

야채 및 과일추출물의 항산화작용

허찬 · 김남이 · 김현표 · 허문영*

강원대학교 약학대학

(Received May 26, 2005; Revised June 13, 2005)

Antioxidant Activity of Vegetables or Fruits Extract in Mice

Chan Heo, Nam Yee Kim, Hyun Pyo Kim and Moon Young Heo*

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

Abstract — The ethanol extracts of the mixed vegetables (Bioactive Vegetables, BV) and the mixed fruits (Bioactive Fruits, BF) were evaluated for their *in vivo* antioxidant activities. Four weeks treatment of oral administration was performed to mice. A $KBrO_3$ as a potent oxidant was used to induce the oxidative stress for *in vivo* experiment. BV and BF were shown to possess the significant inhibitory effect of lipid peroxidation as measured by the level of malondialdehyde (MDA) formation although the potencies were not higher than those of well-known antioxidants such as vitamin C, trolox and quercetin. Furthermore, BV and BF inhibited DNA damage assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and reduced the micronucleated reticulocyte (MNRET) formation of peripheral blood. Antioxidants tested also revealed potent inhibitory activities higher than BV and BF. These antigenotoxic activity profiles were similar to that of abovementioned inhibition of lipid peroxidation. Therefore, BV and BF having mild antioxidant activity as functional food candidates may be useful natural antioxidants by the inhibiting of lipid peroxidation and the protecting oxidative DNA and chromosomal damage.

Keywords □ vegetable, fruit, antioxidant, DNA damage, chromosomal damage, comet assay, micronucleus assay, *in vivo*

최근에 oxidative stress에 의한 지질, 단백질, DNA 등 생체고분자들의 손상으로 인한 노화, 심혈관계 질환 및 암 등의 질병에 관한 관심이 커지고 있다.¹⁻⁴ 세포 내에서 호흡을 통한 산화적 대사는 세포생존에 필수불가결하나 각종 산화적 손상을 일으키는 프리라디칼이나 활성산소종(reactive oxygen species)들을 생성시키게 된다. 과잉의 프리라디칼들이 생성되게 되면 생체 내 항산화 효소들이 보호작용을 하게 되나 부족한 경우에는 과산화지질생성, 단백질 산화, DNA 산화 등에 의해 세포들의 기능이 저하되거나, 돌연변이 또는 세포사멸에 이르게 되고 다양한 산화 스트레스 관련 질병을 야기시키게 된다.⁵ 이에 따라 안전하고 유용하게 사용할 수 있는 항산화제를 천연물로부터 찾고자 하는 연구가 많다.⁶⁻⁹ 특히 야채와 과일에는 항산화성분인 폴리페놀이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.^{10,11} 이에 본 연구에서

는 한국인들이 즐겨먹는 5종의 야채 및 4종의 과일로부터 flavonoid를 비롯한 폴리페놀 화합물들이 다량으로 들어 있는 엑스를 각각 제조하고, 이 엑스들의 항산화활성을 밝혀 이들의 항산화 기능성 식품으로서의 용도를 개발하기 위한 연구를 수행하였다. 5종의 야채로부터 추출된 야채생리활성추출물과 4종의 과일로부터 추출된 과일생리활성추출물들을 대상으로 하여 전보¹²의 *in vitro* 실험에 이어 *in vivo* 항산화작용을 평가하기 위하여 강력한 산화제인 $KBrO_3$ 유도에 대한 생쥐 간조직의 지질과산화역제실험을 실시하였다. 한편, 산화적 DNA 손상 및 염색체손상억제효과를 평가하기 위하여 생쥐 말초혈액을 이용한 single cell gel electrophoresis(comet assay)와 소핵시험(micronucleus assay)를 각각 실시하여 항산화효과를 규명하여 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시약 및 실험동물

Vitamin C, trolox, quercetin BHT, phosphotungstic acid,

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 033-250-6914 (팩스) 033-253-9647
(E-mail) myheo@kangwon.ac.kr

1,1,3,3-tetraethyl ethoxy propane, n-butanol, potassium bromate, low melting point agarose(LMPA), normal melting point agarose(NMPA) 등 시약들은 대부분 Sigma사제를 사용하였고, Tris-HCl buffer 등 세포배양시약들은 Gibco사제를 사용하였다. 본 실험에서 사용한 ICR 생쥐는 (주)폴라스인터내셔널에서 공급받아 강원대학교 약학대학 동물사육실 내에 있는 양압의 무균동물챔버에서 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 및 상대습도 $55 \pm 7\%$ 의 조건으로 7~10일 적응시킨 후 사용했다. 사료는 삼양유지의 마우스식 pellet 사료를 주었으며, 물은 자유롭게 먹게 하고, 12 h/12 h(L/D) cycle의 조건에서 실험하였다.

