

프로폴리스 섭취 후 흡연자의 임파구 DNA 손상도 및 항산화 상태의 변화: 이중맹검 교차 인체시험*

강명희¹ · 이혜진¹ · 김미경² · 성미경³ · 권오란² · 박유경⁴

한남대학교 식품영양학과,¹ 이화여자대학교 식품영양학과,²
숙명여자대학교 식품영양학과,³ 경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과⁴

Changes in Lymphocyte DNA Damage and Antioxidant Status after Supplementing Propolis to Korean Smokers: A Placebo-Controlled, Double-Blind Cross-Over Trial*

Kang, Myung-Hee¹ · Lee, Hye-Jin¹ · Kim, Mi Kyung² · Sung, Mi-Kyung³ · Kwon, Oran² · Park, Yoo Kyoung⁴

¹Department of Food and Nutrition, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

²Department of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

³Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

⁴Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT

Smoking has been known to exacerbate the initiation and propagation of oxidative stresses. Efforts have been made to reduce the smoking-induced oxidative stresses using commercial dietary supplements. Propolis is the resinous substance collected by bees from the leaf buds and bark of trees, especially poplar and conifer trees. In this trial, we examined whether a daily supplementation of 800 mg propolis can protect endogenous lymphocytic DNA damage and modulate antioxidative enzyme activities and the level of antioxidant vitamin in smokers using a placebo-controlled, double-blinded cross-over trial. After two weeks of running-in period, 29 smokers (mean age 34.38 ± 1.73) received 6 tablets/day of either propolis or placebo pills for 4 weeks. After 2 weeks of washout period the subjects switched they pills for cross-over study. The degree of DNA damage (assessed by tail DNA, tail length and tail moment) was not significantly changed with propolis intake or placebo intake. Similarly, total antioxidant status (TAS) remained at the same level regardless of the treatment. Erythrocyte catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), plasma vitamin C and tocopherol level did not differ before and after propolis treatment, and did not differ between treatments. Putting all these results together, we would suggest that it is still too early to claim that propolis possess antioxidative activities. (Korean J Nutr 2009; 42(5): 442~452)

KEY WORDS: propolis, DNA damage, smokers, cross-over, total antioxidant status (TAS), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD).

서 론

프로폴리스는 꿀벌이 자신의 생존과 번식을 유지하기 위하여 여러 식물로부터 수집해온 수지에 꿀벌 자신의 침과 효소 등을 혼합하여 만든 천연 물질로써 200종 이상의 화

접수일 : 2009년 6월 26일 / 수정일 : 2009년 7월 10일

채택일 : 2009년 7월 15일

*This work was supported by grants from 2004 KFDA 'Re-evaluation of Functionality for Antioxidant Health Foods Listed in Korean Food Codex' and the grants from Hannam University in 2009.

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ypark@khu.ac.kr

합물로 구성되어 있으며 수지가 50%, 밀납 (왁스) 30%, 유성성분 10%, 화분 (폴렌) 5%, 그리고 나머지 5%는 유기물 및 무기질이다.¹⁾

프로폴리스는 고대로부터 약리작용이 있다고 알려지면서 많은 나라에서 민간요법으로 널리 사용되어 왔다.²⁾ 현재 우리나라 건강기능식품공전에 고시형 건강기능식품으로 등재되어 있는 프로폴리스의 기능성을 알아보려는 연구들이 최근 많이 시도되면서 주로 항박테리아,³⁾ 항바이러스,⁴⁾ 항염증,⁵⁾ 항암⁶⁾ 및 항균 작용⁷⁾ 등이 보고되고 있으며 최근엔 브라질산 프로폴리스와 그의 주요성분인 artepillin C에 항혈관신생 (antiangiogenic) 효과가 있음이 처음으로 보고되었다.⁸⁾

프로폴리스의 이러한 다양한 생리활성은 대부분 항산화 효과와 관련이 있는 것으로 보이며,⁹⁾ 프로폴리스의 주성분인 polyphenols (flavonoids, phenolic acids, and their esters)에 기인하는 것으로 생각되고 있다.^{10,11)}

프로폴리스 및 그 주요성분들의 항산화 효과에 대해서는 그동안 *in vitro* 실험 및 동물실험을 통하여 많은 연구가 보고되었다.^{11,12-16)} *In vitro* 실험으로는 DPPH 라디칼 소거 실험,¹¹⁾ β -carotene bleaching assay,¹¹⁾ 지질과산화 방지 측정,¹²⁾ superoxide anion 제거 실험,¹³⁾ xantine oxidase 활성¹⁴⁾ 그리고 hydrogen peroxide UV-photolysis에 의해 유도된 DNA cleavage 저해 실험¹³⁾ 등이 보고되었다.

프로폴리스의 항산화 기능성에 대한 동물실험으로는 최근 당뇨를 유발한 동물에서 프로폴리스 투여 후 혈당강하, 지질수준 개선효과 및 항산화 효소 활성 개선 등의 효과가 보고되었으며,¹⁵⁾ Abo-Salem 등¹⁶⁾은 streptozotocin으로 당뇨를 유발한 흰쥐에게 프로폴리스를 투여한 결과 혈당과 지질양상이 개선되고 신장의 기능이 회복되는 것을 관찰하였다.

그러나 현재까지 오랜 기간 프로폴리스를 섭취할 때 인체의 항산화 상태에 어떤 영향을 주는지에 대한 선행연구는 거의 없다. 최근 Jasprica 등¹⁷⁾은 처음으로 프로폴리스의 항산화 효과를 보기위해 인체중재시험을 시도하였으며 프로폴리스를 건강한 대상자에게 30일 동안 공급한 후, 남성대상자에게서 지질 과산화물인 MDA 농도의 감소 및 적혈구 SOD 활성도의 증가가 나타났으나 여성대상자에서는 프로폴리스의 항산화 효과가 나타나지 않음을 관찰하여 프로폴리스의 섭취영향이 섭취기간과 성에 따라 다르게 나타남을 보고하였다. 이 연구 외에는 아직까지 프로폴리스의 항산화 효과 평가를 위한 인체 중재시험이 시도된 바 없으며 더구나 최근 관심이 집중되고 있는 DNA 손상 정도를 적용하여 프로폴리스에 대한 인체의 항산화 효과를 측정하는 연구는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 프로폴리스의 인체에 대한 항산화 생리활성을 DNA 손상 개선정도를 중심으로 평가하려는 목적을 가지고 이중 맹검 (double-blind)에 의한 교차 실험 (cross-over design) 디자인으로 인체 중재연구를 시도하였다. 즉 건강한 남성 흡연자를 두 군으로 나누어 프로폴리스를 4주 섭취시킨 후 wash out period를 가진 뒤에 다시 군을 바꾸어 cross-over 방식으로 4주간 프로폴리스를 섭취시키었으며 중재실험이 끝난 후에 comet assay에 의한 임파구 DNA 손상도 및 적혈구 항산화 효소 수준, 혈장 총 항산화력 및 항산화 비타민 상태를 분석하여 프로폴리스의 항산화 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

대상자 선정 및 식이섭취 조사

본 연구는 대전 소재 한남대학교에 재직 중인 교직원 및 한국화학연구원 소속 연구원 중 흡연을 하고 있는 남자 성인 자원자를 대상으로 본인의 자발적인 동의하에 2004년 6월부터 9월까지 수행되었다. 실험 자원자들은 실험의 내용을 설명들은 후 서면 동의서에 자필 서명을 하였다. 실험 자원자 35명에 대한 설문조사를 실시하였고, 설문조사 결과 영양제나 식이보충제를 섭취하는 사람 및 질병이 있는 사람은 제외한 후, 실험을 시작한 사람은 모두 29명이었다. 10주간의 실험이 진행되는 동안 알레르기 반응 등으로 인해 중도 포기한 사람을 제외하고 실험을 마지막까지 수행한 대상자는 25명이었다.

