

## 녹차추출물의 산화적 스트레스에 대한 억제효과

김남이\* · 이진하\*\* · 허문영\*†

\*강원대학교 약학대학, \*\*강원대학교 바이오산업공학부

## Protective Effect of Green Tea Extracts on Oxidative Stress

Nam Yee Kim\*, Jin Ha Lee\*\*, and Moon Young Heo\*†

\*College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

\*\*School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

**ABSTRACT :** Green tea is of particular source as it has been found to have strong antioxidant activities. The extracts of green tea during the commercial harvest seasons from April, 2003 to August, 2003 were compared. The purpose of this study was to determine the correlation between the polyphenol content of green teas and its antioxidant activities. The content of total polyphenols was analyzed and several antioxidant testings were performed. The levels of total polyphenols were higher in the green teas (e.g. Woojeon, Sejak) harvested during very early spring and lower in the green teas harvested late (e.g. Ipha, Yepcha). In particular, the free radical scavenging, the inhibition of LDL oxidation, the cytoprotective effect and the inhibition of DNA damage were correlated with the total polyphenol contents of green tea extracts harvested early spring such as Woojeon, Sejak and Jungjak. The results obtained here show that all extracts of green teas including purified green tea catechin, GTC, have strong antioxidant activities on oxidative stress *in vitro*. The variation in polyphenol content and antioxidant activities among various types of green tea by the harvesting time may provide critical information for investigators and consumers using tea in purposes of nutrition and chemoprevention.

**Key Words :** Green tea, Free radical scavenging, Antioxidative effect, Cytoprotective effect, DNA damage, Chemoprevention

## 서 언

녹차는 차나무 (*Thea sinensis* L., *Theaceae*)의 잎을 말린 것으로서 최근 녹차 중의 카테킨류에 대하여 혈압강화작용 (Hara *et al.*, 1987), 항산화작용 (Matsuzaki *et al.*, 1985), 암발생예방작용 (Xu *et al.*, 1992; Hayatsu *et al.*, 1992; Sakagami *et al.*, 1992), 충치예방 (Otake *et al.*, 1991), 혈소판응집저해활성 (Yayabe *et al.*, 1989; Sagesaka-Mitane *et al.*, 1990) 등 다양한 생리활성이 연구되고 있다. 녹차 중의 여러 가지 생리활성을 나타내는 물질 중에서 카테킨성분은 폴리페놀화합물로서 항산화작용과 프리라디칼소거작용이 큰 물질이다. 최근의 녹차추출물에 대한 항산화효과에 대한 연구는 주로 폴리페놀성분에 대하여 많이 이루어졌는데, 함유카테킨들의 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)에 의한 azo 프리라디칼 유도 적혈구유도 용혈에 대한 효과 (Zhang *et al.*, 1997), 다양한 중국산 차로부터 제조된 폴리페놀성분의 항산화효과 (Ho *et al.*, 1992), 녹차유래 항산화성물

질들의 암예방효과 (Katiyar *et al.*, 1997), 녹차추출물의 hydroxyl radical과 superoxide anion scavenging activity (Noda *et al.*, 1997), 녹차카테킨류의 lipid peroxidation에 대한 억제효과 (Guo *et al.*, 1996), hydroxyl radical에 의한 DNA break에 대한 억제효과 (Hiramoto *et al.*, 1996), 1,2-dimethylhydrazine 유도 산화적 DNA손상에 대한 보호효과 (Inagake *et al.*, 1995) 등이 알려지고 있다.

본 연구에서는 수확시기에 따라 다양하게 상품화 되어있는 여러 가지 녹차들의 항산화 효능비교차원에서 우전, 세작, 중작, 입하, 엽차 등 녹차들의 에탄올 추출물, 정제된 녹차카테킨추출물 (GTC)과 주요 카테킨성분인 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)를 비교대상으로 하여 free radical 소거작용과 LDL oxidation 억제효과를 비교하였다. 한편, 포유류동물세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 세포독성에 미치는 영향 및 산화적 DNA 손상에 미치는 영향을 연구하여 산화적 스트레스에 의한 항산화성 유전독성억제효과 (antioxidative antigenotoxic effect)를 입증하려고 시도하였다.