야채 및 과일추출물의 제조¹²⁾

강원도 양구지방에서 재배된 배추(*Brassica campestris*), 무청(*Raphanus sativus*), 양파(*Allium cepa*), 오이(*Cucumis sativus*), 셀러리(*Apium graveolens*)를 구입하여 물로 세척 한 후 건조기에서 건조하였다. 건조된 야채를 1:1:1:1:0.1의 비율로 섞고 여기에 주정(대한주정) 20 l와 정제수 20 l를 가해 20일간 실온에서 방치하고 여과 후 농축하여 암녹색의 연조엑스(Bioactive Vegetables, BV)를 얻었다. 건조야채로부터의 회수율은 약 22%(w/w)였다. 한편, 강원도 양구산 사과(*Malus pumilar*), 배(*Pyrus communis*), 포도(*Vitis vinifera*), 제주산 감귤(*Citrus aurantium*)을 세척하고 1:1:1:1의 비율로 섞고 주정(대한주정)을 30 l를 가하고 실온에서 20일간 방치하였다. 이것을 여과하고 농축하여 암갈색의 연조엑스(Bioactive Fruits, BF)를 얻었다. 생과일로부터의 회수율은 약 6.7%(w/w)였다.

투여방법

각 실험군은 6마리씩으로 하고 1일 1회(주 6일) 일정한 시간에 검체(0.2 ml/25 g 마우스체중)를 4주간 경구투여하였다. KBrO_3 는 주사용수에 녹였으며 마우스에 80 mg/kg 용량으로 투여되도록 조제하였으며, 검체들은 0.5% carboxy methyl cellulose (CMC)에 녹여 사용하였다. Negative 군은 0.5% CMC 4주 경구투여하고, 주사용수는 마지막 4일 동안에 복강주사하였다. Positive 군은 0.5% CMC 4주 경구투여하고, KBrO_3 는 마지막 4일 동안 복강주사하였다. Treatment 군은 각 검체(BV, BF는 각각 100 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg 4주 경구투여, vitamin C, trolox, quercetin은 10 mg/kg 4주 경구투여)하였고, 마지막 4일 동안에는 KBrO_3 를 복강주사하였다. 마지막 투여 후 24시간에 소핵시험을 위하여 꼬리정맥에서 말초혈액을 채혈하였고, comet 시험을 위해서 심장채혈을 시행하였으며 이후 간 조직을 적출하여 지질과산화시험에 사용하였다.

간조직의 과산화지질시험

적출한 간조직에서 검체들의 지질과산화 억제효과를 측정하기

위하여 조직 1g당 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)를 6.0 ml를 가해 호모게나이제이션 후 $3,000 \times g$ 로 10분간 원심분리하였다. 상등액 200 μl 와 증류수 200 μl 에 BHT 25 μl , 10% phosphotungstic acid in 0.5 M H_2SO_4 500 μl , 0.7% TBA 250 μl 를 넣은 후 95°C 수욕 상에서 50분간 가열하고 꺼내어 식힌 후 n-butanol 1 ml를 넣고 5분간 추출한 후 4,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로서 1,1,3,3-tetraethyl ethoxy propane을 사용하였으며 검량선으로부터 MDA양을 계산하여 생성된 과산화지질의 양을 MDA $\mu\text{mol/g}$ of tissue로 나타내었다.^{13,14)}

Alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay)

