

## 한국산 겨우살이의 산화적 DNA 손상 억제작용

이소진 · 이미경 · 최근표\* · 김나영\*\*  
노성규\*\*\* · 허문영\*\*\*\* · 김종대 · 이현용 · 이진하†

강원대학교 바이오산업공학부, \*강원도립대학 식품생명과학과,  
\*\*경희대학교 식품영양학과, \*\*\*강원대학교 체육학부, \*\*\*\*강원대학교 약학대학

## Inhibitory effect of Korean mistletoes on the oxidative DNA damage

So Jin Lee, Mi Kyoung Lee, Geun Pyo Choi\*, Na Young Kim\*\*  
Seong Kyu Roh\*\*\*, Moon Young Heo\*\*\*\*, Jong Dai Kim, Hyeon Yong Lee, Jin Ha Lee†

School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon, Korea

\*Dept. Food & Life Science, Gangwon Provincial University, Gangneung, Korea

\*\*Dept. of Food and Nutrition, KyungHee Uni., Seoul 130-701, Korea

\*\*\*Dept. Physical Education, Kangwon National University, Chunchon, Korea,

\*\*\*\*College of Pharmacy, Kangwon National University, Chunchon, Korea

**ABSTRACT** : Korean mistletoes extracts were investigated for *in vitro* antioxidation activity, with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine(DPPH), and an inhibitory effect on oxidative DNA damage by using comet assay. The Korean mistletoes were 4 different kinds classified by their host plants (Korean *Viscum sp.* in *Quercus acutissima* Carr., Korean *Viscum sp.* in *Castanea crenata*, Korean *Viscum sp.* in *Betula platyphylla*, and Korean *Viscum sp.* in *Salix koreensis*). The samples were extracted with ethanol, and fractionated with *n*-butanol, ethyl acetate, chloroform, *n*-hexane, and second distilled water. Among them, ethyl acetate fraction from Korean *Viscum sp.* in *Betula platyphylla* showed the strongest activities to electron donating ability on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) and the protective effect on oxidative DNA damage.

**Key words** : *Viscum sp.*, oxidative DNA damage, comet assay

## 서 언

퇴행성 질환들에 있어서 중요한 원인으로 생각되는 것 중의 하나가 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이다(Loft *et al.*, 1992). ROS는 호기성 대사의 결과로서 정상적인 상태에서 늘 생성된다. ROS에는 superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydroxyl radicals( $\cdot OH$ ), hydrogen peroxide radical ( $\cdot OOH$ ) 등이 있는데, 이들은 높은 화학적 반응성 때문에 일시적으로만 존재하며 유해한 방식으로 DNA, 단백질, 탄수화물, 지질 등과 반응할

수 있다. 세포는 ROS에 대항하기 위한 다양한 항산화 체계를 갖고 있으나, ROS가 세포의 보호 체계를 압도하여 산화환원 항상성을 변화시키게 될 때, 결과적으로 oxidative stress를 입게 된다(James *et al.*, 2002). 생물은 주변환경과 내인성 oxidative stress에 노출되어 있다. 산화적 변이는 주로 단백질, 지질, DNA에서 발생되는데, 단백질과 지질은 쉽게 분해되고 재합성 되기 때문에 oxidative stress에 의한 가장 큰 영향은 DNA 대사과정 중에서 지속적으로의 변형이라 할 수 있다. DNA 염기의 변화는 oxidative stress에 의한 경우가 많으며 이러

† Corresponding author(phone) : jinhalee, E-mail : jinhalee@kangwon.ac.kr

Received 28 January 2002 / Accepted 5 June 2003

한 손상은 암의 유발과 노화과정과도 관련되어 있다 ((Finkel, T. *et al.*; 2000, Bohr, V. *et al.*; 1988, Kawarishi, S. *et al.*, 2001). 산화적 DNA의 손상은 노화를 추적시키며, 그의 주된 부위가 nuclear DNA가 아닌 mitochondria DNA에서 나타난다(Vilhelm *et al.*, 1999). DNA 손상을 일으키는 4가지의 중요한 과정으로는 oxidation, methylation, deamination, depurination 등이 있으며 이 중에서 oxidation이 가장 크게 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다(Ames, 1983).

