



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2008년 2월

석사학위 논문

산화성 스트레스에 의한 DNA의 회복에
미치는 녹차씨 추출물의 항산화제 효과

조선대학교 대학원

생물학과

김설영

2008년 2월

석사학위 논문

산화성 스트레스에 의한 DNA의 회복에
미치는 녹차씨 추출물의 항산화제 효과

조선대학교 대학원

생물학과

김설영

산화성 스트레스에 의한 DNA의 회복에
미치는 녹차씨 추출물의 항산화제 효과

The Antioxidant Effects of Green Tea Seed Extracts Against
DNA under Oxidative Stress

2008년 2월

조선대학교대학원

생물학과

김설영

산화성 스트레스에 의한 DNA의 회복에 미치는 녹차씨 추출물의 항산화제 효과

지도교수 김 영 곤

이 논문을 이 학 석사학위신청 논문으로 제출함

2007년 11월

조선대학교대학원

생물학과

김 설 영

인준서

김설영의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조 선 대학교 교수 _____

위원 조 선 대학교 교수 _____

위원 조 선 대학교 교수 _____

2007년 11월 (석사)

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	8
1. 실험 재료	8
1) 각종 용매 추출물의 조제 및 DNA 시료	8
2. 실험 방법	8
1) Paraquat에 의한 DNA 손상과 각종 용매 추출물의 효과 측정	8
2) Paraquat에 의한 세포의 산화적 스트레스에 대한 각종 용매 추출물의 효과 측정	10
3) HPLC	11
III. 결 과	12
1. Paraquat에 의한 DNA손상과 각종 추출물에 대한 antioxidant 효과 측정	12
2. Paraquat에 의한 세포의 생존률과 각종 추출물 에 대한 antioxidant 효과 측정	14
3. oxidative stress에 대한 세포의 성장률	17
4. antioxidant 효과	17
5. HPLC에 의한 녹차와 녹차씨의 성분분석	21
IV. 고 찰	23
V. 참 고 문 헌	25

그림 목 차

Figure 1. 포유류 세포에서의 oxygens과 nitrogens free radical의 생성과정	2
Figure 2. 포유류 세포에서 oxygens 과 nitrogen free radical의 제거과정	4
Figure 3. Paraquat structure	6
Figure 4. PQ에 유도된 pUC19 plasmid 의 손상에 따른 각종 추출물의 효과	12
Figure 5. PQ에 유도된 Calf thymus DNA의 손상에 따른 각종 추출물의 효과	12
Figure 6. Paraquat 처리 시 각종 용매 추출물에 대한 QC779의 생존률	14
Figure 7. Paraquat 처리 시 각종 용매 추출물에 대한 GC4468의 생존률	15
Figure 8. 녹차씨 추출물이 산화적 스트레스에 의한 QC779의 성장률에 미치는 영향	17
Figure 9. 녹차씨 추출물이 산화적 스트레스에 의한 GC4468의 성장률에 미치는 영향	18
Figure 10. 녹차씨 추출물과 기존 항산화제와의 항산화 효과 비교	19
Figure 11. HPLC에 의한 녹차와 녹차씨의 성분분석	21

ABSTRACT

The Antioxidant Effects of Green Tea Seed Extracts Against DNA under Oxidative Stress

Kim Seol-yeong

Advisor : Prof. Yonug-Gon Kim, Ph.D

Department of Biology

Graduate School of Chosun University

The effects of green seed extracts including extracts of pomegranate seed, grape seed, elm tree bark and royal azaleas as antioxidants or prooxidants were examined. The results show that the green seed extracts are only shown as antioxidants, but the others are shown as a prooxidants against DNA damage and *Escherichia coli* cells under oxidative stress. The green seed extracts were analyzed by HPLC and then the kamempfrol was found. However, it was not found in green tea extracts that contained the epigallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, gallic acid, gallic acid gallate, epicatechin gallate and catechin gallate. Therefore, I suggested that kamempfrol may be strong candidate for antioxidants. The green seed extracts strongly inhibited paraquat - induced DNA single strand breakage of pUC 19 plasmid and calf thymus DNAs. Furthermore, the damaged DNAs were repaired by treatment of green seed extracts. In addition,

the green seed extracts also inhibited the damages of *E. coli* cells against paraquat induced-oxidative stress. The strand breaks of DNA were stimulated also with α -tocopherol and catechin, but not with BHT and green seed extracts in the presence of paraquat. These results suggest that the green extracts act as antioxidants, but the other applied samples has a prooxidative effect DNA damage and cell survival against oxidative stress.

1. 서론

인간은 산소를 이용해서 끊임없이 숨을 쉬면서 생명활동에 필요한 에너지를 얻어 살아가고 있으며 산소는 지구라는 호기성 환경에서 생활하는데 있어서 생존에 필수 불가결한 요소이다. 인체에도 에너지 생성을 위한 대사적 전환에 산소가 꼭 필요하다는 것은 당연한 사실이다. 그러나 이와 같이 생명유지에 절대적으로 필요한 산소이지만 안정한 분자상태인 기저삼중항 산소가 슈퍼옥사이드 라디칼 (superoxide radical, $O_2^{\cdot -}$), 하이드록실 라디칼 (Hydroxyl radical, $\cdot OH$), 과산화 수소 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 등과 같은 반응성이 큰 활성산소로 전환되면서 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 가지고 있다 (Adelson, *et al.*, 1988; Flora, 2007; Valko, *et al.*, 2005).

활성산소는 과산화 지질에 직접 작용하는 활성화 상태에 있는 분자들, 즉 과산화 음이온, 수산화 라디칼 또는 일중항 산소를 의미한다 (Fridovich, 1978). 일반적으로 모든 물질을 구성하는 분자는 원자로 되어 있는데, 원자는 양성자와 그 외곽의 궤도를 선회하는 전자로 구성되어 있다. 전자는 하나의 궤도에서 2개씩 쌍을 구성하여 안정된 상태이지만 하나의 궤도에 전자가 하나인 경우에는 매우 불안정한 상태에서 안정된 상태를 위해 다른 외부로부터 전자를 흡수하려는 매우 활성화된 반응이 일어나 프리라디칼을 발생시킨다 (Marx, 1987). 이러한 프리라디칼은 불안정한 상태에서 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 잃거나 주위로부터 전자 하나를 더 얻어 안정한 상태로 환원하려는 매우 강한 반응적 성질을 가지고 있다. 예를 들어 프리라디칼인 수소 (H) 원자는 전자를 잃으면 수소이온 (H^+)이 되며 전자를 얻으면 수소분자 (H_2)로 존재한다. 이와 같이 프리라디칼 상태인 수소원자는 불완전한 상태에서 완전한 상태로 반응하려고 전자를 얻거나 잃는 과정에서 매우 강한 반응을 보인다 (Halliwell, 1995).

지난 몇 십년간의 연구를 통해서 superoxide radical ($O_2^{\cdot -}$)의 형성은 체내의 물질대사 조절체계를 붕괴하여 prooxidant 기능을 한다는 것을 알 수 있다. 이것은 거대분자들의 유독한 산화를 이끌어낸다. 그리고 superoxide radical ($O_2^{\cdot -}$)은 노화에 관련된 많은 질병들이 발생하는데 주요역할을 하고 있다 (Linnane, *et al.*,

2007).

Fig.1에서 보여주는 바와 같이 인체는 여러 가지 경로를 통해 활성산소를 생성한다. 미토콘드리아는 생물학적 산화와 마지막 단계에서 이용되는 세포 내의 미토콘드리아의 산화적 인산화 (oxidative phosphorylation) 과정을 통해서 산소가 환원되면서 물과 이산화탄소를 생성한다. 그러나 이 과정에서 약 2 - 5 %의 산소는 불안정하게 환원되면서 결과적으로 O_2^- (superoxide) 라디칼을 형성하게 되고,

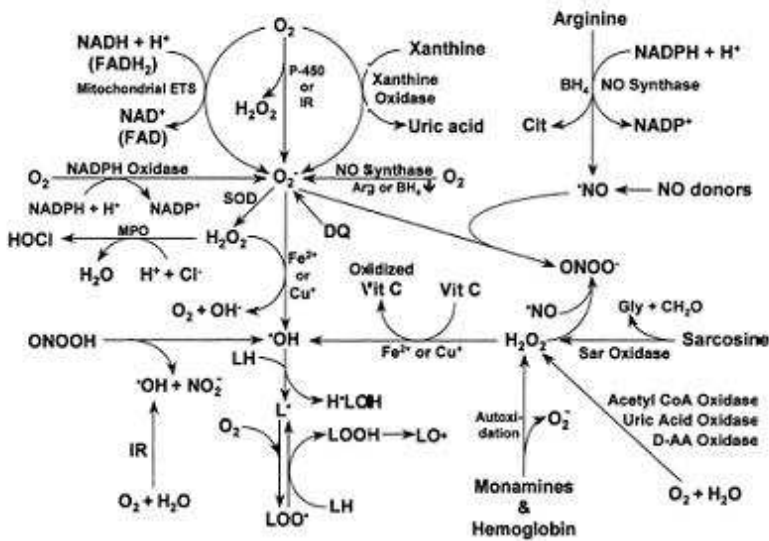


Fig.1. 포유류 세포에서의 oxygens과 nitrogens free radical의 생성과정

이렇게 형성된 O_2^- 는 구리와 철분의 존재 하에 H_2O_2 와 \cdot 애라디칼을 형성하게 된다 (Jenkin 과 Goldfarb, 1993).