심장에서 채취한 혈액을 바로 sodium heparin BD vacutainer에 넣어 잘 섞고, 그 중 50 μl 를 취해 0.5% LMPA를 200 μl 를 가해준 뒤 잘 섞어주었다. 0.65% NMPA 130 μl 를 미리 입힌 slide (fully frosted)에 이 액 50 μl 를 떨어뜨린 후 cover slide를 덮었다. 냉장고에서 약 30분간 굳힌 뒤 cover slide를 제거하고 그 위에 다시 0.5% LMPA를 100 μl 를 떨어뜨린 후 cover slide로 덮고 냉장고에서 30분간 굳혔다. Cover slide를 제거한 후 lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 mM Tris, pH 10, 10% DMSO, 1% Triton X-100)에 담가서 약 60분간 용해시켰다. 그 후 전기영동원충액(300 mM NaOH, 1 mM Na_2EDTA , pH 13)에 20분간 담가 정지하였다. 전기영동장치에 slide를 배열한 뒤 25 V, 300 mA에서 15분간 전기영동하였다. 슬라이드를 꺼내 0.4 M tris(pH 7.5)에 30분간 담가 중화시켰다. Tray에 걸어 말린 후 ethidium bromide(2 $\mu\text{g/ml}$) 20 μl 를 각각에 떨어뜨린 후 515~560 nm의 excitation filter와 590 nm의 barrier filter를 이용하여 형광현미경으로 관찰하여 image analyzer인 KOMET 5.5(Kinetic image, England)를 사용하여 슬라이드 당 50 cell을 분석하였다. Comet 시험의 데이터는 Olive tail moment(% DNA \times distance of center of gravity of DNA, OTM)와 tail length(distance between the head and the last DNA fragment, TL)로 나타내었다.^{15,16)}

KBrO_3 유도 산화적 스트레스에 의한 소핵생성에 대한 억제효과

마우스 꼬리정맥혈을 이용하여 소핵시험을 실시하였다.¹⁷⁾ 마우스 꼬리 정맥을 주사바늘로 찔러 소량 분출해 나오는 혈액을 미리 acridine orange로 코팅된 슬라이드 상에 떨어뜨렸다. 곧 카바글래스를 덮고 2시간 이후에 1,000개의 망상적혈구(reticulocyte, RET) 중 소핵을 가진 망상적혈구(micronucleated reticulocyte, MNRET)를 관찰하였다. 관찰은 형광현미경(blue excitation, 488 nm & yellow filter, 515nm)에서 $1,000 \times$ 로 하였다.

통계처리

통계처리는 Student's t-test를 사용하여 대조군과 투여군의 유

Table I – Inhibitory effect of BV and BF on lipid peroxidation in KBrO₃-treated mouse liver

Treatment ¹ Sample (p.o.)+KBrO ₃ (i.p.)	MDA μmol/g of tissue	
	Mean±S.E.M. ²	Inhibition (%) ³
CMC+Water	5.56±0.57	-
CMC+KBrO ₃ 80 mg/kg	9.86±0.79 ^a	-
BV 100 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	9.80±1.02 ^a	0.6
BV 250 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	8.63±0.54 ^a	12.4
BV 500 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	2.67±0.49 ^{**b}	72.9
BF 100 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	8.74±0.84 ^a	11.4
BF 250 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	5.66±0.48 ^{**b}	42.6
BF 500 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	5.24±0.33 ^{**b}	46.9
Vitamin C 10 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	5.52±0.65 ^{**}	44.0
Trolox 10 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	6.78±0.76 [*]	31.2
Quercetin 10 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	6.94±0.87 [*]	29.6

¹Sample (p.o.) was treated for 6 days a week for one month, and was treated with KBrO₃ (80 mg/kg, i.p.) daily for last 4 consecutive days, simultaneously. Liver from mouse was removed at 24 hours after final treatment of KBrO₃.

²n=5 except BV 100 mg/kg and 250 mg/kg groups (n=4, respectively), Significantly different from positive control group (Student's t-test). * p<0.05, ** p<0.01. The groups with different alphabet are significantly different in the treatment groups of BV or BF including positive control (CMC+KBrO₃ 80 mg/kg) at p<0.05 (ANOVA/Duncan's multiple range test).

³% Inhibition=[MDA_{control}-MDA_{treatment}]/MDA_{control}×100

BV : the ethanol extract of mixed vegetables, BF : the ethanol extract of mixed fruits.

의성을 검정하였고, ANOVA with multiple comparison test를 사용하여 용량간의 유의성 있는 차이를 분석하였다.