대상자들에게 실험기간 동안 식생활을 급격하게 바꾸지 않도록 부탁하였으며 연구기간이 과일과 채소가 흔한 계절임을 감안하여 실험 시작 2주 전부터 과일과 채소의 섭취량을 제한하는 고갈식이 기간을 두었으며, 하루에 먹어야 할 최대한의 과일과 채소의 양에 대한 정보를 제공하면서 고갈식에 대해 지도하였다. 본 연구계획서는 실험 시작 전에 한남대 식품영양건강연구소 인체시험심의위원회 (한남대 IRB)를 통과하였다.

인체시험을 위한 고시형 항산화 식품 (프로폴리스) 선정

인체시험을 위한 고시형 항산화 식품으로는 프로폴리스를 선정하였다. 현재 항산화 기능성을 평가해야 할 7종의 고시형 식품 중에서 비타민 C, E, β -carotene은 외국에서 수행된 인체연구가 많으므로 항산화 기능성을 다시 인체시험으로 평가할 필요가 없을 것으로 판단하였다. 나머지 4종의 고시형 식품 중에서 밀배아, 포도씨유, 레시틴은 동물 실험 결과, 항산화 기능이 있을 가능성이 적고, 프로폴리스는 항산화 물질인 총 flavonoids 함량이 6~7% 정도로 높고 또 *in vitro* 실험과 동물실험을 통해 항산화 기능이 있는 것으로 알려져 있으므로 본 연구에서 인체시험을 위한 고시형 항산화 식품으로 프로폴리스를 선택하였다.

프로폴리스는 (주)서울프로폴리스로부터 제공 받았으며 프로폴리스 캡슐을 하루에 6정을 먹도록 하였다. 하루 섭취량인 프로폴리스 캡슐 6정에 들어있는 프로폴리스 총량은 800 mg/day이었다. 위약은 외견상 프로폴리스와 똑같은 색과 크기의 캡슐에 말토덱스트린을 넣어 공급하였다.

실험 디자인

본 인체 연구는 위약군을 둔 무작위적인 double-blind,

cross-over design으로 처음 2주간 flavonoid류 식품에 대한 고갈식이 기간을 두었으며 두 번의 4주 중재 기간 사이에 2주 동안의 washout 기간을 두었다. 고갈식이 기간이 끝나고 실험 시작하는 날 1차 채혈을 하였으며, 실험 대상자를 위약군과 프로폴리스군의 두 군으로 무작위로 나누는 후 4주 동안 프로폴리스 정제 및 위약 정제를 섭취하도록 하였다. 4주가 끝나는 날 2차 채혈을 하였으며, 2주간 washout 기간 후에 cross-over 방식으로 군을 바꾸어 프로폴리스 섭취하였던 군은 위약을, 위약을 섭취하였던 군은 프로폴리스를 역시 4주 동안 섭취하도록 하였다. 이 교차 실험 시작할 때 3차 채혈을 하였으며, 섭취 기간 중에 과일과 채소 섭취는 일정량으로 제한하였고 식이습관도 평상시처럼 유지토록 지도하였다. 교차실험 4주가 끝난 후에 4차 채혈을 하였다. 채혈하는 날 식이섭취조사와 신체계측조사도 병행하여 실시되었다. 본 영양중재 실험은 실험대상자 본인이 위약을 투여 받는지 혹은 프로폴리스 캡슐을 투여 받는지 모르게 진행되었으며, 연구자도 영양중재 실험이 진행되는 동안, 혹은 각 항목의 분석실험이 진행되는 동안 위약군과 프로폴리스군을 알 수 없도록 double-blind 방식으로 진행되었다. 본 연구의 실험 디자인은 Fig. 1과 같다.

대상자 일반현황 및 식이섭취 조사

조사자의 일반사항으로 조사대상자의 나이, 흡연량, 흡연력, 알코올 섭취 여부, 알코올의 종류와 섭취량에 대한 내용을 설문지를 통해 조사하였다. 매 채혈일에 24시간 회상법을 이용한 식이섭취 조사와 신체계측조사를 수행하였다. 식이섭취 조사는 24시간 회상법을 1대 1 면담법으로 실시하였다. 대상자들의 분량을 회상하는데 도움을 주기 위해 food model 및 사진으로 보는 음식의 눈 대증량을 제시하여 섭취한 모든 음식의 종류와 섭취량이 가능한 정확하게 조사하도록 하였다. 영양소 섭취량은 한국영양학회에서 제작한 CAN program 2.0 version을 이용하여 구하였다. 채혈 첫 주에 식이섭취 빈도조사를 통해 대상자의 지난 한달 동안 섭취한 flavonoids 및 carotenoids 함량을 조사하였다. 식품의 flavonoids 및 carotenoids 함량 database는 본 조사를 위해 대상자에게 반정량적 식품섭취빈도 조사를 분배하여 간단한 주의사항을 안내한 후, 자가 작성 하

도록 하였다. 조사 대상자의 1일 평균 flavonoids 및 carotenoids 섭취량은 조사대상자별로 각 식품의 1회 섭취량과 섭취빈도 값을 곱하여 개인의 1일 평균 식품 섭취량을 계산한 다음, 식품별 flavonoids 함량 database를 이용하여 계산하였다.

신장계와 줄자를 이용하여 신장 및 WHR (wasit-hip ratio)을 측정하였으며, 체중, BMI (body mass index), 체지방량 등의 신체계측조사는 생체임피던스 측정기 (Biospace Co, Ltd. Inbody 2.0)를 이용하여 측정하였다.

채 혈

총 29명의 흡연자로부터 본인의 동의를 얻어 프로폴리스섭취 전후와 위약섭취전후에 4번에 걸쳐서 채혈하였다. 대상자들은 채혈하기 전 8시간 이상 음식물을 먹지 않도록 지도하였으며 대상자들의 혈액은 아침식사 전에 12 mL 정도 채혈 후 2개의 서로 다른 시험관에 분주하였다. DNA 손상을 보기 위한 Comet assay를 위해서는 100 μL heparinated sterile tube에 전혈 (whole blood)을 담고, 나머지 혈액은 lithium-heparinic polystyrene에 담아 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 얻어진 platelet-rich-plasma는 ascorbic acid 측정을 위해 분리하였다. 분리하고 남은 platelet-rich-plasma는 다시 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 항산화 비타민, TAS 및 TRAP 분석을 위해 -80℃ 냉동고에 보관하였다. 적혈구는 isoosmotic phosphate buffered saline으로 처리한 후 질소를 채운 뒤 항산화 효소 분석을 위해 -80℃ 냉동고에 보관하였다.

