

## 산화적 스트레스로 유도된 인체 백혈구 DNA 손상에 대한 울금 추출물의 보호효과

서보영<sup>1</sup> · 박은주<sup>2</sup>

<sup>1</sup>창신대학교 식품영양학과  
<sup>2</sup>경남대학교 식품영양생명학과

### Protective Role of *Curcuma longa* L. Extracts on Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage in Human Leukocytes

Bo-Young Seo<sup>1</sup> and Eunju Park<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Changshin University  
<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Kyungnam University

**ABSTRACT** *Curcuma longa* L. (CL) is widely used as a spice and coloring agent in several foods, such as curry and mustard, as well as cosmetics and drugs. In this study, we investigated the protective effects of CL extracted with various solvents [methanol (MC), ethanol (EC), acetone (AC)] on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in human leukocytes along with total polyphenol contents (TPC) and antioxidant properties. The antioxidant effects of CL were determined by measuring 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity (RSA) and superoxide dismutase (SOD)-like activity. The preventive effect of CL on oxidative stress-induced DNA damage and DNA repair capacities were assessed using comet assay. MC showed the highest TPC (11.17 g gallic acid equivalents/100 g) and antioxidant properties among the solvent extracts. The SC<sub>50</sub> for DPPH RSA was MC: 35.0 > AC: 45.8 > EC: 57.8 µg/mL and SOD-like activity was MC: 46.6 > EC: 141.5 > AC: 296.4 µg/mL. In the comet assay, the ED<sub>50</sub> value of MC showed the highest inhibition (86.7 µg/mL) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage, followed by AC (110.0 µg/mL) > EC (115.8 µg/mL). Analysis of the percentage of damaged cells showed that repair capacity significantly decreased at 4, 8, and 12 h from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in each extract. After 12 h, level of DNA damage recovery was similar to the negative control level. These results suggest that CL has potential antioxidant activity and a protective effect against oxidation-induced DNA damage, and the methanol extract of CL was the most effective.

**Key words:** *Curcuma longa* L., total polyphenol, antioxidant activity, DNA damage, DNA repair capacity

## 서 론

울금(*Curcuma longa* L.)은 생강과에 속하는 다년생 초목으로 알려져 있으며 오랜 기간 동안 다양한 질병의 치료제로 사용되어 왔다(1). 그뿐만 아니라 고대시대부터 향료, 염색제, 방부제 등으로 널리 이용된 기록이 남아있어 활용도가 매우 높은 식물임을 짐작케 한다(2). 최근 연구에 의하면 울금은 알코올성 간 손상이나 간 섬유증과 같은 간질환 또는 기관지염, 낭포성 섬유증과 같은 폐질환, 상처 치유 및 건선과 같은 피부질환에 효과적이고 죽상동맥경화와 심혈관질환과 같은 심장질환 치료에 효과적이며, 당뇨 및 염증질환에도 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다(3). 울금의 유효성분으로는 뿌리와 줄기에 다량 함유된 활성형 폴리페놀인 curcu-

minoids로써 여러 질병뿐 아니라 항산화 및 세포보호 역할을 수행하는 데 뛰어난 활성을 보이며, curcumin, demethoxycurcumin 그리고 bisdemethoxycurcumin 등의 형태로 존재한다(4,5).

항산화란 환경적인 스트레스나 유전적인 결함에 의해 생성되는 활성산소종에 대한 방어체제로 최근 질병의 원인이 되는 하나의 독립적 기전으로 주목받고 있다(6,7). 인체의 활성산소종에 의한 산화적 스트레스는 체내의 지질, 단백질, 탄수화물을 산화시킬 뿐만 아니라 DNA에 직접 작용하여 single-, double-strand breaks, basic sites 그리고 cross-link 등 손상을 일으켜 DNA의 영구적 변형을 유발하고 나아가 암화과정을 촉진하는 인자로 작용한다(8). 항산화물은 이러한 DNA 변형을 억제하는 항돌연변이 활성이나 DNA 손상 후 회복되는 데에도 긍정적인 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다(9). 가장 대표적인 항산화물로는 ascorbate, α-tocopherol, β-carotene 그리고 polyphenol 등이 있으며, 이러한 물질에 의한 항산화 활성 증가는 유전자 발현 조절을

통해 DNA repair enzyme 활성 향상에도 영향을 하는 것으로 보고되었다(10).

울금의 항산화 활성에 대해서는 이미 보고된 바 있으나(11,12), 산화적 스트레스로 유도된 DNA 손상에 대한 보호 효과에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 울금의 아세톤(AC), 에탄올(EC), 메탄올 추출물(MC)의 총 폴리페놀 함량(total polyphenol content, TPC) 및 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity (DPPH RSA), SOD 유사활성(SOD-like activity) 등의 항산화력을 분석하고 이 활성들이 DNA 손상 및 DNA 손상 회복력에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시료의 추출

울금은 창원시에 위치한 약재상에서 국내산으로 구입하여 분석에 이용하였다. 울금을 잘게 잘라 5 g을 저울로 잰 뒤 100 mL의 아세톤, 에탄올, 메탄올에 각각 침지하여 실온에서 72시간 동안 추출하였다. 각 추출물은 여과지(Whatman, Maidstone, UK)로 여과한 후, TPC 분석용을 제외하고 회전진공농축기(Eyela N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 37°C에서 농축하였으며, 농축물은 5 mg/mL 농도로 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 분석 시까지 -20°C에서 보관하였다.