결 과

지질과산화에 대한 억제효과

Table I에 BV, BF 및 항산화제들인 vitamin C, trolox,

quercetin들의 KBrO₃ 유도 산화적 스트레스에 의한 지질과산화 억제작용을 나타내었다. BV와 BF는 투여용량에서 용량의존적인 억제효과를 나타내었다. Student's t-test에서 BV의 경우에는 500 mg/kg, BF의 경우에는 250, 500 mg/kg에서 유의성(p<0.01) 있는 억제효과가 관찰되었으며 BV가 BF보다 활성이 다소 높은 편이었다. 대조물질로 사용한 항산화제들의 활성은 vitamin C, trolox, quercetin 순이었으며 투여용량 10 mg/kg에서 활성이 크게 나타났다. 따라서 BV와 BF는 조추출물임에도 불구하고 양호한 지질과산화억제효과가 있는 것으로 판단되었다.

산화적 DNA 손상에 대한 억제효과

Table II는 BV, BF 및 항산화제들인 vitamin C, trolox, quercetin들의 KBrO₃ 유도 산화적 스트레스에 의한 산화적 DNA 손상에 대한 억제효과를 나타내었다. 산화적 DNA 손상을 Olive tail moment(OTM)과 tail length(TL)로 나타내었을 때, BF 100 mg/kg군을 제외하고 투여용량에서 유의성이 높은(p<0.01) 억제효과를 나타내었다. BV가 BF보다 활성이 다소 높은 편이었으며 대조물질로 사용한 항산화제들의 활성은 vitamin C, trolox, quercetin 순이었고, 이들은 투여용량 10 mg/kg에서 활성이 크게 나타났다. 대체로 BV 및 BF와 대조 항산화제들에 대한 산화적 DNA 손상억제효과는 Table I의 지질과산화시험의 억제경향처럼 유사하게 나타났다. 따라서 BV, BF는 조추출물임에도 불구하고 양호한 지질과산화억제효과가 있는 것으로 판단되었다.

산화적 염색체손상에 대한 억제효과

KBrO₃에 의한 BV와 BF 및 항산화제들의 염색체 손상에 의한 소핵생성의 억제활성을 Table III에 나타내었다. Student's t-test에서 BF 100 mg/kg군을 제외하고(p<0.05), BV와 BF는 투

Table II – Inhibitory effect of BV and BF on KBrO₃-induced DNA damage in mouse peripheral blood

Treatment ¹ Sample (p.o.)+KBrO ₃ (i.p.)	OTM		TL	
	Mean±S.E.M. ²	Inhibition (%) ³	Mean±S.E.M. ²	Inhibition (%) ³
CMC+Water	0.64±0.044	-	4.60±0.41	-
CMC+KBrO ₃ 80 mg/kg	1.67±0.12 ^a	-	12.50±1.04	-
BV 100 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	0.91±0.08 ^{**b}	45.5	5.99±0.44 ^{**}	52.1
BV 250 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	0.71±0.06 ^{**b}	57.5	5.32±0.47 ^{**}	57.4
BV 500 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	0.84±0.09 ^{**b}	49.7	5.83±0.70 ^{**}	53.4
BF 100 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	1.21±0.24 ^{ab}	27.5	10.95±3.34	12.4
BF 250 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	0.87±0.11 ^{**b}	47.9	6.90±1.50 ^{**}	44.8
BF 500 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	0.82±0.14 ^{**b}	50.9	6.10±1.16 ^{**}	51.2
Vitamin C 10 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	0.57±0.06 ^{**}	65.9	3.94±0.41 ^{**}	68.5
Trolox 10 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	0.64±0.03 ^{**}	61.7	4.73±0.16 ^{**}	62.2
Quercetin 10 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	0.76±0.06 ^{**}	54.5	4.86±0.30 ^{**}	61.1

¹Sample (p.o.) was treated for 6 days a week for one month, and was treated with KBrO₃ (80 mg/kg, i.p.) daily for last 4 consecutive days, simultaneously. Blood from heart puncture was taken at 24 hours after final treatment of KBrO₃.

²n=6, Significantly different from positive control group (Student's t-test). * p<0.05, ** p<0.01. The groups with different alphabet are significantly different in the treatment groups of BV or BF including positive control (CMC+KBrO₃ 80 mg/kg) at p<0.05 (ANOVA/Duncan's multiple comparison test).