한국의 산야에 자생하는 한국산 겨우살이(Korean *Viscum album*, var. *coloratum*)는 열매가 백색인 유럽산과는 달리 황색으로 식물의 모양 및 성분에도 유럽산과 차이가 많고, 한방명으로는 기생목(寄生木), 상기생(桑寄生) 등으로 부르며, 항암, 항고혈압, 항균, 항바이러스, 강심 등의 효과를 갖고 있는 것으로 보고된 바 있다(Ham *et al.* 1998; Park *et al.*, 1994a; Park *et al.*, 1994b; Park *et al.*, 1995c; Park *et al.*, 1997d; Park *et al.*, 1998e; Park *et al.*, 1999f; Yoon *et al.*, 1994a; Yoon *et al.*, 1995b; Yoon *et al.*, 1997c). 지금까지 겨우살이에 관한 연구는 주로 여러 암세포에 대한 세포독성효과(Doser *et al.*, 1989; Huelsen *et al.*, 1986; Khwaja *et al.*, 1986; Kuttan *et al.*, 1990; Ribereau-Gayou *et al.*, 1986a; Ribereau-Gayou *et al.*, 1986b)와 항종양 면역조절작용(Bocci *et al.*, 1993; Hajto *et al.*, 1989; Hajto *et al.*, 1990; Joller *et al.*, 1996; Ribereau-Gayou *et al.*, 1996; Schink, 1997)에 관한 연구가 수행되어 왔으며 이와 관련된 겨우살이 주성분이 lectin임이 널리 인정되어 왔다(Bocci *et al.*, 1993; Hajto *et al.*, 1989; Ribereau-Gayou *et al.*, 1996). 그러나 동양에서처럼 겨우살이를 차로 만들어 상시 복용하는 식문화 환경에서 겨우살이의 oxidative stress로 인한 질병의 예방효과에 대한 연구는 지금까지 전혀 이루어져 있지 않다.

DNA oxidative stress를 조사하기 위하여 사용된 comet assay는 분자 독성학을 비롯한 유전자 손상에 관련된 연구에 광범위하게 적용되는 최신 연구 기법으로 처음 Ostling and Johanson(1984)에 의해 각각의 세포 수준에서의 DNA 손상을 직접확인 하기 위하여 도입된 microgel electrophoresis방법으로 Dr. Singh등(1988)에 의해 보다 민감하게 DNA damage를 감지해낼 수 있는 방법으로 발전되었다. 이와 같이 세포 level에서 직접 DNA damage를 측정할 수 있는 comet assay는 방법적인 면에 있어서 간단하고 눈으로 그 손상정도를 쉽게 볼 수 있어서 각각의 세포수준에서 결과를 얻을 수 있는 독특한 방법이다.

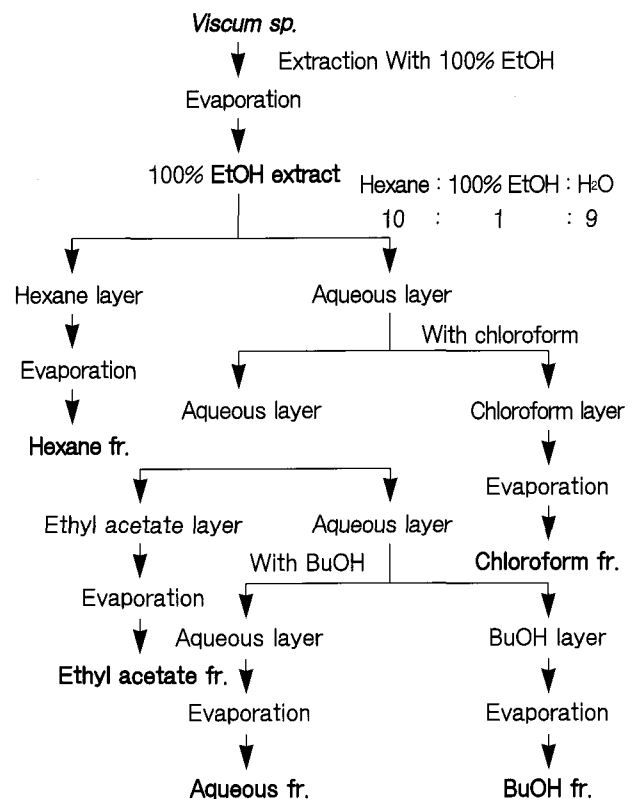
본 연구에서는 암과 노화 등과 관련이 큰 reactive

oxygen species(ROS)유발에 의한 DNA손상에 대하여 억제 가능성이 있는 물질로서 기주목(상수리나무, 밤나무, 자작나무, 버드나무)에 따른 한국산 겨우살이 ethanol 추출물과 5가지 분획물(hexane fr., chloroform fr., ethyl acetate fr., butanol fr., aqueous fr.)을 *in vitro*에서 DPPH에 대한 수소전자공여능의 조사로 항산화 활성과, comet assay를 이용하여 이들의 DNA의 산화적 손상에 미치는 영향을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료 및 추출방법

본 실험에 사용된 한국산 겨우살이(Korean *Viscum album*, var. *coloratum*)는 강원도 평창 지역에서 기주목에 따라 상수리나무 겨우살이(Korean *Viscum sp.* in *Quercus acutissima* Carr.), 밤나무 겨우살이(Korean *Viscum sp.* in *Castanea crenata*), 자작나무 겨우살이(Korean *Viscum sp.* in *Betula platyphylla*), 버드나무 겨우살이(Korean *Viscum sp.* in *Salix koreensis*) 등 총 4종의 겨우살이를 채집하여 물로 깨끗이 세척 한 후 자연 건조하였다. 겨우살이의 잎과 가지를 모두 사용하여 수직의 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료 중량 100g 에



Scheme 1. Fraction process of the Korean *Viscum sp.*

대하여 10배의 70% ethanol로 24시간 동안 2회 반복 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압 여과장치로 여과하여 농축 후 동결 건조하고, 이것을 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol 및 H<sub>2</sub>O로 극성의 차이에 의해 다섯 가지 분획으로 조제하여 분리된 용매 분획물은 농축시켜 시료를 얻었다. 그 방법은 Scheme 1.에 나타내었다. 각각의 분획물의 수율을 계산하고 실험에 사용하였다.