또한 인체는 O_2^- 와 H_2O_2 를 유용한 목적을 위해 만들기도 한다. 활성화된 식세포는 박테리아와 진균을 죽이고 바이러스를 억제시키는 O_2^- 와 H_2O_2 를 이용하는 메커니즘의 하나로서 O_2^- 와 H_2O_2 를 만들어 낸다. 이렇게 의도적으로 중성백혈구, 단핵세포, 대식세포 그리고 호산구에 부적당하게 활성화된다면 위험한 방어기전이 될 수 있다 (Er, et al., 2007). 이러한 것은 염증성 장염이나, 류마티스성 관절염과 같은 만성 염증성 질병을 일으킨다. 따라서 염증을 일으킨 류마티스성 관절에서는 많은

식세포들이 그 관절로 보충되며 그곳에서 활성화 된다. 이들이 만들어낸 독소는 활성산소를 포함하여 관절의 손상에 영향을 준다 (Halliwell, 1997; Gonzalez-Gay, *et al.*, 2005; Kalpakcioglu 와 Senel, 2007).

일반적으로 활성산소는 안정 시에도 미토콘드리아의 전자전달계로부터 방출되며, 생물체가 살아있는 동안 세포 내에서 계속 방출된다. 이러한 활성산소는 결국 인체의 세포막과 세포핵을 공격하여 지질과산화 작용을 유도하고 유전물질인 DNA의 손상을 일으켜 세포사멸을 일으키며 암, 치매, 죽상경화증과 같은 질병과 노화를 일으키는 원인이 된다 (Ryan-Harshman 과 Aldoori, 2005). 또한 DNA의 당-인산 골격이나 염기부분을 직접 공격하여 여러 가지 산화적으로 변성된 purines과 pyrimidines을 형성 시키는데, 이렇게 산화된 염기들은 DNA복제와 repair하는 동안 DNA변이를 일으킬 수 있다 (Asuncion, *et al.*, 1996; Herrero 와 Barja, 2001; Olinski, *et al.*, 2007). 모든 연구결과가 일치하지는 않지만, 대부분의 연구에서 늙은 쥐나 사람의 일부 조직에는 DNA가 산화되어 생성된 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxodG)의 함량이 높은 것으로 밝혀졌다 (Barja와 Herrero, 2000). Melove 등 (1999)은 세 종류의 포유류를 대상으로 나이에 따른 mtDNA 변이의 축적을 조사하였는데, 쥐는 3.5년 침팬지는 59년, 사람은 122년으로 조사되었다. 이것은 수명이 짧은 동물일수록 수명이 긴 동물에 비해 mtDNA 변이의 축적속도가 빠르다는 것을 의미한다 (Wang, *et al.*, 1997). 즉, 활성산소에 의한 DNA손상이 노화와 관련 있음을 의미한다.

또한 ·OH는 지질의 과산화를 유발할 수 있다. 지질은 생체막의 주요 성분일 뿐 아니라 생리대사에 중요한 역할을 하므로 지질의 과산화는 여러 질병의 원인이 되고 있으며 (Halliwell 과 Gutteridge, 1984; Valko, *et al.*, 2005), 단백질의 아미노산변형 (Stadtman 과 Berlet, 1991) 이나, cross-linking (Davis 와 Delsignore, 1987; Datta, *et al.*, 2006)등 도 유발 시킨다. 단백질의 변형은 효소의 비활성화와 단백질의 가수 분해를 촉진하고, 노화 및 질병 유발의 원인이 되고 있다 (Levine *et al.*, 1981; Rivett 와 Levine, 1990; Ethen, *et al.*, 2007). 치매와 관련하여 이 질환의 독성인자로 알려져 있는 amyloid plaque가 ·OH에 의한 단백질의 변성으로 일어날 수 있다는 사실이 보고된 바 있다 (Multhaup *et al.*, 1996).

이러한 활성산소의 유해성을 막기 위하여 우리의 신체는 항산화 비타민, 비효소적 항산화 물질, 그리고 항산화 효소로 구성되어 있는 효율적인 항산화 방어체계를 가지고 있다 (Ji, 1994).

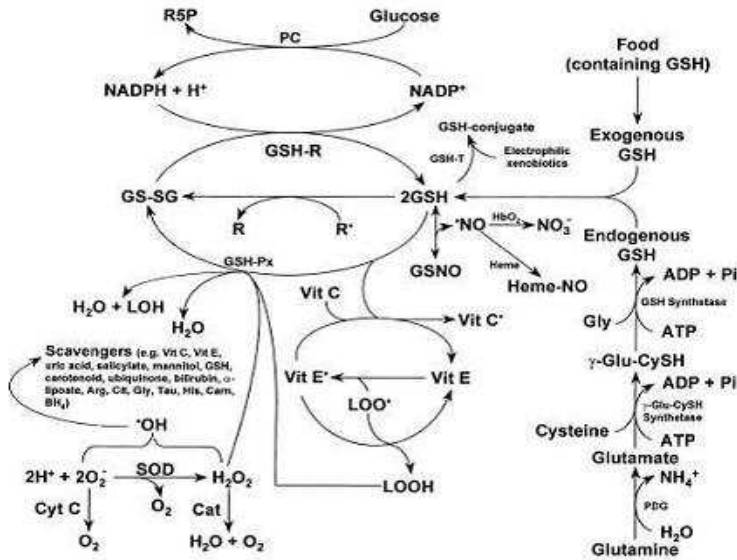


Fig.2. 포유류 세포에서 oxygens 과 nitrogen free radeal의 제거과정

Fig.2에서 보여주는 바와 같이 이러한 항산화 체계 각각의 역할은 독특할 뿐만 아니라, 기능적으로 상호 보완적으로 작용한다.

일반적으로 항산화 비타민은 직접적으로 프리라디칼을 제거하는 역할에 관여하며, 항산화 물질인 glutathion과 다른 thiol물질들은 세포의 산화 환원상태를 유지하는데 중요한 역할을 하고, SOD (superoxide dismutase) (Lushchak, 2006), CAT (Catalase) (Cui, *et al.*, 2006), 그리고 GPX (Glutathion peroxidase) (Manzoori, *et al.*, 2006)와 같은 항산화 효소는 활성산소의 하나인 전자 환원반응을 촉매 한다 (Ji, *et al.*, 1998). 따라서 활성산소로부터의 방어기전을 구축하고 있으며, 기전으로는 우선 활성산소의 생성을 막게 하고, 반응성이 있는 대사산물을 처리함으로써 활성산소의 공격을 차단한다. 또한 이 산화물이 더욱 파괴적인 형태의 활성산소인 '애로 전환되는 것을 막으며, 활성산소에 의해 공격을 받

았을 경우 손상복구를 빠르게 하며 다른 항산화제들이 효과적인 기능을 발휘하기 위한 환경을 제공해준다 (Heffner 와 Repine, 1989).

SOD는 세포에서 산화작용에 대한 첫 번째 방어체계를 갖추는 효소이며, 과산화수소와 산소를 형성시키기 위하여 산화물을 균질화 (dismutase) 시킨다 (Powers, *et al.*, 1993). 세포에서 SOD의 활성분포는 조직들 사이에 다양하게 나타나는데, 쥐의 간에 있어서는 대략적으로 SOD활성의 2/3가 세포질에서 나타나며, 1/3는 미토콘드리아에서 나타난다. 포유동물의 경우 가장 높은 SOD의 활성은 간에서 나타나고, 그 다음이 신장, 뇌, 부신, 그리고 심장에서 나타난다. 골격근의 경우에는 SOD활성의 15 - 30 %가 미토콘드리아 내에서 이루어지고, 나머지 65 - 85 %는 세포질에서 이루어진다 (Powers, *et al.*, 1993).

CAT 주요기능은 H_2O_2 의 분해를 촉진시키는 것이다. 비록, CAT와 GPX의 기능이 중복되는 부분이 있지만, 두 효소는 기질로서 H_2O_2 에 대한 친화도가 다르게 나타나는데, 즉, 포유동물의 GPX는 CAT와 비교해서 낮은 농도에서 H_2O_2 에 대한 친화도가 더 크게 나타난다. 이는 낮은 H_2O_2 농도에서 GPX는 근육세포로부터 H_2O 를 제거하는데 있어 더욱 활발한 역할을 한다고 볼 수 있다 (Ji, 1995).