³% Inhibition=(DNA damage_{control}-DNA damage_{treatment})/DNA damage_{control}×100

BV : the ethanol extract of mixed vegetables, BF : the ethanol extract of mixed fruits, OTM : Olive Tail Moment, TL : Tail Length.

Table III - Anticlastrogenicity of BV and BF on KBrO₃-induced micronucleated reticulocyte (MNRET) in mouse peripheral blood

Treatment ¹ sample (p.o.)+KBrO ₃ (i.p.)	MNRET/1,000RET	
	Mean±S.E.M. ²	Inhibition (%) ³
CMC+Water	1.33±0.61	-
CMC+KBrO ₃ 80 mg/kg	18.67±1.76 ^a	-
BV 100 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	7.67±1.72 ^{**b}	58.9
BV 250 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	3.17±0.79 ^{**c}	83.0
BV 500 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	2.17±0.79 ^{**c}	88.3
BF 100 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	12.00±1.77 ^{*b}	35.7
BF 250 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	8.00±1.63 ^{**b,c}	57.2
BF 500 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	5.33±1.40 ^{**c}	71.5
Vitamin C 10 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	2.00±0.63 ^{**}	89.3
Trolox 10 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	2.50±0.62 ^{**}	86.6
Quercetin 10 mg/kg+KBrO ₃ 80 mg/kg	5.50±2.26 ^{**}	70.5

¹Sample (p.o.) was treated for 6 days a week for one month, and was treated with KBrO₃ (80 mg/kg, i.p.) daily for last 4 consecutive days, simultaneously. Peripheral blood was taken at 24 hours after final treatment of KBrO₃.

²n=6, Significantly different from positive control group (Student's t-test) * p<0.05, ** p<0.01. The groups with different alphabet are significantly different in the treatment groups of BV or BF including positive control (CMC+KBrO₃ 80 mg/kg) at p<0.05 (ANOVA/Duncan's multiple comparison test).

³% Inhibition=[chromosomal damage_{control}-chromosomal damage_{treatment}]/chromosomal damage_{control}×100

BV : the ethanol extract of mixed vegetables, BF : the ethanol extract of mixed fruits, MNRET : micronucleated reticulocyte, RET : reticulocyte.

여농도에서 유의성이 높은(p<0.01) 억제활성을 나타내었으며, BV가 BF보다 활성이 높은 편이었으며 대조물질로 사용한 항산화제들의 활성은 vitamin C, trolox, quercetin 순이었다. BV, BF 및 항산화제들에 대한 억제효과는 Table I의 지질과산화시험과 Table II의 산화적 DNA 손상억제실험 결과와 대체로 유사한 경향을 나타내었다. 따라서, BV와 BF는 조추출물임에도 불구하고 양호한 산화적 염색체손상(소핵생성)억제효과가 있는 것으로 판단되었다.

고찰 및 결론

산화적 stress에 대하여 보호활성을 갖는 chemopreventive agents를 창출하기 위하여 5종의 야채로부터 추출된 야채생리활성추출물(Bioactive Vegetables, BV)와 4종의 과일로부터 추출된 과일생리활성추출물(Bioactive Fruits, BF)을 가지고 생쥐를 이용한 *in vivo* 시험에서 KBrO₃ 유도 지질과산화억제활성과 산화적 DNA 손상억제시험, 산화적 염색체손상억제시험을 실시하였다. 시험결과 BV와 BF는 강력한 항산화작용을 지닌 것으로 알려진 vitamin C, trolox, quercetin 보다는 낮았으나 대체로 투여 용량에서 통계학적 유의성이 있는 억제활성을 나타내었으며, 대체로 용량의존적인 항산화작용을 나타내었다.

KBrO₃는 강력한 산화제로서 세포내 O₂⁻, ·OH 등 ROS 생성¹⁸과 과산화지질생성¹⁹을 일으킨다. 또한, renal proximal tubule에 직접적으로 산화적 DNA손상을 일으켜서 신장암을 일으킨다.²⁰ KBrO₃는 시험관내에서 박테리아,²⁰ 효모,²¹ 포유류 동물세포¹⁸ 및 rat의 콩팥²²에 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8OH2'dG)을 생성시킴으로서 세포내에 산화적 스트레스를 야기시키는 물질이다. 따라서 *in vivo*에서 산화적 스트레스를 용이하게 유도하기 위하여 KBrO₃를 투여하였다.