### 총 페놀 함량

총 페놀 함량은 추출물 자체 시료 1 mL를 취하여 증류수 1 mL를 가하여 희석하고 1 N Folin-Ciocalteu 시약 2 mL를 가하여 실온에서 3분간 방치한 후, 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 2 mL를 가하여 잘 섞은 다음 상온에서 암실 조건으로 방치하였다. 1시간 후 시료를 원심분리 한 다음(13,400×g, 5 min) 상층액을 취하여 ELISA reader(Sunrise, Tecan Co., Ltd., Grödig, Austria)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 g gallic acid equivalents(GAE)/100 g 단위로 나타내었다.

### DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 에탄올에 녹인 0.2 mM DPPH 용액 80 µL를 20 µL의 농도별 시료(1, 5, 10, 50 µg/mL)에 처리한 후 상온에서 10분간 반응시켜 ELISA reader(Sunrise, Tecan Co., Ltd.)를 사용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 계산하여 산출하였으며, 대조구에는 20 µL의 DMSO로 처리하여 흡광도를 측정하였다. 원 시료의 색은 자체 흡광도를 측정된 후 보정하였다. 50%의 DPPH 라디칼을 저해하는 농도인 SC<sub>50</sub>(scavenge 50% of the radical)을 구하여 제시하였다.

Radical scavenging activity (RSA, %)=(1-A/B)×100

A: 시료 첨가구의 흡광도

B: 대조구의 흡광도

### SOD 유사활성 측정

SOD 유사활성은 1, 5, 10, 50 µg/mL로 희석한 울금 추출물 50 µL에 50 µL Tris-HCl buffer(pH 8.5)와 7.2 mM pyrogallol 50 µL를 가하여 25°C에서 45분간 반응시킨 후, ELISA reader(Sunrise, Tecan Co., Ltd.)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 무처리구는 시료 대신 50 µL의 DMSO를 처리하여 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 SOD 유사활성은 아래의 식에 의해 계산하여 나타내었으며, 시료 별로 pyrogallol을 50% 저해하는 농도인 SC<sub>50</sub>(scavenge 50% of the radical)을 구하였다.

SOD-like activity (%)=(1-A/B)×100

A: 시료 첨가구의 흡광도

B: 무처리구의 흡광도

### 혈액 내 백혈구 세포 분리 및 시료처리

건강한 성인남성으로부터 채혈한 신선한 전혈을 Histo-paque 1077(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 이용해 백혈구를 분리한 후 본 실험에 사용하였다. Alkaline comet assay 방법에 따라 분리해 놓은 백혈구에 1, 5, 10, 50 µg/mL의 농도로 처리하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 백혈구를 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 다음, 인위적인 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 200 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 4°C에 5분간 반응시켰으며 그 후 바로 PBS로 세척하였다. Positive control (PC)을 위해 시료 대신 1% DMSO를 처리한 후 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하였고, negative control(NC)은 1% DMSO만을 처리하였다. 본 연구 수행에 앞서 경남대학교 기관생명윤리위원회 승인을 받았다(KUIRB 2013-14).

### Comet assay를 이용한 DNA 손상 측정

반응을 끝낸 백혈구를 75 µL의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 후, 1.0% normal melting agarose(NMA)가 precoating 된 slide 위로 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C에 방치하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 µL로 덮은 후 4°C에 방치하였다. Gel이 굳으면 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, 1% sodium lauryl sarcosine, 1% Triton X-100, 10% DMSO)에 slide를 담가 암실에서 1시간 동안 침지시킨 후 백혈구를 용해시켜 핵막을 제거하였다. Lysis 과정이 끝난 후 slide를 전기영동수조에 배열하고 4°C의 차가운 electrophoresis buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH>13)를 채워 20분 동안 방치하여 DNA의 이중가닥을 풀어주어 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25

V/300±3 mA의 전압으로 20분간 전기영동을 실시하였다. 본 과정은 빛에 의한 DNA의 부가적 손상을 막기 위해 암실 조건에서 실시하였으며 전기영동이 끝난 후 차가운 증성용액(0.4 M Tris buffer, pH 7.5)에 5분간 3회 세척하여 중화시킨 다음 에탄올에 5분간 침지 후 slide를 건조시켰다. 20 µg/mL ethidium bromide로 염색한 slide를 형광현미경(LEICA DMLB, Wetzlar, Germany)의 CCD camera(Nikon, Tokyo, Japan)를 통해 보내진 세포핵 image를 comet image analyzing system(Komet version 5.0, Kinetic Imaging, Liverpool, UK)을 이용해 분석하였다. 백혈구의 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 DNA의 손상 정도는 핵으로부터 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분 내 DNA 함량(% tail intensity)으로 나타내었다. 추출물별 DNA 손상을 절반으로 줄이는 농도인 ED<sub>50</sub>(estimated dose concentration of 50% reduction in oxidative DNA damage)을 구하였다.