**2. 수소전자공여능(electron donating ability, EDA)에 의한 항산화 활성**

4종의 한국산 겨우살이 ethanol추출물과 용매별 분획물들을 DPPH를 이용한 수소전자공여능의 조사로 항산화 활성을 측정하였다(Blois, 1969; Choi *et al.*, 1993). 여러 농도의 시료를 4ml의 메탄올에 녹여 1.5×10<sup>-4</sup> M DPPH (in methanol)용액 1ml를 첨가한 후, 30분간 암소에 방치한 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 수소전자공여능은 각 실험을 3회 반복하여 평균을 낸 다음 대조구에 대한 흡광도의 감소정도를 다음 식에 의하여 계산하였다.

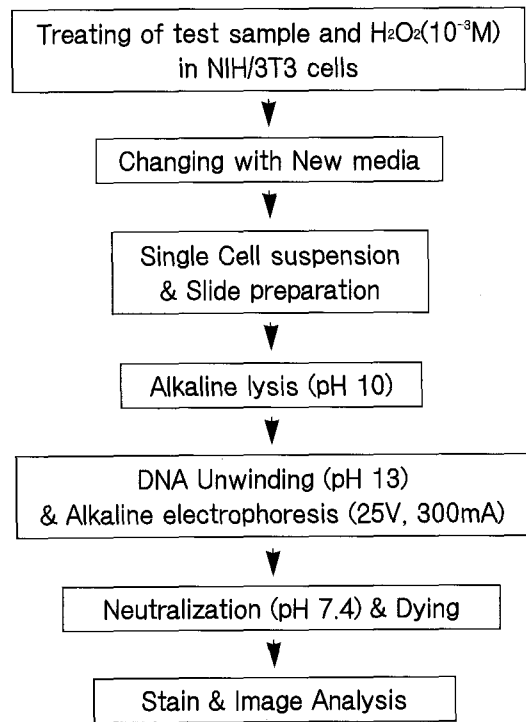
$$\text{Electron Donating Activity(\%)} = [1 - (A/B)] \times 100$$

A : 시료의 흡광도  
B : 대조구 흡광도

**3. Comet assay에 의한 DNA damage에 대한 영향**

*In vitro* 실험으로서 NIH/3T3 cell (mouse embryo fibroblast, ATCC CRL-1658)을 배양하여 comet assay 시험을 실시했다. Comet assay protocol은 Scheme 2.와 같다. 이 세포주는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지에 적응시켜 10% fetal bovine serum, 37.5℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다(Moon *et al.*, 2001). Positive control로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 사용하였으며, negative control로는 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 사용하였다. NIH/3T3 cell 5×10<sup>4</sup>개를 6-well에 각각 넣고, 24시간 후에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(최종농도는 10<sup>-3</sup>M)와 시료 0.1mg/ml(배지 내 시료를 녹인 DMSO의 양은 20μl)를 가한 배지로 교환하였다. 40분간 CO<sub>2</sub> incubator에서 incubation한 후, 새로운 배지로 교환하고 2시간 후에 trypsin-EDTA를 1ml 가하여 cell을 harvest하였다. 이에 PBS (without Cl<sup>-</sup>, Mg<sup>2+</sup>)를 동량 가한 후, 1000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 각각에 0.5% low melting point agarose (LMPA)를 200μl 가하고 적절히 vortex 하였다. 이 액 50μl를 0.65% normal melting point agarose(NMPA) 100μl로 미리 입힌 slide (fully frosted)에 떨어뜨린 후 cover slide를 덮고, 상온에

서 20분간 굳힌 뒤, cover slide를 제거한다음 그 위에 다시 0.5%-LMPA 100μl 떨어뜨린 후 cover slide로 덮고 상온에서 다시 30분간 굳혔다. Cover slide를 제거한 후, lysis buffer (2.5M NaCl, 100mM EDTANa<sub>2</sub>, 10mM Tris buffer, pH 10, 10% DMSO, 1% Triton X-100)에 담근 후에 aluminum foil로 빛을 차단한 채로 1시간 동안 lysis 시켰다. 이것을 electrophoresis buffer(300mM NaOH, 1mM EDTANa<sub>2</sub>, pH 13)에 담근 후에 역시 aluminum foil로 빛을 차단한 채로 30분간 정치시켰다. 다음에 electrophoresis apparatus에 slide를 양극쪽으로 배열한 뒤 25V, 300mA에서 15분간 electrophoresis을 행하였다. Slide를 꺼내어 10분씩 3번 0.4M Tris buffer(pH 7.5) 중에서 중화시켰다. Tray에 걸어 충분히 건조시킨 후 ethidium bromide (2μg/ml)를 30μl씩 각각의 slide에 떨어뜨려 염색한 후 515-560nm의 excitation filter와 590 nm의 barrier filter를 이용하여 형광현미경으로 관찰하였다. 이 때, 관찰은 image analyzer인 KOMET 3.1 (Kinetic Imaging, England)을 사용하여 분석하였다 (Andrew *et al.*, 1997; Andrew *et al.*, 1997; Choucroun *et al.*, 2001; Daryl *et al.*, 1995; Darina *et al.*, 1998; Kim & O'Neill, 1996; McKelvey *et al.*, 1993; Narendra *et al.*, 1991; Narendra, 1996; Singh *et al.*, 1988; Sona & Darina, 2002; Sylvie *et al.*, 1998; Thierry *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999; 류 등., 1997; 지 등., 2000).



