韓國營養學會誌 37(4) : 281~290, 2004

포도주스의 보충섭취가 흡연성인의 혈장 항산화 영양상태 및 DNA 손상 개선에 미치는 영향*

박은주[1] · 김정신[2] · 전은재[2] · 김혜영[2] · 박유경[2] · 강명희[2]§

경남대학교 생명과학부,[1] 한남대학교 이과대학 식품영양학과[2]

The Effects of Purple Grape Juice Supplementation on Improvement of Antioxidant Status and Lymphocyte DNA Damage in Korean Smokers*

Park, Eun Ju[1] · Kim, Jung-Shin[2] · Jeon, Eun-Jae[2]
Kim, Hae-Young[2] · Park, Yoo Kyoung[2] · Kang, Myung-Hee[2]§

Division of Life Sciences,[1] Kyungnam University, Masan 631-701, Korea
Department of Food and Nutrition,[2] Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

ABSTRACT

The purpose of this project was to evaluate whether daily fruit juice consumption could reduce the DNA damage in healthy subjects. The study was performed using 67 healthy volunteers (29 smokers, 38 nonsmokers) who were supplemented with 480 ml of grape juice for 8 weeks. Eight weeks of grape juice consumption did not change any anthropometric parameters. Lymphocyte DNA damage before the study was significantly greater ($p < 0.05$) in smoker than nonsmoker, but, grape juice consumption significantly reduced DNA damage in both smoker (26%) and nonsmoker (17%) to the level where there was no difference remained between the two groups after the intervention trial. This preventive effect of grape juice against DNA damage was not affected by sex of the subjects in non-smokers. Plasma α-carotene, lycopene and γ-totopherol was significantly increased after the trial in smokers, while erythrocyte catalase was significantly increased in both smokers and nonsmokers. Total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) level in all subjects was significantly reduced after the intervention, while GSH-Px activity was increased only in nonsmokers. These results suggests that daily consumption of grape juice may protect DNA damage in peripheral lymphocytes, and supports the hypothesis that grape juice might exert their effect partially via a decrease in oxidative damage to DNA in humans partly by improving their antioxidative defense system. (*Korean J Nutrition* 37(4) : 281~290, 2004)

KEY WORDS : grape juice supplementation, antioxidant status, oxidative DNA damage, TRAP, catalase, SOD, glutathione peroxidase.

서 론

최근 우리나라의 연구동향을 살펴보면 영양학은 물론 의학, 약학분야에서도 특정 식품을 이용한 여러 만성 퇴행성 질환이나 암 등의 예방과 치료 가능성에 관심이 증가하고 있다. 대부분의 경우, 이런 식품들에 함유되어 있는 물질은 체내에서 일어나는 대사 산물인 과산화물의 축적을 방지해 주는 항산화 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 체내에 산화 촉진 물질인 pro-oxidant의 수준과 산화 억제 물질인 anti-oxidant의 균형이 깨져 체내에 산화적 스트레스가 증가하면, 우선적으로는 체내에 과산화물의 축적이 되며, 부가적으로 세포 내 DNA 손상을 야기 시켜 결국 암 및 각종 질병으로 진전이 된다.[1,2] 비흡연자에 비해 흡연자의 신체 내에서는 활성산화물질 (ROS)의 생산이 비정상적으로 높아져 oxidative stress 현상이 더 빈번히 일어나며 그 결과로 DNA 손상이 증가하고 암의 위험성이 높아진다.[3,4] 따라서 흡연자의 항산화 영양상태 및 DNA 손상정도를 monitoring한 후, 흡연자의 DNA 손상을 개선할 수 있는 과일이나 야채 보충섭취 영양중재연구를 통해 항산화 영양상태를 개선하여 암을 예방할 수 있는 방법을 모색하는 연구는 매우 중요하며

접수일 : 2004년 2월 23일
채택일 : 2004년 4월 29일
*This study was supported by a grant of the Korean Health 21 R & D project Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (00-PJ1-PG3-22000-0049).
§To whom correspondence should be addressed.

© 2004 The Korean Nutrition Society

선진 외국에서는 이러한 노력이 많이 시도되어 왔다.[5,6]

최근 역학연구 보고에 의하면 과일, 야채, 포도주 및 차 등의 섭취는 심혈관질환으로 인한 사망률의 감소와 깊은 관계가 있으며,[7-9] 특히, 과일류에 함유되어 있는 flavonoids와 심혈관 질환으로 인한 사망률과는 음의 상관관계를 보인다.[10,11] 한편, 흡연률이나 지방섭취량이 높은 프랑스인들에게서 심장질환 발생률이 현저히 낮은 것은 그 지역 특산물인 포도나 적포도주의 다량 섭취로 인한 것이라는 연구결과가 보고되었다.[12] 이는 포도에 다량 포함되어있는 강한 항산화력을 가진 polyphenol 물질의 효과에 기인 한 것으로 간주되고 있으며, 실제로 *in vitro* 연구에서는 포도에 포함되어있는 polyphenol이 low density lipoprotein (LDL) oxidation을 막는 것이 보고되었다.[13] 과거에는 주로 혈중 지질농도에 대한 집중적인 연구를 통하여 심혈관계질환에 대한 접근을 시도해 왔으나 최근 LDL 산화가 심장질환을 비롯한 여러 노화와 관련된 성인병 발병기전에 미치는 영향들이 알려지면서 체내의 항산화 체계와 이들 질병과의 상관관계에 초점을 맞춰 활발한 연구가 이루어지고 있다.[14-16]

그 동안 포도 및 포도주스의 항산화 효과 혹은 DNA 손상과 관련된 선행연구들을 보면 먼저 *in vitro* 연구로 포도의 polyphenol 중 resveratrol을 추출하여 세포에 처리하면 세포의 산화적 스트레스를 막아 DNA 손상이 감소된다는 연구가 보고된 바 있다.[17] 동물실험으로는 포도 주스의 투여가 platelet activity를 저해하였고, thrombosis를 저해하는 효과가 있는 것이 보고되었으며[18] 이런 효과는 오렌지 주스나 자몽 주스를 사용했을 때는 나타나지 않았다.[19] 이 같은 연구는 지속적인 관심을 끌고 있으나, 동물실험 결과를 인체에 적용하기에는 무리가 있으므로 최근에는 점차적으로 동물실험 연구로부터 human intervention 연구로 진전되고 있다. Day 등[20]은 건강한 성인 7명에게 포도 주스를 7일 동안 투여하였을 때 포도 주스의 섭취가 LDL의 산화를 지연시켜 심혈관질환의 위험을 감소시킨다고 보고하였다. 이 외에도 심혈관질환 환자에게 포도주스를 보충 섭취시키면 LDL 산화의 감소, 혈소판 응집의 감소, 내피조직의 기능 항진 등의 효과가 있음이 보고되고 있다.[21-23]