혈장 항산화 비타민 측정

대상자들의 혈장 ascorbic acid는 선행연구에서와 같이 2, 4-dinitrophenylhydrazine method에 의해 UV/VIS spectrometer로 분석하였다.¹⁸⁾ 혈장을 metaphosphoric acid로 처리하여 단백질을 침전시키고 ascorbic acid를 안정화시켰다. Ascorbic acid는 copper-sulfate로 처리하면 dehydroascorbic acid로 산화된 뒤 diketogluconic acid로 가수분해된다. 이를 2, 4-dinitrophenylhydrazine으로 처리하면 안정한 적갈색물의 osazone이 형성되는데 이것을 520 nm에서 측정하여 혈장 ascorbic acid의 농도를 분석하였다.

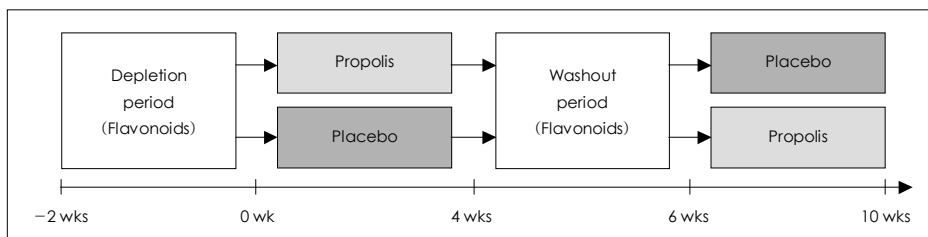


Fig. 1. Flow chart phase of study.

Table 1. HPLC apparatus and conditions

Column	Merck, LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m)
Pump	Shimadzu LC-10AT
Flow rate	0.8 mL/min
Detector	Shimadzu SPD-10A
Wavelength	tocopherols-295 nm
Integrator	Shimadzu C-R6A Chromatopac
Mobile phase	metanol : Dichloromethane = 85 : 15 (v/v)

혈장 α -tocopherol, γ -tocopherol은 ethanol로 단백질을 제거하고 n-hexane으로 지방을 추출한 후 rotary evaporator로 hexane을 증발시키고, mobile phase (metanol : dichloromethane = 85 : 15)에 녹여 HPLC로 측정하였다.³⁶⁾ HPLC 분석조건은 Table 1과 같다.

혈장 총 유리기포집 항산화능 (TRAP), 총항산화력 (TAS) 및 MDA 측정

최근에 개발된 혈장 총 유리기포집 항산화능 (TRAP, total radical-trapping antioxidant potential) 측정법은 혈장 내 α -tocopherol, ascorbate, urate, protein sulfhydryl groups 등의 항산화제들의 복합된 활성을 측정하여 혈장의 총 유리기 포집 항산화능을 나타내므로 시간과 노력을 절약할 수 있는 매우 유용한 방법이다. 혈장 중 TRAP은 Rice-Evans와 Miller의 inhibition assay에 따라 분석하였다.¹⁹⁾ 이 방법은 ABTS [2, 2'-azino bis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfo nate), 150 μ M]와 metmyoglobin (2.5 μ M)을 H₂O₂ (75 μ M)로 활성화시킴으로써 생성된 ferryl myoglobin radical species와의 상호 작용에 의해 형성된 ABTS radical cation의 absorbance를 측정하는데 기초를 두고 있으며 그 absorbance의 억제 정도는 sample (0.84% plasma)에 들어 있는 antioxidant capacity에 비례하게 된다. Sample을 6분 동안 30°C에서 배양한 후 UV/VIS spectrometer로 740 nm의 파장에서 absorbance를 측정하였다. 혈장의 TRAP 농도는 trolox의 calibration curve를 이용하여 계산하였으며 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, mM)으로 표현하였다.

총항산화력을 나타내는 혈장 내 TAS 수준은 앞의 TRAP 분석법과 원리는 매우 유사하나 흡광도에 차이가 있는 방법으로 시판되는 Kit 시약 (Tandox (사) Kit 시약)을 사용하는 매우 간편한 측정법이다. Peroxidase (metmyoglobin) 및 H₂O₂를 혼합하고 ABTS를 배양시켜 ABTS radical을 생성하도록 유도한 후, 유도된 ABTS radical의 흡광도를 600 nm에서 측정한다. 혈장 내에 항산화력이 있는 경우 청록색을 띠는 ABTS radical의 생성을 유도하는 반응

을 억제하게 되므로 시료의 항산화능은 그 발색을 저해하는 정도와 비례하게 된다. Standard는 Trolox를 이용하였다.

지질과산화물은 지용성부분의 불포화 탄소결합과 활성산소가 쉽게 반응해서 일어나는 자동산화과정의 부산물이다. 특히 MDA는 자동산화과정의 최종단계 생성물로 알려져 있다. MDA는 CALBIOCHEM (사)의 지질과산화 kit를 사용하여 분석하였다. 혈장 200 μ L에 철과 n-methyl-2-phenylindole을 1 : 3으로 혼합한 용액 650 μ L을 취하여 반응 시킨다. 위 생성물에 황산을 가한 후 45°C에 60분간 반응시켜서 생성된 물질을 586 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 농도는 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane (TMPO)을 45°C에서 반응시켜 MDA를 생성하는 것을 이용하여 얻은 검량선에 대입하여 구하였다.

적혈구 항산화 효소활성도 측정

적혈구내 superoxide dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GSH-Px), catalase 등의 항산화효소의 분석은 UV/VIS spectrometer에 의해 측정하였다.²⁰⁾ SOD는 적혈구 현탁액을 증류수로 용혈시킨 후 ethanol과 chloroform을 가하고 이를 3,000 U/min, 2분간 원심 분리하였다. 그 상층액을 여러 농도로 나누어 37°C에서 10분간 배양한 후 20 μ L의 pyrogallol을 첨가한 후 320 nm에서 180초간 측정하였다. 적혈구내 SOD의 활성은 pyrogallol의 자동산화를 50% 억제하는 antioxidant capacity로 정의하였다. GSH-Px는 과산화물 (t-butylhydroperoxide)에 의해 glutathione이 산화되는 반응을 촉매한다. 이 때 산화된 glutathione은 glutathione reductase와 NADPH의 존재하에 다시 glutathione으로 환원되고 NADPH는 NADP로 산화된다. 이를 이용해 용혈된 적혈구에 glutathione, glutathione reductase, NADPH를 첨가하고 37°C, 10분간 배양한 뒤 t-butylhydroperoxide를 넣어 반응시켰으며 이 때 감소된 NADPH농도를 340 nm에서 90초간 측정함으로써 GSH-Px의 항산화 정도를 측정하였다.²⁰⁾ Catalase의 활성은 용혈된 적혈구에 50 mM phosphate buffer (pH 7)와 hydrogen peroxide를 첨가한 후 hydrogen peroxide의 감소량을 240 nm에서 30초간 측정하였다.²⁰⁾

Comet assay를 이용한 임파구 DNA damage 측정

Alkaline comet assay는 선행연구에서와 같이 Singh의 방법을 수정, 보완하여 실시하였다.²¹⁾ 임파구는 신선한 전혈 70 μ L을 1 mL의 PBS에 섞은 후 Histopaque 1077를 이용하여 분리해 내었다. 임파구 DNA에 산화적 스트레스를 가하기 위해 200 μ M H₂O₂를 사용하였다. Alkali lysis buffer를 사용하여 DNA의 double strand를 풀어주었으며

lysis가 끝난 slide를 전기영동 buffer로 40분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300 ± 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 20 µL/mL 농도의 ethidium bromide로 핵을 형광 염색하고 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경 (Leica, Germany)으로 관찰하면서 CCD camera (Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image를 Komet 4.0 comet image analyzing system (Kinetic Imaging, UK)이 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 대상자 당 2개의 slide를 만들어 각각 50개씩 총 100개의 임파구에서 DNA 손상정도를 측정하였다.

