

Comet Assay를 이용한 항산화 비타민과 과일·야채즙의 인체 임파구 세포 DNA 손상 감소 효과 비교*

전은재·박유경·김정신·강명희[§]

한남대학교 이과대학 식품영양학과

Comparison of the Protective Effect of Antioxidant Vitamins and Fruits or Vegetable Juices on DNA Damage in Human Lymphocyte Cells Using the Comet Assay*

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

Department of Food and Nutrition, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

ABSTRACT

In this study the *in vitro* protective effects of several antioxidant vitamins (vitamin C, α -tocopherol, β -carotene), fruits and vegetables (strawberry, tangerine, orange and 100% orange juice, carrot juice), on the levels of isolated human lymphocyte DNA damage was measured using Comet assay. Comet assay has been used widely to assess the level of the DNA damage in the individual cells. Lymphocytes were pre-treated for 30 minutes with antioxidant vitamins (10, 50, 100, 500 μ M) or fruits · vegetables (10, 100, 500, 1000 μ g/ml), and then oxidatively challenged with 100 μ M H_2O_2 for 5 min at 4°C. The protective effect of antioxidant vitamins against DNA damage at a concentration of 50 μ M were 50% in vitamin C, 32% in α -tocopherol, whereas, β -carotene showed a 55% protection at a dose as low as 10 μ M. The inhibitory effects of DNA damage by strawberry, tangerine, orange, orange juices, carrot juices were 50 – 60% with wide ranges of doses. The results of the present study indicate that most the antioxidant vitamins and fruits · vegetables juices produced a significant reduction in oxidative DNA damage. (*Korean J Nutrition* 37(6) : 440~447, 2004)

KEY WORDS : β -carotene, carrot juice, DNA damage, comet assay, human lymphocyte cell.

서 론

식이성 항산화 영양소인 β -carotene, vitamin C, vitamin E 등의 섭취가 oxidative stress에 의한 DNA의 산화적 손상을 막는데 효과적이라는 보고가 *in vitro*나 *in vivo* 연구를 통해 많이 발표되고 있으며,¹⁻⁴⁾ 단일 항산화 비타민 보다 β -carotene, vitamin C 그리고 vitamin E의 mixture가 human lung cell에서 산화적 손상을 억제하는데 크게 기여하기도 한다.⁵⁾ 과일과 야채를 많이 섭취하는 사람들이 그렇지 않은 사람들 보다 각종 암 발생의 위험이 낮은 것도 이들 항산화 영양소를 비롯한 phytochemicals 들이 세포의 산화를 예방하고 비정상적 세포의 증식이 일어나는 것을 막

아주는 것과 관련이 있는 것으로 보고 되고 있다.^{6,7)}

항산화 비타민의 체내 항산화 작용 기전을 살펴보면, 지용성인 β -carotene은 singlet oxygen quencher와 radical-trapping antioxidant로써 지질 산화의 개시 단계를 방해하거나 DNA 손상을 막아주는 역할을 하고,⁸⁾ 생체막과 지단백에 존재하는 α -tocopherol은 peroxy radical과 작용하여 지질 과산화의 연쇄반응을 막는 lipid-soluble chain-breaking antioxidant로써 작용한다. 이에 비해 vitamin C는 α -tocopherol의 지질과산화 억제작용을 돕는 water-soluble peroxidation chain-breaking antioxidant로써 작용하고 있다. 이들 다양한 항산화 비타민들은 구리 이온과 결합하여 효소 불활성화를 일으켜 ROS (reactive oxygen species)의 활성을 억제하는 역할을 한다.⁹⁾

세포내 DNA 손상 정도를 측정하는 방법으로 이제까지 사용되었던 chromosomal aberration (CA), sister chromatid exchanges (SCE), micronuclei (MN), 8-OHdG 분석법보다 간편하고 신속하며 민감한 방법으로 COMET (single-cell gel electrophoresis) assay가 최근 소개되고 있

접수일 : 2004년 4월 20일

채택일 : 2004년 6월 11일

*This study was supported by a grant of the Korea Health 21 R & D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (02-PJ1-PG3-22003-0008).

[§]To whom correspondence should be addressed.

으며 이미 *in vitro* 연구, *in vivo* 연구뿐 아니라 DNA 손상 측정을 위한 human monitoring 방법으로 분자 역학적으로 광범위하게 사용되고 있다.¹⁰⁾

그 동안 대표적인 항산화 물질인 vitamin C, carotenoids, flavonoids 등에 대한 항 돌연변이 효과를 comet assay로 본 연구는 활발히 이루어지고 있다.¹¹⁻¹³⁾ Duthie 등¹¹⁾은 α -tocopherol, β -carotene보다 flavonoids (quercetin, myricetin)에서 인체 임파구에 대한 항 돌연변이 효과가 있음을 보고하였으며 또한 연이어 quercetin, myricetin, silymarin 등과 같은 flavonoids의 인체 세포들 (인체 임파구, Caco-2, HepG2, HeLa)에 대한 항 돌연변이 효과에 대한 연구를 보고하였다.¹²⁾ 이 외에도 Noroozei 등¹³⁾은 flavonoids (rutin, apigenin, quercetin-3-glucoside, quercitrin, kaempferol, myricetin, luteolin, quercetin)과 vitamin C의 항 돌연변이 효과에 대한 연구의 일종으로 ED₅₀ 값을 제시하였다. 그러나, 항산화 물질이 포함된 식품류에 관한 세포 수준에서의 유전독성학적 비교 연구는 국내외적으로 거의 이루어져 있지 않고 있으며 식품 추출물의 DNA 손상 억제 효과를 살펴본 연구는 brussels sprouts¹⁴⁾와 김치¹⁵⁾의 항 유전독성 효과를 살펴본 것, 그리고 본 연구실에서 수행한 flavonoids 및 몇몇 야채류를 대상으로 살펴본 것^{16,17)} 외엔 거의 없다.