Scheme 2. Process of the Comet assay

4. Data의 통계처리

모든 결과는 SPSS V. 10.0.7K 로 처리하여 각 항목에 따라 평균오차(SE)를구하고 유의차는 student t-test로 검증하였다. 복수군 별 유의성 검증은 one-way analysis(ANOVA)를 행하고 상관관계(p<0.05)는 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 수소전자공여능(electron donating ability)에 의한 항산화 활성

In vitro상에서의 4종의 한국산 겨우살이(Korean Viscum sp.) ethanol추출물과 분획물들의 DPPH에 대한 전자공여능을 비교하여 Table. 1에 나타내었다.

그 결과, 상수리나무 겨우살이(Korean Viscum sp. in Quercus acutissima Carr.), 밤나무 겨우살이(Korean Viscous sp. in Castanea crenata), 자작나무 겨우살이(Korean Viscum sp. in Betula platyphylla), 버드나무 겨우살이(Korean Viscum sp. in Salix koreensis) ethanol추출물의 전자공여능은 각각 20ug/ml첨가시 19.62%, 16.85%, 14.73%, 19.23%, 40ug/ml첨가시 22.51%, 28.92%, 24.17%, 27.40%, 100ug/ml첨가시 34.87%,

37.61%, 30.91%, 30.50%의 효과를 나타내었다.

4종의 한국산 겨우살이의 분획물 중 ethyl acetate fr. 에서 수소전자공여능이 가장 높았으며, ethyl acetate fr. 20ug/ml의 첨가 경우, 전자공여능은 각각 상수리나무 겨우살이(31.33%), 밤나무 겨우살이(30.60%), 자작나무 겨우살이(33.37%), 버드나무 겨우살이(29.30%), 40ug/ml의 첨가 경우, 전자공여능은 각각 상수리나무 겨우살이(50.43%), 밤나무 겨우살이(49.26%), 자작나무 겨우살이(52.33%), 버드나무 겨우살이(46.50%), 100ug/ml의 첨가 경우, 전자공여능은 각각 상수리나무 겨우살이(71.10%), 밤나무 겨우살이(73.35%), 자작나무 겨우살이(79.35%), 버드나무 겨우살이(70.54%)의 효과가 나타났다.

항산화 작용은 경우에 따라서 항암성 작용을 함께 나타내는 경우가 있는데 이러한 경우의 대부분은 flavonoid 또는 phenol 계 화합물이 그 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Cutter et al., 2001; Anto et al., 1995), 겨우살이의 항산화 작용은 지금까지 암 세포에 특이적인 세포독성을 나타내는 lectin이라고는 생각되지 않으며 어떠한 lectin도 항산화 활성이 있다고는 보고된 바가 없다. 그런 고로 겨우살이의 항산화 작용은 세포독성을 보인 lectin이 아닌 다른 성분으로 추정된다.

Table 1. Electron donating activity of Viscum sp. on DPPH

Samples	Concentration (ug/ml)	EDA(%) <sup>†</sup>					
		Ethanol	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol	Aqueous
Q.c	20	19.62	19.23	24.37	31.33	15.30	15.61
	40	22.51	26.78	31.53	50.43	30.03	16.21
	100	34.87	46.86	41.51	71.10	36.08	17.06
C.c	20	16.85	18.51	21.25	30.60	19.88	13.72
	40	28.92	22.41	32.80	49.26	28.90	16.28
	100	37.61	33.55	45.52	73.35	44.12	18.33
B.p	20	14.73	14.91	22.02	33.37	23.39	13.13
	40	24.17	23.78	34.56	52.33	27.68	14.42
	100	30.91	28.25	46.68	79.35	39.55	16.90
S.k	20	19.23	17.45	17.06	29.30	18.58	12.38
	40	27.40	24.86	20.19	46.50	23.78	14.65
	100	30.50	29.46	24.04	70.54	31.14	18.22

Q.c : Korean Viscum sp. in Quercus acutissima Carr.