흡연자의 항산화 영양상태 및 DNA 손상 정도와 관련하여 그 동안 우리나라에서 수행된 연구로는 흡연 청소년 및 성인의 항산화 영양상태[24,25]와 DNA 손상 정도[26]를 비흡연자와 비교한 관찰연구 논문들이 있으며, 최근 흡연자를 대상으로 항산화 비타민을 보충섭취케 한 후, 산화 손상도 및 면역상태의 변화를 보고한 영양중재연구들도 시도되고 있다.[27,28] 그러나 이 연구들은 대부분 흡연자에게 항산화 비타민을 투여한 연구이며 비타민 대신 항산화 식품을 투여한 후 흡연자의 항산화영양상태 혹은 DNA 손상 개선효과를 본 영양중재연구는 최근 신선초 녹즙 투여 후 항산화 비타민 영양상태를 본 연구[29]외에 국내에서 거의 시도된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 흡연자를 대상으로 그들의 항산화 영양상태 개선 및 DNA 손상 회복을 위한 과일 주스 섭취 intervention 연구를 실시하였다. 최근 역학연구에 의하면 여러 과일 주스 중 포도 주스에 flavonoid 함량이 높아 암 예방 기능이 탁월하다고 보고되고 있다. 그 기전은 명확히 알려져 있지 않으나 체내 항산화력의 증가, 혹은 free radical의 감소, DNA 손상의 방지 등으로 인해 암 발생 과정이 지연되는데 있다고 사료된다. 따라서 본 연구에서는 성인에게 일정기간 포도 주스를 보충섭취 시킨 후, 포도 주스의 섭취가 체내 free radical 수준 감소 및 임파구 DNA 손상 보호에 미치는 효과를 살펴보고자 하였다.

연구방법

1. 대상자 선정 및 질문지, 신체계측, 식이섭취 조사

본 연구는 포도주스를 보충 섭취하는 intervention 연구로서 대전 지역에 거주하는 19~57세 사이의 건강한 남녀 67명을 대상으로 실시되었다. 설문지의 내용은 나이, 건강상태 등 일반사항, 신장과 체중, 흡연에 관한 사항, 운동에 관한 사항, 비타민 영양제 복용 여부, 알코올 섭취 여부 등으로 구성하였다. 흡연에 관한 사항은 흡연여부, 흡연량, 흡연력, 금연기간 등을 조사하였고, 운동에 관한 사항은 운동의 규칙성, 운동 횟수, 운동량, 운동 강도 및 종류에 대한 내용을 조사하였다. 설문지를 통하여 대상자의 인구학적 특성, 건강상태 및 생활습관 (흡연, 음주, 운동 등)을 조사하였으며, 회수된 설문지를 검토하여 설문지 대답이 불성실한 사람과 비타민 영양제를 복용하고 있는 사람은 대상자에서 제외하였다. 신장계와 줄자를 이용하여 신장 및 WHR (wasit-hip ratio)을 측정하였고, 혈압계로 혈압을 측정하였으며, 체중, BMI (body mass index), 체지방량 등의 신체계측조사는 생체임피던스 측정기 (Biospace Co, Ltd. Inbody 2.0)를 이용하여 측정하였다. 영양소 섭취상태 및 식습관은 1대1 면담하는 방식으로 24시간 회상법 및 식품섭취 빈도조사를 이용하여 포도주스 공급 시작일과 종료일 2회에 걸쳐 조사하였으며 영양소 섭취량은 한국영양학회에서 제작한 CAN program과 한국인 영양권장량[30]을 이용하여 구하였다.

2. 포도 주스 보충 투여

대상자에게 100% 천연 포도 주스 (국내 M사 S제품)를 매일 두 번에 걸쳐 총 480 ml씩 8주 동안 섭취하도록 지도

하였으며 실험기간동안 포도주스 섭취 이전의 식이 양상을 유지하도록 지시하였다. 투여 전에 식이 섭취 조사, 인체계측조사 및 1차 채혈 (0주)을 실시하고, 투여 후 2차 채혈 (8주)하여 임파구 DNA 손상 정도, 적혈구 항산화효소활성도, 혈장 항산화 비타민 수준 및 체내 총항산화 영양상태를 나타내는 혈장 TRAP 수준을 측정하였다.

3. 혈액 채취

총 67명의 성인 대상자로부터 본인의 동의를 얻어 채혈을 하였다. 대상자들은 채혈하기 전 8시간 이상 음식물을 먹지 않도록 지도하였으며 대상자들의 혈액은 아침식사 전에 12 ml 정도 채혈 후 2개의 서로 다른 시험관에 분주하였다. Comet assay를 위해서는 100 μl heparinated sterile tube에 전혈 (whole blood)을 담고, 나머지 혈액은 lithium-heparinic polystyrene에 담아 1000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 얻어진 platelet-rich-plasma는 ascorbic acid 측정을 위해 분리하였다. 분리하고 남은 platelet-rich-plasma는 다시 3000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 항산화 비타민 및 TRAP 분석을 위해 -80℃ 냉동고에 보관하였다. 적혈구는 isoosmotic phosphate buffered saline으로 처리한 후 질소를 채운 뒤 항산화 효소 분석을 위해 -80℃ 냉동고에 보관하였다.

4. 혈장 항산화 비타민 측정

대상자들의 혈장 ascorbic acid는 2, 4-dinitrophenylhydrazine method[31]에 의해 UV/VIS spectrometer로 분석하였다. 혈장을 metaphosphoric acid로 처리하여 단백질을 침전시키고 ascorbic acid를 안정화시켰다. Ascorbic acid는 copper-sulfate로 처리하면 dehydroascorbic acid로 산화된 뒤 diketogluconic acid로 가수분해된다. 이를 2, 4-dinitrophenylhydrazine으로 처리하면 안정한 적갈색물의 osazone이 형성되는데 이것을 520 nm에서 측정하여 혈장 ascorbic acid의 농도를 분석하였다. 혈장 α-tocopherol, γ-tocopherol 및 carotenoids는 ethanol로 단백질을 제거하고 n-hexane으로 지방을 추출한 후 rotary evaporator로 hexane을 증발시키고, mobile phase (metanol: dichloromethane = 85 : 15)에 녹여 HPLC로 측정하였고[32] HPLC 분석 조건은 Table 1에 제시하였다.