### Comet assay를 이용한 DNA 손상 회복능 측정

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 손상된 DNA의 repair 양상을 관찰하기 위해 각 시료를 30분간 leukocyte에 처리하였으며, 그 후 200 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 4°C에서 5분간 반응시킨 후 PBS로 세척한 다음 37°C에서 0, 1, 4, 12시간 동안 배양 후 위와 같은 과정으로 DNA 손상을 분석하였다. 시료 처리구에는 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 손상시킨 백혈구를 세 가지 용매를 이용한 울금 추출물을 50 µg/mL 농도로 처리 후 동일한 조건으로 DNA 손상 회복 정도를 분석하였다. Repair capacity는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 1시간 후로부터 12시간 사이의 % tail DNA 정도를 이용하여 DNA migration의 상대적 감소 정도(%) 분석에 이용하였다. 회복능에 대한 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Repair ability (\%)} = 100 \times [(\text{DoX} - \text{DtX}) / \text{DoX}]$$

DoX: 회복 전 DNA 손상 정도

DtX: 회복시간에 따른 DNA 손상 정도

### 통계처리

모든 데이터의 통계처리는 SPSS, Windows 14.0(IBM, Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였고 결과는 평균±표준편차(SD)로 나타내었으며, 신뢰수준 95%( $P < 0.05$ )에서 평균값들에 대해 유의성을 검증하였다. Duncan's multiple range test를 이용하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. TPC 함량과 항산화 활성 사이의 상관관계는 이변량 상관분석을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 총 폴리페놀 함량 분석

폴리페놀 성분은 항산화력을 나타내는 대표적인 성분으로써 수소원자나 전자를 공여하는 능력을 가질 뿐만 아니라 다양한 식품의 구성성분으로 특정 지방산 또는 오일의 산화방지 등과 같은 안정한 라디칼의 중간 매개물로 작용한다

**Table 1.** Total phenolic contents (TPC) of various solvent extracts from *Curcuma longa* L.

	AC <sup>1)</sup>	EC	MC
TPC (g GAE <sup>2)</sup> /100 g)	1.45±0.00 <sup>b3)4)</sup>	1.17±0.02 <sup>a</sup>	11.17±0.00 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>AC: acetone extract, EC: ethanol extract, MC: methanol extract.

<sup>2)</sup>GAE: gallic acid equivalents.

<sup>3)</sup>Data are mean±standard deviation values (n=3).

<sup>4)</sup>Values that do not share a common superscript are significantly different at  $P < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

(9). 본 연구의 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. MC가 11.17±0.00 g GAE/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었고, AC(1.45±0.00 g GAE/100 g), EC(1.17±0.02 g GAE/100 g) 순으로 나타났다. 최근 연구 결과에서 울금의 열수 추출물의 TPC 함량을 분석한 결과 Oh 등(13)의 연구에서는 2.49±0.02 mg GAE/100 g을 보인 반면, Ju 등(14)의 연구에서는 152.75±0.91 mg GAE/100 g을 보여 본 연구 결과와 다소 큰 차이를 보였다. 이러한 결과의 차이는 추출 방법 및 추출용매의 차이로 생각된다. 본 연구 결과가 선행연구 결과에 비해 높은 함량을 나타낸 것은 울금의 주성분인 curcumin이 ethanol, alkalis, ketone, acetic acid 그리고 chloroform 등 유기용매에 잘 녹는 특성과 연관이 있는 것으로 판단된다(15). 이러한 특성을 고려할 때 울금의 폴리페놀 성분이 유기용매에 더 안정한 것으로 생각되며, 본 연구의 결과 메탄올이 폴리페놀 성분 추출에 가장 효율적인 것으로 추정된다.

### 항산화 활성 분석

DPPH는 비교적 안정한 free radical로서 수소공여체의 수소기와 결합 시 환원되어 항산화물의 free radical 소거능을 측정하는 일반적인 분석법(16)으로 널리 이용되고 있다. 그 결과는 Table 2와 같으며 세 가지 추출물 모두에서 유의적으로 농도 의존적 증가 경향을 나타내었다. SC<sub>50</sub>을 분석한 결과 MC가 35.0 µg/mL로 가장 강력한 소거능을 보였으며 다음으로 EC(45.8 µg/mL), AC(57.8 µg/mL) 순으로 나타났다.

SOD 유사활성은 xanthine oxidase에 의해 생성된 O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 억제 활성 분석을 기반으로 하는 분석법으로 항산화 활성을 분석하는 지표로 사용된다(17). Table 2에 나타낸 바와 같이 SOD 유사활성 역시 DPPH 라디칼 소거능과 마찬가지로 모든 추출물에서 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. SC<sub>50</sub>을 분석한 결과 메탄올 추출물이 46.6 µg/mL로 가장 강력한 활성을 보였으며, 에탄올 추출물이 141.5 µg/mL, 아세톤 추출물이 296.4 µg/mL 순으로 나타나 DPPH 라디칼 소거능과 동일한 경향을 보였다.