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6914 (E-mail) myheo@kangwon.ac.kr

Received August 16, 2006 / Accepted November 28, 2006

이에, 채취시기가 다른 여러 가지 시판 녹차추출물들을 대상으로 *in vitro*에서의 free radical 소거능, antioxidant effect, 세포독성억제효과 및 산화적 DNA 손상억제효과를 규명하였기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

EGCG[(-)-epigallocatechin gallate]와 Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic Acid)는 Sigma사로부터 공급받았으며 녹차카테킨 (GTC)은 삼아약품(주)으로부터 제공받아 사용하였다. 녹차는 수확시기(2003년)에 따라 채취된 엽차 (6월 30일경 채취), 입하 (6월 10일경 채취), 중작 (5월 30일경 채취), 세작 (5월 20일경 채취) (이상 대한다원제, 전남 보성산), 우전 (5월 10일경 채취, 고려다원제, 경남 하동산) 각각 100 g에 에탄올 1 l를 넣어 실온에서 3일간 침출한 후 여과하고 여액을 증발농축하여 각각의 에탄올추출물을 얻었다. GTC는 녹차 (채취시기 미상, 전남 보성산) 350 g을 약 80°C의 열수로 추출하고 농축한 후 ethyl acetate로 추출하고 Sephadex LH-20 column을 사용하여 물과 아세톤으로 용출시켜 황색결정을 얻어 사용하였다 (Yun, 1996). 이 녹차카테킨 (GTC)은 HPLC분석 결과 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG)와 (-)-epicatechin (EC)을 다량 함유하고 있으며, 이 중에서 EGCG가 약 60% 정도로 가장 많이 함유되어 있었다 (Data not shown).

### 2. 총폴리페놀분석

녹차추출물 중의 총폴리페놀 분석은 Folin-Ciocalteu법에 따라서 실시하였으며 gallic acid의 양으로서 나타내었다 (Zheng *et al.*, 2001).

### 3. 세포 및 배양방법

본 실험의 *in vitro* 연구에서 사용되는 cell line은 ATCC로부터 분양 받아 강원대 약대 액체질소탱크에 있는 NIH/3T3 cell을 사용하여 수시로 계대하여 실험목적에 맞게 배양하였다. 세포배양은 10% FBS (GIBCO), 1% L-glutamine (GIBCO), 1% penicillin-streptomycin (GIBCO) 함유 DMEM (GIBCO) 배지를 사용하였다.

### 4. 프리라디칼소거작용

DPPH(1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazil)는 분자 내 radical을 함유하고 있는데 이것이 다른 free radical들과 결합하여 안정한 complex를 만든다. 최종농도 60 µmol DPPH 2 ml에 DMSO에 용해시킨 녹차추출물과 GTC, EGCG, Trolox 등의

소정농도용액 2 ml를 가하고 5분간 섞고 30분간 방치 후 520 nm에서 측정하였다 (Fugita, 1988).

### 5. LDL산화에 의한 항산화 효과시험

지질과산화에 의해 생성된 산화 LDL (low density lipoprotein)의 산화억제작용을 TBA (Thiobarbituric acid) 법을 이용하여 측정하였다. 실험군은 소정농도의 검액 10 µl에 2 µg/µl LDL (Sigma사로부터 구입) 10 µl, 150 mM sodium chloride 470 µl, 100 µM copper sulfate 10 µl를 넣었다. 대조군은 검액 대신 10 µl의 DMSO를 넣었고 공시험은 검액 대신 증류수 10 µl를 넣었으며 이 모든 용액은 500 µl가 되도록 하였다. 만들어진 반응 용액을 vortex mixer로 즉시 혼합하고 3시간 동안 37°C incubator에서 배양시켰다. 각각의 반응용액을 400 µl 취하여 15ml 튜브에 담고 4% BHT ethanol solution 25 µl를 분주하여 산화를 정지시킨 다음 0.5 M sulfuric acid에 녹인 10% phosphotungstic acid 500 µl와 0.7% thiobarbituric acid 250 µl를 넣고 마개를 닫아 95°C 수욕조에서 50분간 가열한다. 흐르는 물에서 식힌 뒤 n-butanol을 1 ml씩 넣어 5분간 vortex 한 후 4000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 상등액을 취하여 535 nm에서 측정하였다 (Otaka *et al.*, 1979).

### 6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 세포독성에 대한 억제효과

NIH/3T3 cell에서 녹차추출물들의 세포독성을 MTT법에 따라 microplate reader로 측정하였다 (Cole, 1986, Byun *et al.*, 2005). 한편 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 세포독성에 대한 검체들의 효과도 검정하였다. 이때 NIH/3T3 cell은 well당 25,000개로 하고 배지 80 µl 중에서 24시간 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양 후 검체 단독 또는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 µl 및 검체 10 µl를 가하고 20시간 더 배양한 후 MTT 시약을 15 µl를 가하고 4시간 배양 후 배지를 버리고 DMSO를 200 µl 가하여 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 7. DNA 손상억제효과

NIH/3T3 cell을 배양하여 comet assay를 실시하였다 (Sing *et al.*, 1988, Jin *et al.*, 2005). 양성 대조 물질로는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 사용하였다. 이때 검체를 양성대조물질과 동시처리하거나 단독 투여하여 검체의 DNA 손상 억제효과를 평가하였다. 실험은 NIH/3T3 cell 15 × 10<sup>5</sup>개를 6 well culture dish (35 mm)에 심고, 24시간 후에 양성대조물질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 µl와 DMSO 및 DMSO에 녹인 검체를 소정농도로 넣어 주었다. 45분 후에 배지를 모두 버리고 새 배지 (DMEM)를 3 ml 넣은 후 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 한 시간 동안 배양하였다. 각 culture dish에 trypsin EDTA를 1 ml를 넣고 cell을 harvest하여 배지 2 ml를 넣고 test tube에 취하여 1,100 rpm으로 3분간 원심분