GPX는 지방산과산화물과 핵산에서 파생된 과산화물 (hydroperoxide)을 포함하여 과산화수소 (hydrogen peroxide) 에서부터 복합조직 과산화물까지 낮은 특수성을 가지고 있기 때문에 세포에서 왕성하게 과산화물을 억제하는 역할을 한다. GPX와 CAT 모두 H_2O 에 대해서 더 큰 친화성을 가지고 있다. GPX는 세포질과 세포의 미토콘드리아 기질에 많이 분포되어 있다. GPX 활성은 간과 적혈구에서 높으며, 뇌, 신장, 그리고 심장에서도 중간 정도의 활성을 하지만 골격근에서는 낮다. 또한 GPX는 셀레늄에 의존적인 성격을 가지고 있으며, 쥐에게 셀레늄을 8주동안 투여한 결과 간, 심장, 그리고 근육에서 세포질 GPX는 3-4% 정도 감소된 반면에, 미토콘드리아의 GPX는 간에서 9%, 심장에서 20%, 근육에서 24%를 유지하는 것을 볼 수 있다. 따라서 미토콘드리아에서 셀레늄 결핍에 대한 저항력이 더 크게 나타난다는 사실을 알 수 있다 (Ji, 1995).

이에 따라 식물체에 일반적으로 함유되어 있는 천연 항산화제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이는 1950년대부터 항산화 효과가 우수하다고 밝혀진 BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene) 등의 합성 항산화

제가 실험동물에 암이나 기형을 유발한다는 연구결과 들이 보고되면서, 더욱 가속화 되고 있다 (Smirnova, 2002; Fukumoto, 2000). 하지만 천연 항산화제로서의 인체에 대한 안전성은 있으나 합성 항산화제에 비해 그 효과가 떨어지는 문제점이 발견되고 있다. 그동안 밝혀진 천연 항산화제 중 널리 사용되는 것으로는 tocopherols, flavonoids, polyphenols 등이 있으며, 고혈압과 동맥경화의 억제 작용, 과산화지질의 생성 억제에 의한 노화예방, 중성지질의 생성억제에 따른 비만 방지, 알칼로이드 성분과 쉽게 결합하여 해독작용을 나타내는 등 다양한 생리활성이 있는 것으로 알려져 있다 (Halliwell, 2005; Sies, 2005). 하지만, 환경조건에 따라 위의 천연항산화제가 prooxidant 효과도 나타낸다는 연구논문들이 나오면서 더 정확한 규명이 요구되고 있다 (Kim, 2007; Simić, 2007).

Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium; methyl viologen, PQ, Fig.3)은 식물의 광합성 동안에 superoxide를 생성하여 세포벽과 원형질을 파괴하는 기전으로 잘 알려져 있으며, 우리나라를 포함하여 전 세계적으로 널리 사용되는 비선택성 제초제로서 토양에 닿는 즉시 무독성의 화합물로 재빨리 분해되어 환경에 무해하다는 장점을 가지고 있다. 그러나 독성이 강하여 우연한 사고에 의하여 적은 양이라도 체내에 흡수되면 여러 장기에 치명적인 손상을 일으키며 폐부전에 의한 사망의 가장 큰 원인으로 작용하고 있다 (Onyon *et al.*, 1987).

노출 시 인체 내에서 용해되어 전자수용체로 작용하며 superoxide radical ($O_2^{\cdot -}$) 및 peroxide radical ($O_2^{2\cdot -}$)과 같은 반응성 산소유리기 (reactive oxygen species, ROS)를 발생시켜 세포막, 단백질, 핵산 등과 반응하여 세포손상을 일으킨다 (Aldrick, *et al.*, 1983; Senator, *et al.*, 2004).

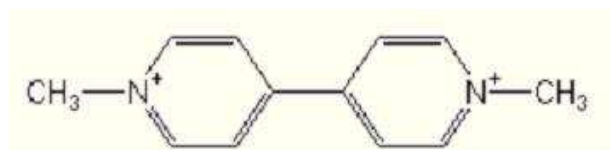


Fig.3. Paraquat(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium; methyl viologen, PQ) 의 구조

PQ는 폐, 간, 신장, 심장 등 신체 중요장기에 손상을 초래하나 특히 폐에 심한 손상을 일으킨다. 폐 조직에서는 에너지의존과정으로 PQ가 흡수되어 혈장과 비교

해 폐에서의 PQ 농도가 6 - 10배정도 높다. 또한 폐는 대기의 산소와 가장 가깝게 접할 수 있는 장기로서 반응성 산소유리기에 의해 가장 많이 손상 받는다. PQ에 의한 폐 손상은 반응성 산소유리기에 의한 직접손상, 염증세포의 활성화에 의한 초기 폐 손상, 그리고 섬유아세포 증식 세포기질의 변화들이 나타나는 후기손상 등이 특징이다. 따라서 PQ를 섭취하면 급성 폐손상과 급성 호흡부전 증후군 및 폐 섬유화로 대부분 사망한다 (Uhal, *et al.*, 1995). 이에 따른 연구보고서들에 따르면 폐상피세포의 세포자살이 급성 폐손상 및 급성 호흡부전 증후군의 발생기전에 중요한 역할을 할 가능성이 크다 (Kitamura, *et al.*, 2001).

과거의 많은 연구들에서는 PQ는 암세포에서 세포독성을 유발시키거나 혹은 PQ에 의한 DNA 손상정도를 측정하는 매개체로서 사용된 것에 불과하였다 (Lee, *et al.*, 2003; Ayaki *et al.*, 2005). 그러나 최근 들어 PQ 자체에 의한 세포독성을 회복시킬 수 있는 방법들 가운데 항산화제에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 그에 비해 실제 임상에서 PQ 중독 시 뚜렷한 해독제나 치료제가 없는 실정이다.

흔히 우리가 알고 있는 식물의 phenolic 성분은 항산화제로 작용한다고 알려져 있으나, 조사된 바에 의하면 prooxidant로서 작용함으로써 이에 대한 연구가 확실히 규명되어야 할 시점이라고 사료된다 (Croft, 1998; Cotelle, 2001; Lee 와 Lee, 2006). 예를 들어, Quercetin은 식물에서 보편적으로 검출되는 polyphenol 성분으로 식물에서 작용 하였을 때 성장촉진물질의 분비를 자극하여 관생을 유도 하지만 농도에 따라서는 생존률을 감소시키는 작용을 하여 prooxidant와 항산화제 역할을 동시에 나타내고 있다고 보고되었으며 (Robaszkievicz, *et al.*, 2007), algerian plants에서 추출한 flavonoid는 mitochondria의 방어에 의해 산화성 스트레스에 대항할 수 있는 능력을 갖으나 농도에 따라 세포에 손상을 주어 역시 prooxidant 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (Lahouel, 2006).

이에 본 연구에서는 pUC19 와 calf thymus 의 DNA를 사용하여 PQ에 의한 DNA 손상을 유도한 후 석류씨, 느릅나무껍질, 철쭉, 녹차씨, 포도씨 추출물을 사용하여 항산화제 개발을 위한 연구를 수행하였으며, 동시에 세포 QC779와 GC4468를 대상으로 동일조건에서 생존률과 성장률을 검사하고 가장 효과가 큰 물질에 대해서 HPLC로 성분을 비교분석 해보고자 한다.

II. 재료 및 방법

2.1 재료

2.1 각종 용매 추출물의 조제 및 DNA 시료

석류씨, 느릅나무껍질, 철쭉, 녹차씨, 포도씨는 분쇄기로 갈은 후 여과하고 이 여과액을 Rotary vacuum evaporater (EYELA N-1000, water bath 선일아이라 KSB-201)에서 HPLC용 에탄올과 7:3비율로 섞어 evaporation하여 에탄올 추출물을 얻었으며, 에탄올 추출물은 동결건조 (SAMWON Freeze Dry system SFDSF12) 하였다. 동결건조한 각 용매들의 분말은 증류수 1 ml에 2 mg씩 넣고 녹인 후 0.22 μ m의 filter에 여과하여 4°C에 보관하여 사용하였다. pUC19 plasmid는 X-gal 처리된 LB 배지에 배양한 후 single colony를 LB 액체 배지에 24시간 배양한 후 Plasmid Miniprep Kit (TaKaRa A510)를 사용하여 추출하였다. Calf Thymus DNA는 SIGMA D-4522를 구입하여 사용하였다. 항산화제는 Butylated Hydroxytoluen (BHT, Sigma, B-1378), α -tocopherol (Sigma, T3251), Kampferol (Sigma, K0133), catechin (Sigma, C-1251)을 구입하여 사용하였다. Pycnogenol (PYC, US patent # 4,698,360)는 해송에서 추출하여 파우더 형태로 만든 제품을 사용하였다. 기타 화학약품은 Sigma사의 제품을 이용하였다. *E. Coli*는 QC779 (LacU169 rps(sodA::MPR13)25(sodB::Kan)1-D2)와 GC4468 (Δ (argF-lac)169 rpsL sup(Am), lac operon deleted)을 사용하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 Paraquat에 의한 DNA 손상과 각종 용매 추출물의 항산화제 효과 측정

pUC19 Plasmid와 Calf Thymus DNA에 PQ (0.17 mM)를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 군과 PQ를 처리 하지 않은 군을 비교하여 PQ가 DNA에 산화적 스트레스를

주는지 여부에 대한 실험을 실시하였다. 또한 DNAs에 석류씨, 느릅나무껍질, 철쭉, 녹차씨, 포도씨 추출물 (10 μg)을 처리하여 30분 동안 반응시킨 군과 PQ (0.17 mM)를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 각종 용매 추출물 (10 μg)을 처리한 군을 비교실험 하여, 용매 추출물 자체의 항산화제 효과 여부를 측정하고, PQ가 처리되었을 경우 방어적인 항산화제 효과를 측정하였다.

