

## *In Vitro* Comet Assay를 이용한 수입산 녹용과 국산 녹용의 DNA 손상 보호 효과 비교 연구

경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과, <sup>1</sup>한남대학교 이과대학 식품영양학과

박 유 경 · 전 은 재<sup>1</sup> · 강 명 희<sup>1</sup>

### The Inhibitory Effect of Antler on DNA Damage Using *in Vitro* Comet Assay

Yoo Kyoung Park, Eun-Jae Jean<sup>1</sup> and Myung-Hee Kang<sup>1</sup>

Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science,  
Kyung Hee University, Seoul 130-701, <sup>1</sup>Department of Food and Nutrition,  
Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

The growing antler has been used for the treatment of various diseases in oriental medicine. Many reports made it evident that deer antlers have various effects: anti-inflammatory effects, anti-stress activities and anti-aging activities. This study was designed to investigate the anti-oxidant activity of antler extract or antler extract+herbal mixture. In addition, the anti-oxidant effect was compared between Korean antler and Russian antler. Human lymphocyte cells were treated with freeze-dried antler extract mixture at several doses that does not induce cytotoxicity (250, 1000, 20,000 $\mu$ g/ml) for one hour at 37°C. Cells were harvested and then treated with 100 $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 min at 4°C as an oxidative stress. Evaluation of the oxidative damage was performed by Comet assay (single-cell gel electrophoresis). Quantification was done by analyzing the tail moment of fragmented DNA migrated in the tail and then were expressed as relative score in relation to the damage of the positive control. Compared to the negative control cells, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated cells showed a considerable DNA damage to the cells. Pre-treatment of antler extract mixture at a dose of 250, 1,000, 20,000 $\mu$ g/ml reduced the oxidative damage for 43.6, 56.8, 87.7%, respectively. The protective effect on DNA damage was greater in Korean antler (62.7%) than Russian antler (31.2%) and overall protective effect was higher in the antler alone than antler mixtures. These results indicate that antler treatment to human lymphocyte cells followed by oxidative stimulus (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inhibited damage to cellular DNA, supporting a possible protective role against oxidative damage induced by reactive oxygen species.

**Key Words:** Deer antler, DNA damage, Comet assay, Human lymphocyte cell

## 서 론

녹용은 옛부터 원기회복, 식욕 증진의 목적으로 사용되어 왔다. 동의보감 등을 통해 잘 알려진 녹용의 효능으로는 빈혈치료, 간기능 개선, 동맥경화 방지, 골다공증 억제, 만성피로회복 및 당뇨치료 등이 있다. 녹용은 사슴의 뿔이 각질화되기 전에 채취 가공하여 말린 것으로 특히 우리나라는 그 수요가 해마다 늘어나 전세계 녹용 생산량의 80%가 국내로 수입되어 소비되고 있는 실정이다.

녹용의 유효 성분과 생리적 효과에 대하여 명확하게 밝혀지고 있지 않지만 녹용의 생화학적 성분들을 분석한 선행 연구들을 미루어 볼 때 녹용 중의 여러 성분들이 단독 또는 복합적으로 생체에 작용하여 생리활성을 나타내는 것으로 보인다.<sup>1)</sup> 녹용의 효능·효과에 관련된 선행연구들을 살펴보면, 녹용의 물 추출액이 병아리 등의 성장을 촉진시키고,<sup>2~4)</sup> 조혈작용이 있으며,<sup>5)</sup> 골다공증 개선효과<sup>6,7)</sup> 및 간기능 개선 등에 효과가 있다는 연구가 주를 이루고 있으나, 녹용의 항암 혹은 항산화 효과에 대한 연구는 충분하지 않다.