Table 1. HPLC apparatus and conditions

Column	Merck, lichrospher 100 RP-18 (5 μm)
Pump	Shimadzu LC-10AT
Flow rate	0.8 μl/min
Detector	Shimadzu SPD-10A
Wavelength	Tocopherols-295 nm, carotenoids-450 nm
Integrator	Shimadzu C-R6A chromatopac
Mobile phase	Metanol: Dichloromethane = 85 : 15 (v/v)

5. 혈장 총 유리기 포집 항산화능 측정

최근에 개발된 혈장 총 유리기포집 항산화능 (TRAP, total radical-trapping antioxidant potential) 측정법은 혈장 내 α-tocopherol, ascorbate, urate, protein sulfhydryl groups 등의 항산화제들의 복합된 활성을 측정하여 혈장의 총 유리기 포집 항산화능을 나타내므로 시간과 노력을 절약할 수 있는 매우 유용한 방법이다. 혈장 중 TRAP은 Rice-Evans and Miller의 inhibition assay 법[33]에 따라 분석하였다. 이 방법은 ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazo- line 6-sulfonate), 150 μM)와 metmyoglobin (2.5 μM)을 H_2O_2 (75 μM)로 활성화시킴으로써 생성된 ferryl myoglobin radical species와의 상호 작용에 의해 형성된 ABTS radical cation의 absorbance를 측정하는데 기초를 두고 있으며 그 absorbance의 억제 정도는 sample (0.84% plasma)에 들어 있는 antioxidant capacity에 비례하게 된다. Sample을 6분 동안 30℃에서 배양한 후 UV/VIS spectrometer로 740 nm의 파장에서 absorbance를 측정하였다. 혈장의 TRAP 농도는 trolox의 calibration curve를 이용하여 계산하였으며 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity, mM)으로 표현하였다.

6. 적혈구 항산화 효소활성도 측정

적혈구내 superoxide dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GSH-Px), catalase 등의 항산화효소의 분석은 UV/VIS spectrometer에 의해 측정하였다. SOD는 적혈구 현탁액을 증류수로 용혈시킨 후 ethanol과 chloroform을 가하고 이를 3000 U/min, 2분 간 원심 분리하였다. 그 상층액을 여러 농도로 나누어 37℃에서 10분 간 배양한 후 20 μl의 pyrogallol을 첨가한 후 320 nm에서 180초 간 측정하였다. 적혈구내 SOD의 활성은 pyrogallol의 자동산화를 50% 억제하는 antioxidant capacity로 정의하였다.[34] GSH-Px는 과산화물 (t-butylhydroperoxide)에 의해 glutathione이 산화되는 반응을 촉매한다. 이 때 산화된 glutathione은 glutathione reductase와 NADPH의 존재하에 다시 glutathione으로 환원되고 NADPH는 NADP로 산화된다. 이를 이용해 용혈된 적혈구에 glutathione, glutathione reductase, NADPH를 첨가하고 37℃, 10분 간 배양한 뒤 t-butylhydroperoxide를 넣어 반응시켰으며 이 때 감소된 NADPH 농도를 340 nm에서 90초 간 측정함으로써 GSH-Px의 항산화 정도를 측정하였다.[35] Catalase의 활성은 용혈된 적혈

구에 50 mM phosphate buffer (pH 7)와 hydrogen peroxide를 첨가한 후 hydrogen peroxide의 감소량을 240 nm에서 30초 간 측정하였다.[36]

7. Alkaline comet assay을 이용한 임파구 oxidative DNA damage 측정

Alkaline comet assay는 선행연구[37]에서와 같이 Singh[38]의 방법을 수정, 보완하여 실시하였다. 임파구는 신선한 전혈 70 μl을 1 ml의 PBS에 섞은 후 Histopaque 1077를 이용하여 분리해 내었다. 임파구 DNA에 산화적 스트레스를 가하기 위해 200 μM H_2O_2를 사용하였다. Alkali lysis buffer를 사용하여 DNA의 double strand를 풀어주었으며 lysis가 끝난 slide를 전기영동 buffer로 40분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300 ± 3 mA의 전압을 걸어 20분 간 전기영동을 실시하였다. 20 μl/mg 농도의 ethidium bromide로 핵을 형광염색하고 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경 (Leica, Germany)으로 관찰하면서 CCD camera (Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image를 Komet 4.0 comet image analyzing system (Kinetic Imaging, UK)이 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 대상자 당 2개의 slide를 만들어 각각 50개씩 총 100개의 임파구에서 DNA 손상정도를 측정하였다.

8. 자료의 통계처리 및 각 요인과의 상관관계 분석

모든 자료는 MS의 excel database system을 이용하여 입력한 후 SPSS-PC+ 통계 package (version 7.0)를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치 ± 평균오차 (SE)를 구하였으며 흡연군과 비흡연군의 평균치 비교는 Student t-test로, 포도주스 섭취 전과 8주 섭취 후의 평균치에 대한 유의적인 차이는 Paired t-test를 통해 검증하였다. 변수들 간의 이변량 상관관계는 Pearson's correlation coefficient인 r계수로 검증하였다.

Table 2. Anthropometric parameters of the subjects before and after the 8 weeks grape juice supplementation trial

Variables	Smoker (male 29, female 0)		Nonsmoker (male 22, female 16)	
	0 wk	8 wk	0 wk	8 wk
Age (yrs)	32.4 ± 1.72[1)]		34.7 ± 1.8	
Height (cm)	172.4 ± 0.8		167.8 ± 1.1	
Weight (kg)	66.8 ± 1.9	66.8 ± 1.8	66.1 ± 1.7	66.3 ± 1.7
BMI (kg/m^2)	22.5 ± 0.6	22.5 ± 0.6	23.4 ± 0.4	23.5 ± 0.4
WHR[2)]	0.84 ± 0.0	0.84 ± 0.0	0.86 ± 0.0	0.86 ± 0.0
%overweight[3)]	103.4 ± 2.8	103.6 ± 2.8	109.3 ± 1.9	109.5 ± 1.9
Smoking habits (packyrs)[4)]	8.6 ± 1.1		0	

1) Values are mean ± S.E
2) WHR: waist/hip ratio
3) %overweight: analyzed using Inbody 3.0 (Biospace Co. Ltd)
4) packyrs = (cigarettes smoked/day X years smoked)/20

Table 3. Daily intake of antioxidant nutrients and cholesterol before and after grape juice supplemented for 8 weeks†