*In vivo*에서 KBrO₃에 의해 유도된 간지질 중의 과산화물에 대하여 vitamin C, trolox, quercetin 등 항산화제들과 함께 BV와 BF는 조추출물임에도 불구하고 양호한 항산화활성을 나타내었다. 따라서 BV, BF 등 조성물들은 KBrO₃에 의해 생성된 O₂⁻, ·OH 등 유리기들을 소거하고 지질과산화억제작용으로 산화적 스트레스에 대한 보호작용을 하고 있다고 판단되었다.

Reactive oxygen species(ROS)는 8OH2'dG 생성을 통하여 GC-TA transversion을 포함하는 돌연변이를 nuclear DNA에서 일으키며 oxidative damage는 노화된 세포에서 돌연변이의 축적이 일어난다.²³ 또한, DNA 수복의 결핍은 세포사를 일으키고 이것은 인접세포들에 있어서 carcinogenesis로의 촉진적 자극을 일으키기도 한다. 산화적 스트레스에 의해 야기되는 DNA나 염색체 손상 등의 유전독성에 대하여 항산화물질들은 암의 개시, 촉진 및 전진단계에서 항산화반응을 통하여 세포 내 대사의 조절, DNA 반응성 물질들의 차단, DNA 복제나 DNA 수복작용과 같은 기전으로 돌연변이나 염색체 손상 및 암을 예방할 수 있는 것으로 기대되고 있다.²⁴ 따라서 항산화성이 있는 유전독성억제제의 발견은 산화적 스트레스에 의한 제반 질병의 예방에 효과적인 chemopreventive agent가 될 수 있다.

본 연구에서는 마우스에 KBrO₃ 투여 후 유도된 마우스 혈액 세포 중 임피구의 DNA single strand breakage를 comet assay로 평가하였다. vitamin C, trolox, quercetin 등 항산화제들과 함께 BV와 BF는 조추출물임에도 불구하고 높은 항산화활성을 나타내었다. Comet assay는 여러 가지 작용기전의 유전독성물질에 의한 단일세포에서의 DNA 손상을 검출할 수 있는 예민한 방법으로 알려져 있다.²⁵ 산화제인 KBrO₃도 사람 fibroblast,²⁶ CHO cell,²⁷ 사람 white blood cells과 rat kidney epithelial cells²⁸을 이용한 comet assay에서 양성반응을 나타내었다고 보고 되어 있다. 한편, glutathione과 같은 항산화제가 KBrO₃ 유도 DNA strand breakage를 억제하였다고 보고하였다.²⁸ 따라서 본 시험의 조건 하에서 KBrO₃ 유도 DNA 손상을 억제하는 BV, BF 등과 vitamin C, trolox, quercetin 등 항산화제들은 KBrO₃에 의해 생성된 ROS들을 소거하고 산화적 유전자 손상에 대한 항산화성 보호작용을 하고 있다고 보여진다.

KBrO₃는 산화적 스트레스 기전으로 세포내에서 chromosome aberration을 일으키고 소핵을 생성시키는 물질로서 발암성이

있는 물질이다.^{20,29)} 또한, *in vitro*에서 DNA damage와 함께 micronucleated cell의 빈도를 증가시키고,³⁰⁾ *in vivo*에서도 rat에서 소핵생성의 증가가 관찰되었다.^{18,31)} 한편, Sai 등에 의하면 흰쥐에서 KBrO₃에 유도된 소핵이 vitamin C, glutathione, cysteine 등에 의해 감소되었음을 보고하고 있다.¹⁸⁾ 본 연구에서도 vitamin C는 물론이고 trolox, quercetin 등 항산화제들과 함께 BV와 BF는 KBrO₃와 같은 강력한 ROS 유발물질에 의한 염색체 수준에서의 손상에 대해서도 잘 나타내었다.

