

마늘의 조리방법에 따른 DNA 손상 보호 효과의 비교

김정미 · 전경임 · 박은주[†]

경남대학교 식품영양학과

Protective Effect of Garlic (*Allium sativum* L.) Extracts Prepared by Different Processing Methods on DNA Damage in Human Leukocytes

Jung-Mi Kim, Gyeong Im Jeon, and Eunju Park[†]

Dept. of Food and Nutritional Science, Kyungnam University, Gyeongsan 631-701, Korea

Abstract

DNA damage including base modifications, loss of base and breaks in DNA strands can occur by exposure to irradiation, smoking and several components of food. Unrepaired DNA damage is known to lead to cellular dysfunction, cell death, cancer, and other diseases such as arteriosclerosis and diabetes. The protective effect of garlic on oxidative stress induced DNA damage has been reported recently. In this study, we investigated the protective effect of garlic extracts prepared by different processing methods (raw garlic extracts, RGE; grilled garlic extracts, GGE; pickled garlic extracts, PGE) on leukocytic DNA damage using comet assay. Human leukocytes were incubated with ethanol and methanol extract of garlic at various concentrations (1, 5, 10, 50 µg/mL), followed by oxidative stimuli (200 µM H₂O₂ or 200 µM 4-hydroxynonenal (HNE)). The methanol and ethanol extracts of RGE, GGE, and PGE showed inhibitory activities of DNA damage induced by H₂O₂ or HNE. Especially methanol extract of RGE (ED₅₀: 13.3 µg/mL) had a higher antigenotoxic effect on H₂O₂ induced DNA damage than those of GGE (23.5 µg/mL) or PGE (24.5 µg/mL). HNE induced DNA damage tended to be effectively inhibited by the lower concentration of all garlic extracts. Therefore, garlic might have protective effects against oxidative DNA damage regardless of processing methods (raw, grilled, pickled) which are the general consumed forms of garlic in Korea.

Key words: garlic, DNA damage, H₂O₂, HNE, human leukocytes, comet assay

서 론

유전 정보를 지니고 있는 핵 안의 DNA는 세포내에서 가장 중요한 요소 중 하나이다. 그러나 DNA는 자발적으로 일어나는 nucleotide의 화학적 변화, 림프세포에서 일어나는 프로그램화된 이중 나선 손상(programmed double strand breaks, DSB)과 같은 불가피한 내부요인과 자외선, 방사선과 같은 외부 환경요인에 의해 계속적인 손상을 겪게 된다(1). 특히, hydroxyl radical(\cdot OH), superoxide ion radical(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 정상적인 대사과정, 흡연 등에 의해 과도하게 발생되어 세포 손상을 야기하는 것으로 알려져 있다. 이들은 DNA 사슬을 절단하거나, DNA의 구성 성분인 guanine과 반응하여 8-hydroxyguanine을 생성하는 등 치명적인 세포 손상을 유도한다(2). 또한 ROS는 인체를 구성하는 세포막의 불포화지방산을 산화시켜 유독성의 산화 생성물을 만들게 된다. ROS가 불포화지방산의 methylene기로부터 수소원자를 탈취함으로써 개시된 지질과산화는 산

소 공급 하에서 연쇄 반응을 통해 계속적으로 진행된다(3). 인간 세포에서 생성되는 유독성 산화생성물은 100여 종이 넘는 것으로 알려져 있으며(4), 대표적인 지질과산화물질로는 malondialdehyde, 4-hydroxynonenal(HNE), aldehyde, epoxide 등이 있다. 이들은 세포 독소로 작용하거나 세포 신호 전달에 강력한 효과를 나타내어 초기 돌연변이 세포가 암세포로 전환되는 과정을 촉진한다.

이처럼 세포가 ROS로부터 받는 공격은 하루에 약 150,000 회에 이르는 것으로 알려져 있지만 정상세포의 경우 손상된 세포에 즉각 반응하여, 특정 신호전달 체계를 통해 손상 세포의 성장을 막고 DNA를 복원시킨다. 그러나 손상 정도가 심하거나 세포의 복원 능력이 저하된 상태에서는 손상된 세포를 사멸 또는 노화와 같은 과정을 통해 손상된 유전 정보의 전달을 배제시키게 된다. 이때 손상된 DNA가 복원되거나 사멸하지 못하고 돌연변이 세포로 될 경우 암을 비롯한 여러 질병의 직접적인 요인으로 작용할 수 있다(2).

암은 개시(initiation), 촉진(promotion), 그리고 진행(progression)의 세 과정으로 진행된다. 개시단계는 생체 내에서

[†]Corresponding author. E-mail: pej@kyungnam.ac.kr
Phone: 82-55-249-2218, Fax: 82-55-244-6504

대사가 활성화된 발암인자가 유전자의 핵산에 결합함으로써 정상세포의 DNA를 손상시키는 비가역적 과정이다. 한편 촉진단계의 경우 조직의 염증이나 산화적 스트레스에 의해 유도되며 약 20~30년 동안 서서히 진행되는 가역적인 과정이다. 따라서 이미 암이 개시된 경우라도 소염, 항산화 작용을 갖는 물질을 통해 촉진단계로의 이행을 억제 또는 지연시킴으로써 암 진행을 막을 수 있을 것이다(5).