C.c : Korean Viscum sp. in Castanea crenata

B.p : Korean Viscum sp. in Betula platyphylla

S.k : Korean Viscum sp. in Salix koreensis

<sup>†</sup> Electron Donating Activity(%) = [ 1-(A/B) ] × 100

A : 시료의 흡광도 B : 대조구 흡광도

2. Comet assay에 의한 DNA damage에 대한 영향

Fig. 1에서 3가지 image analyzer인 KOMET 3.1를 사용하여 3가지 parameter를 분석하여 산화적 DNA손상에 미치는 효과를 나타내었다.

Fig. 1은 head DNA(%)를 나타낸 것으로 positive control인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(10<sup>-3</sup>M)로 40min동안 세포에 처리하여 산화적 손상을 준 결과, head DNA 59%를 보였으며, 시료를 녹이는데 사용된 negative control인 DMSO의 head DNA는 95%로 나타났다. 상수리나무 겨우살이의 ethyl acetate fr.(0.1mg/ml)을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(10<sup>-3</sup>M)와 동시 처리시 tail DNA가 87%, 자작나무 겨우살이 ethyl acetate fr.은 89%, 상수리나무 겨우살이 butanol fr.은 80%, 자작나무 겨우살이 butanol fr.은 83%로 head DNA가 positive control에 비하여 증가함을 알 수 있었다. 과산화수소는 과산화 수소 유리기를 생성하는 대표적인 물질로 일반 공기 중에서 과산화 용 유리기를 생성하는 원리를 이용하여 DNA를 산화적으로 손상을 유도하고 그 작용을 겨우살이 분획물이 억제하는 기능을 조사한 것으로 이미 전술한 바와 같이 겨우살이의 분획물의 항산화 작용이 DNA의 산화적 손상을 억제하는 것으로 보인다. Comet assay에서 DNA head가 원형을 많이 유지 할수록 손상의 정도가 적은 것으로 DNA head % 수가 많은 것이 항산화력이 강한 역할을 가지고 있다고 볼 수 있다.

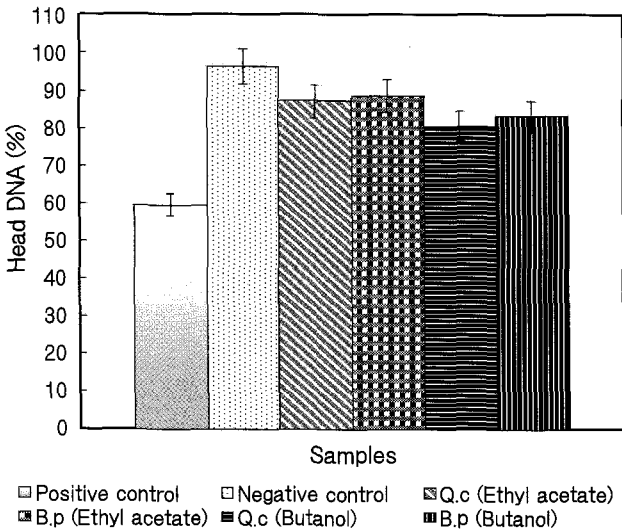


Fig. 1. Maintenance effect of fractions (0.1mg/ml) from Korean *Viscum sp.* on head DNA of NIH/3T3 cell line induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 Q.c : Korean *Viscum sp.* in *Quercus acutissima* Carr.  
 B.p : Korean *Viscum sp.* in *Betula platyphylla*  
 Arithmetic mean(n=5), p<0.01

Fig. 2은 tail DNA(%)를 나타낸 것으로 positive control인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10<sup>-3</sup>M)로 40min동안 세포에 처리하여 산화적 손상을 준 결과, tail DNA 41%를 보였으며, 시료를 녹이는데 사용된 negative control인 DMSO의 tail DNA는 5%로 나타났다. 상수리나무 겨우살이의 ethyl acetate fr.(0.1mg/ml)을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10<sup>-3</sup>M)와 동시 처리시 tail DNA가 13%, 자작나무 겨우살이 ethyl acetate fr.은 11%, 상수리나무 겨우살이 butanol fr.은 20%, 자작나무 겨우살이 butanol fr.은 17%로 tail DNA가 positive control에 비하여 감소함을 알 수 있었다. DNA tail이 생성되는 원리는 세포중에 DNA가 과산화 수소 라디칼이 의하여 손상되어 DNA fragment가 생기는 것으로 이 DNA tail의 % 수가 많을수록 항산화력이 적은 것으로 판단할 수 있다.