울금의 항산화력 수준을 이전 연구들과 비교해 보았을 때 Ak와 Gülçin(18)의 연구에서 DPPH 라디칼 소거능 분석 결과 BHA는 67.8%, α-tocopherol은 64.9%, BHT는 62.5%를 나타냈으며 Trolox는 29.4%로 가장 낮은 활성을 보였

**Table 2.** DPPH radical scavenging activity (RSA), SOD-like activity of various solvent extracts from *Curcuma longa* L.

μg/mL	DPPH RSA (%)			SOD-like activity (%)		
	AC <sup>1)</sup>	EC	MC	AC	EC	MC
1	21.0±0.8 <sup>a2)3)</sup>	25.1±0.3 <sup>a</sup>	35.2±0.4 <sup>a</sup>	4.3±0.4 <sup>a</sup>	8.6±0.3 <sup>a</sup>	9.9±0.5 <sup>a</sup>
5	24.2±0.5 <sup>b</sup>	27.1±0.7 <sup>b</sup>	39.2±0.3 <sup>b</sup>	7.8±2.0 <sup>b</sup>	12.0±0.4 <sup>b</sup>	13.9±0.1 <sup>b</sup>
10	31.3±0.3 <sup>c</sup>	28.0±0.5 <sup>b</sup>	41.2±0.3 <sup>c</sup>	11.0±0.5 <sup>c</sup>	18.0±0.6 <sup>c</sup>	17.7±0.4 <sup>c</sup>
50	51.0±0.3 <sup>d</sup>	43.8±0.4 <sup>c</sup>	57.6±0.8 <sup>d</sup>	11.5±0.6 <sup>d</sup>	21.4±1.7 <sup>d</sup>	52.5±1.1 <sup>c</sup>
SC <sub>50</sub> <sup>4)</sup>	45.8±0.2 <sup>B5)</sup>	57.8±0.5 <sup>C</sup>	35.0±0.4 <sup>A</sup>	296.4±24.9 <sup>C</sup>	141.5±9.4 <sup>B</sup>	46.6±0.6 <sup>A</sup>

<sup>1)</sup>AC: acetone extract, EC: ethanol extract, MC: methanol extract.

<sup>2)</sup>Data are mean±standard deviation values (n=3).

<sup>3)</sup>Values in the same column that do not share a common superscript are significantly different at  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test.

<sup>4)</sup>SC<sub>50</sub> (μg/mL): concentration in μg/mL required to scavenge 50% of the radical.

<sup>5)</sup>Values within DPPH RSA and SOD-like activity that do not share a common superscript are significantly different at  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test.

다. 그에 반해 45 μg/mL 농도의 curcumin은 62.2%의 소거능을 보여 BHT와 같은 수준의 강력한 DPPH 라디칼 소거능을 확인한 바 있다. 이러한 결과는 본 연구의 MC 활성과 가장 유사하며, SC<sub>50</sub>의 분석 결과에서도 MC가 가장 낮게 나타나 MC의 항산화력이 가장 강력한 것으로 확인되었다. 이는 울금에 함유한 총 폴리페놀 함량에 의한 영향인 것으로 풀이된다. 울금의 가장 대표적인 폴리페놀 성분인 curcumin은 2개의 phenol기를 가지는 구조로 enolization을 통해 생리활성에 관여하는 것으로 알려져 있다(4). 또한, oxygen radicals은 1,3-diketone-conjugated diene systems과 함께 phenolic, methoxy기에 의해 소거된다고 보고된 바 있다(5). Diplock(19)은 항산화물들이 금속이온 촉매반응 및 연쇄적 결합을 예방하고 과산화물 분해 및 라디칼 소거와 같은 다양한 기전에 의해 활성을 나타내는 것으로 항산화력은 한 가지의 작용 기전에 의한 것이 아니라 여러 가지 기전이 복합적으로 작용하여 일어나는 일련의 화학반응이라고 밝힌 바 있다. 따라서 본 연구에서 나타난 울금의 항산화력은 세 가지의 용매의 특성이 폴리페놀 함량 차이 및 항산화력에 영향을 미쳤을 것으로 판단되며, 폴리페놀 성분 이외에 울금이 가지고 있는 항산화물이 전체적인 항산화력 차이에 영향을 미친 것으로 판단된다.