마늘(*Allium sativum* L.)은 세계가 인정하는 10대 건강식품 중 하나이며, 특히 항암에 도움을 주는 식재료로 기능성식품의 발전을 위한 가장 주요 후보 중 하나로 지목되고 있다. 마늘은 파, 양파, 부추, 달래 등과 함께 백합과(*Liliaceae*) 과 속(*Allium*)에 속하는 다년생 초본으로(6), 원산지는 중앙아시아이며 중국을 거쳐 우리나라에 전래되어 현재까지 대표적인 향신료로 널리 이용되고 있다. 마늘은 단순한 향신료로서의 차원을 넘어 다양한 생물학적 효력을 가지는 것으로 보고되고 있는데, 대표적으로 항 혈전, 항암, 혈압강하, 콜레스테롤 저하 및 노화방지 작용이 알려져 있으며(7), 이러한 기능성은 allicin(diallyl thiosulfinate), methyl allyl, 1-propenyl allyl, allyl 1-propenyl, 1-propenyl, dimethyl thiosulfinate 등의 thiosulfonates 화합물에서 기인하는 것으로 보고되어 있다(8). Thiosulfonates 화합물의 60~80%를 차지하는 중요한 화합물인 allicin은 마늘을 절단할 경우 alliinase에 의해 전구체인 alliin(S-allyl-L-cysteine sulfoxide)으로부터 만들어지며 이는 항균, 혈중 지질 및 혈당저하 효과와 HMG-CoA reductase 저해를 통한 콜레스테롤생합성 억제 효과가 있다(9). 농림수산부 통계에 의하면 1980년대 초반 마늘 1인당 소비량은 5 kg대이었으며, 1990년대 초반에 10 kg까지 증가하였다가, 1990년대 중반 이후부터 2007년까지 9.2~10.8 kg 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 이는 1일 평균 섭취량으로 환산했을 시 27.4 g을 소비하는 것과 같다. 또한 농수산물유통공사에 의하면 2001년 마늘의 소비처별 점유율은 가정 40%, 요식업소 45%, 가공업체 15% 수준으로 확인되어 있으며, 이용 형태로는 생마늘 25.2%, 다진 마늘 70%, 장아찌 3.3%, 건조 마늘(가공업체 조미료용) 1.5%로 확인되었다. 또한 마늘의 유효 성분이 알려지고 마늘 가공품도 다양화되면서 구운 마늘로 제조한 환 형태와 추출 후 가공한 진액 형태로 소비되는 경우도 있다.

그러나 마늘의 기능성에 대한 연구는 주로 생마늘(10-15)을 위주로 이루어져, 가공 처리된 마늘에 대한 연구(16,17)는 소수에 불과하며, 여러 가지 조리 조건에 따른 활성을 비교한 연구(18-23)는 조리법의 다양성에 비해 미흡한 실정이다. 또한 지질과산화물 중 하나인 HNE로 DNA 손상을 유도한 실험은 극히 드물며, 이를 마늘의 DNA 손상 보호 효과에 응용한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 HNE, H₂O₂에 의해 유도된 DNA 손상에 대한 생마늘, 구운 마늘, 초절임 마늘의 억제 효과를 검증하고자 하였다. 한편, 식품 내 생리활성 물질은 극성과 hydroxylation, glycosyla-

tion 정도와 같은 화학구조에 따라 용해도가 결정되므로 시료의 추출방법에 따라서 그 생리적 효과가 다를 것으로 사료되어 추출 용매로 에탄올과 메탄올 두 가지를 사용하였다.

재료 및 방법

시료 추출

추출용으로 사용된 마늘은 모두 경남 남해 산 마늘로 생마늘과 초절임 마늘을 구입하여 에탄올, 메탄올 100 mL에 각각 5 g의 마늘을 넣어 실온(20~23°C)에서 72시간 동안 환류 추출하였다. 구운 마늘의 경우 구입한 생마늘을 낱알로 분리한 후 호일로 싸서 기름기 없는 팬에서 약 20분간 구워 추출에 사용하였다. 현탁액은 여과(Whatman filter paper No. 1, Tokyo, Japan)한 후 rotary vacuum evaporator(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 38~40°C 항온수조에서 감압 농축하였다. 농축물은 10 mg/mL의 농도로 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 4°C에서 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 본 실험에 사용하였다.

혈액 내 백혈구 분리

건강한 성인 남성 2명으로부터 공급받은 신선한 전혈을 Histopaque 1077을 이용해 백혈구를 분리한 후 본 실험에 사용하였다.

시료의 처리 및 산화적 스트레스 유발

준비된 백혈구 세포에 각 추출 시료를 1, 5, 10, 50 µg/mL의 농도로 처리하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 백혈구를 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하고 인위적으로 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 200 µM의 H₂O₂를 4°C에서 5분 또는 HNE를 37°C에서 30분 간 처리한 후 세척하였다. 양성 대조군(positive control, PC)은 추출 시료 처리 없이 200 µM H₂O₂ 또는 HNE를 처리하였고, 음성 대조군(negative control, NC)의 경우 시료와 인위적 스트레스 처리 없이 PBS만 처리하였다.

DNA 손상 측정(comet assay)

시료 및 산화적 스트레스 처리가 끝난 백혈구는 comet assay(24)를 위해 0.7% low melting agarose gel(LMA) 75 µL와 섞어 1.0% normal melting agarose(NMA)가 pre-coating된 normal slide 위에 골고루 분산한 후 cover glass를 덮어 4°C에 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗겨내고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 µL를 분주하였다. 4°C 냉장 보관한 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris)에 1% Triton X-100을 사용 직전 혼합 후 slide를 침지하여 저온, 암실에서 1시간 방치하여 이중 나선을 풀어주었다. Lysis가 끝난 후, slide를 electrophoresis tank에 배열하고 4°C 냉장 보관한 전기영동 buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA, pH>13)를 채워 40분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali labile sites가 노출되도록

록 하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 어두운 조건에서 25 V/300±3 mA의 전기를 가하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris buffer(pH 7.4)에 10분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 slide를 건조시켰다. 20 µL/mL 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경(Leica, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였다. CCD camera(Nikon, Tokyo, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 Komet 5.0 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, Liverpool, UK)이 설치된 컴퓨터로 분석하였다. 백혈구의 H₂O₂에 의한 DNA 손상 및 각 시료에 의한 손상억제 정도는 핵으로부터 이동해서 꼬리 부분으로 떨어져 나간 % Tail DNA를 측정하였다. 각각의 처리구에서 2개의 slide를 만들어 각각 100개 세포의 DNA 손상 정도를 측정하고 각 처리구는 3회 반복 실험하였다.