통계처리

모든 자료는 MS의 excel database system을 이용하여 입력한 후 SPSS-PC+ 통계 package (version 7.0)를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치 ± 평균 오차 (SE)를 구하였으며 baseline data와 프로폴리스군 및 위약군의 평균치 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)로 분석한 후, 사후 검증은 Bonferroni 법으로 수행하였다.

결 과

조사대상자의 일반사항 및 항산화영양소 섭취량

연구 대상자의 일반 인구 특성, 건강상태 및 생활습관, 신체계측 조사 (신장, 체중, BMI, WHR 및 체지방량 등), 항산화영양소 및 flavonoids 섭취량을 조사한 결과는 Table 2-6과 같다. 연구 수행 전과 연구 수행기간 동안 두군 간에 모든 변수에 유의적인 차이는 없었다. 대상자 29명은 모두 흡연을 하고 있는 성인남자로서 평균 나이 34세, 하루 평균 19 개피의 담배를 15년간 피워왔으며 하루에 한

갑 (20개피) 피우는 것으로 환산하여 계산한 흡연력 (pack-years)은 14.9년이였다 (Table 3). 대상자의 97%인 28명이 음주를 한다고 응답하였으며 평균 음주량은 alcohol 양으로 환산했을 때 하루에 25.4 gm이었다. 하루에 30분 이상 운동한다고 답한 대상자는 14명이였다. 대상자들의 24시간 회상법으로 본 영양소 섭취 상태는 실험기간동안 차이가 없었다 (Table 4).

프로폴리스 섭취 후 항산화 관련 Biomarker의 변화

혈장 내 항산화 비타민 수준

산화 스트레스에 노출되기 쉬운 흡연자에게 있어 프로폴리스의 섭취가 혈장 내 항산화 비타민 수준에 변화를 가져 오는지 살펴보았다. 4주간의 프로폴리스 및 위약 섭취 후에 혈장 비타민 C, α-tocopherol 및 γ-tocopherol 수준은 군 간의 유의적인 차이가 보이지 않았다 (Table 5). 즉 4주간의 프로폴리스 섭취는 흡연자의 혈장 비타민 C와 E 수준을 높이는 효과가 없는 것으로 생각된다.

혈장 내 항산화력 및 지질과산화 정도

프로폴리스를 섭취하였을 때 혈장 내 항산화력 증가와

Table 3. Smoking, drinking and exercise habits of the subjects

Variables	Total (n = 29)
Smoking habits	
Cigarettes/day	19.3 ± 1.2 ¹⁾
Smoking years	15.0 ± 1.4
Pack-years ²⁾	14.9 ± 1.9
Drinking habits	
Number of drinker (%)	28 (97%)
Alcohol ³⁾ /day	25.4 ± 4.4
Exercise habits	
Regular exercisers ⁴⁾ (%)	14 (48%)
Non-exercisers (%)	15 (52%)

1) All values are means ± S.E.
 2) Pack-years = (Cigarettes smoked/day × years smoked) /20
 3) Total amount of alcohol ingested (g) per day
 4) ≥ 30 minutes per day

Table 2. Anthropometric indices of the subjects

Variable	Baseline ¹⁾ (n = 29)	Propolis (n = 26)	Placebo (n = 28)	p-value propolis vs placebo
Age (years)	34.38 ± 1.73 ²⁾	34.27 ± 1.83	34.61 ± 1.77	NS ³⁾
BMI (kg/m ³)	24.78 ± 0.78	24.89 ± 0.87	25.4 ± 0.8	NS
Waist-hip ratio (WHR)	0.85 ± 0.02	0.84 ± 0.02	0.86 ± 0.01	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	122.4 ± 3.1	123.9 ± 2.7	121.4 ± 2.7	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	81.7 ± 1.9	83.9 ± 1.9	80.4 ± 1.7	NS

1) The baseline values are the mean of the 2 baseline measurements obtained at the beginning of the study and after the 2-week washout period
 2) All values are the mean ± SE
 3) NS: not significant between baseline, propolis & placebo group by one-way ANOVA and LSD post-hoc test at p > 0.05

지질과산화 방지효과가 있는지를 알아보기 위하여 혈장 내 총 항산화력을 보는 지표인 TRAP 수준, TAS 및 지질과산화 최종산물인 MDA 수준을 분석하여 본 결과는 Table 7과 같다. 앞에서의 지표와 마찬가지로 위약군과 프로폴리스 섭취군의 혈장 TRAP과 TAS 수준은 차이를 보이지 않았다. 또 위약군과 프로폴리스를 섭취한 대상자들의 혈장 MDA 수준은 baseline에 비해 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의적인 변화는 아니었다 (Table 6).

적혈구 항산화 효소활성

프로폴리스 보충 후의 항산화 효소 활성정도의 변화를 적혈구 superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (EC 1.11.1.6), glutathione peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9)로 나누어 살펴 본 결과는 Table 7과 같다. Catalase와 SOD 활성도는 4주간의 영양증제 실험 후, 프로폴리스 섭취군과 위약군 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았으나, glutathione peroxidase 활성도는 baseline 값에

Table 4. Nutrient intakes estimated from the 24-h dietary recalls in male smokers

Nutrients	Baseline (n = 29)	Propolis (n = 26)	Placebo (n = 25)
Energy (kcal)	1997.9 ± 142.7 ¹⁾	2260.8 ± 132.8	1919.8 ± 135.1
Protein (g)	95.7 ± 7.8	105.4 ± 7.5	83.9 ± 5.2
Fat (g)	55.9 ± 5.8	64.3 ± 5.7	50.3 ± 4.8
Carbohydrate (g)	285.4 ± 20.9	327.7 ± 18.5	276.3 ± 13.1
Calcium (mg)	651.4 ± 53.2	725.5 ± 65.7	603.0 ± 40.2
β-carotene (μg)	3639.7 ± 319.1	4177.6 ± 504.4	3309.6 ± 470.3
Vitamin C (mg)	101.3 ± 9.9	107.8 ± 12.0	93.3 ± 11.3
Vitamin E (mg)	12.5 ± 1.4	15.0 ± 1.47	10.59 ± 1.13
Vitamin A (μg RE)	767.5 ± 67.3	933.2 ± 122.2	747.3 ± 93.0
Retinol (mg)	112.5 ± 27.4	148.8 ± 28.0	187.1 ± 41.6

1) Values are Mean ± S.E.