Variables	Smoker (n = 29)		Nonsmoker (n = 38)	
	0 wk	8 wk	0 wk	8 wk
Energy (kcal)	1687 ± 96	1749 ± 94^{NS}	1750 ± 82	1660 ± 73^{NS}
Vitamin A (RE)	622 ± 94	706 ± 96^{NS}	866 ± 123	748 ± 83^{NS}
Retinol (μg/d)	80 ± 18	150 ± 37^{NS}	164 ± 51	65 ± 10^{NS}
β-Carotene (μg/d)	3210 ± 529	3011 ± 463^{NS}	4073 ± 669	3713 ± 505^{NS}
Vitamin C (mg/d)	120 ± 29	81 ± 17^{NS}	100 ± 12	92 ± 10^{NS}
Vitamin E (mg/d)	10.5 ± 1.6	11.3 ± 1.1^{NS}	11.8 ± 1.3	12.0 ± 1.0^{NS}
Folate (μg/d)	243 ± 35	193 ± 16^{NS}	244 ± 24	218 ± 16^{NS}
Cholesterol (mg/d)	245 ± 36	387 ± 73^{NS}	301 ± 39	241 ± 31^{NS}

Values are mean ± S.E
†: Dietary intake includes the amount of nutrients contained in 480 ml of grape juice: vitamin C 92 mg, β-carotene 4.02 mg, α-tocopherol 1.02 mg, γ-tocopherol 0.06 mg, NS: No statistical differences were noted between 0 wk vs. 8 wks of grape juice supplementation in all variables by paired t-test

연구결과

1. 대상자의 일반사항의 변화

대상자를 흡연군과 비흡연군으로 나누어 설문지를 통하여 일반 인구 특성 및 흡연 등 생활습관을 조사하고 신체계측 조사 (신장, 체중, BMI, WHR 및 체지방량 등)를 실시한 결과는 Table 2와 같다. 흡연군의 평균나이는 32.4세, 비흡연군은 34.7세로 비흡연군의 평균 나이가 다소 높았으나 유의적인 차이는 보이지 않았으며, 흡연군과 비흡연군 사이의 신장, 체중, BMI, WHR, 체지방량으로 본 비만도 등도 유의적인 차이를 보이지 않았다. 실험을 시작하는 시점 (0 week)에 비해 8 주간의 포도 주스 섭취 이후 (8 weeks)에, 흡연자와 비흡연자 모두 체중, BMI, WHR 등 신체 계측치에 유의적인 변화가 나타나지 않았다 (Table 2).

2. 항산화 영양소의 섭취량 변화

포도 주스 섭취 전과 후의 항산화 영양소 섭취량의 변화를 본 결과는 Table 3과 같다. 우선 포도 주스 중재 연구 전 baseline 시점에서, 흡연군과 비흡연군의 항산화 영양소 섭취량에는 차이를 보이지 않았다. 8주 간의 포도 주스 섭취 후, 흡연군 및 비흡연군의 β-carotene, 비타민 C, 비타민 E 및 엽산 섭취량은 섭취 전과 차이를 보이지 않았으나, 흡연군에서 retinol과 cholesterol 섭취량이 유의적인 증가를 보인 반면, 비흡연군에서는 에너지, retinol, cholesterol 섭취량이 유의적인 감소를 보였다 (Table 3).

3. 항산화 영양상태의 변화

실험시작 전 baseline 시점에서 흡연군과 비흡연군의 항산화 영양상태를 분석하여 본 결과, 비흡연자에 비해 흡연자에게서 혈장 α-carotene 및 β-carotene 수준이 유의적으로 낮았으며, 혈장 비타민 C, α-tocopherol, γ-tocopherol, lycopene 및 혈장 TRAP 수준은 두 군간에 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다 (Table 4). 포도 주스 섭취 전과 후, 대상자의 혈장 항산화 비타민 수준 및 혈장 TRAP 수준의 변화를 보면, 8주 간의 포도 주스 섭취 후에 흡연군과 비흡연군 모두에서 혈장 γ-tocopherol 수준 및 혈장 TRAP 수준이 유의적으로 감소한 반면, 흡연군의 혈장 α-carotene과 lycopene 수준은 유의적으로 증가하였다 (Table 4). 대상자의 적혈구 항산화 효소 활성도를 보면, baseline 시점에서 흡연군과 비흡연군 간에 차이는 나타나지 않았다 (Table 5). 포도주스 섭취 8주 후에 흡연군과 비흡연군 모두에서 적혈구 catalase 활성도가 유의적으로 증가하였으며 비흡연군에서 GSH-Px 활성도가 증가하였다. 그러나 적혈구 SOD 활성도는 섭취 후에 유의적인 변화를 나타내지 않았다 (Table 5).

Table 4. Changes of plasma antioxidant vitamin levels before and after grape juice supplemented for 8 weeks

Variables	Smoker (n = 29)		Nonsmoker (n = 38)	
	0 wk	8 wk	0 wk	8 wk
Vitamin C (mg/dl)	1.13 ± 0.0	1.12 ± 0.0	1.21 ± 0.0	1.21 ± 0.0
Tocopherols (μg/dl)				
α-tocopherol	1697 ± 118	1680 ± 101	1858 ± 158	1718 ± 89
γ-tocopherol	233 ± 29	167 ± 16*	216 ± 14	168 ± 15*
Carotenoids (μg/dl)				
α-carotene	4.81 ± 0.57[a]	7.39 ± 0.99*	6.18 ± 0.48[b]	7.34 ± 0.92
β-carotene	17.66 ± 2.40[a]	27.46 ± 4.28	28.58 ± 3.22[b]	25.49 ± 3.63
Lycopene	6.43 ± 0.41	14.07 ± 2.54*	8.76 ± 0.83	14.94 ± 3.05
TRAP (mmol)	1.38 ± 0.02	1.30 ± 0.02**	1.37 ± 0.01	1.25 ± 0.02**

Values are mean ± S.E

*: significantly different between before vs. after grape juice supplementation by paired t-test ($p < 0.05$), **: significantly different between before vs. after grape juice supplementation by paired t-test ($p < 0.01$), a, b: epresent significant difference between smokers and nonsmokers by independent t-test at $p < 0.05$

Table 5. Changes of erythrocyte antioxidant enzyme level before and after grape juice supplemented for 8 weeks

Variables	Smoker (n = 29)		Nonsmoker (n = 38)	
	0 wk	8 wk	0 wk	8 wk
Catalase (K/g Hb)	35.4 ± 0.8	38.3 ± 0.71*	36.4 ± 0.7	39.0 ± 0.9**
GSH-Px (U/g Hb)	21.7 ± 1.4	23.2 ± 1.0	21.1 ± 1.0	26.7 ± 1.3**
SOD (U/g Hb)	2119 ± 27	2127 ± 42	2185 ± 28	2132 ± 36

