

Comet Assay를 이용한 Flavonoids와 항산화 비타민의 인체임파구 세포 DNA 손상 보호 효과*

박유경 · 전은재 · 강명희[§]

한남대학교 이과대학 식품영양학과

Protective Effect of Flavonoids on Lymphocyte DNA Damage Using Comet Assay*

Park, Yoo Kyoung · Jeon, Eun-Jae · Kang, Myung-Hee[§]

Department of Food and Nutrition, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

ABSTRACT

The present study was attempted to investigate and compare the antioxidant potency of several well-known flavonoids, antioxidant vitamin and commercially available popular beverages. The antioxidant potency was assessed by the effect on reducing oxidative DNA damage of human lymphocytes. Cellular oxidative DNA damage was measured by SCGE (single-cell gel electrophoresis), also known as comet assay. Lymphocytes were pre-treated for 30 minutes with wide ranges of doses of apigenin, kaempferol, luteolin, myricetin, rutin, quercetin, α -tocopherol (10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 μ M), green tea extract or grape juice (10, 50, 100, 250, 500, 1000 μ g/mL) followed by a H_2O_2 (100 μ M) treatment for 5 min as an oxidative stimulus. The physiological function of each antioxidant substance on oxidative DNA damage was analyzed as tail moment (tail length \times percentage migrated DNA in tail) and expressed as relative DNA damage score after adjusting by the level of control treatment. Cells treated with H_2O_2 alone (positive control) had an extensive DNA damage compared with cells treated with phosphate buffered saline (PBS, negative control) or pre-treated with all the tested samples. Of all the six flavonoids, quercetin was the most potent antioxidant showing the lowest ED_{50} of 8.5 μ g/mL (concentration to produce 50% protection of relative DNA damage). The antioxidant potency of individual flavonoids were ranked as follows in a decreasing order: luteolin (18.4 μ g/mL), myricetin (19.0 μ g/mL), rutin (22.2 μ g/mL), apigenin (24.3 μ g/mL), kaempferol (25.5 μ g/mL). The protective effect of α -tocopherol was substantially lower (highest ED_{50} value of 55.0 μ g/mL) than all the other flavonoids, while the protective effect was highest in green tea and grape juice with low ED_{50} value of 7.6 and 5.3, respectively. These results suggest that flavonoids, especially quercetin, and natural compounds from food product, green tea and grape juice, produced powerful anti-oxidative activities, even stronger than α -tocopherol. Taken together, supplementation of antioxidants to lymphocytes followed by oxidative stimulus inhibited damage to cellular DNA, supporting a protective effect against oxidative damage induced by reactive oxygen species. (*Korean J Nutrition* 36(2) : 125~132, 2003)

KEY WORDS : flavonoids, apigenin, kaempferol, luteolin, myricetin, rutin, quercetin, antioxidant, green tea, grape juice, α -tocopherol, DNA damage, comet assay.

서 론

여러 역학조사 결과에 의하면 암의 발생은 평소의 식습관과 깊은 관련이 있으며, 특히 과일과 채소의 섭취가 부

족할수록 암에 걸릴 확률이 높다는 것이 밝혀졌다.¹⁻³⁾ 이 때까지 대부분의 과채류의 항암효과에 관한 연구는 과채류에 다량으로 함유되어 있는 vitamin C, carotenoids 등의 항산화 비타민에 대해 초점을 맞추어 연구되어져 왔다. 그러나 최근 들어 과채류의 색소, 풍미에 관여하는 flavonoids 등의 phytochemical이 기존의 알려진 항산화 비타민보다 더욱 효과적인 항산화제 역할을 한다는 것이 알려지면서 이에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.⁴⁻⁶⁾ Flavonoids는 phytochemical 중에서도 과채류, 차 등에 가장 많이 함유되어 있는 polyphenolic compounds로써 일반적으로

접수일 : 2003년 2월 19일

채택일 : 2003년 3월 7일

*This work was supported by Korea Research foundation-Grant (KRF-2001-041-D00279).

[§]To whom correspondence should be addressed.

flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, anthocyanins 등을 포함한 용어이며, 모두 C₆-C₃-C₆의 탄소화합물로써 단지 탄소 고리의 구조만이 조금씩 다를 뿐이다.⁷⁾ Flavonol의 대표적인 물질로는 quercetin, kaempferol, myricetin이 있으며, flavone에는 apigenin, luteolin이 있고, flavonones의 대표적인 물질로는 naringin을 들 수 있다.⁸⁻¹¹⁾ Isoflavones에는 두류에 많이 들어있는 genestein, daidzein 등이 있으며 이들은 에스트로젠과 유사한 생리활성 기능이 있어 갱년기 장애를 완화해 줄뿐 만 아니라 폐경기 이후 나타나는 심혈관계질환 및 골다공증을 예방해주며 나아가 유방암, 전립선암 및 대장암의 발생을 감소시켜주는 생리활성 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다.¹²⁾ 그 외에 anthocyanin계는 적색이나 청색과일, 즉, cherry나 가지, 적 양배추 등에 많이 함유되어 있다. 이와 같은 flavonoids 들은 자외선을 흡수하거나 2가 금속이온 (Cu⁺⁺, Fe⁺⁺)과 착염을 형성하며, 수소 공여체로서 체내 자유 유리기 (free radical)를 포착하여 지질과산화반응을 억제함으로써 암뿐만 아니라 고혈압, 협심증 및 노화를 억제하는데 중요한 역할을 한다고 밝혀졌다.¹³⁾