### DNA 손상에 미치는 영향

Comet assay는 세포 수준에서의 DNA 손상을 직접 확인하기 위하여 도입된 방법으로 소량의 시료를 필요로 하고 실험과정이 간단할 뿐만 아니라 DNA 손상을 민감하게 감지해 낼 수 있는 장점을 가지고 있다(20). 또한, 혈액 세포 이용은 식이섭취에 의한 항산화 영양소의 chemoprotective 효과를 분석하기 위해 적합한 지표로 알려져 있다(21,22). 특히 leukocyte는 체내를 순환하면서 독성물질에 대한 노출을 감지하여 신호를 전달하는 역할을 하는 매개체로 암을 포함한 많은 질병들의 진단을 위한 중요한 지표로 사용될 수 있으며, 본 연구에서 사용한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 hydroxyl radical의 생성을 유도하고 genomic DNA의 변형이나 strand breakage를 통한 세포의 손상에 악영향을 미치는 것으로 알려져

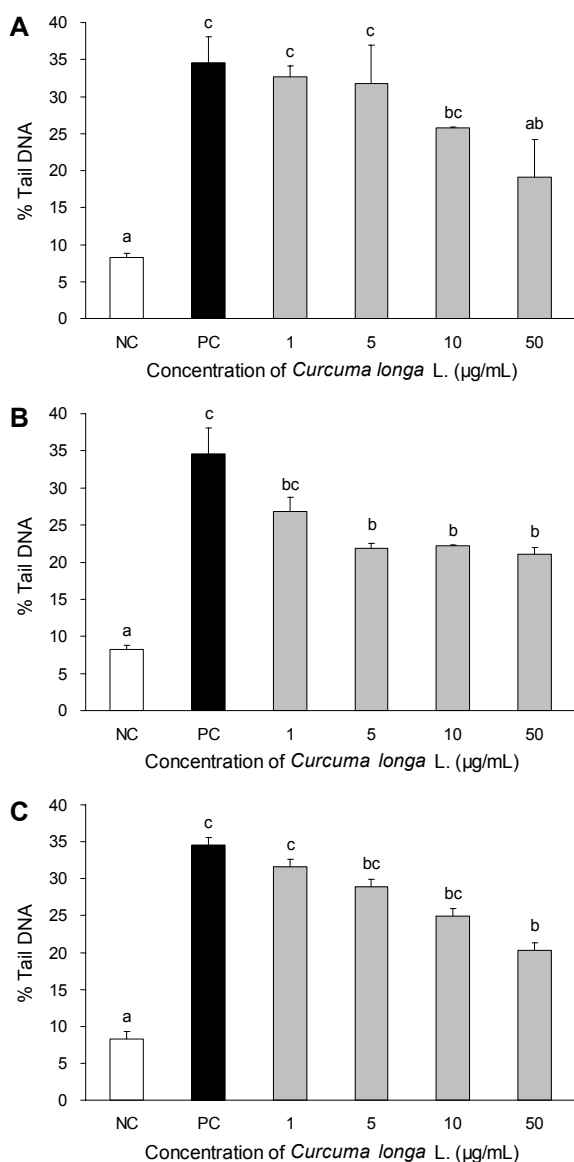
있어 산화적 스트레스를 유발하는 데 유용하게 이용되는 물질로 알려져 있다(23,24).

울금의 세 가지 추출물을 각각 1, 5, 10, 50 μg/mL 농도로 처리한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스에 대한 예방 효과는 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과 추출물을 처리하지 않고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 처리한 PC에 비해 세 가지 추출물 처리구의 모든 농도에서 유의적으로 감소하는 결과를 보였으며, AC와 MC는 농도 의존적 감소 결과를 보여 울금의 농도가 높아질수록 DNA 손상 감소 효과가 더 커지는 것으로 나타났다. 반면 EC는 PC 대비 DNA 손상 예방 효과는 있으나 농도 간 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다. 이 결과를 바탕으로 ED<sub>50</sub> 값을 분석한 결과(Fig. 2) MC가 86.7 μg/mL로 가장 강력한 효과를 보였으며, AC 110.0 μg/mL, EC 115.8 μg/mL 순으로 나타났다. 울금의 폴리페놀 성분인 curcumin은 수소 또는 전자 공여체로 이용되고 전이금속이온으로 작용하는 매우 강력한 항산화 물질로 알려져 있으며(25), curcumin의 이러한 작용이 항유전독성에도 영향을 미친 것으로 생각된다. 또한, 항산화 관련 연구들에 따르면 DNA 손상 억제 효과는 채소나 과일, 허브 등에 함유된 단일 물질에 의한 것이 아닌 다양한 항산화물에 의한 복합적인 작용의 결과로 보고하고 있다(26). 이와 마찬가지로 본 연구의 DNA 손상 억제 결과 역시 울금에 함유되어 있는 폴리페놀 외 다양한 항산화물이 생리활성에 영향을 미친 것으로 풀이된다.

### DNA 손상 회복력에 미치는 영향

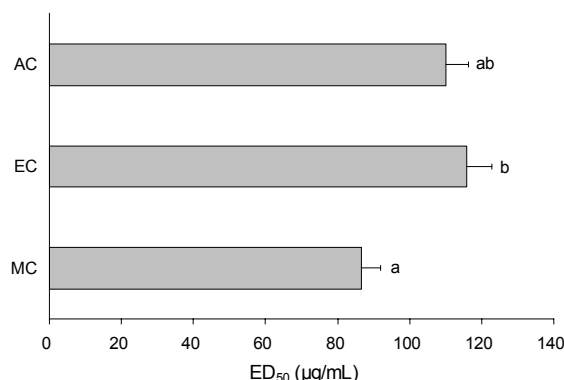
DNA 손상 회복력은 유기체의 산화적 스트레스에 대한 노출 시간 및 노출 정도에 따른 회복력을 분석하는 방법으로 알려져 있으며, 세포 및 관련 체계의 스트레스에 대한 반응을 분석할 수 있는 매우 유용한 지표이다(27).