리 후 상등액을 버리고 DPBS로 세척한 후 다시 1,100 rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 상등액을 버리고 각각에 0.5% LMPA (low melting point agarose)를 300  $\mu$ l 를 가해준 뒤 현탁하였다. 0.65% NMPA (normal melting agarose) 130  $\mu$ l 를 미리 입힌 slide (fully frosted)에 이 액 50  $\mu$ l 를 떨어뜨린 후 cover slide를 덮었다. 냉장고에서 약 30분간 굳힌 뒤 cover slide를 제거하고 그 위에 다시 0.5% LMPA를 130  $\mu$ l 떨어뜨린 후 cover slide를 덮고 냉장고에서 30분간 굳혔다. cover slide를 제거한 후 lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 10% DMSO, 1% Triton X-100)에 담가 60분 동안 용해시켰다. 그 후 전기영동완충액 (300 mM NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 13)에 20분간 담가 정치하였다. 전기영동장치에 slide를 양극 쪽으로 배열한 뒤 25 V, 300 mA 에서 15분간 전기영동 하였다. 슬라이드를 꺼내 0.4 mM tris (pH 7.5)에 30분간 담가 중화시켰다. Tray에 걸쳐 말린 후 ethidium bromide (2  $\mu$ g/ $\mu$ l) 20  $\mu$ l 를 각각의 slide에 떨어뜨린 후 cover slide를 덮어 515-560 nm 의 excitation filter와 590 nm 의 barrier filter를 이용하여 형광현미경으로 관찰하여 image analyzer인 KOMET 5.5 (Kinetic image, England)로 slide 당 25 cell을 분석하였다. 측정파라미터로서 tail length (TL)와 olive tail moment (OTM)를 사용하여 DNA 손상도를 분석하였다 (Olive *et al.*, 1990).

8. 통계처리

실험은 대부분 3회 실험하였으며 얻어지는 data들은 Student's t-test를 사용하여 유의성 검정을 행하였다.

결과 및 고찰

1. 녹차추출물들의 총폴리페놀함량

녹차추출물들의 총폴리페놀함량을 Fig. 1에 나타내었다. 정제된 녹차카테킨인 GTC의 함량이 40%로 가장 높았으며 우전, 세작, 입하, 중작, 엽차 순으로 감소되었다. 모든 녹차에탄올추출물에서 약 25% 이상의 높은 총폴리페놀함량을 나타내었다. 우전이나 세작처럼 비교적 이른 시기에 채취되는 어린잎들에서 총폴리페놀함량이 높은 경향으로 나타났고 입하도 다소 높게 나타났으며 녹차추출물들은 24.7%-32.3% 정도의 분포를 나타내었다. 가장 이른 시기에 수확되는 고급 차인 우전, 세작, 중작을 비교할 때 함량은 우전 > 세작 > 중작 순이었다. 본 연구에서는 수확시기가 다른 시판녹차의 에탄올추출물, 녹차추출물의 정제조성물인 녹차카테킨 (GTC)와 주성분인 EGCG의 프리라디칼 소거작용과 항산화작용 및 이에 의한 산화적 세포독성 억제효과 및 DNA 손상억제효과 등을 검토하였다. 총폴리페놀함량 중 GTC는 Sephadex 컬럼크로마토그래피로 정제한 조성물이기 때문에 40%의 높은 함량을 나타내었다. 녹차의 건

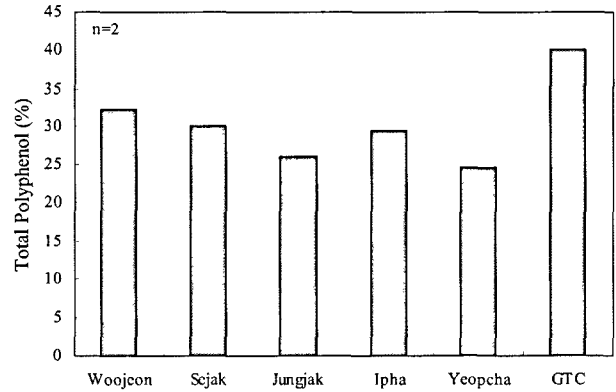


Fig. 1. The contents of total polyphenols in green tea extracts.