기존의 항산화제와 녹차씨 추출물의 항산화제 효과 비교를 위해서 pUC plasmid 에 PQ (0.17 mM)을 처리하여 5분간 반응시킨 후 α -tocopherol (5 mM), Butylated hydroxytoluene (BHT, 80 μM) (Kim 과 Park., 2004), 녹차씨추출물 (GTS, 10 μg), Catechin (330 μM)을 첨가하여 30분간 상온에서 반응시킨 후 1%의 agarose gel로 100V에서 30분간 전기영동 하였다.

2.2.2 Paraquat에 의한 세포의 산화적 스트레스에 대한 각종용매 추출물의 효과 측정

QC779 와 GC4468의 경우에는 LB 고체 medium에서 single colony를 추출하여 5 ml의 LB 배지에서 약1시간동안 37°C의 shaking incubator에서 배양하여 spectrophotometer에서 $OD_{600} = 0.1$ 를 맞춰서 실험에 사용하였다.

생존률 측정은 QC779 와 GC4468의 Cell ($OD_{600} = 0.1$)의 농도는 총 부피 2 ml에서 10 μl 씩 넣어 1 : 200으로 희석시켜서 사용하였고 PQ (2.5 μM)에 의한 산화적 스트레스를 받은 세포생존률을 비교실험 하였다. PQ를 첨가하여 37 °C, 150 rpm 조건의 shaking incubator에서 30분 배양시킨 군을 PQ를 처리하지 않은 군과 비교하기 위하여 각각 배양시킨 최종물을 LB 고체배지에 10 μl 씩 spreading 하여 24시간 동안 37°C incubator에서 배양시킨 후 세포수를 측정하여 기준을 잡았다.

이 후 PQ (2.5 μM)를 처리하여 30분 배양시킨 군에 용매 추출물 (40 μg)을 첨가하여 3시간동안 37 °C, 150 rpm 조건의 shaking incubator에 배양한 군과 PQ를 처리하지 않고 용매 추출물 (40 μg)만 처리하여 배양한 군의 배양액을 LB 고체배지에 10 μl 씩 spreading 하여 24시간 동안 37°C incubator에서 배양시킨 후 세포수를 측정하였다.

생장률 측정은 QC779 와 GC4468의 Cell ($OD_{600} = 0.1$)을 총 부피 20ml의 LB 액체 배지에 1 : 100으로 희석시킨 후 PYC (5 μg), PQ (0.1 mM), 녹차씨추출물 (40

μg)을 각각 더해서 6개의 실험군 (con, PYC, PQ, 녹차씨추출물, PQ+PYC, PQ+녹차씨추출물)으로 나누어 PYC와 녹차씨추출물이 생장률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 37 °C, 150 rpm 조건의 shaking incubator에서 배양하며 총 6시간 동안 매시간 모니터 하여 spectrophotometer로 600 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

2.2.3 HPLC

HPLC는 waters breeze (lc-10vp, Waters Co. Ltd.)를 사용하였으며, Electrochemical detection (ECD)는 L-ECE-6A (Shimazu co. Ltd.)를 사용하였다. Column은 ultrasphere ODS column (4.6mm×25cm, Beckman사)를 이용하였다. HPLC로 녹차를 분석하기 위한 mobile phase는 A; 0.1% phosphoric acid, B; acetonitrile, C; isopropanol을 사용하였으며, 총 running time은 40분으로 mobile phase를 0min, 92% A, 8% B; 16 min, 86% A, 12% B, and 2% C; 25 min, 78% A, 20% B, 2% C; 30 min, 60% A, 38% B, 2% C; 31 min, 92% A 8% B; 40 min, 92% A, 8% B로 조정해주었으며 flow rate는 1ml/min, column temperature는 30°C, wavelength는 280nm이었다. 녹차 성분의 식별은 Jin (2006)을 참조하여서 retention time에 따라 Epigallocatechin (EGC), Catechin (C), Epicatechin (EC), Epigallocatechin gallate (EGCG), Gallocatechin gallate (GCG), Epicatechin gallate (ECG), Catechin gallate (CG)를 식별하였다. HPLC로 녹차씨를 분석하기 위한 mobile phase는 A; distilled water의 혼합물, B; acetonitrile이었다. 총 이때 사용된 column은 ultrasphere ODS column (4.6mm×25cm, Beckman사)를 이용하였으며, 총 running time은 60분으로 mobile phase B를 15 - 80%로 조정하였으며 flow rate는 1 ml/min, column temperature는 30 °C, wavelength는 263 nm이었다.

III. 결 과

3.1. Paraquat에 의한 DNA손상과 각종 용매 추출물에 대한 antioxidant 효과 측정

PQ에 의한 DNA 손상에 대한 추출물을 처리시의 항산화제의 효과를 관찰하기 위해 석류씨, 느릅나무껍질, 포도씨, 녹차씨, 철쭉 추출물을 처리하여 30분 동안 상온에서 반응하여 전기영동한 결과는 다음과 같은 결과를 얻었다 (Fig. 4, 5).

DNA의 경우 느릅나무껍질 추출물 (b)과 포도씨 추출물 (c)이 DNA를 분해하여 band의 양이 줄거나 끊어버려 2개의 band로 나뉘는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 이때 pUC 19 plasmid DNA를 가장 많이 손상시킨 추출물을 포도씨 추출물이고, Calf thymus DNA를 가장 많이 손상시킨 추출물을 느릅나무 껍질 추출물이었다.

또한 PQ (0.17 mM)를 첨가하여 5분 동안 반응시켜 손상을 입힌 후 용매 추출물 (10 μ g)을 씩 첨가하여 30분 동안 상온에서 반응시켜 PQ에 대한 추출물의 반응 결과 PQ와 용매 추출물에 의해서 DNA의 손상이 더해지나 녹차씨 추출물에 의해서는 PQ에 의한 손상이 회복되는 것을 알 수 있었다.

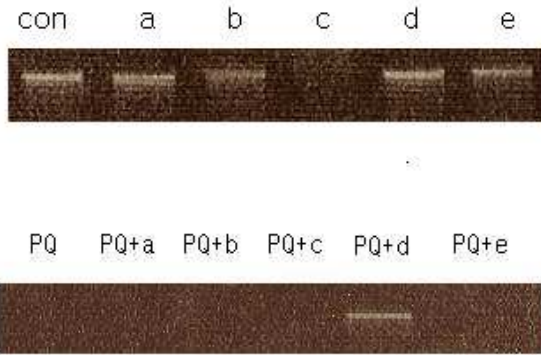


Fig.4. PQ에 유도된 pUC19 plasmid DNA의 손상에 따른 각종 추출물의 효과
 a: 석류씨 추출물 b: 느릅나무껍질 추출물 c: 포도씨 추출물
 d: 녹차씨 추출물 e: 철쭉 추출물

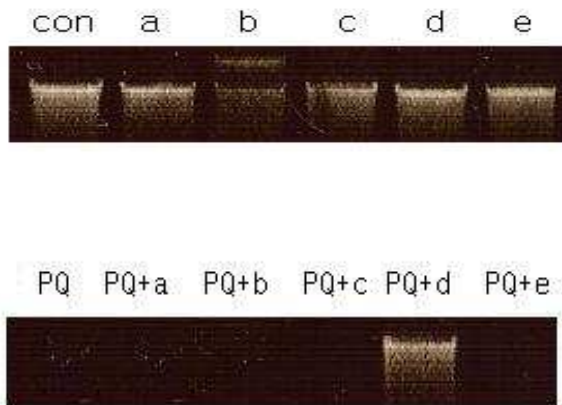


Fig.5. PQ에 유도된 Calf thymus DNA의 손상에 따른 각종 추출물의 효과
 a: 석류씨 추출물 b: 느릅나무껍질 추출물 c: 포도씨 추출물
 d: 녹차씨 추출물 e: 철쭉 추출물

3.2. Paraquat에 의한 세포의 생존률과 각종 용매 추출물에 대한 antioxidant 효과 측정

DNA와 비교하여 세포에서도 에탄올 용매 추출액들이 비슷한 양상을 나타내는지 알아보기 위하여 세포 QC779 와 GC4468에 석류씨, 느릅나무껍질, 포도씨, 녹차씨, 철쭉 추출물을 처리하여 shaking incubator에서 3시간 동안 배양시킨 후 배양액 10 μ l씩 LB medium에서 spreading culture 하여 24시간 동안 배양시킨 세포의 생존률과 PQ (2.5 μ M)를 첨가하여 30분간 배양한 후 추출물 (40 μ g)을 첨가하여 3시간 동안 배양시킨 배양액을 10 μ l씩 LB 고체배지에 spreading culture하여 24시간 동안 배양시켜 세포의 생존률을 비교해보았다 (Fig 6, 7).