따라서, 본 연구에서는 정제된 항산화 비타민 (β -carotene, vitamin C, α -tocopherol, trolox)과 우리나라에서 항산화 비타민의 주요 공급원인 과일·야채 중에서 딸기, 오렌지, 당근, 귤을 가지고 *in vitro* comet assay를 이용하여 DNA 손상 감소 효과를 살펴보았다.

연구방법

1. 시 약

Comet assay를 위한 시약으로 RPMI-1640, DMSO, Histopaque-1077, 일반 사용을 위한 agarose, Low melting point agarose, NaCl KCl, KH₂PO₄, Na₂EDTA · 2H₂O, Tris, Na-lauroylsarcosinate, Triton-X100, NaOH, Vitamin C, α -tocopherol, β -carotene는 Sigma 제품을 사용하였고 이외에 Na₂HPO₄ · 2H₂O (Merch), Trolox (Aldrich), Hydrogen peroxide (Fluka)을 사용하였다.

2. 시료의 제조

항산화 비타민은 vitamin C, α -tocopherol, β -carotene, 그리고 α -tocopherol의 수용성 아날로그인 trolox 등 4가지를 선정하였고, 과일·야채 추출물로는 항산화 비타민이 다량 함유되어 있으면서 우리나라의 대표적인 항산화 비타

민 공급 식품인 딸기, 귤, 오렌지, 당근 주스 및 오렌지 주스 등 5가지를 선정하였다. 딸기, 귤, 오렌지는 과일상태로 구입하여 주서기를 사용하여 즙을 내었고, 당근 주스 및 오렌지 주스는 매일유업에서 시판되는 100% 천연주스를 구입하였다. 시료는 모두 4℃, 9,000 rpm에서 30분간 원심 분리한 뒤 상층액을 취한 후 동결 건조하였다. 위에서 준비된 각 시료들은 DMSO로 희석한 뒤 PTFE membrane filter (0.2 μ M)를 통해 여과 멸균하여 -80℃에 저장하면서 comet assay 실험에 사용하였다.¹⁶⁾

3. 세포 내 DNA 손상의 측정

1) 인체 임파구 세포 분리

건강한 성인 여자의 혈액을 채취하여 전혈 100 μ L를 1 mL RPMI-1640 (10% FBS)배지와 섞은 후, Histopaque 1077 200 μ L를 underlay하여 원심 분리 (1,300 rpm, 6 min)한 뒤 상층의 PBS와 histopaque 사이의 band 부분 약 100 μ L를 1 mL RPMI-1640 (10% FBS)에 섞어 원심 분리하였다.¹⁰⁾ 상층액을 제거한 후 lymphocyte storage buffer (40% RPMI-1640, 50% FBS, 10% DMSO)에 넣어 -80℃ 냉동고에 보관하였고, 1달 이내에 실험에 사용하였다. 실험 시에는 저장된 lymphocyte를 실온에서 재빨리 녹이고 원심 분리하여 상층액이 제거된 cell에 950 μ L PBS와 50 μ L RPMI-1640 (10%FBS)을 섞어 냉동고에 5 min 정도 안정화시킨 후 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 사용하였다.

2) 시료의 pre-treatment 및 산화 스트레스의 유발

준비된 인체 임파구 세포에 시료의 DMSO의 농도가 1%를 넘지 않도록 적정 농도별로 PBS에 희석하여 섞은 뒤 4℃ 냉장고에서 30분간 전처리 (pre-treatment)를 하였다. 시료의 농도 범위는 항산화 비타민 (5~1,000 μ M)과 과일·야채 추출물 (5~1,000 μ g/ml)로 나누어 예비실험을 거쳐 효과가 거의 나타나지 않는 저농도와, 독성이 나타나기 시작하는 고농도를 제외한 후 선정하였으며 시료의 DNA 손상정도는 positive control과 negative control의 범주 내에 속하였다. 시료들의 전처리가 끝난 각 인체 임파구 세포에 100 μ M H₂O₂를 준비하여 1 ml 씩 넣어 섞은 뒤 4℃ 냉장고에서 5분 동안 반응시킨 다음 PBS로 세척하였다. Positive control을 위해 시료를 처리하지 않고 PBS만 처리된 cell에 100 μ M H₂O₂를 처리하였으며, negative control인 PBS 처리세포에는 H₂O₂를 처리하지 않았다.

3) Single-cell gel electrophoresis

위에 제시한 일련의 과정을 마친 cell의 DNA 손상을 측

정하기 위해 comet assay를 실시하였다. Normal melting agarose (NMA)가 precoating된 frosted slide 위로 인체 임파구 세포와 75 μ l의 0.7% low melting agarose gel (LMA)의 현탁액을 골고루 분산시킨 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μ l로 한 겹 더 덮었다. Alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris, 1% Na-lauroylsarcosinate)에 10% DMSO와 1% Triton X-100을 섞어 미리 냉장고에 넣어 차갑게 준비한 후, slide를 담가 저온에서 1시간 동안 lysis 과정을 거쳤다. Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 4°C의 차가운 buffer (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA)를 채워 unwinding 시켰다. 40분이 지난 후 25 V/300 \pm 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 Tris 완충용액 (0.4M, pH 7.5)으로 충분히 세척하였다.

4) Image analysis

Comet image 분석을 위해 ethidium bromide (20 μ g/ml)로 nucleotides를 염색하여 형광현미경 (Leica DMLB, Germany)에서 관찰하고 CCD camera를 통해 comet image analyzing system이 설치된 컴퓨터에서 분석하였다. 임파구의 DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리 (tail length, TL), tail 내 함유된 DNA% (Tail %DNA), 또는 TL 값에 Tail %DNA를 곱해준 tail moment (TM) 값을 측정하여 나타내었으며 각 처리구 당 2개의 slide를 만들어 그 중에서 50개 세포를 관찰하여, H₂O₂에 의한 DNA

손상 및 녹즙에 의한 DNA 손상 억제정도를 측정하였고 각 처리구는 최소 3회 반복 실험하였다. 모든 실험과정은 blind 방식으로 수행하였다.