조물 중의 총폴리페놀함량은 20-35% (Xiao, 1994)이며 녹차의 물추출물 중의 총폴리페놀함량은 50-70% (Caffin *et al.*, 2004)로 알려져 있다. 본 시험에 사용된 녹차추출물은 100% 에탄올추출물이기 때문에 총폴리페놀함량이 물추출물보다 낮게 나타난 것으로 보인다. 녹차 중의 페놀성물질 함량은 녹차의 품질평가에 중요한 파라미터로서 간주되고 있다 (Yao *et al.*, 2005). 한편, 시판 녹차들에서는 우전이나 세작처럼 비교적 이른 시기에 채취되는 어린잎들에서 총폴리페놀함량이 대체로 높은 경향으로 나타났다 (Fig. 1). Bhatia 등에 의하면 녹차 flavanol함량에 있어서 싹 (bud), 첫째잎(first leaf), 둘째잎(second leaf), 셋째잎 (third leaf), 윗줄기(upper stem), 아랫줄기 (lower stem) 순으로 낮아졌으며 건조물로서 5.3-26.5%의 함량분포를 나타내었다 (Bhatia, 1963). 또한, methyl epigallocatechin gallate같은 methylated catechin의 함량도 어린 잎에서 높다고 보고 된 바 있다 (Chiu *et al.*, 2005).

총폴리페놀성분은 catechin류과 catechin gallate류 및 flavanol glycosides, 및 gallic acid 등 단순 페놀성물질들로 구성된다. 일부 보고에 의하면 녹차 중 페놀성물질의 계절별 함량변화는 EGCG, ECG와 total catechin gallates는 추운계절에 수확된 것에서 낮았고 EGC 와 total catechins로서는 추운계절에 수확된 것이 높았다고 보고된 바 있다 (Caffin *et al.*, 2004). 총폴리페놀성분으로는 EGCG나 total catechin gallates의 패턴과 유사하였다 (Caffin *et al.*, 2004). 따라서 본 연구에 사용된 녹차들의 수확시기가 이른 고급차종들인 우전, 세작, 중작 등에서는 어린잎들이 채취되기 때문에 Fig. 1에 나타난 것처럼 총폴리페놀함량은 우전 > 세작 > 중작 순으로 낮아지다가 기온이 높아지는 입하 이후에 채취되는 입하나 8월까지 채취되는 엽차 중에는 다시 총폴리페놀함량이 높아지는 것 같다.

2. 프리라디칼 소거작용

Fig. 2에서 나타난 것처럼 모든 시험대상물질들은 처리농도 (0.5, 2.0, 5.0  $\mu$ g/ml)에서 농도의존적으로 프리라디칼소거작용

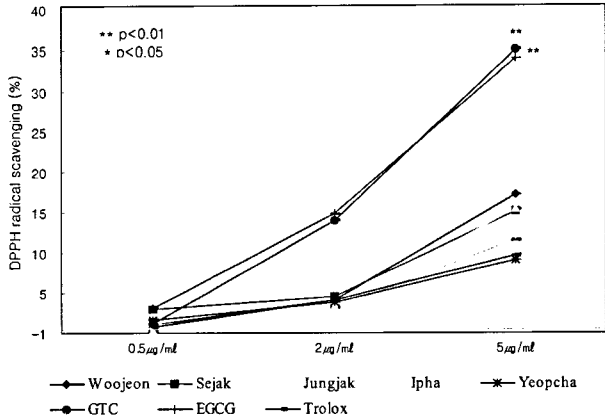


Fig. 2. Free radical scavenging activity of the ethanol extracts of green tea.

을 나타내었다. GTC와 EGCG는 프리라디칼소거능이 가장 높게 나타났으며, 합성항산화제인 Trolox와 BHT(data not shown)의 프리라디칼소거능은 낮은 편이었다. 녹차추출물은 우전, 세작, 중작, 입하, 엽차의 순으로 활성이 나타났다. 이 같은 활성의 순서는 총폴리페놀함량의 순서와 비슷한 경향을 나타내었다. 본 실험은 DPPH free radical의 소거능에 관한 실험으로서 DPPH radical은 hydroxyl radical과 비슷한 거동을 하는 바 EGCG를 다량 함유하고 있는 GTC와 녹차추출물들은 강한 프리라디칼 소거능이 있는 것으로 판단되었다. 또한, 우전, 세작과 중작 같은 이른 시기에 수확되는 어린잎에서 다소 강한 프리라디칼 소거능이 나타나는 것으로 보인다. 가장 이른 시기에 수확되는 고급 차인 우전, 세작, 중작을 비교할 때 활성은 우전 > 세작 > 중작 순이었다.

프리라디칼 소거작용은 총폴리페놀함량과 상관있는 것으로 나타났다. 함량이 높은 어린잎에서 프리라디칼소거능이 컸다. (Fig. 2, 3) GTC와 EGCG의 프리라디칼소거능은 크게 나타났으나 Trolox는 낮은 편이었다. 녹차의 폴리페놀성분은 vitamin E와 같은 항산화성 비타민들 보다 수용성 또는 지용성 라디칼의 효과적인 소거능을 가진다고 알려져 있다 (Wiseman et al., 1997).