현재까지 다양한 연구를 통해 암 발생은 산화적 스트레스로 인한 세포 내 DNA 손상과 깊은 관련이 있는 것으로 밝혀지고 있다. DNA 손상을 측정하기 위해 많은 연구방법들이 개발되어 왔는데 이제까지 사용되었던 방법들보다 쉽고 또 민감한 방법으로 최근 소개되고 있는 것이 comet assay 혹은 단세포 전기영동법 (single cell gel electrophoresis)이다. 이 방법은 처음 Ostling and Johanson¹⁴⁾에 의해 각각의 세포수준에서의 DNA 손상을 직접 확인하기 위하여 도입된 micro gel electrophoresis 방법으로 Singh 등¹⁵⁾에 의해 보다 민감하게 DNA 손상을 감지해 낼 수 있는 방법으로 발전되었다. 이 방법은 인체의 어떤 조직에서도 DNA 손상정도를 측정할 수 있으며 분석 시 소량의 시료만을 필요로 하고 실험과정이 간단할 뿐 아니라 시료 채취 후 몇 시간 내에 결과를 얻을 수 있는 등 많은 장점을 가지고 있다. Comet assay를 이용하면 산소 라디칼의 형성에 의한 DNA 손상과 항산화제의 관계 등을 쉽게 관찰할 수 있으며 oxidative stress에 노출되어 있는 흡연자의 경우 비흡연자보다 DNA 손상 정도가 유의하게 증가되어 있음이 보고된 바 있다.¹⁶⁾ 국내에서도 comet assay는 박과 강¹⁷⁾, 선 등¹⁸⁾에 의해 흡연자와 비흡연자의 산화적 DNA 손상을 비교하는 연구에서 성공적으로 이용된 바 있다.

인체 임파구는 oxidative stress를 잘 반영하는 세포로써 저 농도의 hydrogen peroxide에도 임파구 DNA가 손

상을 받는다고 알려져 있다. 알칼리 환경 하에서 break를 가진 DNA 고리는 supercoiling을 잃게되고 나선구조가 풀려 전기영동 시에 핵으로부터 떨어진 DNA 조각은 comet tail을 형성하게 되며, 그 손상정도가 클수록 핵으로부터 떨어진 거리가 멀어지게 된다.¹⁹⁾ 인체 임파구를 *in vitro* 상에서 flavonoids나 항산화 비타민으로 처리하면 이 물질들에 의해 oxidants와 antioxidants 간의 균형이 회복되면서 hydrogen peroxide에 의해 유도된 DNA 손상이 감소된다. 그러나 flavonoids의 oxidative DNA 손상 억제정도를 측정한 연구는 그리 많지 않으며 우리나라에서는 최근 속, 양파 껍질 등 다양한 식물류에서 추출한 flavonoids의 항산화 효과에 관한 연구가 이루어지고 있으나^{20,21)} flavonoids가 DNA 손상에 미치는 영향에 대해서는 아직 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 chemical flavonoids의 oxidative stress에 의한 인체 임파구 oxidative DNA 손상에 대한 개선효과를 살펴보고, 이를 기존의 항산화 비타민인 α -tocopherol, 그리고 최근 건강음료로서 많은 사람들이 응용하고 있는 녹차와 포도주스의 DNA 손상 개선효과와 비교해 봄으로써 flavonoids의 암 예방 효과의 정도를 규명해보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 준비

본 연구에서 flavonoids chemicals로는 apigenin, kaempferol, luteolin, myricetin, quercetin, quercitrin, rutin (Sigma, USA) 등을 사용하였으며 항산화 비타민으로는 α -tocopherol (Sigma, USA), flavonoids 함유량이 높은 식품으로는 녹차와 포도주스를 사용하였다. α -tocopherol은 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 용해시켜 사용하였으며, 녹차 추출물은 85°C water bath에서 3시간 추출하여 3,000 rpm에서 30분간 원심분리 한 후 상등액을 여과하여 동결 건조하였고, 포도주스는 4°C, 9,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 취한 후 milipore filter (0.45 μ m)로 여과 멸균되어 나온 시료를 동결 건조하여 시료로 제공하였다. 동결 건조한 시료는 세포에 처리하기 위해 DMSO에 적당한 농도로 녹여 eppendorf tube에 옮겨 -80°C 냉동고에 보관하면서 comet assay 실험에 사용하였다.

2. 임파구 분리

채혈 전 최소 8시간 이상은 음식물을 먹지 않은 건강한

실험 대상자 (26세 여성, 비흡연자)로부터 채혈을 하여 heparinated sterile tube에 담아 2~4시간 이내에 임파구 분리를 실시하였다. 인체 임파구는 신선한 전혈 100 μ l를 1 ml의 10% fetal bovine serum (FBS)을 함유한 RPMI-1640에 섞은 후 Histopaque 1077을 이용해 임파구만을 분리하였고, 이렇게 분리된 임파구는 다시 40% RPMI-1640와 50% FBS, 그리고 10% DMSO로 구성된 storage buffer에 넣어 현탁액을 만들어 -20°C 에서 한시간 냉동한 후, -80°C 로 옮겨 냉동 저장하였으며, 2주 내에 실험에 사용하였다.