비교 결과 두 세포 모두 비슷한 양상을 보였으며, 느릅나무껍질 추출물의 경우만 다른 양상을 나타내었다. 이때 실험에 사용된 위의 5가지 용매 추출물들은 세포에 대해서 생존률을 억제했다. 그 중에서도 PQ가 처리되지 않은 그룹에서는 석류씨 추출물 (Fig. 6, 7)이 첨가된 세포의 생존률이 가장 낮았으며, PQ가 첨가되었을 경우에는 포도씨 추출물 (Fig. 6, 7)이 첨가된 세포의 생존률이 가장 낮았다. 이것은 PQ의 성분과 포도씨 추출물의 성분이 결합하면서 더 강한 독성을 갖는다는 것을 의미 하는 것으로 보여진다. 이번 실험에서 주목해야 할 것은 DNA의 실험 결과PQ를 첨가한 후 용매 추출물들을 첨가하였을 때 다른 용매 추출물의 경우 세포생존률이 매우 낮았지만 녹차 추출물 (Fig. 6, 7)을 첨가한 경우에는 두 세포 모두 세포생존률이 2배 가까이 상승한 것으로써, 이는 녹차 추출물이 DNA에서 antioxidant효과를 보였던 것처럼 세포에서도 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

QC779

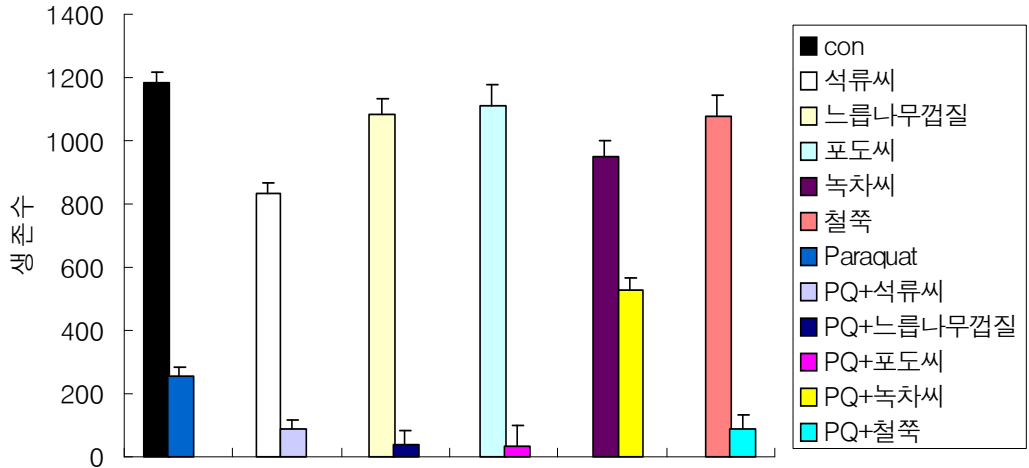


Fig.6. PQ 처리 시 각종 용매 추출물에 대한 QC779의 생존률 비교

con: 세포에 추출물 첨가 후 3시간 반응

PQ: 세포에 paraquat를 첨가하여 30분 반응시킨 후 추출물 첨가 후 3시간 반응

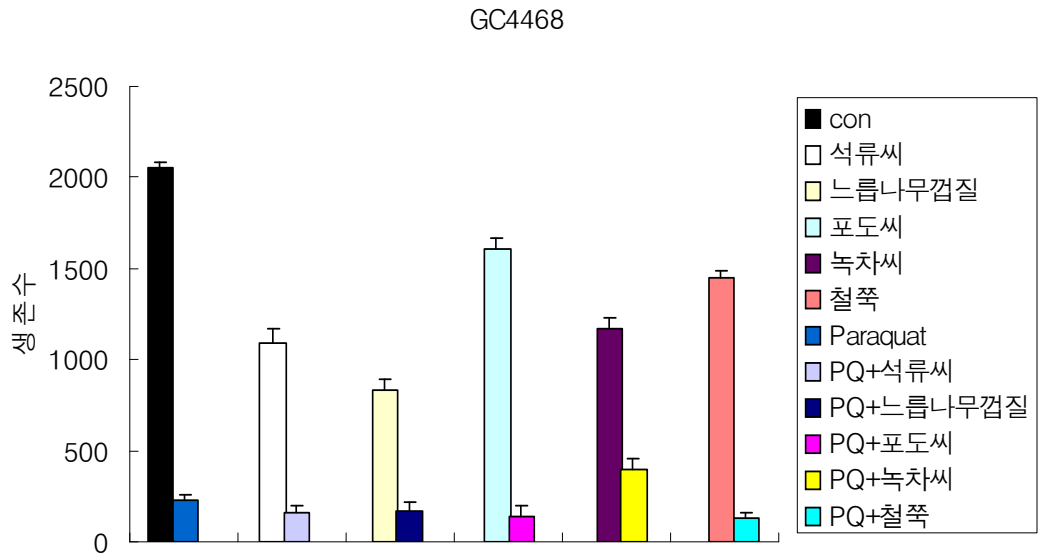


Fig.7. PQ 처리 시 각종 용매 추출물에 대한 GC4468의 생존률 비교

con: 세포에 추출물 첨가 후 3시간 반응

PQ: 세포에 paraquat를 첨가하여 30분 반응시킨 후 추출물 첨가 후 3시간 반응

3.3. 산화성 스트레스에 대한 세포의 성장을 비교

세포의 산화성 스트레스에 대한 녹차씨 추출물의 효과를 살펴보기 위하여 항산화제로 알려진 Pycnogenol (PYC)을 대조군으로 설정하여 OD₆₀₀에서의 세포생장률을 총 6시간에 걸쳐서 매시간 모니터링하여 비교하여 보았다. 이때 실험군은 control, PYC, 녹차씨추출물 (GTS), PQ, PQ+PYC, PQ+GTS 로 총 6개의 군으로 나누어 실험하였으며, 사용된 세포의 종류는 QC779와 GC4468를 사용하였다. 실험 결과 (Fig.8, 9) 시간대별 결과 양상이 매우 유사하였다. PQ를 처리하기 전의 PYC와 GTS의 성장률에 미치는 영향은 미세한 차이로 거의 나타나지 않았지만, PQ를 처리 한 후 30분 후 PYC와 GTS를 처리하여 성장률을 비교한 군에서는 PYC는 PQ만 처리 했을 때보다 세포생장률이 낮아지는 효과를 보였지만, GTS는 세포생장률을 두 세포 모두 약 1.5배정도 상승시키는 역할을 하는 것으로 나타났다 GTS가 PQ에 의한 산화성 스트레스에 대한 항산화적 역할을 하는 것으로 해석할 수 있다.

3.4. 항산화제 효과 비교

녹차씨 추출물이 다른 항산화제와 비교하였을 때 얼마나 효과적인지를 비교하기 위한 실험으로 α -tocopherol (5 mM), Butylated hydroxytoluene (BHT, 80 μ M), 녹차씨추출물 (10 μ g), Catechin (cate, 330 μ M)을 pUC19 plasmid DNA에 PQ (0.17 mM)를 처리하여 산화적 스트레스를 일으킨 다음 첨가하여 DNA의 손상복구 정도 여부를 확인하였다. 그 결과 (Fig.10) 본 실험에서는 항산화제로 알려진 α -tocopherol과 Catechin이 DNA의 회복에 전혀 효과가 나타나지 않았으며, 녹차씨 추출물은 기존에 잘 알려진 합성항산화제인 BHT와 같은 항산화적 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다.