Table 5. Antioxidant vitamin levels in the plasma of male smokers before (baseline) and after 4 weeks of supplementation with propolis or placebo capsule¹⁾

Variable	Baseline (n = 29)	Propolis (n = 26)	Placebo (n = 28)
Vitamin C (mg/dL)	1.34 ± 0.07 ^{NS2)}	1.11 ± 0.07	1.12 ± 0.06
α-tocopherol (ug/dL)	2061 ± 90 ^{NS2)}	1904 ± 94	2119 ± 139
γ-tocopherol (ug/dL)	154 ± 9 ^{NS2)}	169 ± 21	172 ± 19

1) Values are Mean ± S.E.

2) NS: not significant between baseline, propolis & placebo group by one-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test at p > 0.05

Table 6. TRAP, TAS and MDA levels in the plasma of male smokers before (baseline) and after 4 weeks of supplementation with propolis or placebo capsule

Variable	Baseline (n = 29)	Propolis (n = 26)	Placebo (n = 28)
TRAP (mmol/L)	1.211 ± 0.008 ^{1) NS2)}	1.214 ± 0.013	1.206 ± 0.012
TAS (mmol/L)	0.800 ± 0.033 ^{NS2)}	0.877 ± 0.060	0.815 ± 0.053
MDA (K/gHb)	0.044 ± 0.002 ^{NS2)}	0.039 ± 0.002	0.041 ± 0.002

1) Values are Mean ± S.E.

2) NS: not significant between baseline, propolis & placebo group by one-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test at p > 0.05

Table 7. Antioxidant enzyme activities in the erythrocyte of male smokers before (baseline) and after 4 weeks of supplementation with propolis or placebo capsule

Variable	Baseline (n = 29)	Propolis (n = 26)	Placebo (n = 28)
Catalase (K/gHb)	47.87 ± 0.72 ^{1) NS2)}	48.38 ± 0.8	49.13 ± 1.0
GSH-Px (U/gHb)	32.17 ± 1.59 ^{a3)}	24.17 ± 1.31 ^b	27.63 ± 1.67 ^{ab}
SOD (U/gHb)	1894 ± 39 ^{NS2)}	1903 ± 49	1940 ± 37

1) Values are Mean ± S.E. NS: not significant (p > 0.05)

2) NS: not significant between baseline, propolis & placebo group by one-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test at p > 0.05

3) Values within each row not sharing a common superscript letter are statistically different at p < 0.05 (one-way ANOVA and the Bonferroni post-hoc test)

Table 8. DNA damages in the lymphocyte of male smokers before (baseline) and after 4 weeks of supplementation with propolis or placebo capsule

Variable	Baseline (n = 29)	Propolis (n = 26)	Placebo (n = 28)
Endogenous comet			
DNA in tail (%)	24.88 ± 0.43 ^{1)NS2)}	24.19 ± 0.60	23.87 ± 0.70
Tail length (μm)	56.17 ± 0.72 ^{NS2)}	55.18 ± 1.31	53.61 ± 1.18
Tail moment	15.11 ± 0.36 ^{NS2)}	14.19 ± 0.62	13.73 ± 0.68
H ₂ O ₂ comet			
DNA in tail (%)	34.06 ± 0.50 ^{NS2)}	33.35 ± 1.00	33.15 ± 0.82
Tail length (μm)	60.33 ± 0.76 ^{NS2)}	62.46 ± 1.27	60.58 ± 1.84
Tail moment	22.18 ± 0.51 ^{NS2)}	22.32 ± 1.00	21.10 ± 1.05

1) Values are Mean ± S.E.

2) NS: not significant between baseline, propolis & placebo group by one-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test at p > 0.05

비해 프로폴리스 섭취군과 위약군에서 모두 감소하였으며 프로폴리스군의 경우 baseline에 비해 유의적으로 감소하였다 (p < 0.05). 그러나 프로폴리스군과 위약군 간에 유의적인 차이는 볼 수 없었다.

산화적 DNA 손상

체내 임파구 DNA 손상은 알칼리 환경의 전기영동을 이용한 Comet assay를 한 후 DNA 손상정도를 세포의 파괴된 파편의 길이로 측정하였다. 대상자의 임파구 자체의 산화적 손상으로 형성처럼 끌려 나간 DNA 파편의 %를 DNA in tail %, DNA 파편이 끌려 나간 tail의 길이를 tail length, 그리고 이 두 값을 함께 반영한 값을 tail moment로 표시하였다 (endogenous Comet). 또한 대상자들의 DNA 손상이 산화적 요인에 의한 것인지 명확하게 보기 위해 분리해 낸 임파구에 H₂O₂를 처리하여 Comet assay를 실시하였고, 위에서 나타낸 DNA in tail %, tail length 및 tail moment를 관찰하였다 (H₂O₂ Comet). Endogenous Comet에서 프로폴리스군과 위약군의 tail length와 tail moment 값이 baseline에 비해 감소하는 경향은 보였으나 유의적인 차이는 아니었다. H₂O₂ Comet에서도 baseline에 비해 프로폴리스 섭취군과 위약군의 DNA 손상 정도를 나타내는 세 가지 지표에 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 8).

고 찰

그 동안 프로폴리스의 항산화 활성에 관한 연구는 주로 *in vitro* 시험과 동물실험을 중심으로 활발하게 이루어져 왔다. Matshshige 등²²⁾은 브라질에서 수집한 서로 다른 다섯 가지의 종류의 프로폴리스에 DPPH 소거활성 및 superoxide anion 라디칼 소거활성이 있음을 보고하였고 몇몇 연구자들은 이들의 항산화 능력이 흔히 사용하는 비타민

C, 비타민 E 혹은 caffeic acid보다 더 강력함을 관찰하였다.²³⁾ Hayashi 등²⁴⁾은 브라질산 프로폴리스로부터 12개의 페놀화합물을 추출하여 linoleic acid 과산화에 대한 항산화 능력을 테스트해 본 결과 BHT (butylated hydroxytoluene)보다도 강력한 항산화력이 있음을 발견하였다. 프로폴리스의 항산화력은 생산지가 어디인가에 따라 차이를 보이며, 세계 각국의 프로폴리스의 항산화 능력을 DPPH 라디칼 소거능으로 비교해 본 결과 브라질과 중국산 프로폴리스의 수용성추출물, 그리고 페루와 네델란드산 프로폴리스의 me-ethanol 추출물에서 항산화 능력이 높게 나타났다는 연구보고도 있다.²⁵⁾

프로폴리스에는 항산화비타민인 α-tocopherol이 포함되어 있어 이것이 프로폴리스의 항산화 능력과 관련이 있다는 주장²⁶⁾이 있기는 하나 프로폴리스의 항산화 능력은 주로 그 안에 있는 polyphenolic compounds와 flavonoids에 기인하는 것으로 보이며, 이들은 세포 내 자유 라디칼을 제거함으로써 암 발생을 저해하고 간독성을 보호하는 작용을 하는 것으로 생각된다.²⁾ 프로폴리스는 또 유전자 expression 및 cell signaling cascades에도 영향을 미친다.²⁷⁾ 그러나 flavonoids와 phenolic acid들은 *in vitro*의 어떤 상황에서는 pro-oxidant로 작용할 수도 있으며 특정 농도에서 자유 라디칼을 제거하는 대신에 인체에 독성효과를 가져오기도 한다.²⁸⁾ 그러나 이러한 연구들은 거의 모두 *in vitro* 연구들이며, 인체를 대상으로 하는 항산화 활성 연구는 매우 제한되어 있다.

