

Comet Assay를 이용한 케일, 명일엽, 당근, 돌미나리 녹즙의 Chinese Hamster Lung 세포 DNA 손상 보호 효과

전은재* · 김정신* · 박유경* · 김태석** · 강명희**[§]

한남대학교 이과대학 식품영양학과,* (주)풀무원 기술연구소 생물공학연구팀**

Protective Effect of Yellow-Green Vegetable Juices on DNA Damage in Chinese Hamster Lung Cell Using Comet Assay

Jeon, Eun-Jae* · Kim, Jung-Shin* · Park, Yoo Kyoung*
Kim, Tae Seok** · Kang, Myung-Hee**[§]

Department of Food and Nutrition,* Hannam University, Daejeon 306-791, Korea
Biotechnology Team,** Pulmuone Co., Ltd., Seodaemun P.O.Box 146, Seoul 120-600, Korea

ABSTRACT

The present study was attempted to investigate the antioxidant capacity of popular yellow-green vegetable juices (kale, *Angelica keiskei*, carrot, small water dropwort) and to investigate the effect of vegetable juices on protecting oxidative damage to DNA in cultured Chinese hamster lung (CHL) cells. Antioxidant capacity was analyzed by TRAP assay (Total radical-trapping antioxidant potential). Cellular DNA damage was measured by SCGE (single-cell gel electrophoresis, also known as comet assay). Cells incubated in medium with PBS (negative control) or with various concentration of the freeze dried green juices (25, 50, 100, 250 ug/mL) resuspended in PBS were treated with H₂O₂ (200 μM) as an oxidative stimulus for 5 min at 4°C. The physiological function of each vegetable juice on oxidative DNA damage was analyzed and expressed as tail moment (tail length × percentage migrated DNA in tail). Kale juice had the highest TRAP value suggesting that kale has the highest antioxidant capacity followed by *Angelica keiskei*, small water dropwort and carrot. Cells treated with H₂O₂ had extensive DNA damage compared with cells treated with PBS or pre-treated with vegetable juice extracts. All green juices inhibited H₂O₂-induced DNA damage with kale being the most effective juice among the tested juices. These results indicate that green juice supplementation to CHL cells followed by oxidative stimulus inhibited damage to cellular DNA, supporting a protective effect against oxidative damage induced by reactive oxygen species. (*Korean J Nutrition* 36(1) : 24~31, 2003)

KEY WORDS : *Angelica keiskei* · small water dropwort · carrot juice · DNA damage · comet assay · Chinese hamster lung (CHL) cell · TRAP.

서 론

최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 채소 녹즙을 복용하는 사람들이 크게 늘어나고 있다. 이는 녹즙 섭취가 질병이 있는 경우뿐만 아니라 일반인에게도 영양의 불균형을 해소하고 건강에 도움이 되는 천연 성분들을 공급하여 질병을 예방하고 최적의 건강을 유지한다고 소개되고 있기 때문이다.¹⁾ 녹즙은 가열하지 않는 생 야채를 마쇄하여 흡수하기 쉽도록 제조된 즙으로 카로테노이드와 비타민, 무

기질을 많이 함유하고 있고,²⁾ 그 외에도 flavonoids 등 phytochemical을 풍부하게 포함하고 있다.^{3,4)} 녹즙의 주재료로는 케일, 명일엽 (신선초), 샐러리, 돌미나리, 당근, 토마토, 오이, 사과 등의 녹황색 채소 및 과일이 널리 사용되고 있으나 녹즙의 생리적 효능에 대한 과학적인 연구는 충분하지 않다. 그 동안의 녹즙 연구로는 각 채소들의 비타민 함량 등 영양소 함량에 대한 연구,²⁾ 녹즙추출물의 세포 돌연변이 유발억제효과,^{5,6)} 암세포의 성장을 저해하는 효과에 관한 *in vitro* 연구⁷⁾ 등이 보고되고 있다. 녹즙에 관한 동물 실험 연구로는 케일 녹즙 섭취 후 혈청지질 개선효과 연구,⁸⁾ 명일엽 녹즙의 간 손상 방지효과⁹⁾ 및 지질대사 개선 효과에 관한 연구¹⁰⁾가 보고되었다. 그러나 이 연구들의 특징은 대부분 한 가지 녹즙 시료에 대한 생리적 효과를 검

접수일 : 2002년 12월 17일

채택일 : 2003년 1월 10일

[§]To whom correspondence should be addressed.

토한 것이었으며, 현재까지 여러 녹즙들의 생리적 활성이나 기능을 비교한 연구는 보고된 바 없다.