3. Flavonoids와 항산화 비타민 시료, 음료시료의 전처리 (pre-treatment)

Flavonoids 시료와 항산화 비타민, 녹차, 포도주스 시료의 농도 범위는, 예비실험을 거쳐 효과가 거의 나타나지 않는 저농도와, 세포독성이 나타나기 시작하는 고농도의 사이 범위를 선정하였으며, 시료의 DNA 손상정도는 H_2O_2 를 처리한 positive control과 H_2O_2 를 처리하지 않은 negative control의 범주 내에 속하도록 선정하였다. 본 실험에서는 DMSO에 용해된 항산화 시료를 농도별로 PBS로 희석한 후, 4°C 에서 30분간 동안 반응시켰고, 대조군으로 쓰인 positive control 군과 negative control군에는 항산화 시료를 처리하지 않았다. 30분 동안 incubation 한 후, PBS로 두 번 세척한 다음 산화스트레스를 유발하였다.

4. 산화 스트레스의 유발

산화 스트레스에 의한 DNA 손상을 유발시키기 위해, 시료처리를 한 임파구에 100 μM 의 H_2O_2 를 가하여 4°C 냉장고에서 5분 동안 반응시킨 다음 PBS로 세척하였다. Positive control 세포군에는 DMSO (1%) + PBS (99%)를 30분간 전처리한 세포에 100 μM H_2O_2 를 처리하였으며, negative control 세포군에는 DMSO (1%) + PBS (99%)를 30분 처리한 후 H_2O_2 를 처리하지 않고 PBS만 처리하였다.

5. 단세포전기영동과 이미지 분석

위에 제시한 일련의 과정을 마친 cell의 DNA 손상을 측정하기 위해 comet assay를 실시하였다. Normal melting agarose (NMA)가 precoating된 fully frosted slide 위로 인체임파구세포와 75 μl 의 0.7% low melting agarose gel (LMA)의 현탁액을 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μl 로 한 겹 더 덮은 후, lysis 과정을 거쳤다. 미리 준비해 둔

차가운 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris)에 사용직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지 시켰다. Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 4°C 의 차가운 buffer (300 mM NaOH, 10 mM Na_2EDTA)를 채워 unwinding 시켰다. 20분이 지난 후 25 V/300 \pm 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충용액 (pH 7.5)으로 충분히 세척하였다.

Comet image 분석을 위해 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 농도의 ethidium bromide로 nucleotides를 염색하여 형광현미경 (Leica DMLB, Germany)에서 관찰하고 CCD camera (Charge Coupled Device KP-M1, Hitachi Denshi, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 comet image analyzing system이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 임파구의 DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리 (tail length, TL) 또는 tail length에 tail내 함유된 DNA%를 곱해준 tail moment (TM) 값을 측정하여 나타내었으며 각 처리구 당 2개의 slide를 만들어 그 중에서 각각 100개 세포를 관찰하여, H_2O_2 에 의한 DNA 손상, 그리고 flavonoids, 항산화 비타민 및 항산화 식품 (녹차, 포도주스)에 의한 DNA 손상 억제정도를 측정하였다. 각 처리구는 최소 3회 반복 실험을 통해 그 평균을 나타내었으며, 항산화 물질 처리를 전혀 하지 않은 positive control 즉, 100 μM H_2O_2 처리구의 DNA 손상정도를 maximal DNA damage로 계산하고, negative control 즉 H_2O_2 를 처리하지 않은 임파구를 no damage로 계산하여 각 농도에 따른 DNA 손상정도를 비교하여 표기하였다.

6. 통계처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package 10.0을 사용하여 처리하였다. 각 처리구별로 100개의 세포에서 측정된 DNA 손상도 (TL, TM, % DNA in tail)의 평균값과 표준오차를 구하였다. 각 시료마다 세 번 이상의 실험에서 positive control과 negative control을 기준으로 하여 각 농도별로 상대적인 DNA 손상도를 relative score로 표시하였다. 각 농도에서 DNA 손상 억제 정도를 비교하기 위해 농도별로 one-way 분산분석 (ANOVA)을 시행하였으며, 각 농도간의 차이는 Duncan test로 사후 검증하였고, 모든 통계적 유의성은 $\alpha = 0.05$ 수준에서 평가하였다. 또한, 각 시료들의 농도별 DNA 손상 값을 이용하여 linear regression analysis를 한 후, positive control에 비해 DNA 손상을 50% 감소시킬 수 있는 시료의 농도를 계산

Table 1. DNA damage (relative score) of flavonoids and α -tocopherol on H_2O_2 -induced human lymphocytes¹⁾