식물성 polyphenol이 세포막산화를 예방한다는 *in vitro* 연구로부터 *in vivo* 결론을 내리는 것이 적절한가에 대해서는 아직도 논란의 여지가 있으며,¹⁷⁾ *in vitro* 실험들이 바로 *in vivo* 상황으로 외삽되는 것에 우리가 표명되기도 한다.²⁹⁾

본 연구는 인체에서의 프로폴리스 항산화 활성을 측정하기 위해 흡연자를 대상으로 일정기간 프로폴리스 또는 pla-

cebo를 섭취하게 한 뒤에 comet assay에 의한 DNA 손상 정도 및 항산화 영양 상태를 double-blind cross-over 인체적용시험 디자인으로 수행한 *in vivo* 연구이다. 프로폴리스를 4주 동안 매일 섭취할 때 적혈구 항산화 효소인 catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) 활성도, 그리고 혈장의 vitamin C와 tocopherol 수준을 측정하여 항산화 지표들의 변화를 보았으며, 궁극적으로 임파구의 DNA 손상정도가 회복되는 지를 comet assay로 평가하였다.

본 연구에서 4주간 대상자에게 프로폴리스를 교차실험 방식으로 섭취시킨 결과, 프로폴리스 섭취군의 지질 과산화 정도 (MDA 수준)가 위약군 및 실험시작 시점에 비해 감소되는 경향을 보였으며 총 항산화능인 혈장 TRAP 및 TAS 수준도 프로폴리스 섭취군에서 위약군이나 실험시작 시점에 비해 높아지는 경향을 보였으나 모두 통계적으로 유의적인 차이는 아니었다. 이러한 결과는 같은 프로폴리스 시료를 사용한 동물실험 결과, 프로폴리스의 투여가 고지방으로 DNA 손상을 유도한 흰쥐의 항산화력을 개선시키지 않았다는 결과와 같은 것이다.³⁰⁾

SOD (superoxide dismutase)와 GSH-Px (glutathione peroxidase) 활성은 산화적 손상에 대항하는 생물분자들의 일차적인 방어선이며 이 효소들은 유기체가 스트레스 환경에 처했을 때 활성화 된다.³¹⁾ 항산화 물질을 투여한 후에 이 효소들의 활성도가 증가하였다고 보고한 다른 연구들³²⁾과는 다르게 본 연구에서는 프로폴리스 섭취 후에 적혈구의 SOD 활성도는 증가하지 않은 반면 GSH-Px 활성도는 baseline에 비해 오히려 유의적으로 낮아졌다 ($p < 0.05$) (Table 6). Russo 등¹⁴⁾은 *in vitro* 실험에서 프로폴리스에서 분리해 낸 caffeic acid가 SOD 활성도를 높인다고 보고하였고, Kismet 등³³⁾은 동물실험을 수행한 결과 프로폴리스를 섭취한 쥐의 간 GSH-Px 수준은 프로폴리스군에서 높았으나 혈장 GSH-Px 수준은 대조군에 비해 차이가 없었다고 보고하였다. *In vitro* 실험이나 동물실험 결과를 그대로 인체 *in vivo*에 적용하는 것은 무리가 있으므로 인체 중재시험이 중요하나 현재까지 항산화 효소 활성을 endpoint로 평가한 프로폴리스의 항산화 인체 중재연구는 매우 제한적이다. 프로폴리스를 30일간 건강한 남녀 대상자에게 섭취시킨 Jasprica의 연구¹⁷⁾에서도 SOD 활성도는 남성에서만 유의적으로 증가하였을 뿐 여성에서는 변화가 없었으며 GSH-Px 활성도는 남녀 모두에게서 아무런 변화가 나타나지 않았다. 이 연구와는 달리 본 연구에서 프로폴리스 섭취 후에 적혈구 GSH-Px 활성도가 유의적으로 낮아진 이유는 설명하기 어려웠으며 앞으로 프로폴리스의 투여와 항산화

효소 활성도와의 관계에 대한 *in vivo* 연구가 활발히 이루어져야 할 것이다.

DNA 손상은 노화와 함께 증가하며 총 항산화력이 감소함에 따라 증가하므로³⁴⁾ *in vitro* 연구로부터 산화적 손상에 대해 DNA를 보호하기 위해 항산화 비타민의 섭취가 제안되었으나³⁵⁾ 인체의 경우에는 그 결과들이 서로 상반되어 나타나고 있다.^{36,37)} 본 연구에서 Comet assay로 분석한 대상자의 임파구 DNA 손상정도는 항산화 biomarker에서처럼 프로폴리스를 섭취한 군이나 위약을 섭취한 군 간에 차이를 보이지 않았으며 baseline에 비해 개선되는 효과도 보이지 않았다 ($p > 0.05$). 이러한 결과는 본 연구에서 사용된 정도의 프로폴리스 투여로는 DNA 손상에 대해 보호하는 효과를 보이지 않을 수 있다는 것을 제시한다. 프로폴리스 섭취 시 DNA 손상 개선효과에 대한 *in vivo* 인체 중재연구는 현재까지 보고된 바 없으므로 앞으로 이에 대한 좀 더 깊은 연구가 필요할 것이다.

본 연구에서 프로폴리스 투여량을 계산할 때 다른 동물실험 연구에서 제시된 값으로부터 인체에 적용 가능한 값을 계산하여 하루에 800 mg을 투여하였으나 이 정도 양은 흡연자의 항산화 영양상태 및 지질과산화를 개선시키기에는 충분하지 않았을 가능성이 있다. Jasprica 등¹⁷⁾은 프로폴리스를 하루 650 mg씩 3회 (총 1,850 mg) 건강한 남녀 성인에게 투여하였을 때 15일 투여 후에 남자 대상자에서만 혈장 MDA 수준이 감소하였다가 30일 경과 후엔 연구를 시작한 처음수준으로 다시 증가하였고, 더구나 여성대상자에게서는 아무런 변화를 볼 수 없었음을 관찰하면서 프로폴리스 섭취가 지질과산화에 아주 일시적인 영향을 주는 것으로 결론을 내렸다.