통계처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준오차(SE)를 구하고 각 물질의 DNA 손상 억제 정도를 비교하기 위해 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F 값을 구하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

H₂O₂에 대한 조리방법별 마늘 추출물의 DNA 손상 억제 효과

세포내 DNA 손상도를 측정하는 방법에는 micronuclei (MN), chromosomal aberration(CA), sister chromatid exchanges(SCE), 8-OHdG법이 있으며 이보다 실험절차가 간편하고 민감하여 *in vitro*, *in vivo* 연구뿐 아니라 분자 역학적으로 광범위하게 사용되는 comet assay(single-cell gel electrophoresis)가 있다(25). 세포 수준의 DNA 손상을 직접적으로 확인할 수 있는 전기영동기술(microelectrophoresis)은 1984년 Ostling과 Johanson(26)에 의해 처음 소개되었으며, 이는 슬라이드상의 agarose 위에 세포를 띄워 고농도의 세척액과 염 용액으로 단백질을 분해한 후 중성 및 알칼리 조건에서 전기영동을 수행하는 방법이다.

Singh(24) 등은 이전의 comet assay법을 참고하여 X-선 또는 H₂O₂에 의한 DNA 손상을 분석하기 위해 알칼리 전기영동을 사용하였다. 이 분석법은 pH 12.3 이상의 높은 pH에서 알칼리 풀림, 알칼리 용해, 그리고 알칼리 당 침전이 순서대로 일어나게 된다. 손상된 DNA 절편은 인산기에 의해 (-) 전하를 띠므로 전기장의 힘에 의해 anode 쪽으로 이동하여 혜성(comet) 모양을 띄게 되며 이는 염색 시 밝은 형광색을 띄게 된다. DNA 손상이 증가할수록 핵으로부터 anode 쪽으로 이동한 DNA가 많으므로 꼬리 부분의 형광 강도와 길이

는 절단된 DNA 나선 수에 비례하며, 손상되지 않은 세포는 꼬리가 없는 원형 그대로의 핵 모양을 유지한다. 이러한 comet assay는 단일 세포에서 DNA 손상 정도를 직접 측정할 수 있어 특정 처리에 의한 중앙반응을 예견할 수 있는 매우 유용한 연구 방법이다. 그러므로 DNA 손상 억제를 통한 항암 물질 탐색 연구에 comet assay가 적합하며, 실제로 흡연자의 DNA가 비흡연자에 비해 유의하게 증가되어 있음이 comet assay를 통해 확인된 연구가 보고되어 있다(27). 따라서 본 연구에서 마늘의 항 유전 독성 효과를 관찰하기 위해 Singh 등(24)에 의한 DNA comet assay를 실시하였으며 인위적인 스트레스 물질로는 H₂O₂ 또는 HNE를 사용하였다.

H₂O₂는 미토콘드리아 전자전달계에서 불완전한 전자전달로 인해 superoxide의 dismutation을 통해 생성되거나 백혈구의 탐식 과정에서 발생되어(28), 심각한 세포 손상에 관여하는 것으로 알려져 있다. H₂O₂에 의한 DNA 손상의 원인으로 Khanna와 Jackson(29)은 enzymatic DNA digestion과 chromatin 고리와 chromosomes의 oligomers 삭제, Deutsch(30)는 염기 변형과 strand breakage를 지목한 바 있다. 또한 고농도의 H₂O₂는 베타 세포의 과분극(hyperpolarization)을 유발하고 K⁺ 전류를 증가시켜 인슐린 분비를 억제하는 등 세포 기능을 저해하는 것으로 알려져 있다(31).

H₂O₂에 대한 마늘 추출물의 DNA 손상 보호 효과는 Fig. 1에 제시하였다. 마늘 추출물을 1, 5, 10, 50 µg/mL의 농도로 백혈구에 처리한 후 200 µM의 H₂O₂로 DNA 손상을 유도한 결과, 조리법 또는 추출용매 및 처리 농도와 상관없이 모든 추출물에서 양성 대조군(PC)에 비해 DNA 손상이 줄어든 것으로 나타났다. 메탄올 추출물 1 µg/mL 처리군의 경우, DNA 손상 억제력이 구운 마늘 28.8%, 초절임 마늘 23.3%로 나타난 반면 생마늘의 경우 56.4%로 나타나 특히 생마늘은 저농도에서도 항 유전 독성 효과가 탁월한 것을 알 수 있었다. 메탄올 추출군도 생마늘, 구운 마늘, 초절임 마늘의 모든 추출물이 1 µg/mL의 저농도를 포함한 모든 농도에서 양성 대조군에 비해 유의적으로 DNA 손상이 줄어든 것으로 나타났다. 50 µg/mL의 고농도 추출물 중 특히 생마늘 메탄올 추출물은 손상된 DNA가 9.7±0.14%로 나타나 무처리군 음성 대조군(6.0±0.3%)과 거의 비슷한 수치를 보여 DNA 손상 억제 효과가 월등함을 수 있었다. 이러한 결과는 조리방법에 따른 모든 농도, 모든 용매의 DNA 손상도(tail intensity(%))의 합으로 구한 Fig. 2와 H₂O₂로 유도한 DNA 손상을 50% 억제하는데 필요한 추출물의 양을 의미하는 ED₅₀ 값(Fig. 3)에서 확인되었다.