	Controls		Dose of antioxidant pre-treatment (μ M)						
	N ²⁾	P ³⁾	10	25	50	100	200	500	1000
Flavonols (no. of hydroxyl group)									
Kaempferol (4)	0	10 ^a	7.4 \pm 0.1 ^b		6.5 \pm 0.1 ^b	4.7 \pm 0.1 ^c	5.0 \pm 0.1 ^c	5.0 \pm 0.1 ^c	4.7 \pm 0.1 ^c
Rutin (4)	0	10 ^a	7.0 \pm 0.1 ^b	4.6 \pm 0.1 ^c	4.5 \pm 0.1 ^c	5.0 \pm 0.1 ^c		4.9 \pm 0.2 ^c	7.0 \pm 0.2 ^c
Quercetin (5)	0	10 ^a	6.2 \pm 0.2 ^b	3.3 \pm 0.3 ^{de}	2.6 \pm 0.3 ^e	4.2 \pm 0.2 ^d		4.7 \pm 0.2 ^c	4.9 \pm 0.2 ^{bc}
Myricetin (6)	0	10 ^b	5.8 \pm 0.3 ^c		4.9 \pm 0.4 ^c	3.4 \pm 0.2 ^{de}	3.8 \pm 0.2 ^{cd}	2.3 \pm 0.2 ^e	11.4 \pm 0.5 ^b
Flavones (no. of hydroxyl group)									
Apigenin (3)	0	10 ^a	6.3 \pm 0.2 ^{bc}		6.0 \pm 0.3 ^{bc}	5.3 \pm 0.2 ^c	6.4 \pm 0.5 ^{bc}	7.0 \pm 0.3 ^b	
Luteolin (4)	0	10 ^a	7.2 \pm 0.3 ^b	5.9 \pm 0.5 ^c	5.7 \pm 0.3 ^c	3.5 \pm 0.2 ^d	3.8 \pm 0.3 ^d	5.7 \pm 0.4 ^c	
α -tocopherol	0	10 ^a	9.1 \pm 0.4 ^d		6.8 \pm 0.4 ^b	5.4 \pm 0.3 ^{bc}		3.9 \pm 0.4 ^c	

1) All values are mean \pm S.E. For each substance, values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan test.

2) N: negative control (0 μ M H_2O_2)

3) P: positive control (100 μ M H_2O_2)

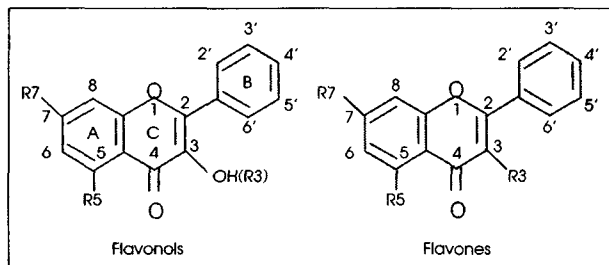


Fig. 1. Chemical structures of flavonols and flavones. Position of hydroxyl group in each flavonols: kaempferol: 5, 7, 3, 4'; rutin: 5, 7, 3', 4'; quercetin: 3, 5, 7, 3', 4'; myricetin: 3, 5, 7, 3', 4', 5. Position of hydroxyl group in each flavones: apigenin: 5, 7, 4'; luteolin: 5, 7, 3', 4'.

하여 ED₅₀의 값을 계산하였으며 이 값으로 각 시료의 DNA 손상 보호효과를 비교하였다. 즉, ED₅₀의 값이 낮을수록 DNA 손상 억제 효과가 큰 것으로 해석하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 사용한 chemical flavonoids인 apigenin, kaempferol, luteolin, myricetin, quercetin, quercitrin, rutin과 항산화 비타민인 α -tocopherol의 DNA 손상 정도를 농도별로 비교해 본 결과는 Table 1과 같으며, flavonoids 중 flavonols와 flavones의 구조적 차이는 Fig. 1에 나타내었다. 여러 flavonoids 중 먼저 flavonols를 보면, hydroxyl기가 4개인 kaempferol은 저농도인 10 μ M에서는 DNA 손상 억제효과가 26%정도이나, 농도의 증가함에 따라 그 억제효과도 증가하여, 100 μ M에 이르러 53%의 억제효과를 나타내었고 그 이후로는 변화가 없었다. Hydroxyl기가 6개로 가장 많은 myricetin의 경우 저농도인 10 μ M에서 억제효과가 42%로 비교적 높은 편이었으며, 500 μ M에서 최고치인 77%를 나타내었고,

1000 μ M에서는 positive control의 수준을 넘어 세포독성을 나타내었다. 역시 Hydroxyl기가 kaempferol과 같이 4개인 rutin의 경우 50 μ M에서 DNA 손상 억제정도가 최고인 55% 수준에 달했으나, myricetin과 유사한 경향으로 1000 μ M에서 DNA 손상이 다시 증가하였다. Hydroxyl기가 5개인 quercetin의 경우 저농도인 25, 50 μ M에서 이미 DNA 손상 억제효과가 67~74%를 나타내어 본 연구에서 사용한 flavonoids 중 가장 높은 DNA 손상 억제효과를 보였다. 이와 같은 결과는 Aruoma 등²²⁾이 quercetin의 TEAC (trolox-equivalent antioxidant capacity)으로 추정한 항산화력이 다른 flavonoids들 보다 높다는 보고와 일치하는 결과이다.

Flavone 들 중 hydroxyl기가 3개인 apigenin은 모든 농도에서 DNA 손상 억제 효과가 50%를 넘지 않았으며, hydroxyl기가 4개인 luteolin의 경우는 농도에 따라 점차로 DNA 손상 억제효과가 증가하여 100 μ M과 200 μ M에서는 62~65%의 억제효과를 보였다.