4. 통계처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 처리구별로 50개의 세포에서 측정된 DNA 손상도 (TL, Tail %DNA, TM)의 평균값과 표준오차를 구하였으며, positive control과 negative control을 기준으로 각 농도별로 상대적인 DNA 손상도를 relative score로 표시하였다. 각 시료의 DNA 손상 억제 정도를 비교하기 위해 농도별로 one-way 분산분석 (ANOVA)을 시행하였고, 두 군 간의 차이는 LSD로 사후 검증하였으며, 모든 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 평가하였다. 또한, 각 시료들의 농도별 DNA 손상 값을 이용하여 수식을 구한 후 positive control에 비해 DNA 손상을 50% 감소시킬 수 있는 시료의 농도를 계산하여 ED₅₀의 값을 계산하였으며 이 값으로 각 시료의 DNA 손상 감소효과를 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 항산화 비타민의 DNA 손상 감소 효과

항산화 비타민의 DNA 손상 감소 효과에 대한 결과는 Table 1 및 Fig. 1에 나타내었다. 네 가지의 비타민 모두 DNA 손상 감소효과가 나타났으나 그 양상은 비타민에 따라 다르게 나타났다. 먼저 DNA 손상을 positive control을 100으로 놓고 상대적인 점수를 주었을 때, α -tocopherol

Table 1. Levels of DNA damage expressed as TD, TL, TM of vitamin C, α -tocopherol, β -carotene, trolox

Treatment	N ¹⁾	P ²⁾	Concentration (μ M)				
			10	50	100	500	
Vitamin C	TD ³⁾	18.2 \pm 0.7 ^a	44.9 \pm 1.3 ^c	35.0 \pm 1.7 ^b	34.8 \pm 2.1 ^b	33.8 \pm 1.4 ^b	32.7 \pm 2.1 ^b
	TL ⁴⁾	55.4 \pm 2.2 ^a	111.5 \pm 3.2 ^c	99.0 \pm 6.5 ^b	85.1 \pm 5.7 ^b	93.5 \pm 4.6 ^b	85.8 \pm 6.9 ^b
	TM ⁵⁾	11.1 \pm 0.7 ^a	53.1 \pm 2.6 ^c	38.0 \pm 3.7 ^b	32.5 \pm 3.4 ^b	34.9 \pm 2.8 ^b	31.6 \pm 4.0 ^b
α -Tocopherol	TD	13.6 \pm 0.8 ^a	48.3 \pm 2.0 ^d	44.3 \pm 2.0 ^d	35.5 \pm 2.0 ^c	34.4 \pm 2.0 ^{bc}	29.6 \pm 1.9 ^b
	TL	51.3 \pm 3.7 ^a	129.0 \pm 4.9 ^d	126.5 \pm 5.3 ^d	117.7 \pm 5.8 ^d	103.5 \pm 4.9 ^c	86.9 \pm 5.4 ^b
	TM	7.4 \pm 0.8 ^a	64.8 \pm 4.1 ^d	59.7 \pm 4.2 ^d	46.4 \pm 4.1 ^c	38.5 \pm 3.2 ^{bc}	30.0 \pm 3.6 ^b
β -Carotene	TD	14.9 \pm 0.8 ^a	52.2 \pm 2.0 ^d	33.5 \pm 1.9 ^b	31.5 \pm 1.9 ^b	30.5 \pm 1.8 ^b	39.2 \pm 2.1 ^c
	TL	56.5 \pm 3.9 ^a	134.5 \pm 4.0 ^d	101.7 \pm 5.8 ^{bc}	94.7 \pm 5.8 ^b	92.1 \pm 5.2 ^b	115.7 \pm 5.2 ^c
	TM	8.5 \pm 0.8 ^a	71.9 \pm 4.1 ^d	37.1 \pm 3.6 ^b	34.5 \pm 3.7 ^b	32.2 \pm 3.6 ^b	48.3 \pm 4.0 ^c
Trolox	TD	14.5 \pm 1.0 ^a	56.7 \pm 1.8 ^d	43.0 \pm 3.2 ^c	32.6 \pm 2.8 ^b	32.3 \pm 2.6 ^b	28.3 \pm 2.8 ^b
	TL	50.5 \pm 3.9 ^a	117.2 \pm 4.2 ^c	95.9 \pm 6.8 ^b	91.9 \pm 6.7 ^b	92.9 \pm 7.1 ^b	79.1 \pm 6.5 ^b
	TM	8.2 \pm 1.1 ^a	68.1 \pm 3.9 ^c	50.0 \pm 5.8 ^b	37.0 \pm 4.8 ^b	37.1 \pm 4.8 ^b	29.3 \pm 4.6 ^b

1) N: negative control (PBS), 2) P: positive control (100 μ M H₂O₂)

3) TD: DNA in tail (%), 4) TL: Tail length (μ m), 5) TM: Tail moment

For each substance, values with different letters within a row are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan's multiple range test. All values are mean \pm S.E