식품의 생리활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있는데, 유전 독성 억제 효과를 알아보는 방법으로 세포 DNA의 손상을 측정하는 방법이 널리 쓰이고 있다. 체내에서 자유유리기 (free radical)와 항산화 물질 (antioxidant) 간의 적절한 균형이 깨져 free radical이 antioxidant 수준보다 초과되면 신체는 산화적 stress를 받게되고, 그 결과 DNA와 같은 민감한 biomolecule이 손상되어 결국은 퇴행성 만성질환으로 발전될 가능성이 높아 진다.^{11,12)} 특히, 활성 산화 물질 (reactive oxygen species, ROS)이나 활성 질소 물질 (peroxynitrite)이 과도하게 존재할 때 이들은 더욱 파괴적이고도 비가역적인 DNA 손상을 일으키며, 이것이 원인이 되어 mutagenesis를 초래하고 나아가 암으로까지 발전할 수 있게 된다.^{12,13)} 그 동안 세포의 DNA 손상을 측정하는 많은 연구방법들이 개발되어 왔는데 최근 DNA 손상을 분석하거나 특히 DNA strand breaks를 검출하는데 간단하며 민감한 기술로 single-cell gel electrophoresis (comet) assay가 소개되고 있다.¹³⁾ 각 세포수준에서 DNA 손상정도를 관찰하는 comet assay는 현재 국내외를 막론하고 방사선 조사식품의 방사선 검지 실험,¹⁴⁻¹⁶⁾ 유전독성 실험과 세포사멸 등의 연구^{17,18)} 및 DNA 손상에 미치는 ROS의 영향이나 식품 항산화제의 DNA 손상 방어 효과에 대한 다양한 연구 등에 활발히 사용되고 있다.¹⁹⁻²¹⁾ 그동안 Comet Assay를 이용하여 수행된 선행 연구를 살펴보면, 식품 내 특정 성분, 즉 quercetin, myricetin, kaempferol, rutin 등 flavonoid 성분,^{19,21,22)} vitamin C,²¹⁾ 대두 부산물²³⁾ 또는 epigallocatechin 같은 phenolic compound 등^{12,24)}이 hydrogen peroxide의 산화적 손상을 받은 DNA에 대한 항 돌연변이 효과를 가지는지를 살펴본 논문이 많이 보고되고 있다. 그러나, 최근에는 식품의 특정성분을 분리, 정제하여 그의 항 돌연변이 효과를 보기보다 식품 전체의 항 돌연변이나 항 유전독성 효과를 평가하는 방향으로 연구의 추세가 전환되고 있다.^{25,26)} 우리 나라에서는 지등²⁷⁾이 전통발효식품인 김치에서의 항 유전 독성효과를 comet assay로 분석하여 발표한 것 외에, 식품의 특정성분이나 식품 추출물의 DNA 손상 억제 효과를 살펴본 연구는 거의 없다.

본 연구는 케일 (kale), 명일엽 (혹은 신선초, *Angelica keiskei*), 당근 (carrot), 돌미나리 (small water dropwort) 녹즙의 항산화능을 측정하여 비교해 보고, 여러 녹즙의 산화적 DNA 손상 보호효과를 comet assay를 이용한 CHL 세포 배양실험을 통하여 관찰하여 비교해 보려는 목적으로

시도되었다.

연구방법

1. 녹즙시료의 제조

녹즙은 (주)풀무원에서 제조, 판매되고 있는 100% 케일 (*Brassica oleracea var. acephala*), 명일엽 (*Angelica keiskei*), 당근 (*Daucus carota L.*), 돌미나리 (Small water dropwort, *Oenanthe stolonifera DC*) 녹즙을 제공받아 즉시 4°C, 9,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 취한 후 항산화능 측정을 위해 별도의 시험관에 분주하였다. 또한, *in vitro* 세포배양 실험을 위해서는 위의 과정을 거친 후 milipore filter (0.45 μm)로 여과 멸균하여 나온 녹즙액을 동결 건조시킨 후, 멸균한 PBS (phosphate-buffered saline)에 적당한 농도로 녹여 eppendorf tube에 옮겨 -80°C 냉동고에 보관하면서 comet assay 실험에 사용하였다.

2. 총 항산화능 (TRAP, total radical-trapping antioxidant potential) 측정

TRAP은 Rice-Evans & Miller²⁸⁾의 inhibition assay 법에 따라 분석하였다. 이 방법은 ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate), 150 μM)와 metmyoglobin (2.5 μM)을 H₂O₂ (75 μM)로 활성화시킴으로써 생성된 ferryl myoglobin radical species와의 상호 작용에 의해 형성된 ABTS radical cation의 absorbance를 측정하는 방법이다. 이 방법의 원리는 각 시료를 6분 동안 30°C에서 배양한 후 UV/VIS spectrophotometer로 740 nm의 파장에서 absorbance를 측정하면, 그 absorbance의 억제 정도는 시료에 들어 있는 antioxidant capacity에 비례하게 되는 것에 기초를 두고 있다. TRAP 농도는 trolox의 calibration curve를 이용하여 계산하였으며 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity, mM)으로 표현하였다.

3. 세포 내 DNA 손상의 측정

1) 세포배양

Chinese Hamster Lung (CHL) 세포는 염색체의 수가 25개, 1회 세포주기는 12~15시간으로서 염색체 이상시험에 적합한 조건을 갖춘 세포이며 DNA 손상을 보기 위한 실험에 많이 사용되는 세포이다. 본 실험에서 사용한 CHL cell은 한국화학연구원 안전성 평가연구소 독성유전체연구팀으로부터 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS)과 Eagle's minimum essential medium을 사용하여, 포화습

도 하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C의 incubator에서 배양하였다. 계대 배양은 cell을 75 cm² tissue culture flask에 60×10⁴ cell이 되도록 파종하여 2~3일간 배양한 후 시행하였고, 시험물질 처리 시에는 6-well plate에 well당 2×10⁴ cell이 되도록 파종하여 48시간 배양한 후 실험하였다.