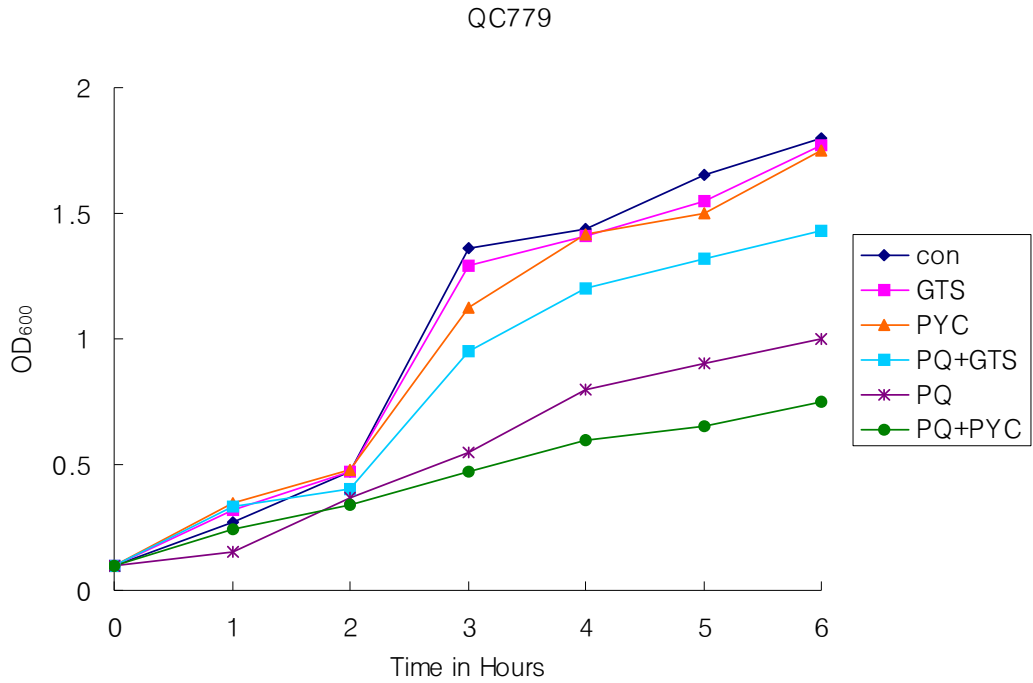


Fig.8. 녹차씨 추출물이 산화적 스트레스에 의한 QC779의 성장률에 미치는 영향
(실험 5회 평균치)

GTS: 녹차씨추출물(Green tea seed)

PYC: pycnogenol

PQ: paraquat

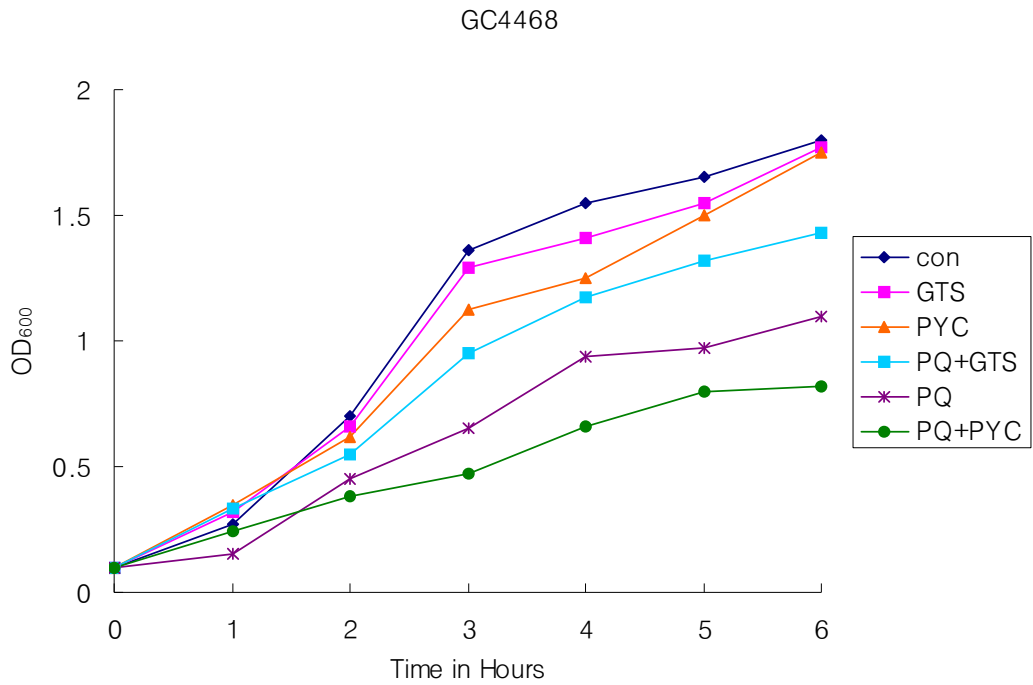


Fig.9. 녹차씨 추출물이 산화적 스트레스에 의한 GC4468의 성장률에 미치는 영향
(실험 5회 평균치)

GTS: 녹차씨추출물(Green tea seed)

PYC: pycnogenol

PQ: paraquat



Fig.10. pUC19 plasmid에 처치한 녹차씨 추출물과 기존 항산화제와의 항산화 효과 비교

PQ: Paraquat

α -toc: α -tocopherol

BHT: Butylated hydroxytoluene

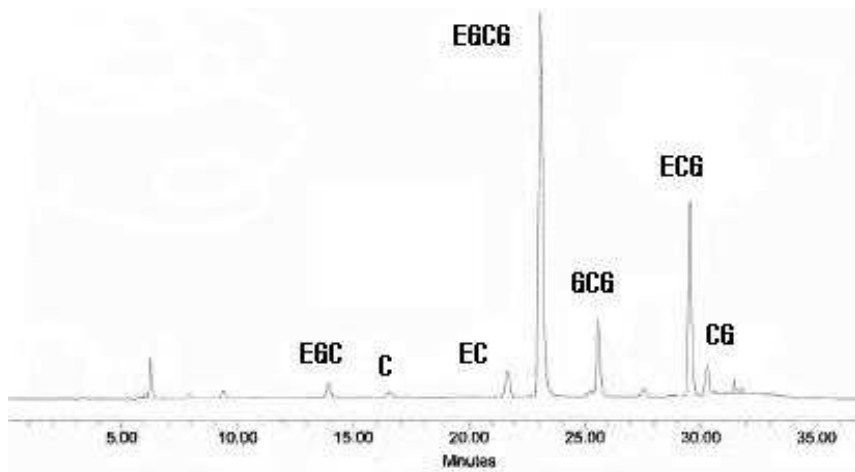
GTS: 녹차씨추출물(Green tea seed)

cate: Catechin

3.5. HPLC에 의한 녹차와 녹차씨의 성분분석

앞의 다양한 추출물의 항산화 효과를 실험 한 결과 가장 효과가 좋은 녹차씨 추출물과 녹차를 가지고 HPLC를 통하여 성분을 비교탐색 해보았다.(Fig.11) 녹차 안에는 Epigallocatechin, Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin gallate, Gallocatechin gallate, Epicatechin gallate, Catechin gallate이 있었고, 녹차씨 안에는 녹차에서는 발견되지 않은 Kaempferol 성분 2가지가 10분 전후로 검출되었다. Kaempferol은 중요한 플라보노이드 중의 하나로써, 지방과 DNA의 산화위험을 막고 강한 항산화작용을 하는 물질로써 (Kanakis, *et al.*, 2007, Lee, *et al.*, 2007) 녹차씨에 의한 DNA의 손상 회복과 Cell의 생존률 증가는 Kaempferol에 의한 것으로 사료된다.

(a)



(b)

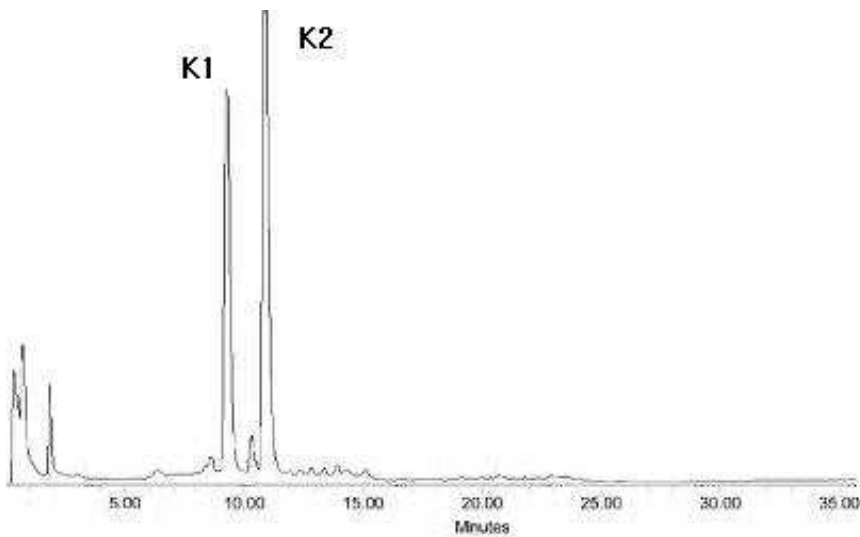


Fig.11. HPLC를 통한 녹차(a)와 녹차씨(b)의 성분분석

(a): Epigallocatechin (EGC), Catechin (C), Epicatechin (EC), Epigallocatechin gallate (EGCG), Gallocatechin gallate (GCG), Epicatechin gallate (ECG), Catechin gallate (CG)

(b): Keampferol (K1과 K2)

IV. 고 찰

프리라디칼과 노화의 관계는 프리라디칼의 병리적 또는 생리적 역할이 광범위하게 연구되고 활성산소종이 생체 내 여러 소기관인 소포체, 퍼옥시좀, 미토콘드리아 내와 세포질에서 각종 산화기작을 통해 생성되는 과산화수소와 함께 DNA, 단백질, 지질 등을 손상시킴으로 노화의 촉진에 밀접한 관계가 있으리라는 가정으로부터 출발하고 있으며, 유기대사를 하는 세포는 산화적 스트레스를 통한 손상을 피할 수 없기 때문에 노화이론으로써의 프리라디칼 이론은 현재 설득력을 지니게 되었다.