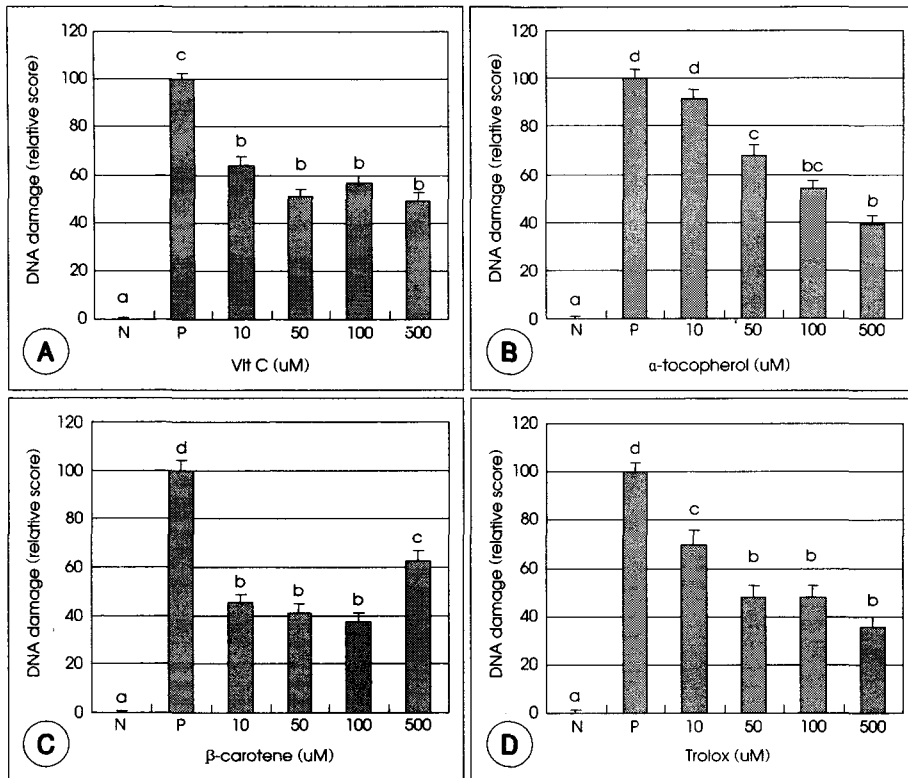


Fig. 1. The effect of antioxidant, (A) vitamin C, (B) α -tocopherol, (C) β -carotene and (D) trolox pre-treatment (30 min) on H_2O_2 -induced DNA damage (relative score, the degree of DNA damage calculated from TM) in isolated human lymphocytes, N: negative control (PBS), P: positive control ($100 \mu M H_2O_2$). For each substance, values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan's multiple range test. All values are mean \pm S.E.

(Fig. 1B) 및 trolox (Fig. 1D)의 경우, positive control에 비해 비타민의 처리 농도가 증가할수록 DNA 손상정도가 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. Alpha-tocopherol은 positive control에 비하여 $10 \mu M$ 의 농도에서는 유의적인 보호효과를 보이지는 않으나 10에서 $50 \mu M$ 로 증가함에 따라 DNA 손상정도가 유의적으로 감소하였으며 $500 \mu M$ 의 농도에서는 50% 이상의 보호효과를 보였다. Trolox의 경우 EH한 10에서 $50 \mu M$, 50에서 $100 \mu M$ 의 농도로 증가함에 따라 보호효과가 더 유의적으로 나타났으며, $100 \mu M$ 이상의 농도에서는 변화가 없었다. 이에 비해 비타민 C를 첨가한 경우 (Fig. 1C), positive control에 비해 비타민 첨가 시 DNA 손상이 감소되었으나 농도의 증가에도 불구하고 유의적인 보호효과를 찾아볼 수 없었다. 가장 낮은 $10 \mu M$ 의 농도에서 가장 큰 보호효과를 보인 β -carotene은 10, 50, $100 \mu M$ 농도에서는 유사한 DNA 손상 감소효과를 보이다가 $500 \mu M$ 에서는 오히려 DNA 손상이 증가하는 양상을 보였다. 이는 고농도에서 β -carotene이 pro-oxidant로 작용하기 때문인 것으로 보여지며 이와 같은 결과는 flavonoids 및 항산화 비타민을 처리 한 뒤 H_2O_2 로 산화적 DNA 손상을 주었을 경우 고농도에서는 오히려 DNA 손상이 유발되었다는 선행 연구보고들과 일치한다.^{11,12,16,18,19)}

Table 1에는 DNA 손상을 3 종류의 지표로 나타냈다. DNA 손상을 나타내는 여러 지표 중 먼저 tail moment로 본 DNA 손상 정도를 살펴보면, 비타민 C는 10, 50, 100, $500 \mu M$ 의 처리농도에서 positive control에 비하여 각각 64%, 50%, 57%, 49%의 DNA 손상을 보였으며 비타민 C의 농도가 증가하여도 DNA 손상 감소효과는 차이가 없었다 (Fig. 1A, Table 1). Szeto와 Benzie¹⁹⁾는 인체 임파구 세포를 이용하여 vitamin C ($50, 100, 200 \mu M$)를 전처리 한 뒤 $60 \mu M$ 의 H_2O_2 로 산화적 스트레스를 준 다음 comet assay를 통해 tail %DNA로 DNA 손상 감소 효과를 본 결과, 비타민 C 농도와 상관없이 DNA 손상 감소효과가 나타나지 않았으며 오히려 DNA 손상을 유발시킴을 관찰하여 농도에 따라 비타민 C가 pro-oxidant로도 사용될 수 있음을 밝혔다.

본 실험에서 α -tocopherol의 경우, $10 \mu M$ 에서는 DNA 손상정도가 91%로 positive control과 비슷한 수준이었으나 50, 100, $500 \mu M$ 로 농도가 증가함에 따라 tail moment로 본 DNA 손상 정도가 각각 68%, 54%, 39%를 보여 농도 의존적으로 감소됨을 알 수 있었다 (Fig. 1B, Table 1). 이는 인체 임파구 세포를 이용하여 실험한 Park 등⁶⁾의 선행연구에서 tail moment로 본 DNA 손상이 $10 \mu M$ 에서 90%를 보였으나 농도가 증가함에 따라 DNA 손

상 감소효과를 보여 500 μM 에서 39%를 보인 결과와 비슷한 경향을 보였다. 또한 Szeto 등²⁰⁾의 연구에서도 tail %DNA로 본 DNA 손상정도는 α -tocopherol 처리농도가 12.5, 25, 50 μM 로 증가할수록 positive control (45 μM H_2O_2)에 비해 대략 25~40%로 감소함을 보고하였다. 그러나 Szeto와 Benzie¹⁹⁾의 연구에서는 α -tocopherol의 처리농도가 25, 50, 100 μM 로 증가하여도 positive control (60 μM H_2O_2)에 비해 유의적인 DNA 손상 감소효과를 보이지 않았으며 오히려 25 μM 에서 50 μM 로 농도가 증가하였을 때 DNA 손상이 증가하였다. Duthie 등¹¹⁾의 연구에서도 Tail %DNA로 본 DNA 손상정도는 100 μM α -tocopherol에서 positive control에 비해 91%를 보여 DNA 손상 감소효과를 거의 보이지 않는 것으로 나타났다.