2) 녹즙시료의 pre-treatment

동결 건조한 녹즙 시료의 농도 범위 (25~250 µg/ml)는, 예비실험을 거쳐 효과가 거의 나타나지 않는 저농도와, 독성이 나타나기 시작하는 고농도를 제외한 후 선정하였으며, 시료의 DNA 손상정도는 positive control과 negative control의 범주 내에 속하였다. 따라서, 본 실험에서는 녹즙시료를 25~250 µg/ml의 농도가 되게 PBS로 희석한 후 CHL cell이 배양되어있는 각각의 well에 처리하였고, 각 녹즙 처리 세포를 PBS 처리 세포 (control)와 함께 37°C CO₂ incubator에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후에는 PBS로 두 번 세척한 다음, 0.1% trypsin-HBSS 용액 100 µl를 처리하여 cell을 수집한 후 300 µl 배지에 현탁시켜 microcentrifuge tube에 옮겨 원심 분리하였다.

3) 산화 스트레스의 유발

산화 스트레스에 의한 DNA 손상을 유발시키기 위해, 200 µM H₂O₂를 준비하여 상층액을 제거한 CHL cell에 처리한 후 4°C 냉장고에서 5분 동안 반응시킨 다음 PBS로 세척하였다. Positive control을 위해 녹즙을 처리하지 않고 PBS만 처리된 cell에 200 µM H₂O₂를 처리하였으며, negative control인 PBS 처리세포에는 H₂O₂를 처리하지 않았다.

4) Single-cell gel electrophoresis

위에 제시한 일련의 과정을 마친 cell의 DNA 손상을 측정하기 위해 comet assay를 실시하였다. Normal melting agarose (NMA)가 precoating된 fully frosted slide 위로 CHL 세포와 75 µl의 0.7% low melting agarose gel (LMA)의 현탁액을 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 µl로 한 겹 더 덮은 후, lysis 과정을 거쳤다. 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris)에 사용직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켰다. Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 4°C의 차가운 buffer (300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA)

를 채워 unwinding 시켰다. 20분이 지난 후 25 V/300±3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충용액 (pH 7.5)으로 충분히 세척하였다.

5) Image analysis

Comet image 분석을 위해 20 µg/ml 농도의 ethidium bromide로 nucleotides를 염색하여 형광현미경 (Leica DMLB, Germany)에서 관찰하고 CCD camera를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 comet image analyzing system이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 임파구의 DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리 (tail length, TL) 또는 tail length에 tail내 함유된 DNA%를 곱해준 tail moment (TM) 값을 측정하여 나타내었으며 각 처리구 당 2개의 slide를 만들어 그 중에서 각각 100개 세포를 관찰하여, H₂O₂에 의한 DNA 손상 및 녹즙에 의한 DNA 손상 억제정도를 측정하였고 각 처리구는 최소 3회 반복 실험하였다.

4. 통계처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 처리구별로 100개의 세포에서 측정된 DNA 손상도 (TL, TM, % DNA in tail)의 평균값과 표준오차를 구하였으며, 각 녹즙의 DNA 손상 억제 정도를 비교하기 위해 농도별로 one-way 분산분석 (ANOVA)을 시행하였고, 두 군간의 차이는 LSD로 사후 검증하였으며, 모든 통계적 유의성은 p < 0.05 수준에서 평가하였다. 또한, 각 시료들의 농도별 DNA 손상 값을 이용하여 linear regression analysis를 한 후, positive control에 비해 DNA 손상을 50% 감소시킬 수 있는 녹즙의 농도를 계산하여 ED₅₀의 값을 계산하였으며 이 값으로 각 녹즙의 DNA 손상 보호효과를 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 녹즙의 중 항산화능 (TRAP) 비교

녹즙 시료들의 총 항산화능을 측정된 결과, 케일 (kale)에서 가장 높고, 명일엽, 돌미나리 그리고 당근의 순으로 나타났다 (Table 1). 즉, 녹색채소들의 TRAP 값이 황색채소인 당근보다 전반적으로 높음이 확인되었다. 케일은 십자화가 채소들 중의 하나로서 다량의 엽록소와 양질의 단백질을 함유하고 있으며 비타민 C, β-carotene 및 무기질 함량이 높아 영양적으로 가치가 있는 식품소재로 알려져 있다^{29,30}. 정 등²⁾의 연구 보고에 의하면, 녹즙의 재료로

Table 1. TRAP levels of various yellow-green vegetable juices

TRAP (mM)	Sources of vegetable juice			
	Kale	Angelica Keiskei	Carrot	Small water dropwort
	1.322 ± 0.006	0.953 ± 0.034	0.399 ± 0.050	0.726 ± 0.008

All values are mean S.D.

쓰이는 명일엽, 케일, 당근, 셀러리, 오이의 항산화 영양성분을 분석한 결과, 케일 녹즙의 비타민 E (α , β , γ -tocopherol) 함량이 다른 녹즙보다 월등히 높았으며 비타민 C 함량도 명일엽의 3.5배, 당근의 20배에 가까운 높은 함량을 보였다. 또한, 총 페놀함량도 명일엽과 당근에 비해 약 두 배정도 높은 것으로 보고되었다.³¹⁾ 이 외에도, 항암 활성이 있는 플라보노이드인 quercetin (110 mg/kg)과 kaempferol (211 mg/kg)의 함량이 다른 채소들보다 다양 포함되어 있다고 보고되어 있다.²⁹⁾ 따라서, 본 연구에서 TRAP 분석법을 이용한 항산화능이 케일에서 가장 높았던 것은 케일의 항산화 영양소 함량이 높은 것과 관련되어 있다고 볼 수 있다. 국내외를 막론하고 녹즙의 항산화 영양소 함량 보고는 많으나, 총 항산화능을 보고한 연구는 아직 없다.