Values are mean ± S.E

*: significantly different between before vs. after grape juice supplementation by paired t-test ($p < 0.05$), **: significantly different between before vs. after grape juice supplementation by paired t-test ($p < 0.01$)

4. 인체 임파구 DNA 손상도의 변화

체내 임파구 DNA 손상은 알칼리 환경의 전기영동을 이용한 COMET assay를 한 후 DNA 손상 정도를 세포의 파괴된 파편의 길이로 측정하였으며 Tail length (TL)와 Tail moment (TM)로 표현하였다. 전체 대상자들의 8주 간 포도주스 섭취에 의한 TL의 변화는 섭취 전의 88.75 ± 1.55 μm로 부터 섭취 후에는 70.25 ± 1.31 μm로 20.8% 정도 유의적으로 ($p < 0.001$) 감소됨을 볼 수 있었다 (Table 6, Fig. 1). 대상자를 흡연자와 비흡연자로 나누어 포도 주스의 섭취가 임파구 DNA 손상에 미치는 효과를 본 결과, 포도 주스 보충섭취 중재연구를 시작하는 시점에서 이미 흡연자들의 임파구 DNA는 비흡연자들에 비해 유의적으로 ($p < 0.05$) 많이 손상되어 있음을 볼 수 있었다 (Fig. 1). 8주 동안의 포도 주스 섭취 후, 흡연자와 비흡연자 모두에게서 TL로 본 임파구 DNA 손상이 감소되었으며 흡연자의 감소정도가 26% 정도인 것에 반해 비흡연자의 감소 정도는 17%를 보여, 포도 주스 섭취 후 흡연자의 DNA 손상의 감소의 폭이 비흡연자에 비해 훨씬 큰 것으로 나타났다 (Fig. 1). 한편 비흡연자 대상자를 남자와 여자로 나누어 포도 주스 섭취 후 DNA 손상변화를 본 결과에서도 마찬가지로 포도 주스 섭취 후에 남자와 여자 모두에게서 임파구 DNA 손상정도가 유의적으로 감소하였다 (data not shown).

5. 임파구 DNA 손상도와 항산화 영양상태의 상관관계 분석

대상자의 임파구 DNA 손상정도와 항산화 영양상태와의 상관관계를 분석한 결과는 Table 7과 같다. 먼저 흡연자와 비흡연자를 합한 전체 대상자의 경우, 포도 주스 섭취 전의 baseline에서 DNA 손상정도와 적혈구 catalase 활성도 및 혈장 TRAP 수준과 역의 상관관계를, 적혈구 GSH-Px 활성도와 정의 상관관계를 보였다. 이에 비해 섭취 8주 후에는 DNA 손상정도와 혈장 α-tocopherol 수준사이에 역의 상관관계를 보였다. 전체 대상자를 흡연에 따라 나누어 분석한 결과 흡연자의 경우, baseline에서 DNA 손상정도와 항산화 영양상태 사이에 아무런 상관관계도 나타나지 않았으나 8주 후에는 적혈구 SOD 수준과 정의 상관관계를 보였다. 이에 비해 비흡연자의 경우 포도 주스 섭취 전 baseline 시점에서 DNA 손상정도와 혈장 lycopene 수준이 역의 상관관계를 보인 반면, 적혈구 GSH-Px 활성도와는 정의 상관관계를 보였다. 한편 포도 주스 섭취 8주 후에는 DNA 손상정도와 혈장 α-tocopherol 수준이 역의 상관관계를, 혈장 TRAP 수준이 정의 상관관계를 보였다.

고 찰

최근 10여 년 동안 포도나 적포도주 섭취의 health benefit에 대한 관심도가 높아져 가고 있으며, 1990년대 초에는 프랑스인의 흡연이나 지방 섭취량이 3배나 높음에도 불구하고 심장질환 발생율이 다른 지역에 비해 현저히 낮은 것은 지역적인 특산물인 포도나 그 산물인 적포도주의 다량 섭취로 인한 것이라는 연구 결과가 보고되었다.[12] 특히 포도 내의 polyphenol 중 resveratrol (2,3',5-trihydroxystilbene)을 추출하여 세포에 처리하면 세포의 산화적 스트레스

Table 6. Changes of the degree of lymphocyte DNA damage (expressed as TL, % tail DNA and TM) assessed by comet assay before and after grape juice supplemented for 8 weeks

Variables	Total (n = 67)		Smoker (n = 29)		Non-smoker (n = 37)	
	0 wk	8 wk	0 wk	8 wk	0 wk	8 wk
Tail length (μm)	88.8 ± 1.6	70.3 ± 1.3**	93.7 ± 2.1[a]	69.7 ± 2.1**	85.0 ± 2.1[b]	70.7 ± 1.7**
Tail moment	14.9 ± 0.5	13.9 ± 0.4	15.7 ± 0.7	13.5 ± 0.7*	14.3 ± 0.7	14.2 ± 0.6

Values are mean ± S.E

*: significantly different between before vs. after grape juice supplementation by paired t-test ($p < 0.05$), **: significantly different between before vs. after grape juice supplementation by paired t-test ($p < 0.001$), a, b: represent significant difference between baseline smokers and nonsmokers by independent t-test at $p < 0.05$

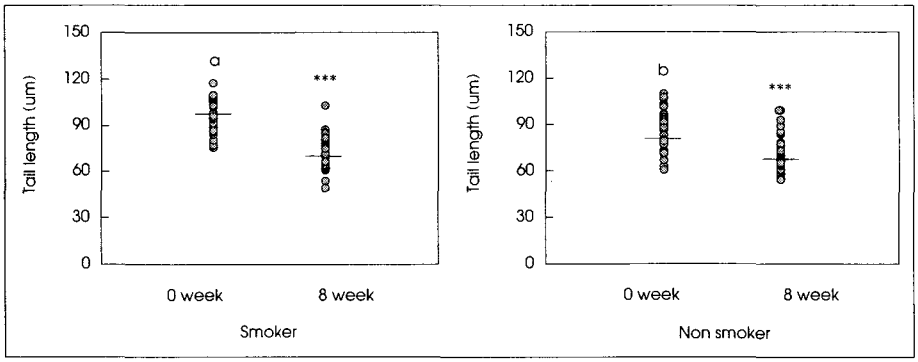

Fig. 1. Changes in lymphocyte DNA damage expressed as TL (tail length) in smoker and nonsmoker group. ***: $p < 0.001$ by paired t-test. a, b: represents significant difference between baseline in smokers and nonsmoker by independent t-test at $p < 0.05$.