노화, 흡연, 환경 오염 등으로 인해 생성된 활성산소(free radical)는 활성산화물질(reactive oxygen species, ROS)의 생산을 비정상적으로 증가시켜 세포 내 항산화 체계의 방어 한계를 넘어서게 되면 산화적 스트레스가 일어나 DNA 손상을 유발시키고 노화를 촉진하거나 암을 비롯한 만성질환을 일으키게 된다.<sup>8)</sup> DNA 손상을 측정함으로써 암 등의 질환요인의 가능성을 예측할 수 있는데 Single cell gel electrophoresis라고 불리는 Comet assay는 각각의 세포수준에서의 DNA 손상을 빠르고 민감하게 감지해 낼 수 있으며 실험과정이 간단하며 DNA 손상과 시험물질(항산화제 또는 식품 등)과의 관계를 쉽게 관찰할 수 있다.<sup>9,10)</sup> Comet assay를 이용한 세포 DNA 손상과 시험물질과의 관계를 보인 선행연구를 살펴보면, phenolic compound,<sup>11)</sup> flavonoids 및 vitamin C<sup>12,13)</sup> 등의 특정 성분물질에 대한 연구와 brussels sprout,<sup>14)</sup> 녹즙<sup>15)</sup> 등의 식품에 대한 항 돌연변이 효과를 관찰한 연구보고가 발표되고 있으나 녹용에 대한 DNA 손상 감소효과에 대한 연구가 거의 없는 실

정이다. 더구나 최근 수입산 녹용의 수입이 주를 이루는 가운데 국산 녹용과 수입산 녹용의 생리활성을 비교한 연구는 보고된 바 없다.

따라서, 본 연구는 녹용이 산화적 손상을 받은 인체 임파구 세포 DNA에 있어 DNA 손상 보호 효과를 가지고 있는지 알아보고, 국산 녹용과 수입 녹용의 DNA 손상 보호 효과는 어느 정도 차이가 있으며, 약제를 첨가한 녹용에 있어서는 어떠한 결과를 미치는지 관찰하려는 목적으로 시도되었다.

## 재료 및 방법

### 1) 녹용시료의 제조

본 연구에 사용된 녹용 추출시료는 청양 사슴 영농 조합에서 제조, 판매되고 있는 국산 아이디어 녹용(국산 녹용 37.5 g+당귀 25 g+생강 10 g+대추 65 g) 제품의 성분을 기준으로 국산 녹용(DA, domestic antler), 수입 녹용(RA, russian antler), 국산 녹용+당귀+생강+대추 혼합액(DA+Herbs), 러시아산 수입 녹용+당귀+생강+대추 혼합액(RA+Herbs)을 한약 탕기를 이용하여 같은 조건으로 원탕 4시간, 재탕 4시간 모두 8시간 달여 제조한 추출액을 사용하였다. 4가지 추출액은 4°C, 9,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 취하고 milipore filter (0.45µm)로 여과 멸균하여 동결 건조한 후 증류수에 희석하여 최고농도 (0.2 g/ml)의 stock solution을 만들어 eppendorf tube에 옮기고 -80°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

### 2) 세포 내 DNA 손상의 측정

(1) Human peripheral blood lymphocytes 분리: 건강한 성인 여자의 혈액을 채취하여 100µl 전혈을 1 ml RPMI-1640 (10% FBS)와 섞은 후, 200µl Histopaque 1077을 underlay하여 원심분리(1,300 rpm, 6 min)한 뒤 상층의 PBS와 histopaque 사이의 band 부분 약 100µl를 1 ml RPMI-1640 (10% FBS)에 섞어 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 lymphocytes storage buffer (40% RPMI-1640, 50% FBS, 10% DMSO)에 넣어 -80°C 냉동고에 보관하였고 1달을 넘기지 않았다. 실험에 사용할

때는 저장된 lymphocytes를 실온에서 재빨리 녹이고 원심분리하여 상층액이 제거된 cell에 950 $\mu$ l PBS와 50 $\mu$ l RPMI-1640 (10%FBS)을 섞어 냉장고에 5 min 정도 안정화시킨 후 원심분리 한 후 상층액을 제거하여 사용하였다.