β -carotene의 경우, tail moment로 본 DNA 손상 정도는 저농도인 10 μM 에서 positive control에 비하여 45%를 보임으로서 본 실험에서 사용한 항산화 시료들 중 가장 탁월한 DNA 손상 감소효과를 보였으며 농도가 증가하여도 이 감소효과는 유지되었으나 500 μM 에서는 63%로 다소 증가하였다 (Fig. 1C, Table 1). Duthie 등¹¹⁾은 β -carotene의 DNA 손상정도를 tail %DNA로 본 결과, 100 μM 농도에서 positive control에 비해 대략 127%를 보여 DNA 손상 감소효과가 나타나지 않음을 보고하였고, Woods 등²¹⁾도 인체 간세포인 HepG2 세포에서 Tail Moment로 본 DNA 손상정도가 β -carotene의 처리농도가 10 μM 일때 positive control (10, 50 μM H_2O_2)에 비해 증가하는 경향을

보였다. 그러나 Astley 등²²⁾의 경우 Molt-17 인체 임파구 세포에 β -carotene을 8 μM 을 전처리한 후 산화적 손상 (100 μM H_2O_2)을 주었을 때 DNA 손상 보호 효과는 나타나지 않았으나, β -carotene의 처리시간 (0, 30, 60, 90, 120분)이 증가함에 따라 SSB (single strand breaks)의 수가 현저하게 감소하였다고 보고하였다.

Trolox의 경우, 처리농도가 10, 50, 100, 500 μM 로 증가할수록 positive control에 대한 DNA 손상이 70%, 48%, 48%, 35%를 보여 농도 의존적으로 감소하였다 (Fig. 1D, Table 1). Szeto 등²⁰⁾의 연구에서는 Tail %DNA로 본 DNA 손상정도는 trolox의 처리농도가 12.5, 25, 50 μM 로 증가할수록 positive control (45 μM H_2O_2)에 비해 현저히 감소함을 보였다.

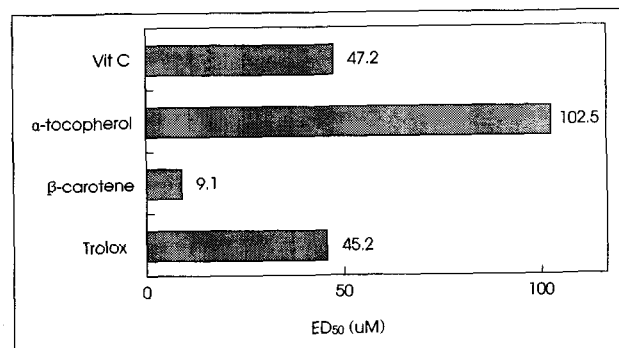


Fig. 2. Comparison of the antioxidant activities of each antioxidant vitamins in the comet assay by the estimated dose that would result in a 50% reduction (ED₅₀) of oxidative DNA damage in human lymphocytes.

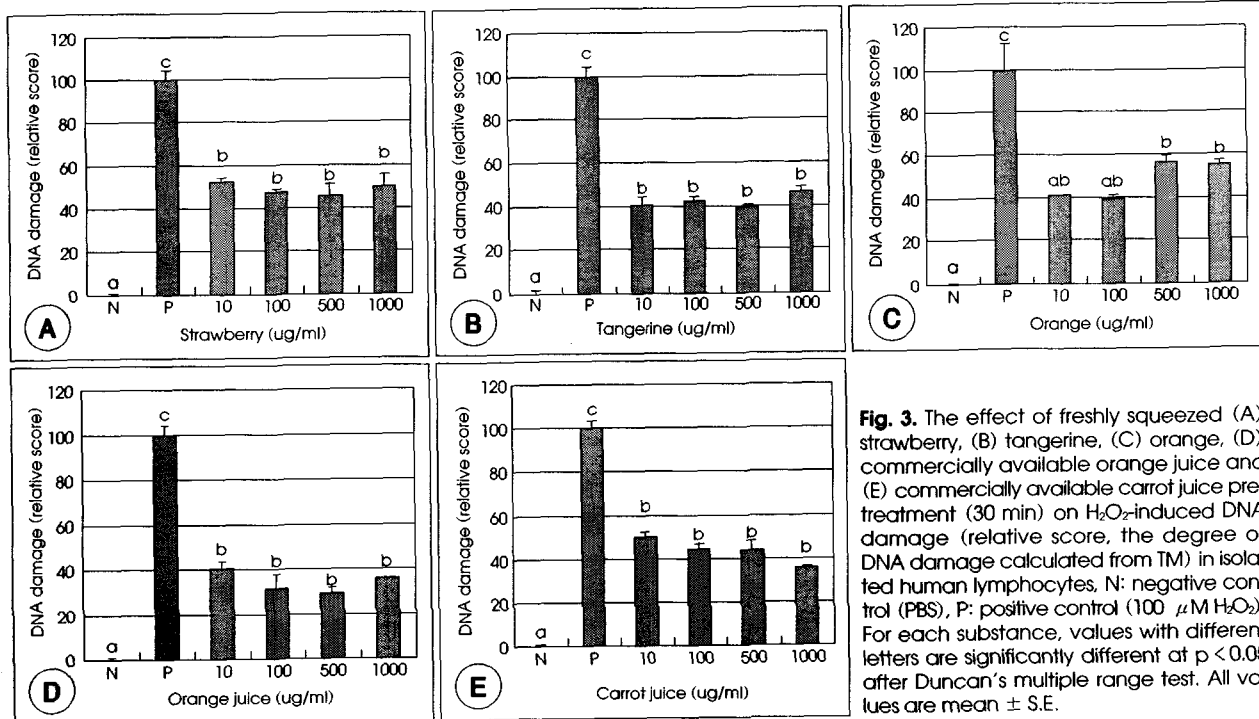


Fig. 3. The effect of freshly squeezed (A) strawberry, (B) tangerine, (C) orange, (D) commercially available orange juice and (E) commercially available carrot juice pretreatment (30 min) on H_2O_2 -induced DNA damage (relative score, the degree of DNA damage calculated from TM) in isolated human lymphocytes. N: negative control (PBS), P: positive control (100 μM H_2O_2). For each substance, values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan's multiple range test. All values are mean \pm S.E.