본 연구에서는 사람의 혈액에서 분리한 leukocyte를 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 처리한 다음 50 μg/mL의 추출물을 0, 1, 4, 12 시간 처리하여 손상된 DNA의 회복력을 분석하였다(Fig. 3). NC의 경우 시간이 경과함에 따른 DNA 손상 정도가 감소하였으나 그 변화의 폭이 크지 않은 반면, 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리구(PC) 및 시료 처리구에서는 처리 1시간 후 DNA 손상



**Fig. 1.** The effect of supplementation *in vitro* with various concentrations of different solvents from *Curcuma longa* L. extracts on 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced DNA damage in human leukocyte. A, acetone extract; B, ethanol extract; C, methanol extract. Bars with different letters are significantly different at *P*<0.05 by Duncan's multiple range test.

이 증가하였으며 4, 12시간이 경과함에 따라 DNA 손상 회복력이 시간 의존적으로 감소하였다. 그뿐만 아니라 울금 추출물을 처리하였을 때 12시간 이후 DNA 손상 회복력이 NC와 동일한 수준으로 나타났다. Table 3과 같이 DNA 손상 회복력을 분석한 결과 그중 MC의 회복 수준이 87.8%가 가장 강력한 회복력을 나타내었다. 이 결과를 바탕으로 PC의 DNA 손상 정도 대비 추출물 처리구의 DNA repair half time 분석 결과를 Table 3에 나타내었다. PC가 9.5시간으로 회복을 위해 가장 오랜 시간이 필요한 데 반해, AC가 7.1시간, EC가 7.6시간, MC가 6.6시간으로 나타나 손상된 DNA가 정상수준으로 회복하는 데 걸리는 시간이 MC 처리



**Fig. 2.** Comparison of the antigenotoxic activities of different solvents from *Curcuma longa* L. extracts in human leukocyte by comet assay assessed by the estimated dose that would result in a 50% reduction in oxidative DNA damage (ED<sub>50</sub>) from 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. AC: acetone extract, EC: ethanol extract, MC: methanol extract. Bars with different letters are significantly different at *P*<0.05 by Duncan's multiple range test.

**Table 3.** Effect of various solvent extracts from *Curcuma longa* L. on the DNA repair ability of human leukocytes

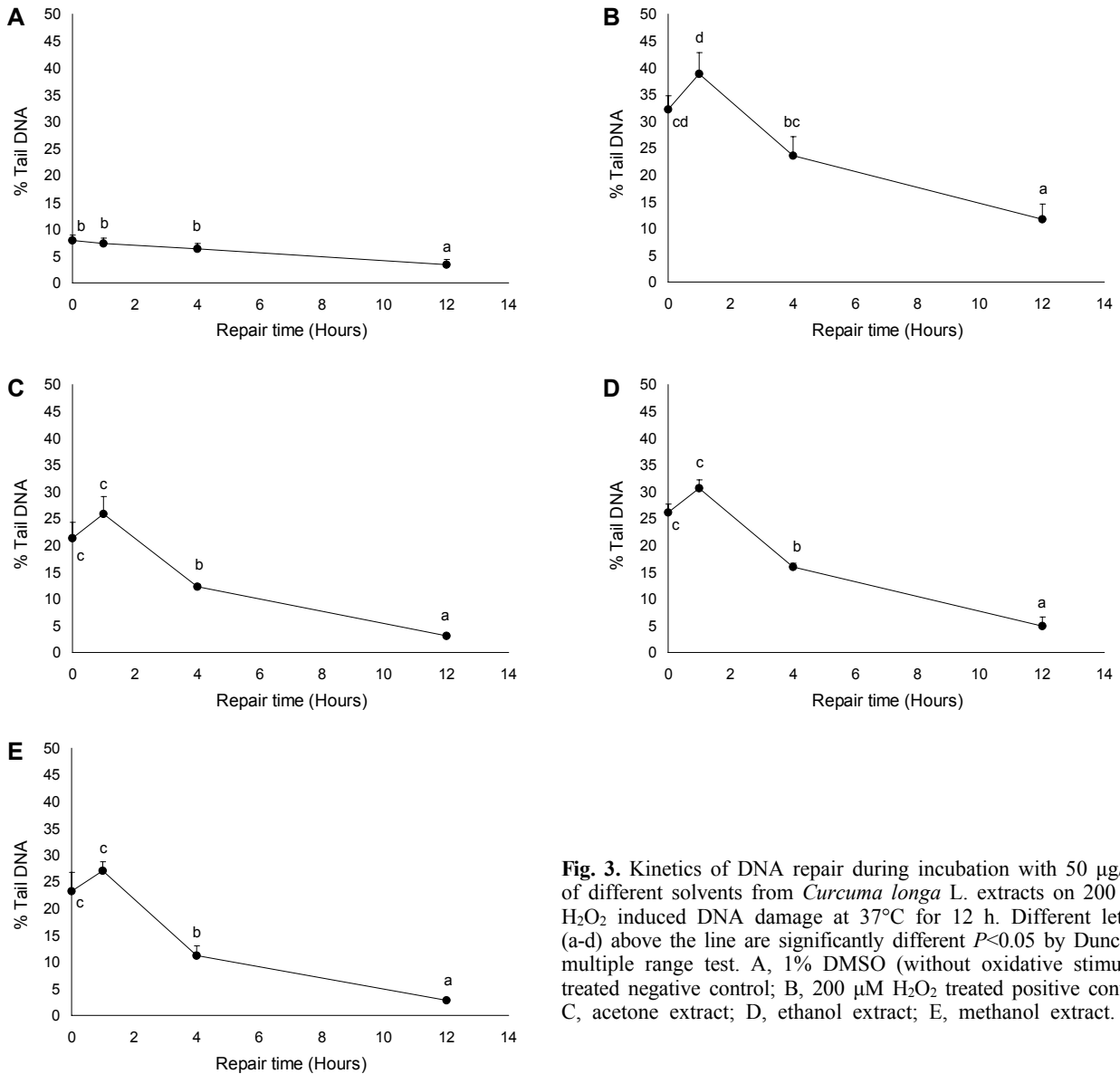
	Incubation time (h)	Repair ability (%) <sup>2)</sup>	Half time of DNA repair (h)
PC <sup>1)</sup>	1	—	9.5
	4	26.8	
	12	63.7	
AC	1	—	7.1
	4	42.1	
	12	85.4	
EC	1	—	7.6
	4	38.8	
	12	80.9	
MC	1	—	6.6
	4	51.7	
	12	87.8	