2. 녹즙의 DNA 손상 억제 효과

Comet assay의 image 분석 결과, 각 시료들의 DNA 손상의 억제효과는 Fig. 1 - 4에서 볼 수 있으며 모든 녹즙 시료에서 positive control에 비해 DNA 손상 억제효과가 나타났다. 각 녹즙의 농도별 DNA 손상 억제 효과를 살펴보면, 먼저 케일은 낮은 농도 (25 μ g/ml)에서 positive control과 비교하여 50%의 높은 DNA 손상 감소를 볼 수 있었고, 농도가 증가함에 따라 그 억제효과가 더 나타나 250 μ g/ml에서는 70%의 억제효과를 보였다 (Fig. 1). 명일엽의 경우, 낮은 농도인 25 μ g/ml에서 25%의 억제효과가 나타났고, 농도가 증가함에 따라 50 μ g/ml부터 DNA 손상 억제 효과가 증가하여 65%를 보였으며, 농도가 100, 250 μ g/ml인 경우에도 50 μ g/ml에서와 같은 정도의 DNA 손상 억제효과를 보였다 (Fig. 2). 이에 비해 당근은 25, 50 μ g/ml에서 각각 38%, 32%의 억제효과가 나타났고, 농도가 증가함에 따라 DNA 손상 억제효과가 증가하여 100 μ g/ml에서 50%, 250 μ g/ml에서 70%를 보였다 (Fig. 3). 돌미나리의 경우도 당근과 마찬가지로 저 농도인 25, 50 μ g/ml에서 각각 32%, 40%의 억제효과가 나타났고, 농도가 증가함에 따라 DNA 손상 억제효과가 농도 의존적으로 증가하여 100 μ g/ml에서 60%, 250 μ g/ml에서 63%를 보였다 (Fig. 4).

이상의 결과를 regression analysis를 통해 ED₅₀ (50%

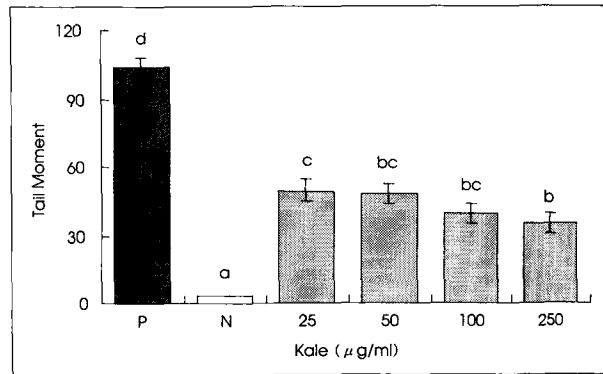


Fig. 1. Inhibitory effect of kale juice on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in CHL cell. P : positive control (200 μ M H₂O₂), N : negative control (PBS), All values are mean SE (n = 100). Bars with different letters are significantly different at p < 0.05 after LSD test.

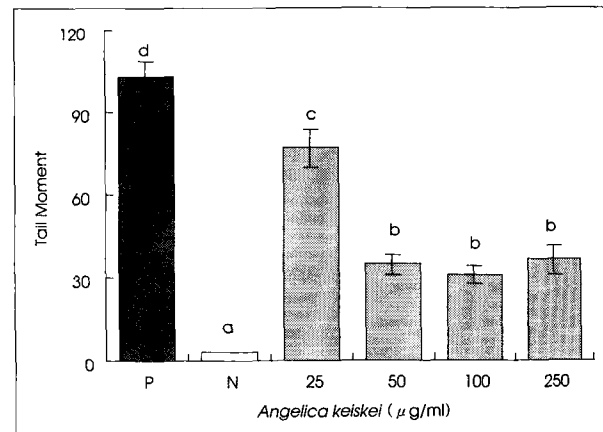


Fig. 2. Inhibitory effect of Angelica keiskei juice on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in CHL cell. P : positive control (200 μ M H₂O₂), N : negative control (PBS), All values are mean SE (n = 100). Bars with different letters are significantly different at p < 0.05 after LSD test.

의 DNA 손상 보호효과를 보이는 녹즙의 농도)을 계산하여 DNA 손상 억제효과에 대한 순위를 알아본 결과, 케일 (39.4 μ g/mL), 명일엽 (60.1 μ g/mL), 돌미나리 (74.0 μ g/mL), 당근 (85.9 μ g/mL)의 순으로 나타났다 (Fig. 5). 각 녹즙의 이와 같은 생리활성 기능은 선행연구에서 보고된 식품내 항산화 영양소의 함량이 높은 것, 그리고 본 연구에서 TRAP 분석법을 이용하여 측정된 바 총 항산화능이 높은 것 (Table 1)과 관련이 있는 것으로 볼 수 있다.