Table 2. Levels of DNA damage expressed as TD, TL, TM of strawberry, tangerine, orange, orange juice, carrot juice

Treatment	N ¹⁾	P ²⁾	Concentration (μg/mL)				
			10	100	500	1000	
Strawberry	TD	13.8 ± 1.0 ^a	51.2 ± 2.3 ^c	33.2 ± 0.7 ^b	30.5 ± 0.3 ^b	31.1 ± 2.8 ^b	31.6 ± 3.1 ^b
	TL	47.9 ± 2.7 ^a	113.4 ± 11.1 ^c	89.6 ± 3.7 ^b	88.8 ± 3.6 ^b	89.2 ± 9.7 ^b	90.8 ± 7.9 ^b
	TM	7.5 ± 0.9 ^a	59.6 ± 4.2 ^c	34.8 ± 2.0 ^b	32.3 ± 1.3 ^b	31.2 ± 5.2 ^b	33.5 ± 5.3 ^b
Tangerine	TD	14.8 ± 1.5 ^a	50.8 ± 2.0 ^c	31.3 ± 1.8 ^b	31.4 ± 0.3 ^b	30.3 ± 0.9 ^b	32.6 ± 1.2 ^b
	TL	52.2 ± 5.9 ^a	117.0 ± 5.5 ^c	84.5 ± 6.4 ^b	89.1 ± 7.2 ^b	84.5 ± 1.8 ^b	88.8 ± 4.3 ^b
	TM	8.8 ± 1.7 ^a	61.4 ± 4.3 ^c	30.1 ± 3.8 ^b	30.9 ± 2.2 ^b	29.3 ± 1.3 ^b	32.9 ± 3.1 ^b
Orange	TD	10.5 ± 0.9 ^a	49.6 ± 3.0 ^c	25.7 ± 2.5 ^b	26.5 ± 4.3 ^b	31.8 ± 4.0 ^b	32.6 ± 2.2 ^b
	TL	40.2 ± 0.2 ^a	101.2 ± 21.2 ^b	82.7 ± 7.7 ^b	75.0 ± 4.6 ^b	85.6 ± 2.0 ^b	81.2 ± 6.1 ^b
	TM	4.4 ± 0.4 ^a	52.7 ± 12.7 ^c	24.2 ± 0.1 ^{ab}	23.3 ± 2.3 ^{ab}	31.5 ± 3.6 ^b	31.1 ± 1.5 ^b
Orange juice	TD	11.3 ± 1.2 ^a	52.0 ± 0.9 ^c	29.6 ± 4.0 ^b	25.5 ± 2.2 ^b	28.8 ± 5.0 ^b	29.1 ± 2.1 ^b
	TL	48.9 ± 2.4 ^a	124.6 ± 8.8 ^c	90.0 ± 4.1 ^b	82.4 ± 12.7 ^b	72.4 ± 2.8 ^b	79.1 ± 1.5 ^b
	TM	6.4 ± 1.0 ^a	67.5 ± 4.1 ^c	31.1 ± 3.2 ^b	25.4 ± 6.8 ^b	24.2 ± 2.7 ^b	28.4 ± 0.3 ^b
Carrot juice	TD	11.6 ± 1.0 ^a	51.5 ± 2.0 ^c	31.9 ± 2.4 ^b	28.8 ± 0.7 ^b	29.5 ± 2.0 ^b	27.1 ± 1.0 ^b
	TL	44.5 ± 2.7 ^a	116.0 ± 3.0 ^c	88.0 ± 0.8 ^b	90.7 ± 2.5 ^b	84.2 ± 8.3 ^b	77.0 ± 3.7 ^b
	TM	5.7 ± 0.7 ^a	61.4 ± 3.1 ^c	33.4 ± 2.4 ^b	30.3 ± 2.5 ^b	29.9 ± 4.2 ^b	25.3 ± 0.9 ^b

1) N: negative control (PBS), 2) P: positive control (100 μM H₂O₂)

For each substance, values with different letters within a row are significantly different at p < 0.05 after Duncan's multiple range test. All values are mean ± S.E

각 항산화 비타민의 DNA 손상 감소효과 비교해 보기 위해 DNA 손상을 50% 감소시키기 위한 각 물질의 농도인 ED₅₀을 계산하여 본 결과는 Fig. 2와 같다. DNA 손상 감소효과가 가장 큰 비타민은 β-carotene으로 9.1 μM이었으며 그다음이 trolox로 45.2 μM, 그 다음이 비타민 C로 47.2 μM, 그리고 마지막은 α-tocopherol으로써 102.5 μM을 보였다. Noroozi 등¹³⁾은 비타민 C의 ED₅₀을 계산한 결과 233 mM를 보였다고 보고하여 본 실험 결과와 큰 차이를 보였다. 본 실험 결과, 항산화 비타민 중 β-carotene이 가장 우수한 DNA 손상 감소효과를 지닌 것으로 나타났다.