<sup>1)</sup>PC: 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated positive control, AC: acetone extract, EC: ethanol extract, MC: methanol extract.

<sup>2)</sup>Repair ability (%)=100×[(DoX - DtX)/DoX], where DoX represent DNA damage before the recovery period in the condition X and DtX represent DNA damage after a recovery period, for the same condition.

구에서 가장 짧은 것으로 나타났다.

일반적으로 인체는 산화적 스트레스에 대한 항산화물체에 의한 보호효과에도 불구하고 DNA 손상은 지속해서 일어나고 있으며 이러한 손상의 대부분은 repair 기전에 의해 회복된다(28). DNA 손상 회복력은 계속되는 산화적 스트레스에 의한 DNA의 손상을 최소 수준으로 유지하기 위해 repair enzyme이 활성화되어 방어하는 작용으로 회복된다(29). 만약 이 기전을 통해 DNA가 완전히 회복되지 않는다면 유전자 변형에 의해 돌연변이를 유발하여 암 등의 질병에 중대한 원인이 된다(28). 따라서 본 연구의 결과는 울금 추출물이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 방어기전에 작용하여 DNA 손상회복을 촉진한다는 것을 뒷받침한다.



**Fig. 3.** Kinetics of DNA repair during incubation with 50 µg/mL of different solvents from *Curcuma longa* L. extracts on 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced DNA damage at 37°C for 12 h. Different letters (a-d) above the line are significantly different  $P < 0.05$  by Duncan's multiple range test. A, 1% DMSO (without oxidative stimulus) treated negative control; B, 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated positive control; C, acetone extract; D, ethanol extract; E, methanol extract.

**요 약**

울금은 간질환, 기관지염, 폐질환 및 심장질환에 효과적인 식물로 알려져 있으며, 항산화 및 세포보호에도 작용하는 것으로 알려져 있다. 이러한 울금을 아세톤, 에탄올, 메탄올 등으로 추출하여 울금에 함유된 총 폴리페놀 함량(TPC) 및 DPPH 라디칼 소거능, SOD 유사활성 등의 항산화력 그리고 comet assay를 이용한 DNA 손상억제 효능 및 회복능을 분석하고자 하였다. 그 결과 TPC는 울금의 메탄올 추출물 (11.17±0.00 g GAE/100 g), 아세톤 추출물(1.45±0.00 g GAE/100 g), 에탄올 추출물(1.17±0.02 g GAE/100 g)의 순으로 나타나 메탄올 추출물에 가장 많은 폴리페놀이 함유된 것으로 나타났다. 항산화력을 분석한 DPPH 라디칼 소거능 및 SOD 유사활성 분석 결과 역시 메탄올 추출물이 가장