본 연구 결과, TRAP으로 측정된 총 항산화능이나, DNA

손상 억제효과에 있어서 여러 녹즙 중 케일 녹즙이 가장 탁월한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 몇 연구자들이 *in vitro* 세포실험을 통해 케일 녹즙에 항 돌연변이 생리활

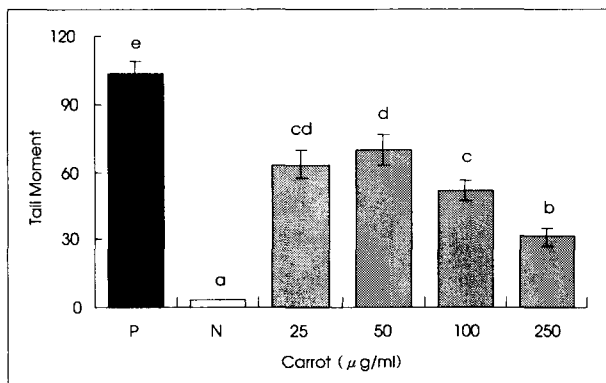


Fig. 3. Inhibitory effect of carrot juice on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in CHL cell. P : positive control (200 μM H₂O₂), N : negative control (PBS), All values are mean SE (n = 100). Bars with different letters are significantly different at p < 0.05 after LSD test.

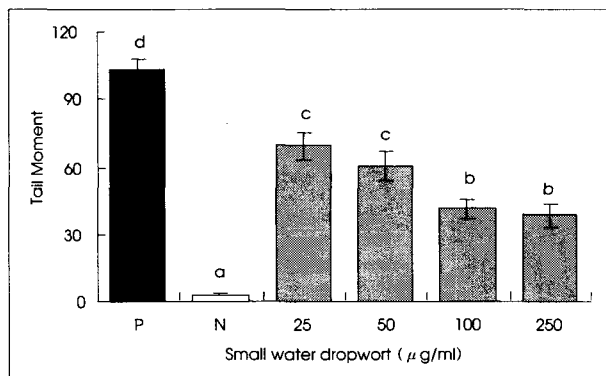


Fig. 4. Inhibitory effect of small water dropwort juice on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in CHL cell. P : positive control (200 μM H₂O₂), N : negative control (PBS), All values are mean SE (n = 100). Bars with different letters are significantly different at p < 0.05 by after LSD test.

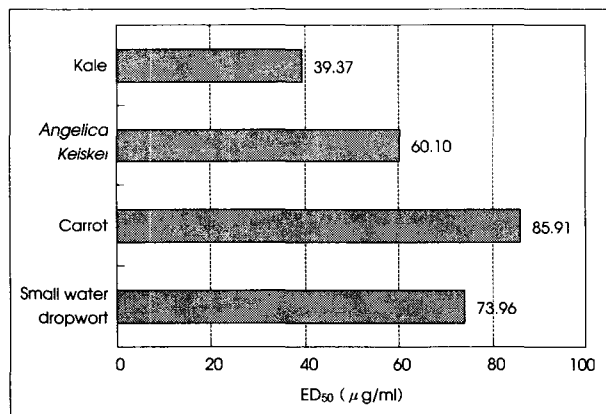


Fig. 5. Comparison of the antioxidant activities of each vegetable juice in the comet assay by the estimated dose that would result in a 50% reduction (ED₅₀) of oxidative DNA damage in CHL cell.

성이 있음을 보고한 결과들^{32,33}과 일치한다. 즉, 이 등³²은 케일의 불용성 및 수용성 식이섬유소의 항돌연변이 작용을 보고하였으며, 최 등³³은 aflatoxin B₁에 의한 돌연변이 유발 실험에서 신선한 케일즙의 유전독성 억제효과를 확인하여 보고하였다. 그 외 동물실험 연구결과로는 케일 녹즙이 고콜레스테롤혈증 흰쥐의 인지질과 콜레스테롤 농도를 저하시켰으며 혈청 및 간장의 과산화지질 농도도 낮추었다는 보고가 있다.^{8,34}

녹즙의 주된 재료로 이용되고 있는 명일엽 (*Angelica keiskei* Koidz.)은 미나리과에 속하는 다년생 초목으로 신선초, 선삼초, 심립초라 불리우며 비타민, 무기질, 식이섬유질이 풍부할 뿐 아니라 생리활성 물질인 각종 flavonoid, coumarin, saponin 등이 들어있어 자연 건강식품으로 주목받고 있는 녹즙이다. 명일엽 녹즙에 관한 연구는 주로 영양성분에 관한 것이 보고되었으며^{4,35} 최근 생리적 기능에 관한 연구가 보고되고 있다.^{9,10} 김 등³⁵은 명일엽 생즙의 영양성분을 분석하였고, 박과 김⁹은 온도별 저장의 차이와 착즙 즉시에 비해 24, 48, 72시간 후의 명일엽 생즙의 β-carotene과 vitamin C의 함량 및 항산화능의 변화를 보았으며 착즙 후 시간의 경과에 따라 항산화 비타민의 파괴율이 증가됨을 보고한 바 있다. 최근 명일엽 녹즙의 동물실험을 통한 *in vivo* 생리활성기능에 관한 연구가 몇 편 보고되었는데, 정 등⁹은 명일엽 녹즙이 간 손상을 유발한 흰쥐의 간기능 개선에 미치는 영향을 살펴보아 간 기능보호 기능의 가능성을 제시하였으며, 박 등¹⁰은 명일엽이 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향을 살펴보아, 혈장콜레스테롤 감소효과를 보고하였다. 본 연구 결과에서도 명일엽 녹즙이 비교적 높은 총 항산화능과, DNA 손상 억제효과를 보여, 명일엽 녹즙의 항 돌연변이 효과를 확인할 수 있었다.