이같은 BV와 BF의 지질과산화억제, 산화적 DNA 손상억제, 산화적 염색체손상 억제 등 항산화효과는 함유성분 중에 폴리페놀이 함유되어 있기 때문인 것으로 판단된다. BV와 BF에는 total polyphenol로서 각각 3.52%, 0.96%로서 함량을 나타내며, total flavonoid로서는 각각 0.40%, 0.075% 정도 함유하고 있다.¹²⁾ 기 발표된 논문에서도 배추, 무우청, 양파, 오이, 셀러리와 같은 야채와 사과, 배와 같은 과일에는 quercetin, kaempferol 배당체들이 다량 함유되어 있으며,³²⁾ 감귤에는 hesperetin, naringenin 배당체,³³⁾ 포도에는 resveratrol³⁴⁾ 등 항산화성 물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 polyphenol류와 flavonoid 화합물들이 항산화작용으로 세포 내 oxidative stress를 감소시킨다고 알려져 있다.³⁵⁻⁴⁰⁾

따라서, BV와 BF와 같은 조성물들은 flavonoid를 비롯한 항산화성 polyphenol 화합물들을 함유하여 *in vivo*에서 KBrO₃ 유도 지질과산화억제활성을 나타내었으며, DNA 및 염색체 수준에서의 산화적 손상에 대해서도 억제효과를 나타내었다. 비록 BV와 BF는 대조 항산화제들보다는 항산화활성이 낮았지만 비교적 완전한 활성을 특징으로 하는 건강기능식품용으로는 응용가치가 큰 활성소재로 판단된다. 그러므로 BV와 BF 등 조성물들은 산소유리기들에 의한 산화적 손상에 억제적으로 작용하는 기전을 활용하여 향후 항산화, 항노화, 암예방제로서의 응용가능성이 높은 추출물 및 관련제제로서 항산화 기능성 식품으로서의 응용가능성이 있는 것으로 판단되었다.

감사의 말씀

본 연구논문은 2004년도 지역협력연구센터사업(한림대 실버생물산업기술연구센터)의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) 통계청 : 2002 사망원인통계결과, 통계청, 서울 (2003).
- 2) Jansen, M. C., Bueno-de-Mesquita, H. B., Rasanen, L., Fidanza, F., Nissinen, A. M., Menotti, A., Kok, F. J. and Kromhout, D. : Cohort analysis of fruit and vegetable

- consumption and lung cancer mortality in European men. *Int. J. Cancer* **15**, 913 (2001).
- 3) Feskanich, D., Ziegler, R. G., Michaud, D. S., Giovannucci, E. L., Speizer, F. E., Willett, W. C. and Colditz, G. A. : Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1812 (2000).
- 4) Bazzano, L. A., Serdula, M. K. and Liu, S. : Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* **5**, 492 (2003).
- 5) Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S. and Robards, K. : Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **127**(1), 183 (2002).
- 6) Duthie, G. and Crozier, A. : Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **3**, 447 (2000).
- 7) Marnett, L. J. : Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**, 361 (2000).
- 8) Lin, J. K. and Tsai, S. H. : Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol. *Proc. Natl. Sci. Council. Repub. China* **23**, 99 (1999).
- 9) Inagake, M., Yamane, T., Kitao, Y., Oya, K., Matsumoto, H., Kikuoka, N., Nakatani, H., Takahashi, T., Nishimura, H. and Iwashima, A. : Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage by green tea extract in rat. *Japan J. Cancer Res.* **86**, 1106 (1995).
- 10) Justesen, U., Knuthsen, P. and Leth, T. : Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **99**(1-2), 101 (1998).
- 11) Justesen, U., Knuthsen, P. and Leth, T. : Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Lett.* **114**(1-2), 165 (1997).
- 12) 이승철, 허찬, 이승현, 김현표, 허문영 : 야채 및 과일추출물의 항산화작용과 산화적 염색체손상에 대한 억제효과. *약학회지* **48**(2), 111 (2004).
- 13) Ohtka, H., Ohishi, N. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351 (1979).
- 14) Kitta, K., Hagiwara, Y. and Shibamoto, T. : Antioxidative activity of an isoflavonoid, 2'-o-glycosyl isovitexin isolated from green barley leaves. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1843 (1992).
- 15) Sing, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. : A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184 (1988).
- 16) Olive, P. L., Banath, R. E. and Durand, R. E. : Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiat. Res.* **122**, 86 (1990).