이처럼 생마늘군의 효과가 월등한 것은 열 또는 산 처리로 인한 유효 성분의 손실이 없었던 것에서 기인된 결과로 사료되며, 마늘의 항암 성분인 diallyl disulfide, methyl allyl sulfide가 특히 생마늘에서 다량 검출되었다고 보고한 Kim과 Mo(16)의 연구와 일맥상통하는 결과이다. 또한 이는 Cu⁺²와

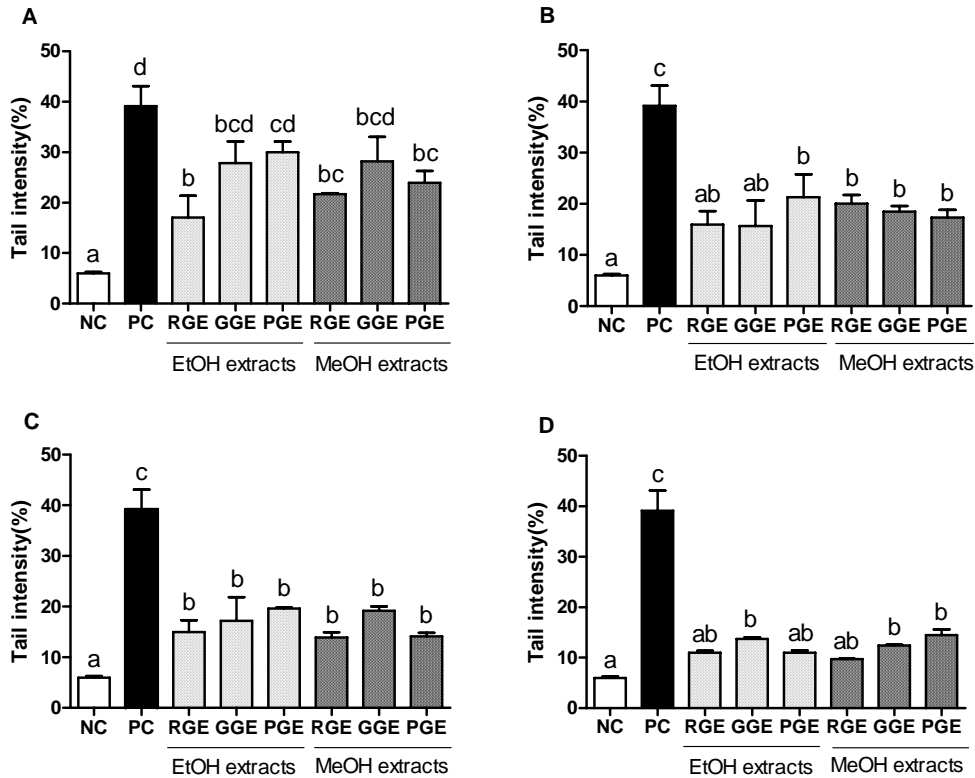


Fig. 1. The effect of supplementation *in vitro* with different concentrations of garlic extracts on 200 µM H₂O₂ induced DNA damage in human leukocyte. A, 1 µg/mL ethanol or methanol extracts prepared by different processing methods; B, 5 µg/mL ethanol or methanol extracts prepared by different processing methods; C, 10 µg/mL ethanol or methanol extracts prepared by different processing methods; D, 50 µg/mL ethanol or methanol extracts prepared by different processing methods. NC, negative control (without oxidative stimulus); PC, 200 µM HNE treated positive control; RGE, raw garlic extracts; GGE, grilled garlic extracts; PGE, pickled garlic extracts. Values not sharing the same letter are significantly different from one another (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

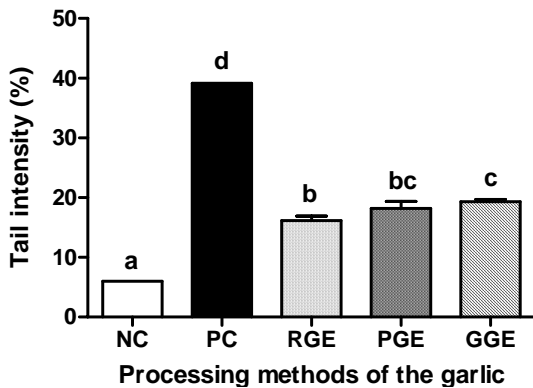


Fig. 2. Comparison of the antigenotoxic activities of garlic extracts prepared by different processing methods on 200 µM H₂O₂ induced DNA damage in human leukocyte. The values were calculated as the sum of all concentrations from methanol and ethanol extracts of RGE, GGE, and PGE. NC, negative control (without oxidative stimulus); PC, 200 µM H₂O₂ treated positive control; RGE, raw garlic extracts; GGE, grilled garlic extracts; PGE, pickled garlic extracts. Values not sharing the same letter are significantly different from one another (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

phenanthroline에 의한 DNA 손상 억제 효과를 TBA(thio-barbituric acid) 반응성 물질로 확인한 Park과 Lee(32)의 연구에서 가열한 마늘의 DNA 손상 억제 효과가 무가열군에

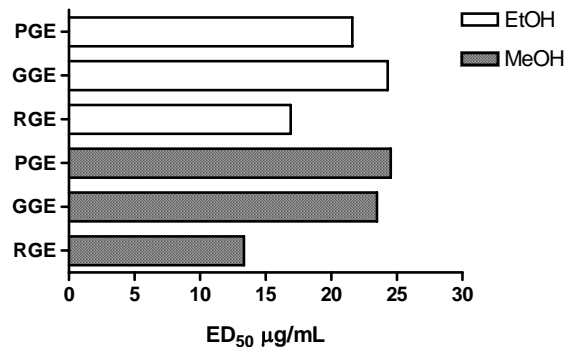


Fig. 3. Comparison of the antigenotoxic activities of garlic extracts in human leukocytes assessed by the estimated dose that would result in a 50% reduction in oxidative DNA damage (ED₅₀) from 200 µM H₂O₂. RGE, raw garlic extracts; GGE, grilled garlic extracts; PGE, pickled garlic extracts.

