효과와 추후 천연 proteasome 저해제로서의 사용 가능성을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

- [1] J.Y. Im, S.C. Kim, S.N. Kim, Y.M. Choi, M.R. Yang, I.H. Cho, H.R. Kim, Protein and Amino-acid contents in Backtae, Seoritae, Huktae, and Seomoktae Soybeans with Different Cooking Methods, Korea Journal of Food and Cookery Science, 32 (2016) 567-574.
- [2] S. Lee, Y.B. Lee, H.S. Kim, Analysis of the General and Functional Components of Various Soybeans, Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition, 42 (2013) 1255-1262.
- [3] 경기도농업기술원, 두류 소비트렌드 변화와 대응전략, 경기농업 FOCUS, 4 (2015).
- [4] 2010년 - 2019년 수출입 통계, 농수산식품수출지원정보 KATI.
- [5] S.W. Kim, N.S. Kim, M.J. Oh, H.R. Kim, M.S. Kim, D.Y. Lee, S.H. Yoon, M.Y. Jung, H.J. Kim, C.H. Lee, C.H. Oh, Anti-obesity Effects of Fermented Soybean Oils in 3T3-L1 Pre-Adipocytes and High Fat Diet-Fed C57BL/6J Mice, Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition, 46 (2017) 279-288.

[6] H.Y. Kim, Y.H. Han, M.H. Kim, K.S. Kim, Effects of Different Kinds of Korean Soybeans on Body Lipids and Lipid Peroxidation in Rats, *The Korean Journal of Nutrition*, 40 (2007) 229-234.

[7] Y.H. Jeon, J.H. Won, J.E. Kwon, M.R. Kim, Antioxidant Activity and Cytotoxic Effect of an Ethanol Extract from *Seoritae*, *Korea Journal of Food and Cookery Science*, 27 (2011) 1-10.

[8] R. Liu, Z. Cai, B. Xu, Characterization and quantification of flavonoids and saponins in adzuki bean (*Vigna angularis L.*) by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ analysis, *Chemistry Central Journal*, 11 (2017) 1-17.

[9] Y. Mukai, S. Sato, Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract attenuates blood pressure elevation and modulates nitric oxide synthase and caveolin-1 expressions in rats with hypertension, *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 19 (2009) 491-497.

[10] M. Jammel, A. Ali, M. Ali, Isolation of antioxidant phytoconstituents from the seeds of *Lens culinaris* Medik. *Food Chemistry*, 175 (2015) 358-365.

[11] K. Ganesan, B. Xu, Polyphenol-Rich Lentils and Their Health Promoting Effects, *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (2017) 1-23.

- [12] R.H. Liu, Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action, *the Journal of Nutrition*, 134 (2004) 3479S-3485S.
- [13] L. Zhou, X. Lin, A.M. Abbasi, B. Zheng, Phytochemical Contents and Antioxidant and Antiproliferative Activities of Selected Black and White Sesame Seeds, *BioMed Research International*, (2016) 1-9.
- [14] M. Dong, X. He, R.H. Liu, Phytochemicals of Black Bean Seed Coats: Isolation, Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidative Activities, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 6044-6051.
- [15] W.Zhang, D.G. Popovich, Chemical and Biological Characterization of Oleanane Triterpenoids from Soy, *Molecules*, 14 (2009) 2959-2975.
- [16] J. Yang, Role of Selected Fruits and Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanisms of Action, Graduate the School of Cornell University (2007).
- [17] L. Bonfili, V. Cecarini, M. Amici, M. Cuccioloni, M. Angeletti, J.N. Keller, A.M. Eleuteri, Natural polyphenols as proteasome modulators and their role as anti-cancer compounds, *the FEBS Journal*, 275 (2008) 5512-5526.

[18] V.R. Yadav, S. Prasad, B.K. Sung, R. Kannappan, B.B. Aggarwal, Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer, *Toxins*, 2 (2010) 2428-2466.

[19] K.T. Liby, M.M. Yore, M.B. Sporn, Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer, *Nature*, 7 (2007) 357-369.

[20] A. Bishayee, S. Ahmed, N. Brankov, M. Perloff, Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer, *Frontiers in Bioscience*, 16 (2011) 980-996.

[21] S. Flankland-Searby, S.R. Bhaumik, The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1825 (2012) 64-76.

[22] L. Piwowar, K.R. Landis-Piwowar, Proteasome Inhibitors In Cancer Therapy: A Novel Approach To A Ubiquitous Problem, *Clinical Laboratory Science*; Bethesda, 25 (2012) 38-44.

[23] H. Yang, K.R. Landis-Piwowar, D. Chen, V. Milacic, Q.P. Dou, Natural Compounds with Proteasome Inhibitory Activity for Cancer Prevention and Treatment, *Curr Protein Pept Sci*, 9 (2008) 227-239.

[24] J.C. Cusack, R. Liu, M. Houston, K. Abendroth, P.J. Elliott, J. Adams, A.S. Baldwin, Enhanced Chemosensitivity to CPT-11 with Proteasome Inhibitor PS-341: Implications for Systemic Nuclear Factor- κ B Inhibition, *Cancer Research*, 61 (2001) 3535-3540.