프로폴리스의 항산화 기능성은 프로폴리스가 함유하고 있는 polyphenol 및 flavonoids 함량에 기인하는데²⁾ 프로폴리스의 종류 및 산지에 따라 polyphenolic compounds 혹은 flavonoids 함량이 다르고 이에 따라 DNA 손상 회복능 및 항산화력이 달라질 수 있으므로 단순히 프로폴리스의 양만 비교하여 결과를 해석하는 데에는 한계가 있다. 나아가서 프로폴리스가 가지고 있는 폴리페놀 화합물들 간에 상승적 (synergistic) 상호작용 혹은 길항적 (antagonistic) 상호작용도 가능할 것이다.³⁸⁾ 본 연구에서는 인체시험에 사용한 프로폴리스의 polyphenolic compounds이나 flavonoids 양을 분석하지 않았다는 제한점이 있으므로 앞으로는 프로폴리스 사용량 외에 프로폴리스에 함유되어 있는 polyphenolic compounds의 양을 분석한 후에 비교하는 작업이 필요할 것이다.

현재까지 프로폴리스의 항산화 효과를 측정하기 위해 시

도된 인체 중재연구 자료들이 서로 비교하기에는 매우 제한되어 있긴 하지만, 프로폴리스 섭취에 따른 인체의 항산화 효과에 대하여 이렇게 서로 다른 결과가 보고되는 이유로 각 중재연구에서 측정된 항산화 지표들이 서로 다르다는 점과 중재연구의 형태 및 기간이 다르기 때문인 점을 생각해 볼 수 있다.¹⁷⁾

항산화 기능을 측정하기 위한 지표가 정말 *in vivo* 산화적 손상을 측정하기에 적절하고 타당한 지표인가 하는 점은 중요하게 검토할 필요가 있을 것이다. 국내에서 인체시험에 적용할 수 있는 항산화 지표의 신뢰도에 대한 연구가 수행되었는데, Pubmed를 대상으로 문헌조사를 하여 지표들을 선별한 후 2차에 걸친 전문가 델파이 조사에 의해 항산화 관련 biomarker의 타당성을 검토한 결과, 인체시험에 있어서 가장 신뢰성 있는 biomarker로는 임파구 DNA 손상도가 꼽혔으며 그 다음으로는 혈장 TRAP 및 TAS, 적혈구 SOD, GSH-Px, Catalase의 순서였다.³⁰⁾ 혈장 항산화 비타민인 vitamin C와 E 그리고 지질과산화 지표인 MDA 등은 신뢰도 순위가 그 다음으로 나타났다.

DNA 손상 정도를 보는 항 유전효과에 대한 조직의 특이성도 항산화 식품을 사용한 중재연구에서는 중요하게 생각해 볼 수 있다.³⁸⁾ 실제로 채소나 과일 등의 암의 위험을 감소시키는 효과는 폐, 대장 혹은 전립선 등의 조직에서도 나타남에도 불구하고 많은 연구자들이 혈장, 혈구, 뇨 중의 biomarker만을 측정해 오고 있다.³⁹⁾ 따라서 이런 인체 조직에 있어서 채소/과일의 DNA 손상과 산화 과정에서의 효과에 대해 더 알아볼 필요가 있다. 실제로 채소/과일들은 많은 생리적/병리적 과정, 즉 감염, 대사, 면역 등의 과정을 조절할 수 있으므로 사실은 채소/과일의 항산화 능력이 암과 심장병을 예방하는 주요 요인은 아닐 수도 있을 것이다.⁴⁰⁾

중재연구에 있어서 가장 중요한 제한점 중의 하나는 대상자 수가 제한되어 있다는 점과 관찰 기간이 짧다는 점이다. 본 연구에서 프로폴리스의 DNA 손상 개선 및 항산화 효과가 거의 나타나지 않은 것도 대상자 개인 간의 변이가 컸다는 것에 부분적으로 기인했을 것이다. 개인 간 변이로 인해 대상자수가 많지 않은 인체 중재연구를 수행할 때 그 중재효과를 관찰하기가 어려워지며,⁴¹⁾ 개인 간의 변이로 인해 genotoxicity가 나타나지 않음은 다른 여러 연구자들에 의해서도 보고된 바 있다.⁴¹⁻⁴³⁾ 따라서 프로폴리스의 항산화 효과에 대한 전반적인 그림을 얻기 위해서는 앞으로는 항산화 기능을 측정하기 위한 타당한 biomarker를 사용하여 좀 더 많은 수의 대상자, 더 오랜 실험기간 그리고 건강한 사람보다는 반건강인, 즉 질병의 위험요인을 가지고 있는 사람들 (high risk group)을 대상으로 randomized

clinical trail을 수행할 필요가 있을 것이다.

대상자들이 open diet 상태에 있었다는 점, 프로폴리스의 투여량이 비교적 적었다는 점, 개인간 변이가 컸다는 점 등이 본 연구에서 프로폴리스의 섭취효과가 유의적으로 나타나지 않았던 것과 관련이 있는 것으로 보인다. 결론적으로 하루에 800 mg의 프로폴리스 섭취는 건강한 흡연자의 내재적인 임파구 DNA 손상을 개선시키고 대상자의 항산화 상태를 향상시키는데 충분하지 않았다. 따라서 앞으로 프로폴리스의 DNA 손상 개선 및 항산화 효과를 측정하기 위하여 광범위하고 정밀하게 디자인된 인체 중재연구가 필요할 것이다.

요 약

흡연은 신체 내 산화 스트레스를 유발할 뿐 아니라 체내 항산화 상태를 악화시킨다. 따라서 흡연으로 인해 유도되는 산화 스트레스를 줄여주기 위한 여러 다양한 식품영양학적인 시도들이 되어져 왔다. 프로폴리스는 꿀벌이 자신의 생존과 번식을 유지하기 위하여 여러 식물에서 뽑아낸 수지에 꿀벌 자신의 침과 효소 등을 혼합하여 만든 천연 물질이다. 본 연구에서는 프로폴리스가 산화 스트레스로 인해 나타난 흡연자의 DNA 손상을 회복시키기 위해 항산화 영양 상태를 개선시키는지 보고자 하여 placebo를 사용하는 double-blind cross-over 인체시험을 수행하였다. 흡연자에게 800 mg의 프로폴리스와 placebo를 4주 섭취시킨 후 2주 washout period를 가진 뒤 다시 군을 바꾸어 교차시험으로 4주간 섭취시킨 후, comet assay에 의한 DNA 손상도 및 신체 내 항산화 효소 수준, 총 항산화력 및 항산화 비타민 상태를 분석하였다. 처음 2주 동안의 고갈기간 후에 흡연자 29명 (평균나이: 34.38 ± 1.73 세)을 프로폴리스군과 위약군의 두 군으로 나누어 하루에 프로폴리스 또는 위약을 4주 동안 공급하였고 2주 동안의 washout 기간을 가진 후에 교차실험을 위해 대상자의 군을 바꾸어 다시 4주 동안 프로폴리스와 위약을 공급하였다. Comet assay로 분석한 대상자의 임파구 DNA 손상정도는 프로폴리스를 섭취한 군이나 위약을 섭취한 군 간에 차이를 보이지 않았으며 총 항산화 영양상태도 두 군 간에 차이가 나타나지 않았다. 적혈구 항산화 효소인 catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) 활성도, 그리고 혈장 vitamin C와 tocopherol 수준도 프로폴리스군과 위약군 사이에 차이를 보이지 않았다. 따라서 흡연자에 있어서 프로폴리스의 항산화 효과를 평가하기 위해서는 앞으로 더 다양한 연구가 필요하리라고 생각된다.