Table 7. Correlation coefficiency r[1] between tail length (TL) and antioxidant variables before and after grape juice supplemented for 8 weeks

Variables	Tail length (μm)					
	Total (n = 67)		Smoker (n = 29)		Non smoker (n = 38)	
	0 wk	8 wk	0 wk	8 wk	0 wk	8 wk
Plasma Vitamin C	0.178	−0.076	0.310	−0.025	0.185	−0.109
Plasma tocopherols						
α-tocopherol	0.128	−0.298*	0.214	−0.256	0.134	−0.331*
γ-tocopherol	0.086	−0.210	0.102	−0.168	0.046	−0.241
Plasma carotenoids						
α-carotene	−0.069	0.121	−0.080	0.029	0.073	0.165
β-carotene	−0.083	0.180	−0.370	−0.083	0.170	0.322
Lycopene	−0.211	0.020	0.199	0.048	−0.344*	0.011
Erythrocyte enzyme activity						
Catalase	−0.305*	0.192	−0.266	0.186	−0.3	0.194
GSH-Px	0.341*	0.117	0.261	0.123	0.418*	0.115
SOD	−0.223	0.142	−0.260	0.409*	−0.092	−0.054
Plasma TRAP	−0.294*	0.212	−0.176	0.055	−0.240	0.325*

1) Pearson's correlation coefficiency r
*: significantly different between before vs. after grape juice supplementation by paired t-test ($p < 0.05$)

를 막아 DNA 손상이 감소된다는 연구 또한 보고된 바 있었으며,[39] *in vivo* 연구로, 건강한 성인 7명에게 포도 주스를 7일 동안 투여하였을 때 포도 주스의 섭취가 LDL의 산화를 지연시킨다고 보고되었다.[40] 따라서 본 연구에서는 포도 주스의 섭취가 흡연자의 임파구 DNA 손상에 보호효과를 가지는지 보고자하여 수행되었다.

먼저 흡연군과 비흡연군을 비교해 보면, 본 연구에서는 19~57세의 건강한 성인 남녀 67명을 흡연자 29명과 비흡연자 38명으로 나누어 두 군의 영양실태, 생활습관, 식습관 등을 조사하여 살펴 본 결과 두 군간의 영양섭취정도나 생활습관, 비만도 등에는 유의적인 차이가 없었다. 혈장 항산화 영양상태를 보면 비흡연자에 비해 흡연자에게서 혈장 α−carotene 및 β−carotene 수준이 유의적으로 낮았으며, 이들의 혈액 임파구를 분리하여 DNA 손상정도를 comet assay로 측정하여 본 결과, 흡연자들의 임파구 DNA 손상이 비흡연자에 비해 유의적으로 증가되어있음을 관찰 할 수 있었다. 이와 같은 결과는 흡연자들은 비흡연자에 비해 항산화 영양상태가 낮으며,[24,25] 흡연습관에 따라 흡연력과 흡연량이 많아질수록 임파구 DNA 손상도가 증가하였다는 연구들[17]과 일치하는 결과이다. 흡연자에게서 보이는 이러한 항산화 영양상태의 변화와 DNA의 손상 증가 현상은 흡연으로 인해 recactive oxygen species (ROS) 생성이 증가한 것이 직접, 간접적으로 관련되어 흡연자의 암이나 심혈관계 질환으로의 위험을 증가시키는 것으로 여겨진다.

흡연자와 비흡연자에게 천연 포도 주스를 480 ml씩 8주 간 보충 섭취시킨 후, 포도 주스 섭취 전과 후의 항산화 영양상태를 비교해 본 결과, 신체 내 총 항산화력을 나타내주는 혈장 TRAP 수준은 기대와는 달리 흡연군과 비흡연군 모두에서 포도 주스 보충섭취 후에 유의적으로 감소하였다. 그러나, 포도 주스 섭취 전과 후의 TRAP 수준이 모두 TRAP의 정상범위인 0.8~1.51 mM 안에 들어 있으므로 이 결과에 큰 의미는 없을 것으로 생각된다. 한편, 영양중재연구가 진행되는 8주 동안 항산화 영양소의 섭취량에 큰 변화가 없었음에도 불구하고 흡연자와 비흡연자의 혈장 carotenoids 수준이 증가하였다. Muller 등[41]의 보고에 따르면 당근과 시금치를 섭취한 건강한 대상자들의 혈장 carotenoids가 증가하였으며 α, β−carotene이 풍부한 당근 섭취 후 혈장 내 α, β−carotene 수준이 증가하고 β−carotene 함량만 높은 시금치 섭취 후에는 혈장 β−carotene 수준만 증가하였다. 본 연구에서는 포도 주스 섭취 후 흡연자의 혈장 α−carotene, β−carotene 및 lycopene 수준이 증가한 것은 포도 주스에 polyphenol 함량이 풍부하여 다른 항산화 영양소의 절약작용을 보이는 것으로 추정해 볼 수도 있으리라고 생각된다. 한편 polyphenol이 풍부한 포도 주스 섭취 후 항산화 효소 활성도가 모두 증가할 것으로 기대가 되었으나, 적혈구 catalase 및 GSH−Px 활성도는 증가한 반면 SOD 활성도는 변화가 없었다. Jaruga 등[42]은 항산화 비타민을 섭취하는 동안 DNA 손상은 감소하나 SOD와 catalase 활성도가 증가함을 보고하였고, Brennan 등[43]은 거꾸로 항산화 비타민 섭취가 흡연자의 DNA 손상은 감소시키나 SOD와 GSH−Px 활성을 감소시킨다고 하였다. 한편 Kim 등[44]은 polyphenol이 풍부한 식이를 투여한 기간 동안

SOD 활성도가 증가하였다고 보고하였다.