(2) 녹용의 전처리와 산화적 스트레스 유발: 동결 건조한 녹용시료는 적절한 농도(5~20,000 $\mu$ g/ml)로 희석한 뒤 4°C, 30 min의 조건하에 lymphocytes에 pre-treatment하며, 산화 스트레스에 의한 DNA 손상을 유발시키기 위해 100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 4°C, 5 min 동안 반응시킨다. Negative control은 시료를 처리하지 않았고 Positive control은 negative control에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하였다.

(3) Single-cell gel electrophoresis: Normal melting agarose (NMA)가 precoating된 fully frosted slide 위에 모든 처리를 끝낸 cell과 75 $\mu$ l의 0.7% low melting agarose gel (LMA)의 현탁액을 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 $\mu$ l로 한 겹 더 덮었다. 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris)는 사용직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 준비된 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지 시켰다. Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 4°C의 차가운 buffer (300 mM NaOH, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA)를 채워 unwinding 시켰다. 40분이 지난 후 25 V/300 $\pm$ 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충용액(pH 7.5)으로 충분히 세척하였다.

(4) Image Analysis: Comet image 분석을 위해 20 $\mu$ g/ml 농도의 ethidium bromide로 nucleotides를 염색하여 형광현미경(Leica DMLB, Germany)에서 관찰하고 CCD camera를 통해 보내진 각각의 세포 핵 image는 comet image analyzing system이 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 처리구 당 2개의 slide를 만들어 그 중에서 각각 50개 세포를 관찰하여, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 DNA 손상 및 녹용 시료에 의한 DNA 손상 억

제정도를 측정하였고 각 처리구는 최소 3회 반복 실험하였다.

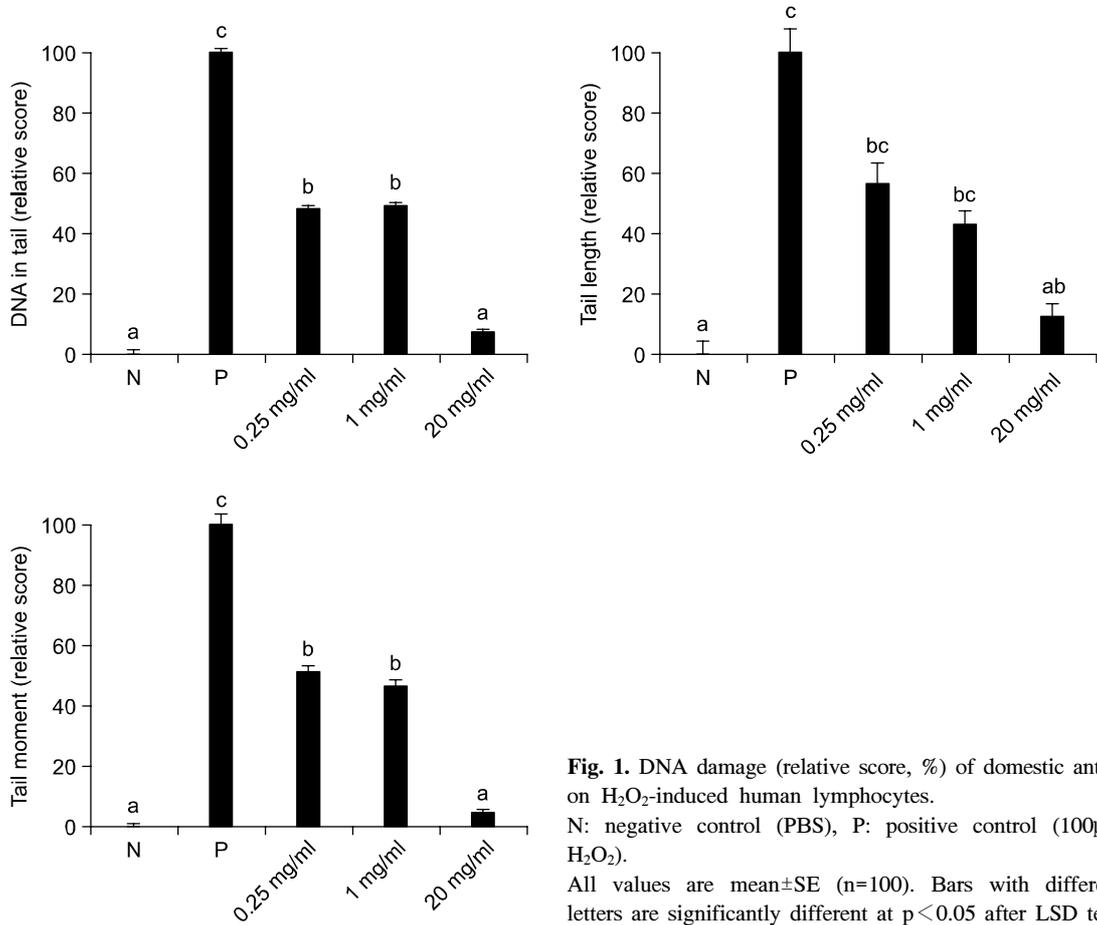
### 3) 통계처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 처리구별로 50개의 세포에서 측정된 DNA 손상도(TL, TM, % DNA in tail)의 평균값과 표준오차를 구하였으며, 각 녹즙의 DNA 손상 억제 정도를 비교하기 위해 농도별로 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하였고 모든 통계적 유의성은  $p < 0.05$  수준에서 평가하였다.