### 3. LDL 항산화효과

Fig. 3에서 나타낸 것처럼 LDL 산화에 대한 억제효과는 처리농도 200 µg/ml에서 GTC, EGCG, Trolox 및 BHT는 각각 87.2%, 89.3%, 90.6%, 89.0%로서 높게 나타났으며 모든 녹차추출물들도 90% 이상의 억제효과를 나타내었다. 녹차추출물들의 활성비교에서는 큰 차이는 아니지만 우전, 세작, 중작 등에서 다소 높았고 엽차는 다소 낮은 편이었다. 본 실험은 ethyl linoleate를 사용하여 Fenton reaction에 의해 생성된 hydroxyl radical의 지질과산화작용에 대한 억제효과를 관찰하는 것으로서 EGCG, GTC와 녹차추출물들은 강한 지질과산화

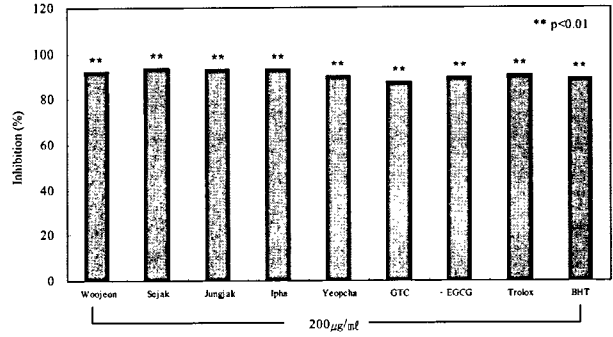


Fig. 3. Inhibition of green tea extracts on copper-mediated low density lipoprotein (LDL) oxidation.

억제작용이 있는 것으로 판단되었다. 한편, 가장 이른 시기에 수확되는 고급 차인 우전, 세작, 중작을 비교할 때 활성은 비슷하였다. 따라서 입하 이전에 수확되는 첫물차들은 채취시기가 이룰수록 총폴리페놀함량도 높고 이에 따른 항산화활성도 크다고 보여지며 기온이 상승하는 시기에 수확되는 두물차 이후 차들은 다시 총폴리페놀함량이 증가하고 이에 따른 항산화활성이 커지는 biphasic한 함량 및 활성의 경시적 변화를 보일 수 있는 것으로 사료된다.

LDL 산화억제효과에서는 큰 차이는 없었지만 녹차의 우전이나 세작 등 어린잎으로 제조된 녹차에서 활성이 컸다. GTC, EGCG, Trolox, BHT도 200 µg/ml 처리농도에서 90% 이상 억제효과가 나타났다. Zhu 등에 의하면 녹차 폴리페놀들이 기존의 항산화제들보다 LDL 산화에 더 강력하게 억제효과를 나타내었다고 보고 한 바 있다 (Zhu et al., 1999). 항산화제들의 주요 항산화작용은 redox potential과 관련이 크다. 녹차의 catechin들의 환원전위는 vitamin E 환원전위보다 낮으며, 이 같은 낮은 환원전위와 중성용액에서 활성산소종의 높은 소거능은 녹차폴리페놀의 강한 항산화작용을 나타낸다 (Jovanovic et al., 1998). 한편 폴리페놀의 킬레이트생성과 항산화효과와 관련성이 크다 (Auroma et al., 1997). 대부분의 폴리페놀 성분들은 각기 킬레이트생성능에는 차이가 있지만 Fe<sup>2+</sup>를 킬레이트하여 간접적인 항산화작용을 갖게 된다. Trolox나 BHT는 프리라디칼 소거능은 크지 않았고 LDL산화에 대한 억제효과는 컸으며 GTC 및 EGCG와 녹차추출물들은 DPPH 라디칼소거작용도 컸으며 LDL 산화에 대한 억제효과도 컸다. 따라서 녹차추출물들은 redox potential과 chelating capacity에 기인한 프리라디칼 소거 및 항산화능을 모두 갖고 있는 것으로 판단된다.

### 4. 세포독성 및 세포독성 보호작용

Fig. 4에 나타낸 것처럼 녹차추출물들의 처리농도 50 µg/ml 및 100 µg/ml에서 거의 세포독성을 나타내지 않았다. Trolox, EGCG 및 GTC 등 대조물질들도 세포독성을 나타내지 않았으

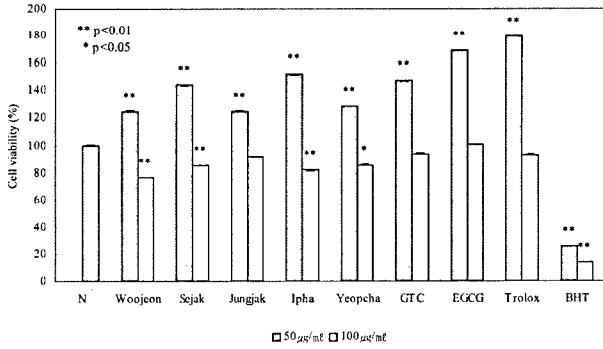


Fig. 4. Cytotoxicity of green tea extracts in NIH/3T3 cells.