비해 43.7% 감소된 것으로 보고한 것과 연관된 결과이다.

H₂O₂에 의한 DNA 손상을 분석하기 위해 알칼리 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 핵을 염색하여 형광현미경으로 관찰한 image는 Fig. 4에서 확인할 수 있다. PBS 처리한 음성 대조군(A)은 꼬리가 없는 원형 그대로의 핵 모양을 유지하고 있었으며, 반면, 200 µM H₂O₂를 처리하여 인위적으로 산화적 스트레스를 가한 양성 대조군(B)의 경우

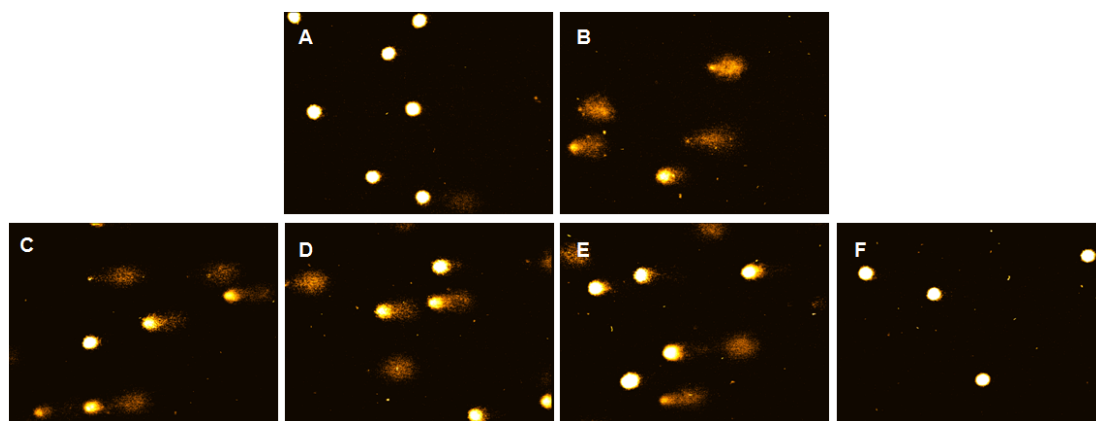


Fig. 4. Micrographs representing images obtained from the comet assay. A, without oxidative stimulus; B, 200 µM H₂O₂ treated positive control; C, RGE 1 µg/mL+H₂O₂; D, RGE 5 µg/mL+H₂O₂; E, RGE 10 µg/mL+H₂O₂; F, RGE 50 µg/mL+H₂O₂. RGE, raw garlic extracts.

손상된 DNA 조각이 길게 꼬리를 형성한 것을 관찰할 수 있었다. 생마늘 메탄올 추출물을 1, 5, 10, 50 µg/mL로 처리할수록 손상된 DNA가 적어 꼬리가 짧아지고 원형에 가까운 것으로 확인되었다.

HNE에 대한 조리방법별 마늘 추출물의 DNA 손상 억제 효과

HNE는 세포막 지질 과산화를 통해 생성되는 aldehyde 생성물로써 1991년 Esterbauer 등에 의해 알려졌으며, 세포 내에서 0.1~5 micromolar 정도의 낮은 농도에서는 세포 증식을 촉진하는 등 유효하지만, 산화적 스트레스에 의해 10~20 micromolar 이상 과도하게 발생하면 caspase enzymes, 신경세포 사멸과 같은 독성 경로로 유도하는 주 매개체가 된다고 보고되어 있다(33). 따라서 인위적으로 DNA 손상을 유도함에 있어 HNE가 적합할 것으로 사료되며, 본 연구실에서도 항암 소재 개발을 위한 연구에 산화적 스트레스 유발 물질로 HNE를 사용한 바 있다(19). 또한 예비 실험 결과 (Fig. 5) DNA 손상도가 PBS 처리를 한 음성 대조군(6.5±0.6%)에 비해 100 µM HNE 처리군은 7.3±0.2%로 손상도가 경미한 반면 200 µM HNE 처리군은 14.0±0.9%로 유의적으로 증가한 것으로 나타나 본 실험에서 200 µM HNE를 처리하였다.

HNE에 대한 마늘 추출물의 DNA 손상 억제 효과는 Fig. 6에 제시하였다. 마늘 추출물을 농도별로 백혈구에 처리한 후 200 µM의 HNE로 DNA 손상을 유도한 결과, 조리법 또는 추출 용매 및 처리 농도와 상관없이 초절임 마늘의 50 µg/mL을 제외한 모든 추출물에서 양성 대조군에 비해 DNA 손상이 줄어든 것으로 나타났다. 그러나 H₂O₂에 대한 DNA 손상 억제 효과가 고농도에서 유효했던 것과는 대조적으로 HNE에 대한 DNA 손상 억제 효과는 오히려 저농도에서 높은 것으로 확인되었다(결과 미제시). 이는 일정 농도의 마늘 추출물만으로도 HNE에 의한 DNA 손상이 억제되며 추출액의 농도가 높을수록 마늘의 특정 화합물과 HNE가 결합함