최근 노화 및 암, 염증, 동맥경화, 심장병, 치매 등 각종 질병과 프리라디칼과의 관련성이 대두되며 항산화제 (antioxidants)에 대한 연구가 활발하다 (Ames, *et al.*, 1993). 프리라디칼들은 생체막에 존재하는 불포화 지방산을 산화시켜 막의 유동성을 저해하고, 효소와 수용체의 활성을 손상시키며, 막 단백질에 손상을 입혀 결국 세포의 불활성화를 일으키는 작용을 하며 (Dean, *et al.*, 1993), DNA의 당-인산 골격이나 염기부분을 직접 공격하여 여러 가지 산화적으로 변성된 purines과 pyrimidines을 형성 시키는데, 이렇게 산화된 염기들은 DNA복제와 repair하는 동안 DNA변이를 일으켜 세포손상을 줄 수 있다.

항산화제는 프리라디칼 및 반응성 산소화합물의 생성의 방지, 활성도 경감, 손상된 조직의 복원 혹은 다른 항산화제의 기능을 향상시키는 물질을 총칭하는 의미로 사용되며, 효소계 항산화제와 비효소계 항산화제로 나뉘는데 효소계 항산화제 (SOD, catalase, glutathione system)는 미토콘드리아의 기질이나 각 조직에 존재하여 free radical 및 반응성 산소화합물의 독성을 제거함으로써 신체 항상성을 유지하는 역할을 하며 (Sen 과 Hanninen, 1994), 비효소계 항산화제 (비타민 E, C, B6, β -carotene, selenium, N-acetylcysteine) (Cemek, *et al.*, 2006; Sampayo-Reyes 와 Zakharyan, 2006; Szeto, *et al.*, 2006)는 항산화 효소와는 달리 외부에서 섭취해야 하며, 항산화 효소와 함께 연쇄반응을 일으켜 그 효과를 증대시키는 것으로 알려진다.

본 연구에서는 Paraquat를 처리하여 superoxide radical ($O_2^{\cdot -}$)를 유도한 후에

Paraquat에 의한 DNA와 세포의 손상의 항산화제 방어효과를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 최근 키위, 꽃양배추, 브로콜리와 같은 십자화과 야채 또는 토마토, 양파 및 도정하지 않은 곡류, 과일, 꽃, 나무, 홍삼, 해조류 등과 같은 인체 친화적이면서 다기능적 효능을 가진 천연물질들이 산화적 스트레스로 인한 DNA 손상 회복에 효과적이라는 보고 (Chen, *et al.*, 2007; Kawashima, *et al.*, 2007)가 이어지면서 이 분야에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 본 실험에서는 석류씨, 느릅나무껍질, 포도씨, 녹차씨, 철쭉의 추출물을 만들어 실험에 사용하였다. 그 결과 석류씨, 느릅나무껍질, 포도씨 추출물의 경우에는 prooxidant 효과를 나타내었으며, 녹차씨 추출물의 경우에는 세포의 생존률과 성장률을 상승시키면서, DNA 손상도 회복시켜 주는 것으로 보아 antioxidant 효과가 있는 것으로 사료된다. 이에 녹차씨의 antioxidant 효과를 가지는 성분을 알아보기 위하여 녹차씨 추출물을 HPLC를 통하여 분석해보았다. 그 결과 (Fig.11) 녹차씨의 성분에서 Kaempferol 성분이 확인되었는데 이들 Kaempferol은 중요한 플라보노이드중의 하나로써, 지방과 DNA의 산화위험을 막고 강한 항산화작용을 하며 (Kanakis, *et al.*, 2007, Lee, *et al.*, 2007), 혈액 안에서 혈소판을 만들고 LDL (low density lipoprotein)의 산화를 막아 동맥경화증을 예방하며 (Hirano, *et al.*, 2007), 암 세포 형성을 억제하는 화학적 예방 작용제로서 활동하는 물질로 밝혀져있다 (Leung, *et al.*, 2007). 또한 quercetin과 Kaempferol을 함께 적용하면 암세포들의 증식을 줄이는 상승작용을 통하여 각각의 플라보노이드의 첨가 때보다 더 효과적이라는 보고 (Kanashiro, *et al.*, 2007) 도 있다. 따라서 녹차씨 추출물의 성분인 Kaempferol은 강력한 항산화제 역할을 하고 있으며 paraquat에 의한 손상의 회복의 치료제로서의 큰 가능성을 갖는다고 사료된다.

V. 참고문헌

- Adelson, R., F.L. Saul and B.N. Ames. 1988. Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2706-2708.
- Aldrick, T.K., A.B. Fisher, E. Cadenas, B. Cahnce. 1983. Evidence for lipid peroxidation by paraquat in the perfused rat lung. *J Lab Clin Med.* 101:66-73.
- Ames, B.N., M.K. Shigenaga, T.M. Hagen. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:7915-22.
- Asuncion, J.G., A. Millan, R. Pla., L. Bruseghini, A. Esteras, F.V. Pallardo, J. Sastre, J. Vina. 1996. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.* 10:333-338.
- Ayaki, H., M.J. Lee, K. Sumino, H. Nishio. 2005. Different cytoprotective effect of antioxidants and change in the iron regulatory system in rodent cells exposed to paraquat or formaldehyde. *Toxicology.* 208:73-79.
- Barja, G., A. Herrero, 2000. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.* 14:312-8.
- Cemek, M., S. Dede, F. Bayrioglu, H. Caksen, F. Cemek. and N. Mert. 2006 Relationship between antioxidant capacity and oxidative stress in children with acute hepatitis A. *World J Gastroenterol.* 12(38):6212-6215

- Chen, W.J., J., Wang, X.Y., Qi, B.J., Xie. 2007. The antioxidant activities of natural sweeteners, mogrosides, from fruits of *Siraitia grosvenori*. *Int J Food Sci Nutr.* 12:1-9
- Cotelle, N. 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.* 1(6):569-90. Links
- Croft, KD. 1998. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci.* 854:435-42.
- Cui, Y., J.P. Barford. and R. Renneberg. 2006. A disposable, screen-printed electrode for the amperometric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyroxinase. *Anal. Sci.* 22(10):1279-1281.
- Datta, P., S., Basu, S.B., Chakravarty, A., Chakravarty, D., Banerjee, S., Chandra, A.. Chakrabarti. 2006. Enhanced oxidative cross-linking of hemoglobin E with spectrin and loss of erythrocyte membrane asymmetry in hemoglobin Ebeta-thalassemia. *Blood Cells Mol Dis.* 37(2):77-81.
- Dean, R.T., Giese, M.J. Davies. 1993. Reactive species and their accumulation on the radical damaged proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18:437-41.
- Er, T.K., S.M., Tsai, S.H., Wu, W., Chiang, H.C., Lin, S.F., Lin, S.H., Wu, L.Y., Tsai, T.Z., Liu. 2007. Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. *Clin Biochem.* 40(13-14):1015-9.
- Ethen, C.M., C., Reilly, X., Feng, T.W., Olsen, D.A., Ferrington. 2007. Age-related macular degeneration and retinal protein modification by

4-hydroxy-2-nonenal. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48(8):3469-79.

Flora, S.J. 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol.* 53(1):1-2.

Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science.*

Fukumoto, L.R., Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 48(8):3597-604.
Links

Gonzalez-Gay, M.A.,C., Gonzalez-Juanatey, J., Martin. 2005. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum.* 35(1):8-17.

Halliwell, B. 1995. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann. Rheum. Dis.* 53:505-510.

Halliwell, B. 1997. Antioxidants and Humandisease : A General Introduction. *Nutrition Reviews.* 55(1):267-277.

Halliwell, B., J., Rafter, A., Jenner. 2005. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr.* 81(1 Suppl):268S-276S.

Heffner , J.E., J.E. Repine. 1989. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am. Review of Respiratory Eisease.* 140:531-554.