2. 과일·야채류의 DNA 손상 감소 효과

Comet assay image 분석을 통해 관찰한 과일·야채류의 DNA 손상 감소 효과는 Fig. 3과 Table 2에 나타내었다. 시료의 처리 농도가 10, 100, 500, 1000 μg/ml로 증가할수록 positive control에 대비한 DNA 손상정도는 신선히게 착즙한 딸기즙의 경우 52%, 48%, 46%, 50%, 귤즙의 경우 40%, 42%, 39%, 46%, 오렌지즙의 경우 59%, 61%, 44%, 45%로 세 종류의 과즙 모두 50~70% 정도의 탁월한 DNA 손상 감소효과를 보였으나 농도에 따른 차이는 보이지 않았다 (Fig. 3A-C, Table 2). 마찬가지로 시제품 천연 100% 오렌지 주스 및 당근 주스에서도 DNA 손상 감소효과가 뚜렷하게 나타났으며 오렌지 주스의 경우, 10, 100, 500, 1000 μg/ml로 처리 농도가 증가할수록 po-

sitive control에 대비한 DNA 손상정도가 지속적으로 감소하여 40%, 31%, 30%, 36%를 보였으며 500 μg/ml에서 DNA 손상 감소효과가 제일 큰 것으로 나타났으나 농도에 따른 유의적인 차이는 볼 수 없었다 (Fig. 3D, Table 2). 이와 같은 결과를 신선히게 착즙한 오렌지즙 (Fig. 3B)과 비교해 보면, 큰 차이는 아니나 시제품 100% 오렌지 주스의 DNA 손상 감소효과가 신선히게 착즙한 오렌지즙보다 더 좋은 것으로 나타났다. 100% 천연 시제품 당근 주스의 경우, 처리 농도가 10, 100, 500, 1000 μg/ml로 증가할수록 DNA 손상이 50%, 44%, 43%, 35%로 감소되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 3E, Table 2). 이는 Jeon 등¹⁷⁾의 연구에서 CHL (Chinese hamster lung) 세포에 25, 50, 100, 250 μg/ml의 시제품 당근 주스를 처리하였을 경우 positive control (200 μM H₂O₂)에 대한 DNA 손상 정도가 62%, 68%, 50%, 30%로 나타난 것과 비슷한 경향이였다. 다만 이 선행연구¹⁷⁾에서는 당근 주스의 DNA 손상 감소효과가 농도 의존적으로 나타났으나 본 실험에서는 농도 의존적 경향만 보였을 뿐 농도별 유의성은 볼 수 없었다. 이는 선행연구에서는 CHL 세포를 사용하였고, 본 실험에서는 인체 임파구 세포를 사용하는 등 실험 조건이 서로 달랐기 때문이라고 생각된다.

각 과일·야채추출물의 DNA 손상 감소효과 비교해 보기 위해 ED₅₀을 계산하여 본 결과는 Fig. 4와 같다. 각 시료 중 DNA 손상 감소효과가 가장 큰 시료는 오렌지 주스 (8.4 μg/ml)와 귤 (8.4 μg/ml)로써 같은 값을 보였고, 그 다

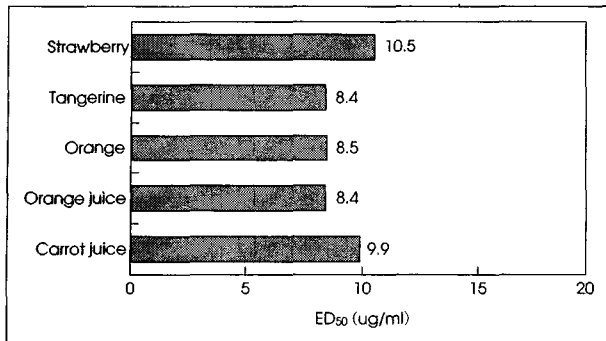


Fig. 4. Comparison of the antioxidant activities of each fruits and vegetables juices in the comet assay by the estimated dose that would result in a 50% reduction (ED₅₀) of oxidative DNA damage in human lymphocytes.

음이 오렌지즙 (8.5 $\mu\text{g/ml}$), 당근 주스 (9.9 $\mu\text{g/ml}$), 그리고 딸기 (10.5 $\mu\text{g/ml}$)의 순으로 나타났으나, 신선한 과일을 착즙한 경우와 시제품으로 100% 천연 주스를 사용하였을 경우 모두 ED₅₀ 값이 40~50%로 큰 차이 없이 유사하게 나타나 과일·야채 시료간의 DNA 손상 감소 효과의 차이를 볼 수 없었다.

본 연구에서와 같이 ED₅₀를 계산하여 각 추출물의 DNA 손상 정도를 비교하는 방법은 몇몇 연구자들이 보고하고 있으나,^{13,16,17} ED₅₀ 값은 regression 계산식에서 계산된 추정치이므로 절대적인 값으로 이해하기에는 제한점이 있다. 현재까지 각 식품의 항산화 정도 및 DNA 손상 억제 정도를 상대적으로 비교하는 이상적인 방법은 개발되지 않고 있으므로 앞으로 여러 항산화 식품들의 DNA 손상 억제효과를 비교하는 방법 및 치료 개발에 대한 다양한 연구가 좀 더 깊이 있게 이루어져야 하리라고 본다.

본 연구 결과, 본 연구에서 사용한 모든 항산화 비타민 및 과일·야채추출물에서 hydrogen peroxide의 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 감소 효과가 뚜렷하게 나타났으며 ED₅₀ 값으로 비교한 결과, DNA 손상 감소효과가 가장 우수한 시료는 β -carotene이었으며, 과일·야채추출물은 모든 시료에서 DNA 손상 감소효과가 나타났으나 각 식품류의 ED₅₀값이 매우 비슷하여 DNA 손상 감소효과의 우위를 가리기 어려웠다. 또 항산화 비타민과 과일·야채추출물을 비교해 본 결과, 저 농도에서 단일 항산화 비타민보다 항산화 비타민이 많이 함유되어 있는 과일·야채추출물들의 DNA 손상 감소효과가 더 뚜렷하게 나타났다. 이러한 결과는 과일·야채 등 식품에는 항산화 비타민 외에 polyphenols, carotenoids나 flavonoids같은 phytochemical들이 함유되어 있어 이들이 더욱 효과적인 항산화제 역할을 하여 DNA 손상 감소 효과를 보이기 때문인 것으로 생각된다.^{12,16,23} 앞으로 여러 가지 과일과 야채 등 식품류의 항산

화 효능을 *in vitro* DNA 손상 감소효과 뿐 아니라 동물실험이나 인체실험을 통한 *in vivo* DNA 손상 감소효과로도 평가하고 비교하는 작업이 더욱 폭 넓게 이루어져야 하리라고 본다.