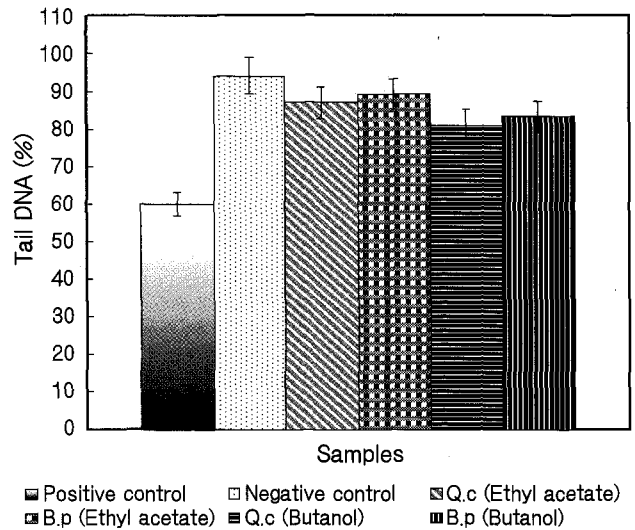
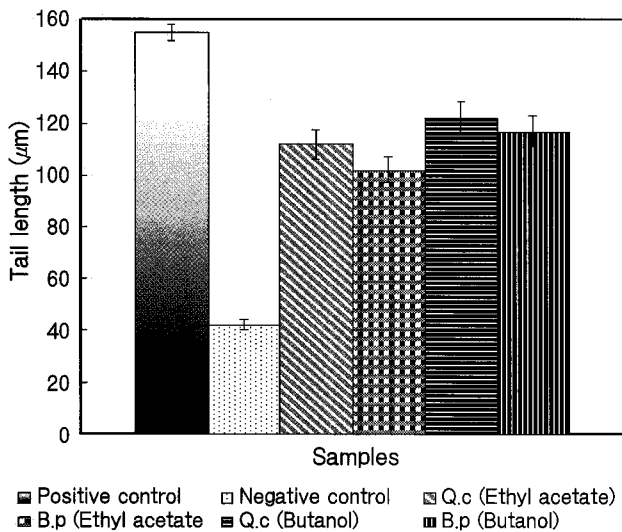


Fig. 2. Inhibitory effect of fractions (0.1mg/ml) from Korean *Viscum sp.* on DNA damage of NIH/3T3 cell line induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 Q.c : Korean *Viscum sp.* in *Quercus acutissima* Carr.  
 B.p : Korean *Viscum sp.* in *Betula platyphylla*  
 Arithmetic mean(n=5), p<0.01

Fig. 3는 분석에 유용한 parameter인 tail length(μm)로써 positive control인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10<sup>-3</sup>M)로 40min동안 세포에 처리하여 산화적 손상을 준 결과, 149μm의 tail length를 보였으며, 시료를 녹이는데 사용된 negative control인 DMSO의 tail length는 43μm로 나타났다. 상수리나무 겨우살이의 ethyl acetate fr.(0.1mg/ml)을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(10<sup>-3</sup>M)와 동시 처리에는 110μm, 자작나무 겨우살이 ethyl acetate fr.은 104μm, 상수리나무 겨우살이 butanol fr.은 123μm, 자작나무 겨우살이 butanol fr.은 118μm로 tail length가 positive control에 비하여 감소함을 알 수 있었다. 시료

를 녹이는데 사용된 negative control인 DMSO의 tail length는 43 $\mu$ m로 나타났다. DNA tail의 길이를 측정하여 수치로 본 몇몇 겨우살이 분획물의 DNA의 산화적 손상에 대한 항산화력 기능의 차이는 크지 않으나 대조구인 과산화수소 유리기의 경우보다 감소하는 것이 확인된 것은 겨우살이가 항산화성 물질로 암세포에 대한 특이적인 세포독성이 lectin과 함께 작용할 가능성도 기대된다.

이 연구의 결과로 겨우살이의 분획물들은 항산화력이 있으며 아울러 산화적 DNA 손상을 억제할 수 있는 기능이 있음이 확인되었다.



**Fig. 3.** Inhibitory effect of fractions (0.1mg/ml) from Korean *Viscum sp.* on tail DNA length of NIH/3T3 cell line induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 Q.c : Korean *Viscum sp.* in *Quercus acutissima* Carr.  
 B.p : Korean *Viscum sp.* in *Betula platyphylla*  
 Arithmetic mean(n=5), p<0.01

### 적 요

기주목(상수리나무, 밤나무, 자작나무, 버드나무)별 겨우살이 ethanol추출물과 5가지 분획물 (hexane fr., chloroform fr., ethyl acetate fr., butanol fr., aqueous fr.)을 이용하여 *in vitro*에서 DPPH를 이용한 수소전자공여능, DNA에 대한 산화적 손상 및 손상억제 효과등에 미치는 영향을 연구하기 위하여 comet assay를 실시하였다.

4종의 한국산 겨우살이의 ethanol추출물과 분획물 중 ethyl acetate fr.들이 높은 수소전자공여능을 보였다.

Comet assay 분석에서 head DNA의 형태를 유지하거나 또는 tail DNA의 생성을 억제하는 겨우살이 fr.들이 DNA에 대하여 항산화적 기능이있음을 보여 주었다. 또는

comet assay 유용한 parameter인 tail length( $\mu$ m)는 positive control인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10<sup>-3</sup>M)로 40min동안 세포에 처리하여 산화적 손상을 준 결과, 149 $\mu$ m의 tail length를 보였으며, 상수리나무 겨우살이의 ethyl acetate fr.(0.1mg/ml)을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(10<sup>-3</sup>M)와 동시 처리에는 110 $\mu$ m, 자작나무 겨우살이 ethyl acetate fr.은 104 $\mu$ m, 상수리나무 겨우살이 butanol fr.은 123 $\mu$ m, 자작나무 겨우살이 butanol fr.은 118 $\mu$ m로 tail length가 감소하는 것으로 보아 겨우살이가 산화적 DNA 손상을 방어한다는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과로 볼 때 한국산 겨우살이는 산화적 stress를 일으키는 활성 산소 자유라디칼의 생성에 대해 보호 활성을 나타내어 유용한 chemopreventive agent의 기능이 기대된다.