당근은 베타카로틴이 많이 함유되어 있는 식품으로 그 영양적인 평가가 높은 편이었으나,^{2,30} 생리적 활성에 대한 연구는 미비하다. 오히려, 당근에 함유되어 있는 ascorbate oxidase는 가열처리를 하지 않는 경우에 비타민 C를 파괴할 수 있다.³⁶ 당근에 들어있는 대표적인 항산화 물질인 β-carotene에 대한 연구는 상당히 많은데 비해, 당근 자체의 생리활성에 관한 연구는 많지 않다. 본 연구에서는 당근의 생리활성 연구의 하나로 당근녹즙에 DNA 손상 억제 효과가 있음을 관찰하였으며, 이는 당근에 함유된 bioactive molecule이 세포 내로 흡수되어 DNA 손상 억제의 생리활성을 보인 것을 생각된다. 이와 같은 결과는 앞으로 인체 영양중재 연구를 계획할 때, β-carotene 등 단일 항산화제 보충보다는 식품으로의 보충섭취를 권장하는데 사용될 수 있으리라 생각된다.

한편, 돌미나리는 우리나라에서 흔히 식용되는 녹색채소이며 비타민 A, B₁, B₂, C 등이 풍부하고, 무기질 또한 상당량 함유하고 있다고 옛부터 전해져오고 있으나, 돌미나리의 영양성분에 관한 연구 논문은 거의 보고된바 없다. 돌미나리의 생리활성효과에 관한 연구도 돌미나리 추출물이 발암제에 의한 돌연변이 유발 실험에서 항 돌연변이 효과를 나타냈다는 보고³⁷⁾와, 세포면역기능을 강화시켰다는 동물실험결과 등이 보고 된 바 있을 뿐,³⁸⁾ 그 외에는 보고된 바 없다. 본 연구에서 여러 녹즙들간의 항산화 효과 및 DNA 손상 억제효과를 비교하여 보았는데, 이러한 결과는 우리나라에서 처음 보고되는 것으로 의미가 있다고 본다.

최근 항암효능이 우수한 물질을 찾아내고, 그 생리활성 물질을 연구 검토하여 천연물에서 추출하거나, 기존의 화합물들 중, 독성이 낮고, 발암억제가 우수한 물질에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며,³⁹⁾ 그 중 대표적인 것으로 retinoids 계열의 화합물, β -carotene, dehydroepiandrosterone 등이 있다.⁴⁰⁾ 널리 알려진 ATBC (alpha-tocopherol and beta-carotene) 종단연구에서 흡연자에게 β -carotene을 supplement로 주고 폐암 발생율을 관찰한 결과, 기대와는 달리 β -carotene 투여가 오히려 발암을 촉진하는 결과가 가져오는 것이 보고된⁴¹⁾ 반면, β -carotene이 많이 함유되어 있는 녹황색채소 및 과일, 고구마 등의 섭취량이 높은 사람이 일반적으로는 위암, 대장암, 유방암 발생이 낮은 것이 보고되어⁴²⁾ 식품의 특정성분을 분리하여 섭취하는 것보다 식품 자체를 섭취하는 것이 암 예방에 보다 더 유리할 수 있다는 사실이 입증되고 있다. 이러한 결과를 바탕으로, 본 연구에서도 β -carotene 함량이 가장 높은 당근 ($5.9 \pm 0.5 \mu\text{g}/100\text{g}$)이 항산화능과 DNA 손상 감소 효과가 비교적 높을 것으로 예상하였지만,²⁾ 실제로 TRAP 값이나, DNA 손상 보호 효과의 정도 또한 모든 녹즙들 중에서 가장 낮은 것으로 나타났다. 이는 아마도 β -carotene을 식품의 일부로 섭취하였을 때의 bioavailability가 정제된 β -carotene의 bioavailability보다 저하되었다는 연구결과로부터 설명될 수 있을 것이다.⁴³⁾

본 연구에서 각 녹즙시료에 대한 농도별 DNA 손상 억제효과를 측정한 후, 이 값들을 이용하여 각 녹즙의 상대적 활성능을 ED₅₀으로 표현하여 비교하였는데, DNA 손상 억제효과를 ED₅₀으로 비교하는 방법은 다른 연구⁴⁵⁾에서도 보고된 바 있다. 즉, Noroozi 등⁴⁵⁾은 인체 임파구 세포를 이용하여 여러 종류의 flavonoids들과 vitamin C의 산화적 DNA 손상에 미치는 효과를 ED₅₀ 값을 이용하여 표기한 후 ED₅₀ 값으로 각 물질의 DNA 손상 억제효과 순위를 비교하였다. 그러나 ED₅₀ 값은 regression 계산식에서 계