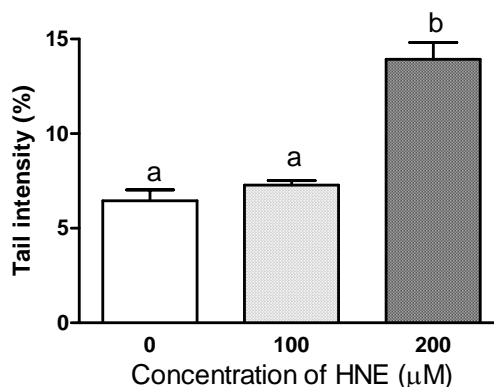


Fig. 5. DNA damage induced by different concentrations of HNE. Values not sharing the same letter are significantly different from one another (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

으로써 항 유전 독성 효과가 상쇄되는 것으로 사료된다.

한편, 구운 마늘군의 경우 1 µg/mL의 저농도에서도 음성 대조군과 유사한 수준까지 DNA 손상이 억제된 것으로 나타나 HNE에 대한 항 유전 독성 효과는 구운 마늘이 더 월등한 것을 알 수 있다. 이처럼 H₂O₂에 대한 DNA 손상 억제 효과가 생마늘이 높았던 것과 달리 HNE에 대한 효과는 구운 마늘에서 높게 나타난 것(Fig. 7)은 활성산소 중 하나인 H₂O₂와 지질과산화물인 HNE가 DNA를 손상 혹은 억제시키는 기전의 차이에서 기인 된 것으로 사료되며 차후 관련된 기전 연구가 수행되어야 할 것이다. 이러한 구운 마늘의 월등한 항 유전 독성 효과는 생마늘의 항암 화합물로 알려진 diallyl disulfide, methyl allyl sulfide, selenium 함유 화합물(34), gamma-glutamyl-Se-methylselenocysteine(GG-MSc)(35) 외에 열처리 과정에서 새롭게 생성된 어떠한 화합물이 DNA 손상 억제에 가담한 것으로 생각되어지며 이는 항균, 항 독성 효과가 있는 allyl alcohol과 allyl mercaptan, methyl pyrazine 등이 열처리 후 새롭게 생성되었다고 보고한 정(36)의 연구와 연관 지을 수 있다. 또한 DNA 손상 억제능이 가장 작게 나타난 초절임 마늘의 경우 조리 중 활성 화합물이

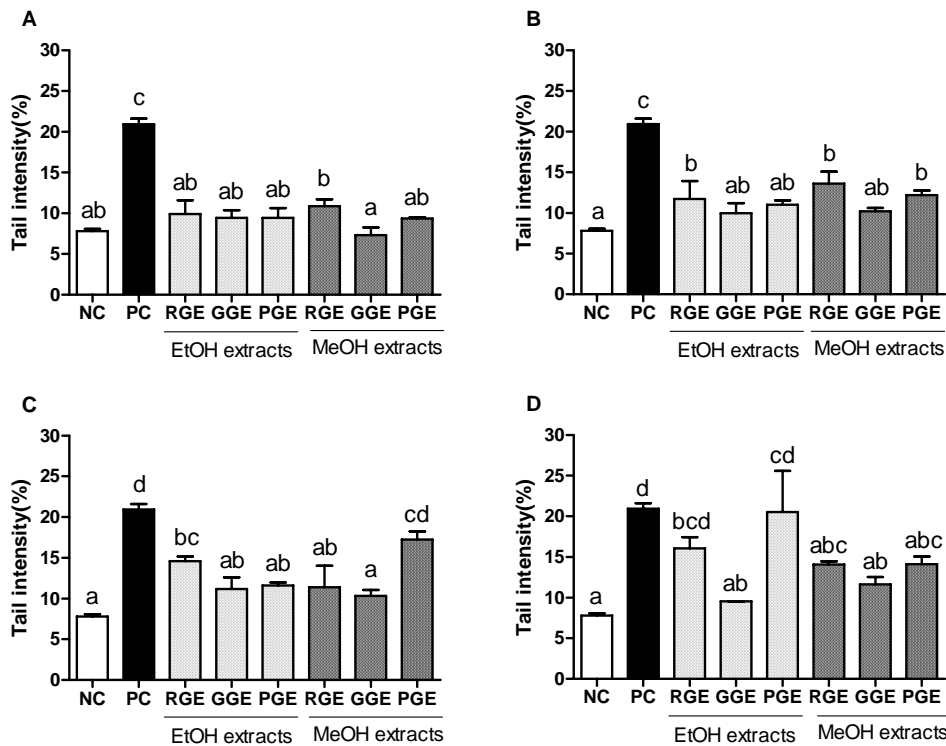


Fig. 6. The effect of supplementation *in vitro* with different concentrations of garlic extracts on 200 µM HNE induced DNA damage in human leukocyte. A, 1 µg/mL ethanol or methanol extracts prepared by different processing methods; B, 5 µg/mL ethanol or methanol extracts prepared by different processing methods; C, 10 µg/mL ethanol or methanol extracts prepared by different processing methods; D, 50 µg/mL ethanol or methanol extracts prepared by different processing methods. NC, negative control (without oxidative stimulus); PC, 200 µM HNE treated positive control; RGE, raw garlic extracts; GGE, grilled garlic extracts; PGE, pickled garlic extracts. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