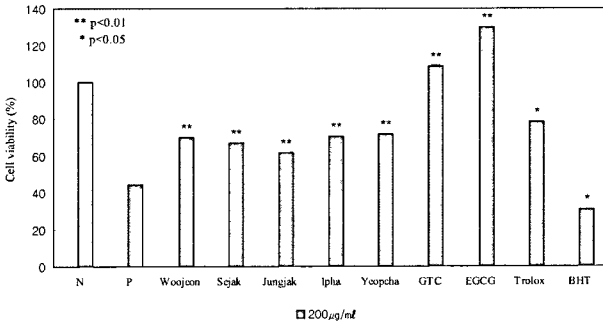


Fig. 5. Cytoprotective effects of green tea extracts against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 × 10<sup>-4</sup>M)-induced cytotoxicity by MTT method.

나 BHT는 다른 시험물질들보다 세포독성이 크게 나타났다. 녹차추출물들은 낮은 처리농도인 50 µg/ml에서 오히려 세포증식작용이 나타났다. 이 같은 경향은 EGCG나 Trolox가 컸다.

한편, Fig. 5에 나타난 것처럼 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 세포독성에 대해서도 GTC, EGCG, Trolox 등은 처리농도 200 µg/ml에서 세포독성 억제작용을 나타내었다. 대조물질들의 세포독성보호작용은 EGCG > GTC > Trolox의 순으로 활성이 강했다. 그러나 BHT는 억제활성이 나타나지 않고 오히려 세포독성이 크게 나타났다. 녹차추출물들의 억제활성은 Trolox와 비슷하였으며 수확시기별 녹차추출물들 사이의 특징적인 차이는 나타나지 않았다. 가장 이른 시기에 수확되는 고급 차인 우전, 세작, 중작을 비교할 때 활성은 우전 > 세작 > 중작 순이었다.

녹차추출물들은 200 µg/ml에서 거의 세포독성이 나타나지 않았으며 GTC, EGCG, Trolox등도 같은 조건에서 세포독성을 나타내지 않았다. 그러나 합성항산화제인 BHT는 세포독성을 크게 나타내었다. 50 µg/ml의 낮은 농도에서 녹차추출물들은 오히려 세포증식작용을 나타내었으며 이는 배지 중에 생성되는 활성산소라디칼 등 유해인자를 제거하여 세포증식이 일어나는 것으로 보인다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 산화적 세포독성에 대해서도 녹차추출물들은 trolox와 비슷한 정도의 세포독성보호작용을 나타내었으나 EGCG와 GTC보다는 낮은 편이었다. 그러나 합성항산화제인 BHT는 같은 조건에서 세포독성을 증가시켰다.

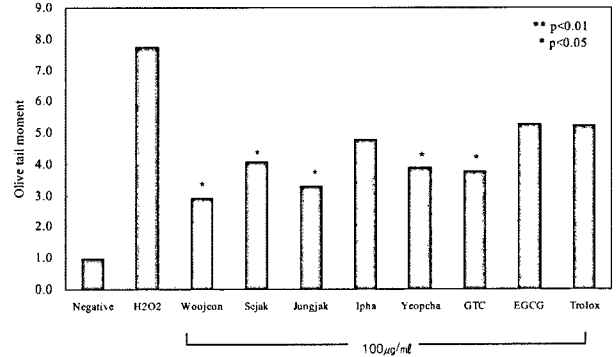
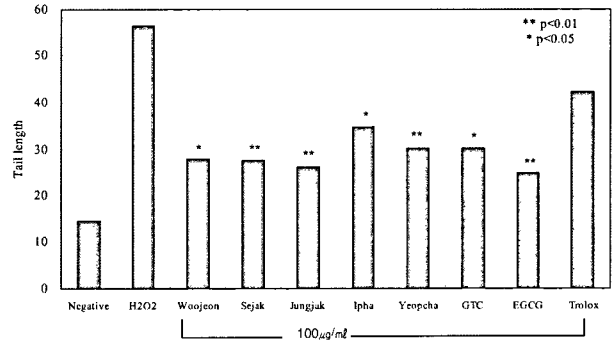


Fig. 6. Inhibition of green tea extracts on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 × 10<sup>-4</sup>M)-induced DNA damage by comet assay.

이런 결과들로 보아 녹차추출물들은 BHT와는 달리 자체세포 독성도 없으며 활성산소라디칼에 의한 세포독성을 경감시키는 작용이 있는 안전한 항산화물질로 판단되었다.