위 결과에서 볼 수 있듯이 저농도에서와 고농도에서 DNA 손상보호 효과가 시료마다 다르게 나타나므로, 각 농도에서 각 flavonoids의 DNA 손상 억제 효과를 하나의 그래프로 표기하여 Fig. 2에 제시하였다. 그 경향을 살펴보면, flavonoids 중 hydroxyl기가 4개인 kaempferol을 제외하면 hydroxyl기가 5, 6개인 flavonols (quercetin, myricetin, rutin; Fig. 2에서 실선으로 표시)의 DNA 손상 억제 효과가 hydroxyl기가 3, 4개인 flavones (apigenin, luteolin; Fig. 2에서 점선으로 표시)보다 비교적 좋은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 일반적으로 hydroxyl기의 위치와 숫자가 항산화력, 나아가 DNA 손상 억제 효과에 중요한 역할을 한다는 보고와 일치한다.^{23,24)}

항산화 비타민 α -tocopherol의 경우, 저농도인 10 μ M

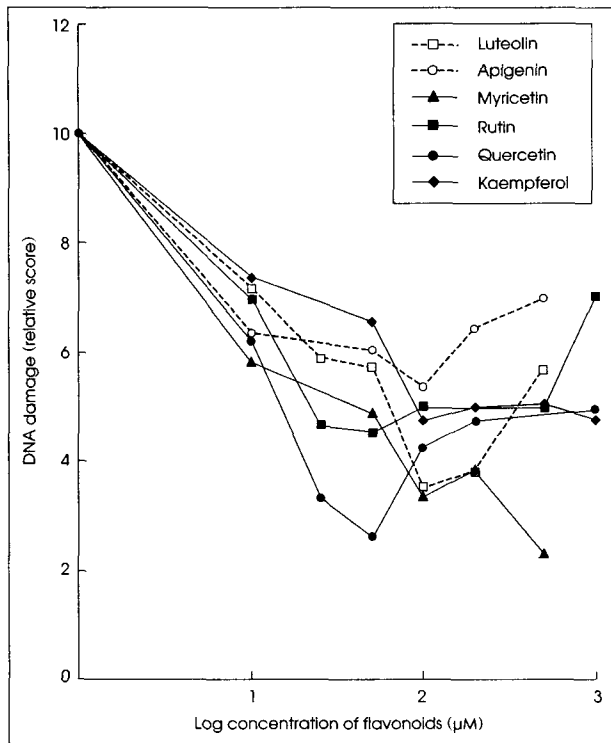


Fig. 2. Effects of individual flavonoids on DNA damage (relative score) in human lymphocytes by comet assay.

에서는 DNA 손상 억제효과가 10% 정도밖에 나타나지 않았으나, 농도가 증가함에 따라 억제효과가 커져 500 μ M에서는 61%의 억제효과를 보였다 (Table 1). 항산화 비타민인 α -tocopherol의 이와 같은 DNA 손상 억제 효과를 flavonoids의 억제효과와 비교해 볼 때, 고농도에서는 큰 차이가 없으나, 저농도에서는 낮은 편으로 나타났다. 이와 같은 결과는 flavonoids는 singlet oxygen이나 superoxide free radical, hydroxyl radicals와 같은 초기단계의 자유유리기와 활성산소종을 제거하는 기능이 있어서 'high-level' antioxidant라고 알려져 있는 반면에, α -tocopherol은 peroxy radicals 등 과산화과정의 비교적 후기 단계의 자유유리기를 안정화시키기 때문에 'low-level' antioxidant로 분류된다는 Torel 등²⁵⁾의 주장으로 보충 설명될 수 있겠다.

최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 녹차의 음용이 늘어나고 있으며, 관심의 증가와 더불어 녹차의 기능성에 관한 연구도 활발하게 이루어지고 있다. 실제로 유럽 7개국 연합의 역학조사 결과, 녹차를 하루에 5~7잔 마시면 비음용자에 비해 심장질환 이환율이 낮아지는 것이 보고된 바 있다.²⁶⁾ 따라서 본 연구에서는 chemical로서의 flavonoids에 비해 실제 식품으로 섭취하게되는 녹차의 DNA손상 억

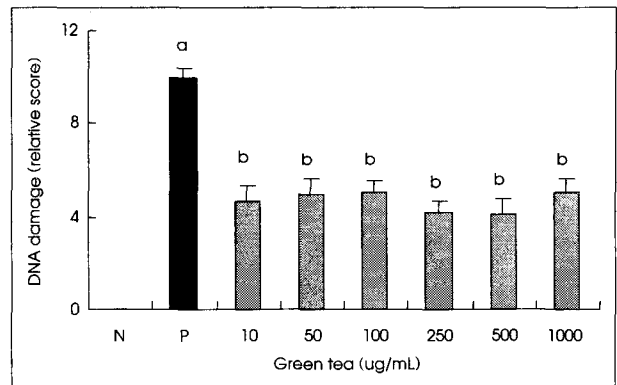


Fig. 3. Inhibitory effect of green tea on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in human lymphocyte. P: positive control (200 μ M H₂O₂), N: negative control (PBS). All values are mean \pm SE (n=100). Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan test.

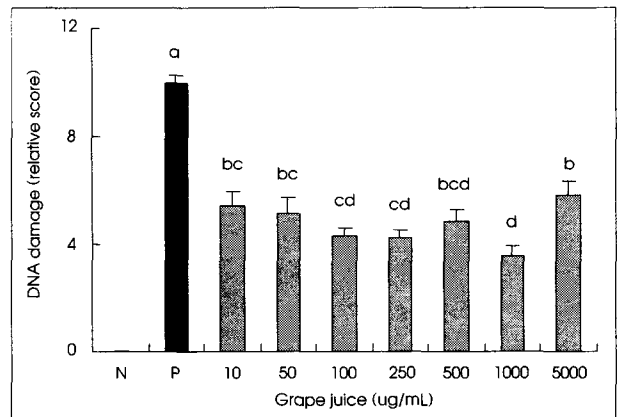


Fig. 4. Inhibitory effect of grape juice on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in human lymphocyte. P: positive control (200 μ M H₂O₂), N: negative control (PBS). All values are mean \pm SE (n=100). Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan test.