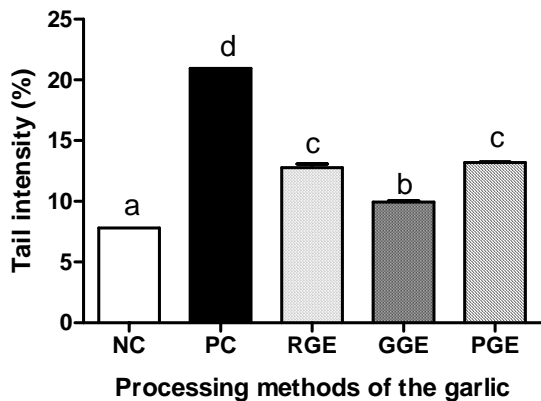


Fig. 7. The antigenotoxic effects of garlic extracts prepared by different processing methods on 200 µM HNE induced DNA damage in human leukocyte. NC, negative control (without oxidative stimulus); PC, 200 µM HNE treated positive control; RGE, raw garlic extracts; GGE, grilled garlic extracts; PGE, pickled garlic extracts. The values were calculated as the sum of all concentrations from methanol and ethanol extracts of RGE, GGE, and PGE. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

줄어든 것으로 사료되며 이는 생마늘에서는 allicin(diallyl thiosulfinate)을 비롯한 기능성 화합물이 30여개 동정된 반면 장아찌에서는 allicin이 전혀 검출되지 않았고, dithiins, monosulfide 등이 감소해 20개 이하의 화합물이 동정된 Kim

과 Mo(16)의 연구와 연관시킬 수 있다.

한편 구운 마늘 군에서 농도에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않은 것은 H₂O₂를 이용한 DNA 손상(39.2±4.0%)에 비해 HNE로 유도한 손상(20.9±0.5%)이 작은 것을 감안할 때, DNA 손상이 충분히 유도되지 못한 상태였으므로 1 µg/mL 낮은 농도에서도 음성 대조군 수치와 비슷할 정도로 DNA 손상이 억제되어 고농도의 효과가 나타나지 못한 것으로 보인다.

음성 대조군과 HNE에 의해 손상된 백혈구 DNA(양성 대조군) 및 생마늘, 구운 마늘, 초절임 마늘 에탄올 추출물(1 µg/mL)에 의해 회복된 백혈구 DNA의 comet image는 Fig. 8에 제시하였다. 본 연구 결과를 종합해보면, H₂O₂ 및 HNE로 유도된 DNA 손상에 대한 마늘의 항 유전 독성 효과는 생마늘, 구운 마늘, 초절임과 같은 조리 방법에 상관없이 전반적으로 우수한 것을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 조리법에 따른 마늘의 항 유전 독성 효과를 확인하기 위해 생마늘, 구운 마늘, 초절임 마늘의 에탄올 또는 메탄올 추출물을 백혈구에 처리한 후 comet assay를 수행하였다. 그 결과 조리 방법, 추출 용매에 상관없이 모든

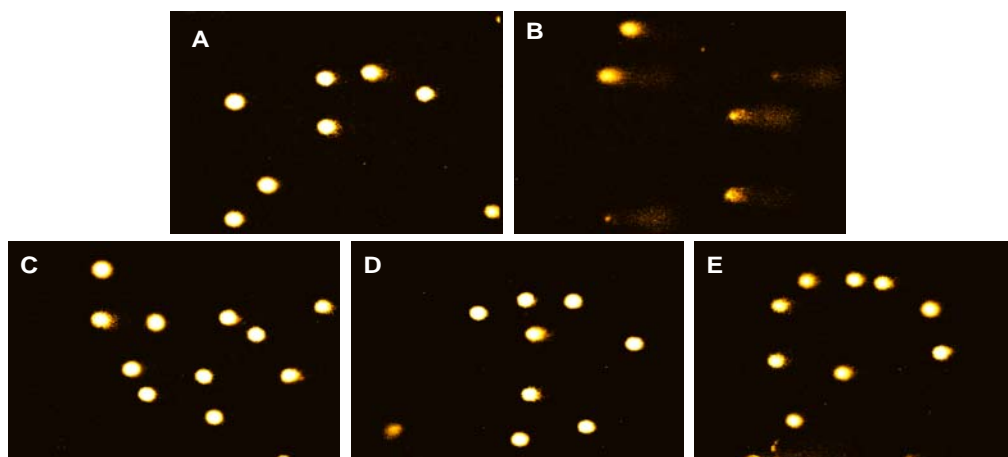


Fig. 8. Micrographs representing images obtained from the comet assay. A, without oxidative stimulus; B, 200 μ M HNE treated positive control; C, RGE 1 μ g/mL+HNE; D, GGE 1 μ g/mL+HNE; E, PGE 1 μ g/mL+HNE. RGE, raw garlic extracts; GGE, grilled garlic extracts; PGE, pickled garlic extracts.