### 5. 산화적 DNA 손상에 대한 억제효과

Fig. 6에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 DNA 손상에 대한 억제효과를 나타내었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독처리군에 비하여 모든 시험대상물질들은 tail length (TL) 및 olive tail moment (OTM)로 나타낸 DNA 손상을 억제시켰다. TL로서 비교하였을 때 GTC, EGCG, Trolox는 각각 46.8%, 56.2%, 25.4%의 억제효과를 나타내었으며 모든 녹차추출물들도 38% 이상의 억제효과를 나타내었다. OTM으로서 비교하였을 때 GTC, EGCG, Trolox는 각각 52.3%, 33.3%, 33.8%의 억제효과를 나타내었으며 모든 녹차추출물들도 39% 이상의 억제효과를 나타내었다.

녹차추출물들의 활성비교에서는 프리라디칼소거능이나 LDL 산화억제경향과는 다소 다르게 나타났다. 큰 차이는 아니지만 입하와 엽차에서 다소 높았으며 우전, 세작, 중작 등에서 다소 낮은 편이었다. Comet assay는 DNA single strand breaks를 검출하는 것이므로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 생성된 ·OH radical에 의한 손상이 검출된다. 가장 이른 시기에 수확되는 고급 차인 우전, 세작, 중작을 비교할 때 활성은 우전 > 세작 > 중작 순이었다.

본 연구에서는 NIH/3T3 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 DNA single strand breakage를 comet assay로 평가하였다. Comet

assay는 여러 가지 작용기전의 유전독성물질에 의한 단일세포에서 DNA 손상을 검출할 수 있는 예민한 방법으로 알려져 있다 (Collins, 2004). GTC, EGCG, Trolox 등 항산화제들과 함께 녹차추출물들은 조추출물임에도 불구하고 거의 유사한 산화적 DNA손상억제효과를 나타내었다. 한편 녹차추출물들의 이 같은 억제효과에 대하여 녹차 잎에 따른 채취시기변동은 잘 나타나지 않았다.

Reactive oxygen species (ROS)는 8OH<sup>2</sup>dG 생성을 통하여 GC-TA transversion을 포함하는 돌연변이를 nuclear DNA에서 일으키며 oxidative damage는 노화된 세포에서 돌연변이의 축적이 일어난다 (Ames, 1983). 또한, DNA수복의 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 진전단계에서 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 (Flora *et al.*, 1992).

## 적 요

수확시기가 다른 시판녹차의 에탄올추출물, 녹차추출물의 정제 조성물인 녹차카테킨 (GTC)와 주성분인 EGCG의 프리라디칼 소거작용과 항산화작용 및 이에 의한 산화적 세포독성 억제효과 및 DNA 손상억제효과 등을 검토하였다. 본 연구에서 총폴리페놀함량, 프리라디칼소거작용, LDL산화 억제작용은 우전, 세작, 중작 등 어린잎으로 제조된 녹차의 추출물에서 함량과 활성이 높았으나 산화적 세포독성에 대한 보호작용 및 산화적 DNA손상에 대한 억제효과는 입하나 엽차도 활성이 작지 않았다. 그러나 가장 이른 시기에 수확되는 고급 차들인 우전, 세작, 중작을 비교할 때 총폴리페놀함량과 프리라디칼소거작용, LDL산화 억제작용생물활성, 산화적 세포독성에 대한 보호작용 및 산화적 DNA손상에 대한 억제효과는 우전 > 세작 > 중작 순이었다. 녹차추출물과 같은 항산화성이 있는 유전독성억제제의 발견은 산화적 스트레스에 의한 제반 질병의 예방에 효과적인 chemopreventive agent가 될 수 있으므로 녹차추출물들은 산소유리기들에 의한 산화적 손상에 억제적으로 작용하는 기전을 활용하여 항후 항산화, 항노화, 암예방제로서의 응용가능성이 높은 추출물 및 관련제로서 항산화 기능성 식품으로서의 응용가능성이 큰 것으로 판단되었다.

## 사 사

본 연구논문은 2005년도 지역협력연구센터사업 (한림대 실

버생물산업기술연구센터)와 과학기술부 나노바이오사업 바이오식품소재기반기술개발사업 (한국식품연구원)의 지원으로 수행되었음을 밝히며 이에 감사드리는 바이다.