### 사 사

본 연구논문은 2001년도 한국과학재단 지역협력연구센터 사업(한림대 실버생물산업기술연구센터 R12-2001-007)의 연구비 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사 드립니다.

### LITERATURE CITED

Ames BN (1983) Dietart carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative diseases. *Science*. 221. 1256-1246.

Andrew C, Maria D, Michael F, Martina S, Helena P, Susan D, Laurence F, Mihalis P, Katarina R and Nicholas V (1997) Comet assay in human biomonitoring studies : reliability, validation and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30 : 139-146.

Andrew R, Collins, Victoria L, Dobson, Maria Dusinska, Gayle Kennedy, Rudolf Stetina (1997) The comet assay: what can it really tell us?. *Mutation Res.* 375 : 183-193.

Anto RJ, Sukumaran K, Kuttan G, Rao MNA, Subbaraju V and Kuttan R (1995) Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds, *Cancer Lett.* 97 : 33-37

Blois MS (1969) Antioxidant determination by the use of stable free radical. *J. Food. Sci.* 40-981.

Bocci V (1993) mistletoes(*Viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy, a review. *J. Biol. Regul. Homeo. Agents* 7 : 1-6.

Bohr V, Anson RM, Mazur S, and Dianov G (1988) Oxidative DNA damage processing and changes with aging, *Toxicol. Lett.* 102-103, 47-52

Byung Hoon H, Myung Hwan P, Jae Youl C, Ji Soo P, Eun Sook Y, Kyong UB (1998) Effect of Ginsenosides from *Panax Ginseng* on TNF-alpha Production and T Cell

- Proliferation, *Yakhak Hoeji* 42(3) . 29 : 6~301
- Choi JS, Park JH, Kim HG, Young HS and Mun SI (1993) Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus daviana*. *Kor. J. Pharmacology* 24 : 299-303.
- Choucroun P, Gillet D, Dorange G, Sawicki J, Dewitte D (2001) Comet assay and early apoptosis. *Mutation Research* 478 : 89-96.
- Cutter H, Wu LY, Kim C, Morre DJ and Morre DM (2001), Is the cancer protective effect correlated with  $\lambda$  growth inhibition by green tea (-)-epigallocatechin gallate mediated through an antioxidant mechanism?, *Cancer Lett.* 162 : 149-154
- Darina Slamenova, Alena Gabelova, L'ubica Ruzekova (1998) Perculturing of Chinese hamster V79 cells with sublethal concentration of theophylline sensitizes cells to cytotoxic effects of MNNG. *Mutation Research* 408 : 11-17.
- Daryl W Fairbairn Peggy L, Olive Kim L (1995) The comet assay : a comprehensive review. *Mutation Research* 339 : 37-59.
- Dool R, and R Peto (1981) The causes of cancer : Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today., *J. Natl. Cancer Inst.* 66(6) : 1192.
- Doser C, Doser M, Huelsen H and Mechelke F (1989) influence of carbohydrates on the cytotoxicity of an aqueous mistletoes drug and of purified mistletoes lectins tested on human T-leukemia cells. *Arzneim-forsch. Drug Res.* 39 : 433-436.
- Doyle A, JB Griffiths, and DG Newell (1993) *Cell & Tissue culture : Laboratory procedures*. Wiley.
- Finkel T, and Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of aging, *Nature* 408(9) : 239-247
- Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C and Gabius HJ (1990) Increased secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to  $\beta$ -galactoside specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.* 50 : 3322-3326.
- Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ (1989) Modulatory potency of the  $\beta$ -galactoside specific lectin from mistletoe extract(iscador) on the host defense system *in vitro* in rabbits and patients. *Cancer Res.* 49 : 4803-4808.
- Huelsen H, Doser C, Mecheilke E (1986) Differences in the *in vitro* effectiveness of preparations produced from mistletoes of various host trees. *Arzneim-forsch. Drug Res.* 39 : 647-651.
- James F Curtin, Maryanne Donovan, Thomas G Cotter (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods* 265(1-2) : 49-72.
- Joller PW, Menrad JM Schwarz T, Pfueller U, Parnham, M.J., Weyhenmeyer, R. and Lentzen, H (1996) Stimulation of cytokine production via a special standardized of mistletoes preparation in an *in vitro* human skin bioassay. *Arzneim-Forsch. Drug Res* 46 : 649-653.
- Kawanishi S, Hiraku Y, and Oikawa S (2001) Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation Res.* 488 : 65-76
- Khwaja TA, Dias CB and Pentecost S (1986) Recent studies on the anticancer activities mistletoes(*Viscum album*) and its alkaloids. *Oncology* 43, Suppl. 1 : 42-50.
- Kim L and O Neill Daryl W (1996) Analysis of SCGE using laser-scanning microscopy. *Mutation Res.* 319 : 129-134.
- Kuttan G, Vasudevan DM and Kuttan R (1990) Effect of a preparation from *Viscum album* on tumor development *in vitro* and in mice. *J. Ethnopharmacol.* 29 : 35-41.
- McKelvey-Martin VJ, Green MH L, Schmeizer P, Pool-Zobel BL, De Meo P and Collins A (1993) The single cell electrophoresis assay(comet assay) : A European review. *Mutation Research* 288 : 47-63.
- Moon Kim Lee Jo Kim (2001) Protection against ultraviolet B- and C-induced DNA damage and skin carcinogenesis by the flowers of *Prunus persica* extract. *Mutation Research* 496 : 47-59.
- Narendra P Singh (1996) Microgel Electrophoresis of DNA from Individual Cells. *Plenum Press. New york.*
- Narendra PS, Raymond RT, Ralph ES and Edward LS (1991) A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Res.* 252 : 289-296.
- Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjonneland A, Overvad K, Poulsen HE (1992) Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans : influence of smoking. gender and mass index. *Carcinogenesis* 13(12) : 2241-2247.
- Ribereau-Gayon G, Dumont S, Muller C, Jung ML, Poindron P and Anton R (1996) mistletoe lectin I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett.* 109 : 33-38.
- Ribereau-Gayon G, Jung ML, Baudino S, Salle G and Beck JP (1986a) Effects of mistletoes(*Viscum album*) extract on cultured tumor cells. *Experientia* 42 : 594-599.
- Ribereau-Gayon G, Jung ML, Baudino S, Salle G and Beck JP (1986b) Comparison of the effects of fermented and unfermented mistletoes preparations on cultured tumor cells. *Oncology* 43, Suppl. 1 : 35-41.
- Schink M (1997) Mistletoe therapy for human cancer : the role of the natural killer cell, *Anti-Cancer Drugs.* Suppl. 47-51.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175 : 184-191.
- Sona Robichova, Darina Slamenova. (2002) Effects of vitamins C and E on cytotoxicity induced by N-nitroso