추출물에서 DNA 손상 억제 효과가 것으로 나타났으며 활성 산소인 H₂O₂에 대한 DNA 손상 억제 효과는 생마늘 메탄올 추출물에서, 지질과산화물인 HNE에 대한 DNA 손상 억제 효과는 구운 마늘 메탄올 추출물에서 높은 것으로 나타났다. 또한 H₂O₂로 유도한 스트레스에서는 마늘 추출물의 농도를 1, 5, 10, 50 μ g/mL로 증가시킬수록 DNA 손상 억제능이 좋은 것으로 나타난 반면 HNE로 스트레스를 유도한 군에서는 저농도인 1 μ g/mL에서 오히려 높은 효능이 나타났다. 따라서 마늘의 항 유전 독성 효과는 한국인의 일반적인 마늘 섭취 형태인 생마늘, 구운 마늘, 초절임 마늘에 상관없이 탁월한 것을 알 수 있었다. 이와 같은 마늘의 항 유전 독성 효과는 식재료로써의 마늘의 소비 및 의약품 소재로써의 이용성을 증진시킬 수 있는 자료가 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 경남대학교 학술논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- Bohr VA. 2002. DNA damage and its processing. Relation to human disease. *J Inherit Metab Dis* 25: 215-222.
- 김영명. 2006. 유해산소에 의한 DNA 염기 손상, 암 발생 첫 단계. *메디컬 업저버* 345호 특집VI. p 49.
- Leeuwenburgh C, Heinecke JW. 2001. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem* 8: 829-838.
- Dizdaroglu M. 1991. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med* 10: 225-242.
- 서영준. 2001. 발암과정에 있어서 cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암예방. *분자세포생물학 뉴스* 13: 8-17.
- Kim MB, Oh YJ, Lim SB. 2009. Physicochemical characteristics of garlic from Daejeong Jeju and major cultivation areas in Korea. *J Kor Culinary Res* 15: 59-66.
- Kik C, Kahane R, Gebhardt R. 2001. Garlic and health. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 11: 57-65.
- Lawson LD. 1998. Effect of garlic on serum lipids. *JAMA* 11: 1568-1576.
- Byun BH, Kim SH, Jeong HG, Kim BY, Nm CH, Roh PU. 1995. Effect of garlic on enzyme activities of rats fed lard and alcohol. *J Fd Hyg Safety* 10: 163-168.
- Kang JH, Ahn BW, Lee DH, Byun HS, Kim SB, Park YH. 1988. Inhibitory effects of ginger and garlic extracts on the DNA damage. *J Korean Food Sci Technol* 20: 287-292.
- Kim KJ, Do JR, Kim HK. 2005. Antimicrobial, antihypertensive and anticancer activities of garlic extracts. *J Korean Food Sci Technol* 37: 228-232.
- Shin DS, Lee CJ. 2007. Effects of combined raw garlic ingestion and weight-bearing, aerobic exercise on blood lipids and bone mineral density in obese male high school students. *J Kor Sport Res* 18: 153-162.
- Shin SH, Kim MK. 2004. Effect of dried powders or ethanol extracts of garlic flesh and peel on lipid metabolism and antithrombotic capacity in 16-month-old rats. *Kor J Nutr* 37: 515-524.
- Lim SW, Kim TH. 1997. Physiological activity of allin and ethanol extract from Korean garlic (*Allium sativum* L.). *J Korean Food Sci Technol* 29: 348-354.
- Byun PH, Kim WJ, Yoon SK. 2001. Effects of extraction conditions on the functional properties of garlic extracts *J Korean Food Sci Technol* 33: 507-513.
- Kim MR, Mo EK. 1995. Volatile sulfur compounds in pickled garlic. *J Korean Soc Food Sci* 11: 215-221.
- Koo BS, Ahn MS, Lee KY. 1994. Changes of volatile flavor components in garlic -seasoning oil. *J Korean Food Sci Technol* 26: 520-537.
- Chun HJ, Park JE. 1997. Effect of heat treatment of garlic added diet on the blood of spontaneously hypertension rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 103-108.
- Park JH, Park YK, Park EJ. 2009. Antioxidative and anti-genotoxic effects of garlic (*Allium sativum* L.) prepared by different processing methods. *Plant Foods Hum Nutr* 64: 244-249.
- Lee SJ, Shin JH, Kang MJ, Seo JK, Sung NJ. 2009. Antioxidant activity of garlic with different processing on soybean oil. *J Fd Hyg Safety* 24: 204-210.
- Kim MR, Mo EK, Lee KJ. 1993. Inhibition of lipoxigenase activity by the extract of various processed garlic. *Korean*

- J Soc Food Sci* 9: 215-221.
22. Kim YD, Kim KM, Chang Ki, Sun HE, Kim IK, Cho KJ. 2004. Antimicrobial activity of garlic extracts according to different cooking methods. *J Korean Food Preserv* 11: 400-404.
 23. Bae HJ, Chun HJ. 2002. Changes in volatile sulfur compounds of garlic under various cooking conditions. *J Korean Soc Food Cookery Sci* 18: 365-371.
 24. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1998. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
 25. Park EJ, Kang MH. 2002. Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human bio-monitoring. *Kor J Nutr* 35: 213-222.
 26. Ostling O, Johanson KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298.
 27. Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. 1994. Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 307: 323-333.
 28. Lenaz G. 1998. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1366: 53-67.
 29. Khanna KK, Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genet* 27: 247-254.
 30. Deutsch JC. 1998. Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 255: 1-7.
 31. Kim CH, Kim CH, Park HK, Suh KI, Lee KU. 2002. Effects of hydrogen peroxide on insulin secretion in rat pancreatic islets 3. *J Korean Diabetes Asso* 26: 265-273.
 32. Park PS, Lee MY. 1992. The effects of onion and garlic on copper-phenanthroline complex induced DNA degradation. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 367-371.
 33. Kruman I, Annadora J, Bruce-Keller, Bredesen D, Waeg G, Mattson MP. 1997. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress induced neuronal apoptosis. *J Neuroscience* 17: 5089-5100.
 34. Bedwal RS, Nair N, Sharma MP, Mathur RS. 1993. Selenium-its biological perspectives. *Med Hypotheses* 41: 150-159.
 35. Dong Y, Lisk D, Block E, Ip C. 2001. Characterization of the biological activity of gamma-glutamyl-Se-methyl-selenocysteine: a novel, naturally occurring anticancer agent from garlic. *Cancer Res* 61: 2923-2928.
 36. 정현상. 산지별 마늘의 향기 항산화활성과 열처리 효과. 2008. 식품 저장과 조리 산업 7: 19-32.

(2010년 3월 9일 접수; 2010년 4월 22일 채택)