포도 주스 Intervention 연구결과, 8주 동안의 포도 주스 보충 섭취 후 흡연자와 비흡연자 모두에게 있어서 임파구 DNA 손상정도가 21% 감소하였으며, 흡연자의 경우는 26%, 비흡연자는 17%나 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 포도 주스 섭취 후 DNA 손상이 감소됨과 동시에 흡연자의 혈장 carotenoids 수준이 증가하였고, 적혈구 catalase 활성도가 증가한 것으로 보아 흡연자의 항산화 영양상태 개선과 DNA 손상 감소는 연관이 있는 것으로 보인다. 이를 확인하기 위하여 대상자의 DNA 손상 정도와 항산화 영양상태와의 관련성을 분석한 결과, 흡연 여부 혹은 포도 주스 섭취 전과 후에 따라 상관관계 양상이 다르게 나타났다. Baseline 시점에서 전체 대상자의 경우, DNA 손상정도와 적혈구 catalase 활성도 및 혈장 TRAP 수준과 역의 상관관계를 보여 catalase 및 총항산화능 (TRAP)으로 본 항산화 영양상태가 좋을 수록 DNA 손상 정도가 낮아진다는 점을 확인할 수 있었으나, 항산화 효소 중 GSH-Px 활성도와는 정의 상관관계를 보여 이 사실을 뒷받침 할 수 없었다. 또 이와같은 상관관계는 흡연 여부에 따라서도 다르게 나타나서 흡연자의 경우, 항산화 영양상태와 DNA 손상 사이에 아무런 상관관계도 나타나지 않은데 비해 비흡연자의 경우 DNA 손상정도는 혈장 lycopene 수준과 역의 상관관계, 적혈구 GSH-Px 활성도와 정의 상관관계를 보였다. 또 8주간의 포도 주스 섭취 후에는 DNA 손상정도와 혈장 α-tocopherol 수준이 역의 상관관계를 보였다. 이와 같은 결과로부터, DNA 손상과 항산화 비타민 및 항산화 효소 활성도가 부분적으로 역의 상관관계를 보이지만 대상자의 흡연 여부에 따라 다르게 나타나며 포도 주스 섭취 전 후에 따라서도 다르게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 포도 주스 보충 섭취 후 나타난 임파구 DNA 손상 감소 효과의 기전이 혈장 TRAP 수준이나 carotenoids를 비롯한 항산화 비타민 영양상태의 개선이라는 요인에도 기인하지만, flavonoids와 관련된 다른 기전도 관계되어 나타날 가능성을 제시하여 주며,[45] 부분적으로 항산화효소인 catalase 활성도의 증가와 관련이 있을 것임을 시사해 준다.

전 세계적으로 건강한 흡연자에게 포도 주스를 보충 섭취케 한 후 임파구 DNA 손상 정도를 관찰한 연구는 아직 보고되지 않고 있으며 이런 시점에서 본 연구결과 포도 주스 섭취로 인해 흡연자의 임파구 DNA 손상이 의미 있는 수준으로 감소한 것은 매우 고무적인 연구결과라고 할 수 있다. 즉, 포도 주스 섭취 전에 훨씬 많이 손상되었던 흡연자의 임파구 DNA가 8주 동안 하루에 2컵씩의 포도 주스 섭취 후 비흡연자 수준으로 거의 회복되는 것으로 보아, 포도 주스의 섭취를 통해 흡연자의 각종 암 발생 위험율을 감소시키고 이로 인해 암을 예방할 수 있을 가능성을 제시할 수 있었다.

그 동안 국내외에서 포도 주스 외에 다른 야채나 과일 주스를 사용하여 인체 영양중재 연구를 수행한 후 DNA 손상 감소효과를 본 연구로는 폴리페놀이 다량 함유된 주스,[46] 토마토, 시금치 및 당근 등 야채 주스를 사용한 연구,[47] 그리고 국내에서 녹즙[29]을 섭취시킨 연구들이 보고되었다. Bub 등[46]은 건강한 성인에게 cyanidin glycosides와 epigallocatechin gallate가 함유된 주스를 2주 동안 섭취시킨 결과 DNA 손상 정도가 현저히 감소함을 관찰하였다. Pool-Zobel 등[47]은 27~40세의 건강한 비흡연자를 대상으로 lycopene을 강화한 토마토 주스, β-carotene과 α-carotene을 강화한 당근 주스, 그리고 lutein을 강화한 말린 시금치 가루를 연속하여 섭취시킨 후에 임파구 DNA의 endogenous strand breaks가 감소하였으며 특히 oxidative base damage는 당근 주스 섭취시에 현저히 감소하는 것을 관찰하여 보고하였다. 한편 국내에서의 연구로는 흡연자에게 신선초 녹즙을 6주간 섭취 시킨 후에 comet assay로 관찰한 임파구 DNA 손상 정도가 유의적으로 감소함이 보고되었다.[29]

이상의 결과에서 흡연자의 DNA 손상이 비흡연자에 비해 높았음과 8주 동안의 포도 주스 섭취는 흡연자의 임파구 DNA 손상 정도를 억제시키는 것을 관찰함으로써 인체 DNA 손상을 monitoring 하는 biomarker로 alkaline comet assay가 훌륭하게 활용될 수 있음을 확인하였다. 또 8주 간의 포도 주스의 보충 섭취 후 나타난 적혈구 catalase 활성도 증가 및 DNA 손상 감소를 통해 포도 주스의 보충 섭취는 궁극적으로 흡연자의 항산화 상태를 개선할 뿐 아니라 임파구 DNA 손상을 효과적으로 억제시키는 것을 알 수 있었다. 그러나 인체항산화 영양상태를 알아보는 biomarker로서의 혈장 TRAP 분석법은 본 연구 대상자에게 민감하지 않은 것으로 나타남에 따라 인체 항산화 영양상태를 알아보기 위한 다른 민감한 분석법이 개발되어야 할 것으로 생각된다. 앞으로 DNA 손상 회복으로 본 포도 주스의 암 예방효과에 대하여 보다 자세한 기전을 밝히는 연구가 요구된다. 본 연구 결과는 앞으로 alkaline comet assay를 이용한 다양한 DNA 손상관련 임상실험과 영양중재실험을 시작하는데 널리 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

결 론

본 연구 결과, 하루에 2컵씩 8주간의 포도 주스 보충 섭취는 흡연자의 혈장 carotenoids 수준 및 적혈구 catalase

활성도를 증가시키고 임파구의 DNA 손상정도를 회복시키는 것을 확인하였으며 이로써 흡연자의 포도 주스 섭취는 흡연자에게 그 위험성이 증가하는 각종 암을 예방하는 효과가 있을 가능성을 제시할 수 있다. 이러한 포도 주스의 효과는 포도 주스 내에 다량 함유된 여러 항산화 물질의 항산화 기능으로 인해 나타난 것으로 생각되며, 이 항산화 물질들이 흡연자의 산화 스트레스로 인한 임파구 DNA 손상을 효과적으로 감소시켰을 것으로 추정해 볼 수 있다. 그러나 인체의 항산화 영양상태를 알아보는 biomarker로 혈장 TRAP 분석법은 본 연구 대상자에게 민감하지 않은 것으로 나타났다.