요약 및 결론

본 연구에서는 대표적인 항산화 비타민들과 과일·야채추출물의 항산화 생리활성 효능에 대한 검증의 한 방법으로 DNA 손상 감소 효과에 대해 살펴보았다. 본 연구에서 인체 임파구 세포에 여러 가지 항산화 비타민과 과일·야채추출물을 농도별로 처리하고 hydrogen peroxide (H₂O₂)로 산화적 손상을 준 후 DNA 손상 감소 효과를 alkaline comet assay로 평가한 결과, 항산화 비타민의 처리농도가 10, 50, 100, 500 μM 으로 증가함에 따라 vitamin C (36, 49, 43, 51%), β -carotene (55, 59, 63, 37%), α -tocopherol (9, 32, 46, 61%), 및 trolox (30, 52, 52, 65%)의 DNA 손상 보호 효과가 나타났다. 한편 과일·야채추출물의 경우에도 처리농도가 10, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 으로 증가함에 따라 딸기즙 (48, 53, 54, 50%), 귤즙 (60, 58, 61, 54%), 오렌지즙 (59, 61, 44, 45%), 오렌지 주스 (60, 69, 71, 64%) 및 당근 주스 (50, 56, 57, 65%) 모두에서 인체 임파구 세포의 DNA 손상에 대한 보호 효과가 나타났다. 항산화 비타민들 중에서 ED₅₀ 값으로 비교해 본 결과 hydrogen peroxide의 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 감소 효과가 가장 우수한 시료는 β -carotene으로 나타났다. 과일·야채추출물은 모든 시료에서 DNA 손상 감소효과가 나타났으나 각 식품류의 ED₅₀값이 매우 비슷하여 DNA 손상 감소효과의 우위를 가리기 어려웠다. 본 연구 결과 이들 항산화 비타민이 많이 함유되어 있는 과일·야채들의 DNA 손상 감소효과가 저농도에서 뚜렷하게 보였는데, 이는 과일·야채에 함유되어 있는 단일 항산화 비타민들 외에 polyphenols, carotenoids나 flavonoids같은 phytochemical들에 기인한 것이라고 생각된다.

Literature cited

- 1) Baker DL, Krol ES, Jacobsen N, Liebler DC. Reactions of beta-carotene with cigarette smoke oxidants. Identification of carotenoid oxidation products and evaluation of the prooxidant/antioxidant effect. *Chem Res Toxicol* 12(6): 535-543, 1999
- 2) Panda K, Chattopadhyay R, Ghosh MK, Chattopadhyay DJ, Chatterjee IB. Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis. *Free Radic Biol Med* 27: 1064-1079, 1999

- 3) Welch RW, Turley E, Sweetman SF, Kennedy G, Collins AR, Dunne A, Livingstone MB, McKenna PG, McKelvey-Martin VJ, Strain JJ. Dietary antioxidant supplementation and DNA damage in smokers and nonsmokers. *Nutr Cancer* 34: 167-172, 1999
- 4) Lee BM, Lee SK, Kim HS. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, beta-carotene and red ginseng). *Cancer Lett* 132: 219-227, 1998
- 5) Zhang P, Omaye ST. Antioxidant and prooxidant roles for beta-carotene, alpha-tocopherol and ascorbic acid in human lung cells. *Toxicol in Vitro* 15 (1): 13-24, 2001
- 6) Riso P, Pinder A, Santangelo A, Porrini M. Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage? *Am J Clin Nutr* 69 (4): 712-718, 1999
- 7) Pool-Zobel BL, Bub A, Muller H, Wollowski L, Rechkemmer G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis* 18 (9): 1847-1850, 1997
- 8) Palozza P, Krinsky NI. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: an overview. *Methods Enzymol* 213: 403-420, 1992
- 9) Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74 (1): 139-162, 1994
- 10) Park EJ, Kang MH. Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human biomonitoring. *Korean J Nutrition* 35 (2): 213-222, 2002
- 11) Duthie SJ, 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
- 12) 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
- 13) Noroozi M, Angerson WJ, Lean MEJ. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 67: 1210-1218, 1998
- 14) Zhu CY, Loft S. Effects of brussels sprouts extracts on hydrogen peroxide-induced DNA strand breaks in human lymphocytes. *Food Chemical Toxicol* 39: 1191-1197, 2001
- 15) 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
- 16) Park YK, Jeon EJ, Kang MH. Protective effect of flavonoids on lymphocyte DNA damage using comet assay. *Korean J Nutrition* 36 (2): 125-132, 2003
- 17) Jeon EJ, Kim JS, Park YK, Kim TS, Kang MH. Protective effect of yellow-green vegetable juices on DNA damage in chinese hamster lung cell using comet assay. *Korean J Nutrition* 36 (1): 24-31, 2003
- 18) Panayiotidis M, Collins AR. Ex vivo assessment of lymphocyte antioxidant status using the comet assay. *Free Rad Res* 27: 533-537, 1997
- 19) Szeto YT, Benzie IFF. Effects of dietary antioxidants on human DNA *ex vivo*. *Free Rad Res* 36 (1): 113-118, 2002
- 20) Szeto YT, Collins AR, Benzie IFF. Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. *Mutat Res* 500: 31-38, 2002
- 21) Woods JA, Bilton RF, Young AJ. β -Carotene engenders hydrogen peroxide-induced DNA damage in human hepatocellular HepG2 cells. *FEBS* 449: 255-258, 1999
- 22) Astley SB, Elliott RM, Archer DB, Southon S. Increased cellular carotenoid levels reduce the persistence of DNA single-strand breaks after oxidative challenge. *Nutr Cancer* 43 (3): 202-213, 2002
- 23) Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13 (10): 572-584, 2002