■ 감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청(2004) 용역연구과제 연구비와 한남대학교(2009)의 연구비 지원으로 연구되었으며 이에 감사를 드립니다. 아울러 본 인체연구에 필요한 프로폴리스 시료를 제공해 주신 (주)서울프로폴리스에도 감사드립니다.

Literature cited

- 1) Gomez-Caravaca AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmacol Bio Anal* 2006; 41: 1220-1234
- 2) Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 2001; 15: 561-571
- 3) Kartal M, Yildiz S, Kaya S, Kurucu S, Topcu G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J Ethnopharmacol* 2003; 86: 69-73
- 4) Amoros M, Lurton E, Boustie J, Girre L. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut-2-enyl caffeate. *J Nat Prod* 1994; 64: 235-240
- 5) Wang L, Mineshita S, Ga I, Shigematsu T, Matsuno T. Antiinflammatory effect of propolis. *Jpn J Pharmacol Ther* 1993; 24: 223-224
- 6) OrDolic N, Terzic S, Mihaljevic Žver L, BaĐic I. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(1): 928-933
- 7) Murad JM, Calvi SA, Soares AMVC, Bankova V, Sforzin JM. Effect of propolis from Brazil and Bulgaria in fungicidal activity of mactophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol* 2002; 79: 331-334
- 8) Ahn MR, Kunimasa K, Ohta T, Kumazawa S. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits *in vitro* tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Lett* 2007; 252: 235-243
- 9) Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sci* 2007; 80: 370-377
- 10) Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S, Nakayama T, Kaji K, Uto Y, Hori H, Nagasawa H, Ohta T. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53(5): 643-651
- 11) Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem* 2004; 84: 329-339
- 12) Isla MI, Nieva Moreno MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol* 2001; 76(2): 165-170
- 13) Russo A, Cardile V, Sanchez F, Troncoso N, Vanella A, Garbarino JA. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci* 2004; 76(5): 545-558
- 14) Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002; 73 Suppl 1: S21-S29
- 15) Abo-Salem OM, El-Edel RH, Harisa GE, El-Halawany N, Ghonaim MM. Experimental diabetic nephropathy can be prevented by propolis: Effect on metabolic disturbances and renal oxidative parameters. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22(2): 205-210
- 16) El-Sayed el-SM, Abo-Salem OM, Aly HA, Mansour AM. Potential antidiabetic and hypolipidemic effects of propolis extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22(2): 168-174
- 17) Jasprica I, Mornar A, Debeljak Z, Smolčić-Bubalo A, Medić-Sarić M, Mayer L, Romić Z, Bućan K, Balog T, Sobocanec S, Sverko V. *In vivo* study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J Ethnopharmacol* 2007; 110(3): 548-554
- 18) Kim CS, Kang HJ, Lee SH, Park YK, Kang MH. The effect of alpha-tocopherol supplementation on the improvement of antioxidant status and lymphocyte DNA damage in postmenopausal women. *Korean J Nutr* 2007; 40(8): 708-718
- 19) Park E, Kang MH. Smoking and high plasma triglyceride levels as risk factors for oxidative DNA damage in the Korean population. *Ann Nutr Metab* 2004; 48: 36-42
- 20) Kim HY, Park YK, Kim TS, Kang MH. The effect of green vegetable drink supplementation on blood pressure, erythrocyte antioxidant enzyme activities and plasma lipid profiles of Korean male subjects. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2006; 35(3): 344-352
- 21) Park YK, Park E, Kim JS, Kang MH. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat Res* 2004; 529: 77-86
- 22) Matshshige K, Kusumoto IT, Yamamoto Y, Kadota S, Nambe T. Quality evaluation of propolis. 1. A comparative study on radical scavenging effects of propolis and *vespae nidus*. *J Trad Med* 1995; 12: 45-53
- 23) Matshshige K, Basnet P, Kadota S, Namba T. Potent free radical scavenging activity of dicaffeoyl quinic acid derivatives from propolis. *J Trad Med* 1996; 13: 217-228
- 24) Hayashi K, Komura S, Isaji N, Ohishi N, Yagi K. Isolation of antioxidant compounds from Brazilian propolis: 3, 4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. *Chem Pharm Bull* 1999; 47: 1521-1524
- 25) Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, et al. Biological evaluation of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol* 2000; 72: 239-246
- 26) Oyaizu M, Ogihara H, Fujimoto Y. Antioxidative activity of extracts from propolis. *J Jap Oil Chem Soc* 1999; 48: 135-138
- 27) Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans CA. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 838-849
- 28) Galati G, O'rien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 287-303
- 29) Cherubini A, Beal MF, Frei B. Black tea increases the resistance of human plasma to lipid peroxidation *in vitro*, but not *in vivo*.

- Free Radic Biol Med* 1999; 27: 381-387
- 30) Sung MK, Kim MK, Kang MH. Establishment of functional evaluation system for antioxidants (II): Re-evaluation of functionality for antioxidant health foods listed in Korean Food Codex. Final Report of the Korean Food and Drug Administration Research Project; 2004
- 31) Anderson HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1997; 43: 562-568
- 32) Kutlu M, Naziroglu M, Simsek H, Yilmaz T, Sahap Kukner A. Moderate exercise combined with dietary vitamins C and E counteracts oxidative stress in the kidney and lens of streptozotocin-induced diabetic rat. *Int J Vitam Nutr Res* 2005; 75: 71-80
- 33) Kismet K, Sabuncuoglu MZ, Kilicoglu SS, Kilicoglu B, Devrim E, Erel S, Sunay AE, Erdemli E, Durak I, Akkus MA. Effect of propolis on oxidative stress and histomorphology of liver tissue in experimental obstructive jaundice. *Eur Surg Res* 2009; 41 (2): 231-237
- 34) Cederbaum AI. Introduction-serial review: alcohol, oxidative stress and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1524-6.
- 35) Konopacka M, Rzeszowska-Wolny J. Antioxidant vitamin C, E and beta-carotene reduce DNA damage before as well as after gamma-ray irradiation of human lymphocytes *in vitro*. *Mutat Res* 2001; 491: 1-7
- 36) MaCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1034-1053
- 37) Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res* 1996; 56: 1291-1295
- 38) Stahl W, Junghans A, de Boer B, Driomina ES, Briviba K. Carotenoids mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Lett* 1998; 427: 305-308
- 39) WCRF. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC. World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research; 1997
- 40) Bazzano LA, Serdula MK, Liu S. Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2003; 5: 492-499
- 41) John JH, Ziebland S, Yudkin P, LS Roe. Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 359: 1969-1974
- 42) Silliman K, Parry J, Kirk LL, Prior RL. Pycnogenol does not impact the antioxidant or vitamin C status of healthy young adults. *J Am Diet Assoc* 2003; 103: 67-72
- 43) Chopra M, O'Neill ME, Keogh N, Wortley G, Southon S, Thurnham DI. Influence of increased fruit and vegetable intake on plasma and lipoprotein carotenoids and LDL oxidation in smokers and nonsmokers. *Clin Chem* 2000; 46(11): 1818-1829