제효과는 어떤지를 측정하였으며 그 결과를 Fig. 3에 제시하였다. Fig. 3에서 보듯이 임파구 세포에 녹차를 투여하였을 때, 다른 flavonoids들과는 상이한 양상을 보였다. 즉, 저농도인 10 μ g/mL에서 이미 50% 이상의 DNA 손상 억제효과를 보인 반면에, 농도의 증가에도 불구하고 억제 효과가 증가하지 않았다. 또한 농도가 1000 μ g/mL에 달해도 세포독성을 나타내지 않았다. 저농도에서도 민감하게 DNA손상 보호효과를 보인 것은 아마도 녹차에 함유되어 있는 여러 polyphenol성 화합물 즉 catechin, β -carotene, vitamin C, flavonols류 들의 synergy 작용을 통한 것으로 간주된다.²⁷⁾ 이와 같은 결과는, 최근에 많은 연구자들의 연구추세가 비타민 C, E, β -carotene 등의 정제된 항산화 영양소보다는 토마토, 당근, 시금치 등의 야채를 사용하여 영양 보충 intervention 연구를 하도록 권장하고 있

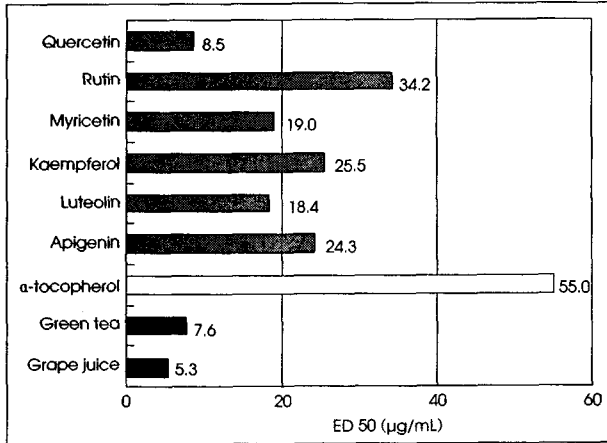


Fig. 5. Comparison of the antioxidant activities of individual flavonoids, antioxidant vitamin and food products in comet assay by the estimated dose that would result in a 50% reduction (ED₅₀) of oxidative DNA damage in human lymphocytes.

는 것으로 보충 설명될 수 있다.

식품의 형태로 항산화 영양소를 이용한 외국의 영양중재 연구들 중 포도주스 또한 과산화지질 형성을 지연시키거나, 혈소판 aggregation을 저해한다고 보고된 바 있으며,^{28,29)} 본 연구자의 실험실에서도 포도주스의 총 항산화력을 측정해 본 결과 항산화 효과가 있음을 입증한 바 있으므로,³⁰⁾ 본 연구에서 항산화 음료의 하나로 포도주스의 DNA 손상 억제효과를 살펴보았다 (Fig. 4). Fig. 4에서 보면, 녹차와 유사하게 저농도 10 µg/mL에서 약 45%의 DNA손상 억제효과를 보였으며, 그 보다 높은 농도에서는 농도의 증가에 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 포도를 이용한 외국의 연구경향을 보면 세포실험으로는 포도내의 polyphenol 중 resveratrol (2,3',5-trihydroxystilbene)을 추출하여 세포에 처리하면 세포의 산화적 스트레스를 막아 DNA 손상이 감소된다는 연구가 있으며,³¹⁾ 동물실험으로는 포도 주스의 투여가 platelet activity를 저해하였고, thrombosis를 막은 것으로 보고되었다.³²⁾

위의 결과들을 정리하여 각 flavonoids들과 항산화 비타민, 그리고 항산화 음료의 항산화력을 비교하기 위해서, 모든 시료의 단위를 µg/mL로 통일한 후, positive control에 비해 DNA 손상을 50% 감소시킬 수 있는 시료의 농도를 ED₅₀로 계산하여 Fig. 5에 나타내었다. 앞에서의 결과와 같이, flavonols 중 quercetin의 ED₅₀ 값이 flavonoids 중에서 가장 낮은 것으로 나타났고 다른 flavonols인 myricetin과 kaempferol은 flavones인 luteolin 혹은 apigenin과 비슷한 정도의 ED₅₀ 값을 보였다. ED₅₀ 값이 낮은 것이 DNA 손상 억제 효과가 높은 것이므로, flavonoids 중 가장 DNA 손상 억제효과가 높은 것은 quercetin

인 것을 알 수 있었다. Flavonoids 중 flavonols인 rutin은 ED₅₀ 값이 flavonoids 중 가장 높았으며, 이와 같은 결과는 Fig. 1에서 보듯이 R3 위치가 conjugate 되어 있기 때문에 다른 flavonoids들 보다 항산화력이 떨어지기 때문인 것으로 보인다.^{33,34)} 항산화 비타민 α-tocopherol의 ED₅₀ 값은 55 µg/mL로서 본 연구에서 사용한 모든 flavonoids와 녹차, 포도주스 등에 비해 가장 높은 것으로 관찰되었다. 이는 이미 앞에서 고찰한 바와 같이 α-tocopherol의 자유 유리기를 소거하는 작용이 그 반응의 후기에 나타나기 때문이라고 생각된다.