강력한 활성을 보였으며, 그다음으로 에탄올, 아세톤 추출물의 순으로 나타났다. Comet assay를 이용한 DNA 손상 억제력을 분석한 결과 모든 추출물 처리구가 추출물을 처리하지 않은 positive control(PC)에 비해 유의적인 DNA 손상 억제력을 보였으며, ED<sub>50</sub>값 분석 결과 메탄올 추출물이 86.7 µg/mL, 아세톤 추출물이 110.0 µg/mL, 에탄올 추출물이 115.8 µg/mL의 순으로 나타나 메탄올 추출물의 활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 울금 추출물 처리 4, 8, 12시간 후의 DNA 손상 회복력을 분석한 결과, negative control (NC)의 경우 시간 경과에 따른 회복 능력 변화가 크지 않았으나 추출물 처리구에서는 1시간 후 증가한 DNA 손상이 시간 의존적으로 회복되는 것을 확인하였으며, 특히 12시간 후의 회복 수준은 NC와 동일한 수준임을 확인할 수 있었다. 추출물을 처리하지 않은 NC에 대한 추출물 처리구의 DNA

repair half time을 분석한 결과, PC가 9.5시간으로 가장 오랜 시간이 걸린 데 반해 메탄올 추출물이 6.6시간, 아세톤 추출물이 7.1시간, 에탄올 추출물이 7.6시간으로 메탄올 추출물이 DNA 손상 회복에 가장 짧은 시간이 소요되는 것으로 나타났다. 결론적으로 본 연구를 통해 아세톤, 에탄올, 메탄올 등의 용매를 이용한 울금 추출물의 항산화 활성, DNA 손상 억제 및 회복활성을 확인하였다. 추출용매에 따른 활성 비교에서는 메탄올 추출물에서 가장 높은 활성이 나타났으므로 메탄올이 울금의 폴리페놀을 비롯한 항산화물 추출에 가장 효율적인 용매라는 것을 알 수 있었다. 그러나 본 연구에서는 항산화력을 가진 대표물질인 폴리페놀 성분만을 분석하여 폴리페놀 중 어떤 성분이 항산화력에 영향을 보인 것인지 알 수 없으므로, 차후 연구에서는 용매별 항산화물 성분 분석을 통해 항산화력 및 항유전독성 효과에 기인하는 물질이 무엇인지 근거가 뒷받침되어야 할 것으로 판단된다.

## REFERENCES

1. Surh YJ, Chun KS. 2007. Cancer chemopreventive effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595: 149-172.
2. Philpott M, Ferguson LR. 2007. Cancer prevention by dietary bioactive components that target the immune response. *Curr Cancer Drug Targets* 7: 459-464.
3. Johnson JJ, Mukhtar H. 2007. Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Lett* 255: 170-181.
4. Aggarwal BB, Harikumar KB. 2009. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 40-59.
5. Miriyala S, Panchatcharam M, Rengarajulu P. 2007. Cardioprotective effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595: 359-377.
6. Imlay JA. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57: 395-418.
7. Perrone GG, Tan SX, Dawes IW. 2008. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1783: 1354-1368.
8. Eigner D, Scholz D. 1999. *Ferula asa-foetida* and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. *J Ethnopharmacol* 67: 1-6.
9. Cuvelier ME, Richard H, Berset C. 1992. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 324-325.
10. Frei B, England L, Ames BN. 1989. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6377-6381.
11. Ammon HRT, Wahl MA. 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med* 57: 1-7.
12. Park J, Lee J, Jun W. 2013. Radical scavenging and anti-obesity effects of various extracts from turmeric (*Curcuma longa* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1908-1914.
13. Oh H, Park H, Ju MS, Jung SY, Oh MS. 2010. Comparative study of anti-oxidant and anti-inflammatory activities between *Curcuma longae* Radix and *Curcuma longae* Rhizoma. *Korea J Herbol* 25: 83-91.
14. Ju JC, Shin JH, Lee SJ, Cho HS, Sung NJ. 2006. Antioxidative activity of hot water extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 7-14.
15. Araújo CAC, Leon LL. 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L.. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 723-728.
16. Singh N, Rajini PS. 2004. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chem* 85: 611-616.
17. Öyanagui Y. 1984. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* 142: 290-296.
18. Ak T, Gülçin I. 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact* 174: 27-37.
19. Diplock AT. 1997. Will the 'good fairies' please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease?. *Free Radical Res* 27: 511-532.
20. Collins AR, Dušinská M, Gedik CM, Štětina R. 1996. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker?. *Environ Health Perspect* 104: 465-469.
21. Bub A, Watzl B, Blockhaus M, Briviba K, Liegibel U, Müller H, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. 2003. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J Nutr Biochem* 14: 90-98.
22. Fenech M, Stockley C, Aitken C. 1997. Moderate wine consumption protects against hydrogen peroxide-induced DNA damage. *Mutagenesis* 12: 289-296.
23. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA, Brown PO. 2003. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1896-1901.
24. Deutsch JC. 1998. Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 255: 1-7.
25. Blasiak J, Trzeciak A, Kowalik J. 1999. Curcumin damages DNA in human gastric mucosa cells and lymphocytes. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 18: 271-276.
26. Shibata H, Sakamoto Y, Oka M, Kono Y. 1999. Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 1295-1297.
27. Plappert U, Barthel E, Raddatz K, Seidel HJ. 1994. Early effects of benzene exposure in mice. Hematological versus genotoxic effects. *Arch Toxicol* 68: 284-290.
28. Fillion L, Collins A, Southon S. 1998. Beta-carotene enhances the recovery of lymphocytes from oxidative DNA damage. *Acta Biochim Pol* 45: 183-190.
29. Szeto YT, Collins AR, Benzie IFF. 2002. Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. *Mutat Res* 500: 31-38.