[25] A. Mehdad, G. Brumana, A.A. Souza, J.A.R.G. Barbosa, M.M. Ventura, S.M.D. Freitas, A Bowman-Birk inhibitor induced apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition, *Cell Death Discovery*, 2 (2016) 1-10.

[26] H. Ludwig, D. Khayat, G. Gaccone, T. Facon, Proteasome Inhibition and Its Clinical Prospects in the Treatment of Hematologic and Solid Malignancies, *Cancer*, 104 (2005) 1794-1807.

[27] N. Bailon-Moscoso, G. Cevallos-Solorzano, J.C. Romero-Benavides, M.I.R. Orellana, Natural Compounds as Modulators of Cell Cycle Arrest: Application for Anticancer Chemotherapies, *Current Genomics*, 18 (2017) 106-131.

[28] G.d. Bettignies, O. Coux, Proteasome inhibitors: Dozens of molecules and still counting, *Biochimie*, 92 (2010) 1530-1545.

[29]] P.G. Richardson, S. Kumar, J.P. Laubach, C. Paba-Prada, N. Gupta, D. Berg, H. van de Velde, P. Moreau, New developments in the management of relapsed/refractory multiple myeloma - the role of ixazomib, *Journal of Blood Medicine*, 8 (2017) 107-121.

[30]] L. Huang, C.H. Chen, Proteasome regulators: activators and inhibitors, *Curr Med Chem*, 16 (2009) 931-939.

[31] H.G. Yoon, R.H. Liu, Effect of Selected Phytochemicals and Apple Extracts on NF- κ B Activation in Human Breast Cancer MCF-7 Cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 3167-3173.

[32] D.O. Kim, K.W. Lee, H.J. Lee, C.Y. Lee, Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 3713-3717.

[33] K.L. Wolfe, R.H. Liu, Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 5596-8907.

[34] Y. Chen, G. Wang, H. Wang, C. Cheng, G. Zang, X. Guo, R.H. Liu, Phytochemical Profiles and Antioxidant Activities in Six Species of Ramie Leaves, PLOS ONE, 9 (2014) 1-9.

[35] S.Y. Kim, Development of Cellular Proteasome Activity (CPA) Assay and Anti-cancer Effects of Tea Leaves Extracts, Graduate school of Sungshin Women's University (2016).

[36] M. Navarro, I. Moreira, E. Arnaez, S. Quesada, G. Azofeifa, D. Alvarado, M.J. Monagas, Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd, Plants 6 (2017) 1-13.

[37] S.D. Gupta, N.J. Suh, Tocopherols in cancer: An update, Molecular nutrition & Food research, 60 (2016) 1354-1363.

[38] Y. Fang, W. Cao, M. Xia, S. Pan, X. Xu, Study of Structure and Permeability Relationship of Flavonoids in Caco-2 Cells, Nutrients, 9 (2017) 1-15.

[39] S.H. Shim, 20S Proteasome Inhibitory Activity of Flavonoids isolated from *Spatholobus suberectus*, Phytother, 25 (2011) 615-618.

[40] Y.W. Chen, S.C. Huang, S.Y. Lin-Shiau, J.K. Lin, Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1, *Carcinogenesis*, 26 (2005) 1296-1306.

ABSTRACT

Effects of Legumes Extracts on Proteasome Inhibitory Activities and Anti-cancer Effects, Anti-oxidant Effects

Min, Soo Yeong

Department of Food and Nutrition

Graduate school of

Sungshin University

26S proteasome is an enzyme in cytoplasm and nucleus of eukaryotic cell and it has been reported that it regulates apoptosis, cell cycle and immune response. In cancer cell, NF- κ B activated by 26S proteasome enters into nucleus and inhibits apoptosis, so it causes tumor cell proliferation and expansion. Thus inhibition of proteasome activity can contribute to prevent cancer development. The purpose of this study is to evaluate the 26S proteasome inhibition activities (PIAs) and anti-cancer effects, anti-oxidant effects of selected legumes (soybeans, black beans, adzuki beans and lentils) that are consumed frequently among most Koreans and have lots of flavonoids and triterpenoids. For this study, many of experiments are carried out including CE assay, CPIA assay, and cell proliferation assay, cell cycle

analysis and apoptosis analysis using HepG2 cell, DPPH, ABTS and CAA assay, and western blotting. In CE assay, adzuki beans and lentils significantly increased PIA at concentration of 100 μ g/mL. In CPIA assay, soybeans and black beans significantly increased PIA at concentration of 100 μ g/mL. Also, every beans extracts significantly arrest cell cycle including sub-G1 phase and G0/G1 phase, S phase, G2/M phase ($p < 0.05$). In DPPH, ABTS and CAA assay, adzuki beans significantly showed high anti-oxidant activity ($p < 0.05$). In western blotting, soybeans, adzuki beans and lentils significantly suppress NF- κ B activation ($p < 0.05$). Therefore, these results suggest that soybeans, black beans, adzuki beans and lentils might have possibilities as natural proteasome inhibitors and especially soybeans, adzuki beans and lentils suppress NF- κ B activation, thus might have anti-cancer effects. Also soybeans, black beans, adzuki beans and lentils have anti-oxidant activities, especially adzuki beans, thus adzuki beans might have possibilities as powerful anti-oxidants.