Comet assay는 민감하고 간단하며, 경제적이고 특별한 기구의 사용이 필요 없는 반면에, 지나치게 민감하며, 일정 정도의 DNA 손상을 초과하면 그 수준을 측정하기 어렵다.³⁵⁾ 또 Anderson 등³⁶⁾은 혈액성분이 함유된 상태, 즉, 분리된 임파구가 혈액으로 오염된 상태에서는 배지에 함유된 FBS 만으로도 임파구 민감도가 감소되어 저농도에서 flavonoids의 항돌연변이 효과가 나타나지 않을 수도 있다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 이와 같은 오류를 방지하기 위해 DNA 손상 수준 측정이 가능한 maximal damage 값 이내의 농도를 선정하여 실험하였고, 또한 저장용 배지에 포함되어있는 FBS로 인해 metabolic activation이 일어나지 않도록 임파구 세포를 phosphate buffer로 2회 이상 충분히 세척한 후 수행하였으므로 이로 인한 오류는 최소화 된 것으로 생각된다.

본 연구에서 여러 종류의 시료를 다양한 농도로 처리하는 과정에서 생기는 처리 임파구 채취일 간의 차이를 최소화하기 위해서 신선한 임파구 대신 냉동 저장된 임파구를 사용하였으며, 실험기간동안 임파구의 냉동저장기간이 2주를 넘기지 않도록 하여 채혈횟수를 최소한으로 제한하여 수행하였다. 최근 세포 독성실험 등이나 인체 biomonitoring에 임파구를 이용한 comet assay가 실용화되면서, 실험 과정 중에 임파구의 냉동, 저장의 필요성이 증가되고 있는 가운데, Duthie 등³⁷⁾은 신선하게 분리된 임파구와 냉동 저장되었던 임파구의 DNA 손상정도의 차이를 비교하여 본 결과, 신선한 임파구와 두 달 동안 냉동 저장되었던 임파구의 DNA 손상정도 사이에 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다.

본 연구에서는 apigenin, kaempferol, luteolin, myricetin, quercetin, rutin과 녹차, 포도주스의 H₂O₂에 의한 DNA 손상보호 효과를 comet assay를 통해 살펴보고 항산화 비타민인 α-tocopherol과 비교해 본 결과, 각각의 flavonoids와 녹차, 포도주스에서 DNA 손상 억제 효과가 나타났으며 이들의 DNA 손상 억제효과는 항산화 비타민인 α-

tocopherol보다 높았다. 녹차와 포도주스의 DNA 손상 억제효과가 flavonoids보다 높았으며, flavonoids 중에서는 quercetin의 DNA 손상 억제효과가 가장 높아 녹차와 포도주스와 비슷하였다.

이상에서 살펴본 결과, 각각의 flavonoids나, flavonoids 함유식품으로서의 녹차, 포도주스의 일상적인 섭취는 신체 내에서 발생되거나 스트레스, 환경적 요인에 의한 산화적 스트레스의 소거기능이 있어, 암 예방이나 만성질환의 예방에 중요한 역할을 차지할 수 있다고 사료된다.

요약 및 결론

본 연구의 관심은 apigenin, kaempferol, luteolin, myricetin, quercetin, quercitrin, rutin 등의 flavonoids와 항산화 비타민인 α -tocopherol, 녹차, 포도주스가 H_2O_2 에 의한 DNA 손상의 억제기능을 가지는지 comet assay 측정을 이용해 살펴보는 데 있었다. 검사에 사용된 모든 시료에서 임파구 DNA 손상 억제 기능을 발견할 수 있었으며, 그 억제능력은 ED_{50} 로 살펴본 다른 시료에 비해 녹차 추출물, 포도주스가 비교적 높았으며, flavonoids 중 특히 quercetin이 높은 것으로 나타났다. 그러나, 본 연구의 결과는 항산화 영양소에 대한 연구가 더 많이 이루어진 후에, 즉, 체내에서의 flavonoids 성분의 흡수와 대사 등에 대한 기초 배경연구가 더 활발해진 이후에야 신중하게 해석되어야 할 것이며, 현재 이를 위한 식품 내 flavonoids의 함량을 database화하여 기본자료 구축이 이루어지고 있으며, 식품 내 flavonoids 섭취량 측정을 위한 식이 분석법의 개발도 활발히 진행되고 있다.

본 연구를 종합해 보면, 본 연구를 통해 인체 임파구에 있어 flavonoids의 영양적, 기능적 가치를 재고해 봄으로써, 암 예방 차원에서 flavonoids 역할의 중요성을 강조하게 되었으며, 우리나라 사람들의 상용음료인 녹차의 생리적 기능을 재검토하였으며, 최근 수요가 늘어나고 있는 포도주스의 항산화 효과 또한 입증되었다. 따라서, 본 연구를 기초로 동물과 인체를 대상으로 한 여러 가지 형태의 *in vivo* 실험이 수행될 수 있을 것이며, 나아가서 본 연구결과는 건강한 사람이나, 심혈관 질환자, 암 환자 등을 대상으로 한 human intervention 연구의 기초 자료로도 활용될 것을 기대한다.