산된 추정치이므로 절대적인 값으로 이해하기에는 제한점이 있다. 여러 종류의 phytoestrogen의 DNA 손상 억제 효과를 comet assay로 살펴 본 Sierens 등⁴⁴⁾은 genistein, equol, vitamin C 등의 DNA 손상 억제 효과를 각각 농도별로 분석하였을 뿐, 각 물질의 효능을 ED₅₀와 같은 지표를 구하여 비교하지는 않았는데, 이는 각 화합물이 세포 내로 흡수되는 시간이 다르거나, 각 화합물이 처리되는 세포의 종류, 혹은 그 세포가 암세포인지 정상세포인지의 여부에 따라 그 결과가 일관성 없이 나타나기 때문이라고 하였다. 앞으로 여러 항산화 식품들의 DNA 손상 억제 효과를 비교하는 방법 및 지표 개발에 대한 다양한 연구가 심도있게 이루어져야 하리라고 본다.

요약 및 결론

본 연구는 최근 수요가 늘어나고 있는 녹즙의 생리활성 효능에 대한 검증의 한 방법으로 녹즙시료들의 항산화능을 측정 비교하고, 그들의 DNA 손상 보호효과에 대해 살펴 보았다. 케일, 명일엽, 돌미나리, 당근 중, 항산화능이 가장 좋은 식품소재는 케일이었으며, 역시 DNA 손상의 보호효과에서도 케일이 가장 우수한 것으로 나타났다. 본 연구 결과를 요약하여 보면, 첫째, 각 녹즙들의 항산화능을 측정 비교한 결과 케일, 명일엽, 돌미나리, 당근 모두에게서 항산화능을 관찰할 수 있었으며, 항산화능의 순서는 케일 > 명일엽 > 돌미나리 > 당근으로 나타났다. 둘째, 녹즙의 항돌연변이 효과로서 DNA 손상 억제효과를 통해 살펴본 결과, 본 실험에서 사용한 녹즙 4종류 모두에서 DNA 손상 억제효과가 나타났으며 DNA 손상 억제효과가 가장 큰 순서로 보면, 케일 > 명일엽 > 돌미나리 > 당근의 순으로 항산화능의 순서와 일치하였다. 본 연구 결과 나타난 녹즙의 항산화 능력 및 DNA 손상 억제 효과를 이용하여, 앞으로 동물이나 인체를 이용한 *in vivo* 생리활성효과 연구, 특히 흡연자나 환자 등 DNA가 많이 손상되어 있는 대상자들의 DNA 손상 회복을 위한 녹즙 보충섭취 영양중재연구 등이 더 깊게 이루어져야 하리라고 본다.

Literature cited

- 1) Yang HS. The effect of green juice, *Food and Hygiene* 6: 62, 1993
- 2) Chung SY, Kim HW, Yoon S. Analysis of antioxidant nutrients in green yellow vegetable juice. *Korean J Food Sci Technol* 31 (4): 880-886, 1999
- 3) Kim OK, Kung SS, Park WB, Lee MW, Han SS. The nutritional