- 17) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, T., Sofuni, T. and Ishidate, Jr., M. : The micronucleus assay with peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.* **278**, 209 (1990).
- 18) Sai, K., Hayashi, M., Takagi, A., Hasegawa, R., Sofuni, T. and Kurokawa, Y. : Effects of antioxidants on induction of micronuclei in rat peripheral blood reticulocytes by potassium bromate. *Mutat. Res.* **269**(1), 113 (1992).
- 19) Kurokawa, Y., Matsushima, Y., Takamura, N., Imazawa, T. and Hayashi, Y. : Relationship between the duration of treatment and the incidence of renal cell tumors in male F344 rats administered potassium bromate. *Jpn. J. Cancer Res.* **78**(4), 358 (1987).
- 20) Sai, K., Tyson, C. A., Thomas, D. W., Dabbs, J. E., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y. : Oxidative DNA damage induced by potassium bromate in isolated rat renal proximal tubules and renal nuclei. *Cancer Lett.* **87**(1), 1 (1994).
- 21) Ballmaier, D. and Epe, B. : Oxidative DNA damage induced by potassium bromate under cell-free conditions and in mammalian cells. *Carcinogenesis* **16**(2), 335 (1995).
- 22) Umemura, T., Takagi, A., Sai, K., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y. : Oxidative DNA damage and cell proliferation in kidneys of male and female rats during 13-weeks exposure to potassium bromate (KBrO₃). *Arch. Toxicol.* **72**(5), 264 (1988).
- 23) Ames, B. N. : Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative diseases. *Science* **221**, 1256 (1983).
- 24) Flora, S., Bronzetti, G. and Sovels, F. H. : Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. *Mutat. Res.* **267**, 153 (1992).
- 25) Collins, A. R. : The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* **26**(3), 249 (2004).
- 26) Mosesso, P., Penna, S., Pepe, G., Lorenti-Garcia, C. and Palitti, F. : Potassium bromate but not X-rays cause unexpectedly elevated levels of DNA breakage similar to those induced by ultraviolet light in Cockayne syndrome (CS-B) fibroblasts. *Cytogenet Genome Res.* **104**(1-4), 78 (2004).
- 27) Poul, J. M., Huet, S., Godard, T. and Sanders, P. : Lack of genotoxicity of potassium iodate in the alkaline comet assay and in the cytokinesis-block micronucleus test. Comparison to potassium bromate. *Food Chem. Toxicol.* **42**(2), 203 (2004).
- 28) Parsons, J. L. and Chipman, J. K. : The role of glutathione in DNA damage by potassium bromate *in vitro*. *Mutagenesis* **15**(4), 311 (2000).
- 29) Sai, K., Takagi, A., Umemura, T., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y. : Relation of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat kidney to lipid peroxidation, glutathione level and relative organ weight after a single administration of potassium bromate. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**(2), 165 (1991).
- 30) Watanabe, S., Togashi, S. and Fukui, T. : Contribution of nitric oxide to potassium bromate-induced elevation of methaemoglobin concentration in mouse blood. *Biol. Pharm. Bull.* **25**(10), 1315 (2002).
- 31) Awogi, T., Murata, K., Uejima, M., Kuwahara, T., Asanami, S., Shimono, K. and Morita, T. : Induction of micronucleated reticulocytes by potassium bromate and potassium chromate in CD-1 male mice. *Mutat. Res.* **278**(2-3), 181 (1992).
- 32) Herotog, M. G. L., Hollaman, P. C. H. and Katan, M. B. : Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2379 (1992).
- 33) Mouly, P., Gaydou, E. M. and Auffray, A. : Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **800**(2), 171 (1998).
- 34) Matsuoka, A., Furuta, A., Ozaki, M., Fukuhara, K. and Miyata, N. : Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. *Mutat. Res.* **494**(1-2), 107 (2001).
- 35) Aruoma, O. I., Bahorun, T. and Jen, L. S. : Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutat. Res.* **544**(2-3), 203 (2003).
- 36) Frei, B. and Higdon, J. V. : Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: evidence from animal studies. *J. Nutr.* **133**(10), 3275S (2003).
- 37) Dragsted, L. O. : Antioxidant actions of polyphenols in humans. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **73**(2), 112 (2003).
- 38) Prior, R. L. : Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**(3 Suppl), 570S (2003).
- 39) Riboli, E. and Norat, T. : Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**(3 Suppl.), 559S (2003).
- 40) Naska, A., Antoniou, A., Friel, S., Trygg, K., Turrini, A. and Trichopoulou, A. : Vegetable and fruit: the evidence in their flavour and the public health perspective. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **73**(2), 63 (2003).