Literature cited

1) Van Poppel G, Van den Berg H. Vitamins and cancer. *Cancer*

Letters 114: 195-202, 1997

2) Martinez ME, Giovannucci E. Diet and the prevention of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 16: 357-376, 1997

3) Schatzkin A. Dietary change as a strategy for preventing cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 16: 377-392, 1997

4) Duthie SJ, Dobson VL. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr* 38: 28-34 1999

5) Aherne SA, O'Brien NM. The flavonoids, myricetin, quercetin and rutin, protect against cholestan-3 β , 5 α , 6 β -triol-induced toxicity in chinese hamster ovary cells in vitro. *Nutr Res* 19: 749-760, 1999

6) Wang W, Goodman MT. Antioxidant property of dietary phenolic agents in a human LDL-oxidation ex vivo model: interaction of protein binding activity. *Nutr Res* 19: 191-202, 1999

7) Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary Occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research* 18(12): 195-2018, 1998

8) Eun JB, Jung YM, Woo GJ. Identification and Determination of Dietary Fibers and Flavonoids in Pulp and Peel of Korean Tangerine (*Citrus aurantium* var). *Korean Food Sci Technol* 28(2): 371-377, 1996

9) Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 40: 237-239, 1992

10) Bilyk A, Cooper L, Sapers GM. Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion (*Allium cepa* L.) tissue. *J Agric Food Chem* 32: 274-280, 1984

11) Bilyk A, Sapers GM. Distribution of quercetin and kaempferol in lettuce, kale, chive, garlic chive, leek, horseradish, red radish, and red cabbage tissues. *J Agric Food Chem* 33: 226-232, 1985

12) Barnes S. Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 86-392, 1998

13) Plaa GL, Witschi H. Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 16: 125-131, 197

14) Ostling O, Johanson KJ. Microgel electrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298, 1984

15) Singh PN, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191, 1988

16) Betti C, Davini T, Giannesi L, Loprieno N, Barale R. Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 307: 323-333, 1994

17) Park EJ, Kang MH. Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human biomonitoring. *Korean J Nutrition* 35(2): 213-222, 2002

18) Sun SJ, Chung HW, Han JH. Smoking related DNA damage in human lymphocytes assessed by the comet assay. *Environmental Mutagens & Carcinogens* 22(2): 83-89, 2002

19) Mckelvey-Martin VJ, Green MHL, Schemerzer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A european review. *Mutat Res* 288: 47-63, 1993

20) Yoon HS, Lee KE, Kim JS, Pae JO. Antioxidative Effectiveness of Water Extract and Ether Extract in Wormwood (*Artemisia*

- montana Pampan). *J Food Sci Nutr* 21 (1): 17-23, 1992
- 21) Kim HG, Kwon JH, Kwak HJ, Kwon YJ, Chung PH. Originals: Physiological Activity and Antioxidative Effect of Methanol Extract from Onion (*Allium cepa* L). *J Food Sci Nutr* 29(2): 249-256, 2000
 - 22) Aruoma OI, Halliwell B, Williamson G. In vitro methods for characterizing potential prooxidant and antioxidant actions of nonnutritive substances in plant foods. In: Aruoma OI, Cuppet SL, ed. *Antioxidant Methodology-in vivo and in vitro concept*. pp.3173-3183, AOCS Press, Champaign, Illinois, 1997
 - 23) Chen ZY, Chan PT, Ho KY, Fung KP, Wang J. The antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem Phys Lipids* 79: 157-163, 1996
 - 24) Shimoi K, Masuda S, Furugori M, Esaki S, Kinae N. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in x-ray irradiated ice. *Carcinogenesis* 14: 2669-2672, 1994
 - 25) Torel J, Cillard J, Cillard P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radicals. *Phytochemistry* 25: 383-385, 1986
 - 26) Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155 (4): 381-386, 1995
 - 27) Weisburger JH. Tea and Health: the underlying mechanism. *Proc Soc Exp Biol Med* 220(4): 271-275, 1999
 - 28) Osmon H, Maalej N, Shanmuganayagam D, Folts JD. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys. *J Nutr* 128: 2307-2312, 1998
 - 29) Day AP, Kemp HJ, Bolton C, Hartog M, Stansbie D. Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. *Ann Nutr Metab* 41 (6): 353-357, 1997
 - 30) Kim SM Park YK, Seong IW, Kang MH. Changes in antioxidant status and lipid profiles after grape juice supplementation to patients with cardiovascular disease (CVD). *IX Asian Congress of Nutrition* New Delhi, India, 2003
 - 31) Sgambato A, ardito R, Faraglia B, Boninsegna A, Wolf FI, Cittadini A. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutation Res* 496: 171-180, 2001
 - 32) Demrow HS, Slane PR, Folts JD. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* 91: 1182-1188, 1995
 - 33) Hardigree AA, Epler JL. Comparative mutagenesis of plant flavonoids in microbial systems. *Mutat Res* 58: 231-239, 1978
 - 34) Silva J, Herrmann SM, Heuser V, Peres W, Possa Marroni, Gonzalez-Gallego J, Erdtmann B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and Chem Toxicol* 40: 941-947, 2002
 - 35) Pool-Zobel BL, Bub A, Rechkemner G. Application of the comet assay to study oxidative DNA damage in human cell. In: Aruoma OI, Cuppet SL, ed. *Antioxidant Methodology-in vivo and in vitro concepts*, pp.39-52, AOCS Press, Champaign, Illinois, 1997
 - 36) Anderson D, Basaran N, Dobrzynska MM, Basaran A, Yu T-W. Modulating effects of flavonoids on food mutagens in humans in human blood and sperm samples in the comet assay. *Terat Carcinogen Mutagen* 17: 45-58, 1997
 - 37) Duthie SJ, Pirie L, Jenkinson AMcE, Narayanan S. Cryopreserved versus freshly isolated lymphocytes in human biomonitoring: endogenous and induced DNA damage, antioxidant status and repair capability. *Mutagenesis* 17(3): 211-214, 2002