Herrero, A., G. Barja. 2001. Effect of aging on mitochondrial and nuclear DNA oxidative damage in the heart and brain throughout the life-span of

- the rat. *J. Am. Aging Assoc.* 24:45–50.
- Hirano, R., W., Sasamoto, A., Matsumoto, H., Itakura, O., Igarashi, K., Kondo. 2001. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 47(5):357–62.
- Jenkin, R.R., A. Goldfarb. 1993. Introduction: oxidative stress, aging, and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc. Sports Med.* 25(2):210–12.
- Ji, L.L. 1994. Oxidative stress during exercise : Implication of antioxidant nutrients. *Free Radical Biology Medicine*. 18(6):1079–1086.
- Ji, L.L., C. Leeuwenburgh, S. Leichtweis, M. Gore, R. Feibig, J. Hollander, J. Bejma. 1998. Oxidative stress and aging. *Annals New York Academy of Science*. 854:102–117.
- Kalpakcioglu, B., K., Senel. The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*.
- Kanashiro, A., J.G., Souza, L.M., Kabeya, A.E., Azzolini, Y.M., Lucisano-Valim. 2007. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group. *Z Naturforsch [C]*. 62(5–6):357–61
- Kawashima, A., T., Madarame, H., Koike, Y., Komatsu, J.A., Wise. 2007. Four week supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates increased protective serum antioxidants and folate and decreased plasma

- homocysteine in Japanese subjects. *Asia Pac J Clin Nutr.* 16(3):411-21.
- Kim, H.J., H.O., Lee, D.B., Min. 2007. Effects and Prooxidant Mechanisms of Oxidized alpha-Tocopherol on the Oxidative Stability of Soybean Oil. *J Food Sci.* 72(4):C223-30.
- Kim, Y.G, H.Y, Park. 2004. The effects of Pycnogenol on DNA damage in vitro and expression of superoxide dismutase and HP1 in Escherichia coli SOD and catalase deficient mutant cells. *Phytother.Res.* 18(11):900-905
- Kitamura, Y., S. Hashimoto, N. Mizuta, A. Kobayashi, K. Looguchi, I. Fujiwara, et al. 2001. Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 163:762-769.
- Lahouel, M., S., Amedah, A., Zellagui, A., Touil, S., Rhouati, F., Benyache, E., Leghouchi, H., Bousseboua. 2006. The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti- and pro-oxidant effect and flavonoids concentration. *Therapie.* 61(4):347-55.
- Lee, M.K., H.Y., Jeon, K.Y., Lee, S.H., Kim, C.J., Ma, S.H., Sung, H.S., Lee, M.J., Park, Y.C., Kim. 2007. Inhibitory constituents of *Euscaphis japonica* on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglia. *Planta Med.* 73(8):782-6
- Lee, K.W., H.J. Lee. 2006. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors.* 26(2):105-21.
- Lee, T.B, D.Y. Lim, H.J. Jeon, Y.D. Min, K.C. Kim, K.J. Kim et al. 2003. Differential induction of Mn-containing superoxide dismutase by paraquat in peripheral lymphocytes of normal subjects and gastric cancer patients.

Mol cells. 16:13–18.

Leung, H.W., C.J., Lin, M.J., Hour, W.H., Yang, M.Y., Wang, H.Z. Lee. 2007. Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol.* 45(10):2005–13.

Linnane, A.W., M. Kios, L. Vitetta. 2007. Healthy aging: regulation of the metabolome by cellular redox modulation and prooxidant signaling system: the essential roles of superoxide anion and hydrogen peroxide. *Biogerontology.* 8(5):445–67.

Lushchak, V.I. 2006. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *Acta. Biochim. Pol.* 24:72–89.

Manzoori, K.L., M., Amjadi, M., Orooji. 2006. Application of crude extract of Kohlrabi (*Brassica oleracea gongylodes*) as a rich source of peroxide in honey samples. *Anal. Sci.* 22(9):1201–1206.

Marx, G. 1987. Site specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper(II) and ascorbate. *Biochem. J.* 236:397–400.

Melov, S., P.E. Coskun, D.C. Wallace. 1999. Mouse models of mitochondrial disease, oxidative stress, and senescence. *Mutat. Res.* 434:233–247.

Olinski, R., A., Siomek, R., Rozalski, D., Gackowski, M., Foksinski, J., Guz, T., Dziaman, A., Szpila, B., Tudek. 2007. Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim*

Pol. 54(1):11–26.

Onyon, L.J., G.N. Volans. 1987. The epidemiology and prevention of paraquat poisoning. *Human Toxicol* 6:19–29.

Powers, S.K., D. Criswell, J. Lawler, D. Martin, F.K. Lieu, L.L. Ji, R.A. Herb. 1993. Rigorous exercise training increase superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am. J. Physiol.* 265:H2094–H2098.

Robaszekiewicz, A., A., Balcerczyk, G., Bartosz. 2007. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int.* 31(10):1245–50.

Ryan-Harshman, M., W., Aldoori. 2005. The relevance of selenium to immunity, cancer, and infectious/inflammatory diseases. *Can J Diet Pract Res.* 66(2):98–102.

Sampayo-Reyes, A., and R.A. Zakharyan. 2006. Tocopherol esters inhibit human glutathione S-transferase omega. *Acta. Biochim. Pol.* 53(3):547–552.

Sen, C.K., O. Hanninen. 1994. Physiological antioxidants. In exercise and oxygen toxicity, edited by Sen C.K., O. Hanninen, L. Paker. *Elsevier Science.* 89–126.

Senator, A., W., Rachidi, S., Lehmann, A., Favier, M., Benboubetra. 2004. Prion protein protects against DNA damage induced by paraquat in cultured cells. *Free Radic Biol Med.* 37(8):1224–30.

Sies, H., W., Stahl, A., Sevanian. 2005. Nutritional, dietary and post-prandial oxidative stress. *J Nutr.* 135(5):969–72.

- Simić, A., Manojlović, D., Segan, D., Todorović, M. 2007. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*. 12(10):2327-40.
- Smirnova, E.G., Y.I., Lyubimov, T.G., Malinina, E.Y., Lyubimova. N.I., Alexandrushkina, B.F., Vanyushin, G.M., Kolesova, L.S., Yaguzhinsky. 2002. Ionol (BHT) produces superoxide anion. *Biochemistry (Mosc)*. 67(11):1271-5.
- Szeto, Y.T., W.K. Chu, and I.F. Benzie. 2006. Antioxidants in fruits and vegetables: a study of cellular availability and direct effects on human DNA. *Biotech. Biochem*. 70(10): 2551-2555.
- Tatla, S.R., V. Woodhead, J.C. Foreman, B.M. chain. 1999. The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cell. *Free. Radic. Biol. Med*. 26:14-24.
- Uhal, B.D., L. Joshi, A.L. True, S. Mundle, A. Raza, A. Pardo, et al. 1995. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 269:819-28.
- Valko, M., H., Morris, M.T., Cronin. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 12(10):1161-208.
- Wang, E., A. Wong, G. Cortopassi. 1997. The rate of mitochondrial mutagenesis is faster in mice than in humans. *Mutat. Res*. 377:157-166.

감사의 글

먼저 본 논문의 처음 연구계획에서부터 완성에 이르기까지 학문적 기틀을 잡아 주시고 친절하고 소상한 가르침을 베풀어 주셨던 지도교수이신 김영곤 교수님께 머리 숙여 깊은 감사를 드립니다. 그리고 바쁜 와중에도 논문심사과정을 통하여 아낌없는 격려와 지도를 하여 주신 박현용, 이현화 교수님께 감사를 드립니다.

지난 2년이라는 시간은 저에게 있어서 앞만 보고 달려와 놓친 것, 잃은 것도 많은 시간이었지만 그 만큼 제 인생 전체를 볼 때 가장 큰 발전과 발돋움의 기간이었습니다. 이렇게 변화할 수 있게 도와주신 제 주위에 모든 분들에게 감사의 말씀을 드립니다.

언제나 가까이에서 저의 많은 부분을 공유해주고 큰 힘이 되어주며 항상 긍정적인 마인드로 저에게 힘을 주었던 실험실 동기 지민이에게 많이 고맙고, 논문 작업 내내 의지가 되었고 인생의 많은 조언을 해준 정숙언니에게 고맙습니다.

그리고 유머러스하고 뛰어난 우리 실험실 막내 은지 덕분에 항상 좋은 분위기에 서 많은 자극을 받을 수 있었습니다. 또한 사랑하는 계연이와 대도무문의 길을 걷는 안성오빠에게 항상 힘과 용기를 주어서 고맙다고 전하고 싶습니다.

마지막으로 늘 저를 믿어주시고 항상 투자를 아낌없이 해주신 할아버지, 할머니, 그리고 아빠에게 마음 깊이 감사드리고 부족하지만 대학원 생활의 결실인 이 논문을 바치고 싶습니다. 가슴 깊이 사랑합니다.

이제 졸업을 앞두고 사회를 나가는 문턱에 서니 설레임과 두려움이 앞섭니다. 하지만 지금까지 해왔던 것처럼 주위의 모든 분들께 실망시키지 않고 후회 없는 삶을 살도록 하루 하루 노력하는 사람이 되겠습니다. 감사합니다.

2007년 11월

김 설 영 올림

저작물 이용 허락서

학 과	생물학과	학 번	20067029	과 정	석사
성 명	한글: 김 설 영 한문 : 金 設 瑛 영문 : Kim Seol-Yeong				
주 소					
연락처	E-MAIL : tjfud2735@naver.com				
논문제목	한글 : 산화성 스트레스에 의한 DNA의 회복에 미치는 녹차씨 추출물의항산화제 효과 영어 : The Antioxidant Effects of Green Tea Seed Extracts Against DNA under Oxidative Stress				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대()

2008년 2월 22일

저작자: 김 설 영 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하