- compounds, *N*-nitrosomorpholine and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in Caco-2 and V79 cell lines. *Cancer letters* 182 : 11-18.
- Sylvie S, Christine S, Nathalie S, Nathalie E** (1998) Use of the Single-Cell Gel Electrophoresis Assay for the Immunofluorescent Detection of DNA Damage. *Anal. Biochemistry* 259 : 1-7.
- Thierry G, Edwige D, Pierre L, Carole V, Francois S, Jean Michel P, Pascal G** (1999) Early detection of staurosporine induced apoptosis by comet and annexin V assays. *Histochem Cell Biol.* 112 : 155-161.
- Thomas B, Wilfried B, Ulrike M, Wolfgang-Ulrich M, Christian S** (1999) Optimization and Standardization of the "Comet Assay" for Analyzing the Repair of DNA Damage in Cells. *Strahlenther Onkol.* 175 : 333-40.
- Vilhelm A Bohr, Grigory L Dianov** (1999) Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie.* 81 : 155-160.
- Won-Bong Park, Bo-Yeun Choung, Sun-Myo Park, Taik-Soo Lee, Jung-Hee Kim and Seung-Shi Ham** (1999) Antitumor activities of extracts and lectin from *Viscum album* L. and *Viscum album* var. *coloratum* on cultured HL-60 cells. *Foods and Biotechnology* 8(4) : 232-237.
- Yoon TK, Yoo YC, Choi OB, Do MS, Kang TB and Lee SW** (1995) Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor angiogenesis and metastasis of hematogenous and nonhematogenous tumor cells in mice. *Cancer Lett.* 97 : 83-91.
- Yoon TK, Yoo YC, Hong EK and Cho YH** (1994) Effects of Korean mistletoe extracts on the induction of IL-1 and TNF- $\alpha$  from macrophages. *Kor. J. Pharmacogn.* 25 : 132-139.
- Yoon TK, Yoo YC, Kang TB, Do MS, Azuma I and K JB** (1997) Immunological activities of Korean mistletoe extract (*Viscum album coloratum*; KM-110). *Korean J. Immunol.* 19 : 571-581.
- Ryu JC, Kim HJ, Seo YR and Kim KR** (1997) Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay) to Detect DNA damage and Apoptosis in Cell Level. *Environmental Mutagens.* 17-2. 71-77.
- Lee TC** (1996) Colored standard illustration of Korean plants (Korean). Academic Publish Co. (Seoul, Korea) 71.
- Ji ST, Park JH, Hyun CK and Shin HK** (2000) the antigenotoxic effects of Korean native fermented food, Baechu Kimchi using comet assay. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29(2) : 316-321.