## LITERATURE CITED

- Ames BN (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative diseases. *Science*, 221:125-6.
- Auroma OI (1997) Antioxidant and prooxidant actions of plant extracts and plant-derived compounds. *Proc. Nutri. Soc.* 21:85-90.
- Bhatia IS (1963) Chemical aspects of green leaf processing. *Two and A Bud.* 10(2):28-33.
- Byun KS, Lee YW, Jin HJ, Lee MK, Lee HY, Lee KJ, Heo MY, Yu CY, Lee JH (2005) Genotoxicity and cytotoxicity in human cancer and normal cell lines of the extracts of *Rhododendron brachycarpium* D. Don leaves. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13(4):199-205.
- Caffin N, D'Arcy B, Yao L, Rintoul G (2004) Developing an index of quality for Australian tea. *RIRDC* 33(4):1-206.
- Chiu FL, Lin JK (2005) HPLC analysis of naturally occurring methylated catechins, 3'- and 4"-methyl-epigallocatechin gallate, in various fresh tea leaves and commercial teas and their potent inhibitory effects on inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 53(18):7035-7042.
- Cole SPC (1986) Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 17:259.
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26(3):249.
- Flora S, Bronzetti G, Sovels FH (1992) Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. *Mutation Res.* 267: 153.
- Fugita Y, Uera I, Morimoto Y, Nakajima M, Hatano C, Okuda T (1988) Studies on inhibition mechanism of auto-oxidation by tannins and flavonoids. *Yakugaku Zasshi* 108:129.
- Guo Q, Zhao B, Li M, Shen S, Xin W (1996) Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1304:210.
- Hara Y, Matsuzaki T, Suzuki T (1987) Angiotensin converting enzyme inhibiting activity of tea components. *Nippon Nogei-kagaku Kaishi* 61:803.
- Hayatsu H, Inada N, Kakutani T, Arimoto S, Negishi T, Mori K, Okuta T, Sakata I (1992) Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate. *Prev. Med.* 21:370.
- Hiramoto K, Ojima N, Sako K, Kikugawa K (1996) Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. *Biol. Pharm. Bull.* 19:558.
- Ho CT, Chen Q, Shi H, Zhang KQ, Rosen RT (1992) Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Prev. Meq.* 21(4):520.
- Inagake M, Yamane T, Kitao Y, Oya K, Matsumoto H, Kikuoka N, Nakatani H, Takahashi T, Nishimura H,

- Iwashima A** (1995) Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage by green tea extract in rat. *Japan J. Cancer Res.* 86:1106.
- Jin HJ, Lee HY, Kim JD, Heo MY, Lee JH** (2005) Genotoxicity and mutagenicity of the extracts of *Morus alba* L. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13(6):217-225.
- Jovanoic SV, Steenken S, Smith MG, Hara Y** (1998) Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. *Flavonoid Health Disease* 7:137-161.
- Katiyar SK, Mukhtar H** (1997) Tea antioxidants in cancer chemoprevention. *J. Cell Biochem. Suppl.* 27:59.
- Matsuzaki T, Hara Y** (1985) Antioxidative activity of tea leaf catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 59:129.
- Noda Y, Anzai K, Mori A, Kohno M, Shinme M, Packer L** (1997) Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42(1):35.
- Olive PL, Banath RE, Durand RE** (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiat. Res.* 122:86.
- Ohtka H, Ohishi N, Yaki K** (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95:351.
- Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M** (1991) Anticarcinogenic effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Cancer Res.* 51:438.
- Sagesaka-Mitane Y, Miwa M, Okada S** (1990) Platelet aggregation inhibitors in hot water extract of green tea. *Chem. Pharm. Bull.* 38:790.
- Sakagami H, Asano K, Hara Y, Shimamura T** (1992) Stimulation of human monocyte and polymorphonuclear cell iodination and interleukin-1 production by epigallocatechin gallate. *J. Leukoc. Biol.* 51:478.
- Sing NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL** (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184.
- Wiseman S, Balentine DA, Frei B** (1997) Antioxidants on Tea. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37(8):705-718.
- Xiao WX** (1994) Polyphenols and the metabolism in tea trees. In: Wang ZN (Ed) *Tea Biochemistry* 2nd edition. Agric. Academic Press, Beijing, p. 86-118.
- Xu Y, Ho CT, Amin SG, Han C, Chung FL** (1992) Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res.* 52:3875.
- Yao L, Caffin N, D'Arcy B, Jiang Y, Shi J, Singanusong R, Liu X, Datta N, Kakuda Y, Xu Y** (2005) Seasonal variations of phenolic compounds in Australia-grown tea (*Camellia sinensis*). *J. Agric. Food Chem.* 53(16):6477.
- Yayabe F, Kinugasa H, Takeo T** (1989) A simple preparative chromatographic separation of green tea catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 63:845.
- Yun YP, Kang WS, Lee MY** (1996) The antithrombotic effects of green tea catechins. *J. Fd. Hyg. Safty* 11(2):77.
- Zhang A, Zhu QY, Luk YS, Fung KP, Chen ZY** (1997) Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Sci.* 61:384.
- Zheng W, Wang SY** (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* 49:5165-5170.
- Zhu QY, Huang Y, Tsang D, Chen ZY** (1999) Regeneration of  $\alpha$ -tocopherol in human low-density lipoprotein by green tea catechin. *J. Agric. Food Chem.* 47(5):2020-2025.