- component of *Angelica keiskei* koidz. *Korean J Food Sci Technol* 24: 592-596, 1992
- 4) Park WB, Kim DS. Changes of contents of β -carotene and vitamin C and antioxidative activities of juice of *Angelica keiskei* Koidz stored at different conditions. *Korean J Food Sci Technol* 27: 375-379, 1995
 - 5) Lee SM, Park KY, Rhee SH. Antimutagenic effect and active compound analysis of kale juice in salmonella system. *Korean J Food Sci Technol* 26 (5): 965-971, 1997
 - 6) Han KS, Cheong EH, Ham SS, Shim TH, Lee TS, Lee HK. Antimutagenicity of small water dropwort juice on the microbial mutagenicity induced by 2-aminofluorene. *Korean J Food Safety* 8: 225-230, 1993
 - 7) Okuyama T, Takada M. Antitumor-promotion by principles obtained from *Angelica keiskei*. *Planta Med* 57: 242-246, 1991
 - 8) Chung SY, Kim SH, Kim HS, Kang JS, Cheong HS, Kim GJ, Kim HJ. Effects of water soluble extract of ganoderma lucidum, kale juice and sodium dextrothyroxine on hormone and lipid metabolism in hypercholesterolemic rats 1. concentration of triiodothyronine, thyroxine, blood sugar and lipid composition in serum. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 19 (5): 381-389, 1990
 - 9) Jung HK, Park PS, Huh NC, Kim SO, Kim KS, Lee MY. Inhibitory effect of *Angelica keiskei* Koidz green juice on the liver damage in CCl₄-treated rats. *Korean J Food Sci Technol* 27: 531, 1998
 - 10) Park JH, Park SK, Cho YS, Chun SS, Choi SH, Park JC. Effects of *Angelica keiskei* on Lipid Metabolism in Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26 (2): 308-313, 1997
 - 11) Simic MG. Mechanism of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 202: 377-386, 1988
 - 12) Melissa KJ, George L. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res* 459: 211-218, 2000
 - 13) Eva H, Darina S, Lucia H, Tapan KM, Alena G and Andrew RC. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutat Res* 409: 163-171, 1998
 - 14) Olive PL, Banath JP. Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as function of position in the cell cycle. *Mutat Res* 294: 275-283, 1993
 - 15) Olive PL, Banath JP. Radiation-induced DNA double-strand breaks produced in histone-depleted tumor cell nuclei measured using the neutral comet assay. *Radiat Res* 142: 144-152, 1995
 - 16) Kim CK, Yang JS, Lee HJ. Detection of irradiated grains using the DNA 'Comet Assay'. *Korean J Food Sci Tech* 31: 906-911, 1999
 - 17) Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339: 37-59, 1995
 - 18) Mckevery-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A. A European review. *Mutat Res* 288: 47-63, 1993
 - 19) Collins AR, Duthie GG, Dobson VL. Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutat Res* 393: 223-231, 1997
 - 20) Duthie SJ, Johnson W, Dobson VL. The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. *Mutat Res* 390: 141-151, 1997
 - 21) Mostafa N, Wilson JA, and Michael EJL. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 67: 1210-1218, 1998
 - 22) Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 336: 69-77, 1995
 - 23) Michael JP, Elizabeth DW, Lynn K, Karen R, Lori CA, Rayburn AL. The use of single cell gel electrophoresis and flow cytometry to identify antimutagens from commercial soybean by-products. *Mutat Res* 402: 211-218, 1998
 - 24) Melissa RK, Jing X, Karen EA, George L. Disparate effects of similar phenolic phytochemicals as inhibitors of oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res* 485: 309-318, 2001
 - 25) Zhu CY, Loft S. Effects of Brussel sprouts extracts on hydrogen peroxide-induced DNA strand breaks in human lymphocytes. *Food Chemical Toxicol* 39: 1191-1197, 2001
 - 26) Verhoeven DTH, Goldbohm RA, van Poppel G, Verhagen H, van den Brandt PA. Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 733-748, 1996
 - 27) Ji ST, Park JH, Hyun CK, Shin HK. The antigenotoxic effects of Korean native fermented food, baechu kimchi using comet assay. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29 (2): 316-321, 2000
 - 28) Rice-Evans C, Miller N. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymol* 234: 279-293, 1994
 - 29) Bilyk A, Saper GM. Distribution of quercetin and kaempferol in lettuce, kale, chive, garlic chive, leek, horse radish, red radish and red cabbage tissues. *J Agric Food Chem* 33: 226-231, 1985
 - 30) Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherland. *J Agric Food Chem* 40: 2379-2386, 1992
 - 31) Chung SY, Kim NK, Yoon S. Nitrite scavenging effect of methanol fraction obtained from green yellow vegetable juices. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28 (2): 342-347, 1999
 - 32) Lee SM, Lee SH, Park KY, Rhew TH, Kim BK, Chung HY. Antimutagenic effect of insoluble dietary fibers from some green yellow vegetables and soybean by binding the carcinogens. *J Life Sci* 5: 26-32, 1995
 - 33) Choi YH, Park KY, Lee SM, Yoo MA, Lee WH. Inhibitory effect of the fresh juice of kale on the genotoxicity of aflatoxin B₁. *Korean J Genetics* 17 (3): 183-190, 1995
 - 34) Chung SY, Kim SH, Kim HS, Kang JS, Cheong HS, Kim GJ, Kim HJ. Effects of water soluble extract of ganoderma lucidum, kale juice and sodium dextrothyroxine on hormone and lipid metabolism in hypercholesterolemic rats 2. lipid compositions of liver, brain and testis. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 20 (1): 59-64, 1991
 - 35) Kim OK, Kung SS, Park WB, Lee MW, Ham SS. The nutritional components of Aerial Whole Plant and juice of *Angelica keiskei* Koids. *Korean J Food Sci Technol* 24: 592-596, 1992
 - 36) Pachla LA, Reyhods DL, Kissing PT. Analytical methods for determining ascorbic acid in biological samples, food products and pharmaceuticals. *AOAC* 68: 2, 1985
 - 37) Han KS, Cheong EH, Ham SS, Shim TH, Lee TS, Lee HK.

- Antimutagenicity of small water dropwort juice on the microbial mutagenicity induced by 2-aminofluorene. *Korean J of Food Safety Hygiene* 8 (4) : 225-230, 1993
- 38) Kim GH, Jang MW, Park GY, Lee SH, Ryu TH, Sunwoo YK. Effects of small water dropwort extract on cellular immune response of mice. *J Bacteriol Virol* 28 (5) : 419-430, 1993
- 39) Ziegler RG. Review of epidemiology that carotenoids reduce the risk of cancer. *J Nutr* 119: 116-120, 1989
- 40) Fish B. Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. *Cancer* 54: 2609-2616, 1984
- 41) Vainio H. Chemoprevention of cancer: lessons to be learned from beta-carotene trials. *Toxicol letters* 112-113: 513-517, 2000
- 42) Owens WC, Cross KW. The alpha-tocopherol and beta-carotene cancer prevention study group. *N Eng J Med* 330: 1029-1039, 1994
- 43) Torronen R, Lehmusaho M, Hakkinen S, Hanninen O, Mykkanen H. Serum beta-carotene response to supplementation with raw carrots, carrot juice or purified beta-carotene in healthy non-smoking women. *Nutrition Res* 16(4): 565-575, 1996
- 44) Sierens J, Hartley JA, Campbell MJ, Leatham AJC, Woodside JV. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutat Res* 485: 169-176, 2001
- 45) Noroozi M, Angerson WJ, Michael EJL. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 67: 1210-1218, 1998