Literature cited

1) Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922, 1993
2) Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in men. *J Mol Med* 74: 297-312, 1996
3) Park E, Kang MH. Smoking and High Plasma Triglyceride Levels as Risk Factors for Oxidative DNA Damage in the Korean Population. *Ann Nutr Metabolism* 48(1): 36-42, 2004
4) Dhawan A, Mathur N, Seth PK. The effect of smoking and eating habits on DNA damage in Indian population as measured in the Comet assay. *Mutation Res* 474(1-2): 121-128, 2001
5) Hakim IA, Harris RB, Brown S, Chow HH, Wiseman S, Agarwal S, Talbot W. Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study. *J Nutr* 133(10): 3303S-3309S, 2003
6) Porrini M, Riso P, Oriani G. Spinach and tomato consumption increases lymphocyte DNA resistance to oxidative stress but this is not related to cell carotenoid concentration. *Eur J Nutr* 41(3): 95-100, 2002
7) Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339: 1523-1526, 1992
8) Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342: 1007-1011, 1993
9) Criqui MH, Ringel BL. Does diet or alcohol explain the French paradox? *Lancet* 344: 1719-1723, 1994
10) Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155: 382-386, 1995
11) Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J* 312: 478-481, 1996
12) Ulbright TLV, Southgate DAT. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* 338: 985-992, 1991
13) Vinson JA, Yang JH, Proch J, Liang X. Grape juice, but not orange juice, has in vitro, ex vivo, and in vivo antioxidant properties. *J Med Food* 3(4): 167-171, 2000
14) Singh RB, Niaz MA, Rastogi S. Usefulness of antioxidant vitamins in suspected acute myocardial infarcion (The indian experiment of infarct survival-3). *Am J Cardiol* 77: 232-236, 1996
15) Kromhout D. Fatty acids, antioxidants, and coronary heart disease from an epidemiological perspective. *Lipids* 34: S27-31, 1999
16) Retsky KL, Freeman MW, Frei B. Ascorbic acid oxidation product (s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. *J Biol Chem* 268: 1304-1309, 1993
17) 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
18) 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
19) Osmon H, Maalej N, Shanmuganayagam D, Folts JD. Grape juice but not orange or grapefruit juiceinhibits platelet activity in dogs and monkeys. *J Nutr* 128: 2307-2312, 1998
20) 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 Metabolism* 41(6): 353-357, 1997
21) Miyagi Y, Miwa K, Inoue H. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am J Cardiol* 80: 1627-1631, 1997
22) Stein JH, Keevil JG, Donald DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 100: 1050-1055, 1999
23) Chou EJ, KEevil JG, Aeschlimann S, Wiebe DA, Folts JD, Stein JH. Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol* 88: 553-555
24) Lim JY, Kim JH. The effects of smoking on antioxidative enzyme activities in male adolescents. *Korean J Comm Nutr* 7(6): 844-851, 2002
25) Kang MH, Park EJ. Effects of smoking and regular physical exercise habits on the status of plasma lipidsoluble antioxidant vitamins and ubiquinone (coenzyme Q10) in Korean middle-aged men. *Korean J Nutr* 33(2): 158-166, 2000
26) Lee JH, Kang MH. Effects of smoking and age on SCE frequency reflecting DNA damage of human lymphocytes in elderly Koreans. *Korean J Nutr* 36(8): 851-858, 2003
27) Kim MK, Chang MJ. The Quantitative determination of reversible and irreversible oxidative damages induced by smoking cessation and supplementation of antioxidative vitamins in Korean Male Smokers. *Korean J Nutr* 33(2): 167-178, 2000
28) Kim WK. Effects of vitamin C supplementation on immune status in smoking and nonsmoking male college students. *Korean J Nutr* 31(8): 1244-1254, 1998
29) Kim JS, Kim HY, Park YK, Kim TS, Kang MH. The effects of green vegetable juice (Angelica Keiskei) supplementation on plasma lipids and antioxidant status in smokers. *Korean J Nutr* 36(9): 933-941, 2003

30) Recommended dietary allowances for Koreans, 7th revision, Korean Nutrition Society, 2000
31) Pesce AJ, Kaplan LA. Methods in clinical chemistry. The C.V. Mosby Company, 1987
32) Genser D, Kang MH, Vogelsang H, Elmadfa I. Status of lipid-soluble antioxidants and TRAP in patients with crohn's disease and healthy controls. *Eur J Clin Nutr* 53: 675-679, 1999
33) Rice-Evance C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology* 234: 279-293, 1994
34) Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474, 1974
35) Beutler E. Glutatione peroxidase. In: Red cell metabolism: A manual for biochemical methods, pp.71-73, Verlag Grune and Straton. New York, 1984
36) Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, ed. Methods of enzymatic analysis, pp.673-678, Verlag Chemie. Weinheim, 1974
37) Park EJ, Kang MH. Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human biomonitoring. *Korean J Nutr* 35(2): 213-222, 2002
38) 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
39) 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
40) 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
41) Muller H, Bub A, Watzl B, Rechkemmer G. Plasma concentrations of carotenoids in healthy volunteers after intervention with carotenoid-rich Food. *Eur J Nutr* 38(1): 35-44, 1999
42) Jaruga P, Jaruga B, Gackowski D, Olczak A, Halota W, Pawlowska M, Olinski R. Supplementation with antioxidant vitamins prevents oxidative modification of DNA in lymphocytes of HIV-infected patients. *Free Radic Biol Med Mar* 1; 32(5): 414-420, 2002
43) Brennan LA, Morris GM, Wasson GR, Hannigan BM, Barnett YA. he effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H2O2-induced DNA damage in human lymphocytes. *Br J Nutr Aug*; 84(2): 195-202, 2000
44) Kim HY, Kim OH, Sung MK. Effects of phenol-depleted and phenol-rich diets on blood markers of oxidative stress, and urinary excretion of quercetin and kaempferol in healthy volunteers. *J Am Coll Nutr Jun*; 22(3): 217-223, 2003
45) Aherne SA, O'Brien NM. Protection by the flavonoids myricetin, quercetin, and rutin against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cells. *Nutr Cancer* 34(2): 160-166, 1999
46) Bub A, Watzl B, Blockhaus M, Briviba K, Liegibel U, Muller H, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J Nutr Biochem* 14(2): 90-98, 2003
47) Pool-Zobel BL, Bub A, Muller H, Wollowski I, Rechkemmer G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis* 18(9): 1847-1850, 1997