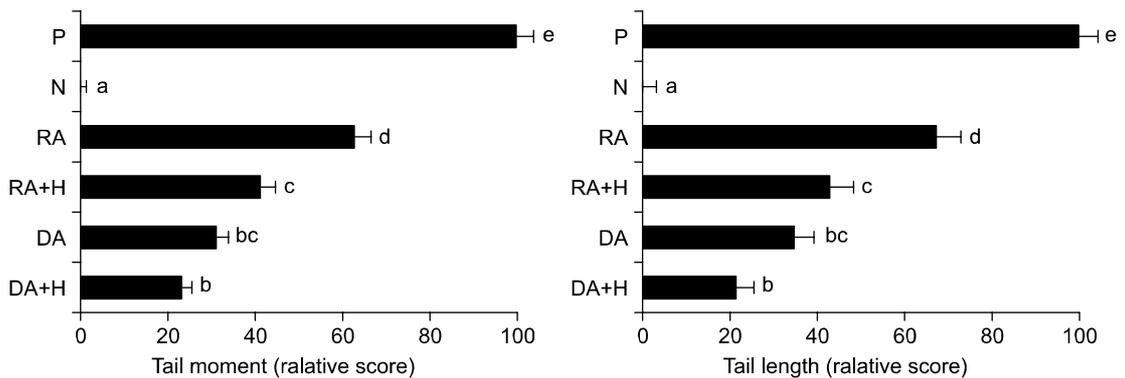
## 결과 및 고찰

국산 녹용의 인체 임파구 DNA 손상 감소효과에 대한 comet image 분석결과는 Fig. 1에 나타내었다. Tail%DNA의 경우 녹용의 처리 농도가 0.25, 1, 20 mg/ml로 증가함에 따라 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 산화적 손상에 대한 DNA 감소효과가 positive control (100 $\mu$ M)에 비하여 52%, 51%, 93%의 DNA 손상 감소효과가 나타났고, tail length ( $\mu$ m)의 경우에는 녹용의 처리 농도가 증가할수록 positive control보다 49%, 53%, 95%의 DNA 손상 감소효과가 나타났으며 tail moment도 positive control에 비해 녹용의 처리 농도가 0.25, 1, 20 mg/ml로 증가할수록 44%, 57%, 88%의 DNA 손상 감소효과가 나타났다. 전반적으로 0.25 mg/ml의 모든 시료에서 약 50% 정도의 DNA 보호효과가 나타났으며 20 mg/ml의 고농도에서도 독성은 보이지 않았다. 국산 녹용과 수입 녹용에 대한 DNA 손상 감소효과는 50% 정도의 DNA 손상 감소효과를 보였던 250 $\mu$ g/ml의 처리 농도에서 살펴본 결과는 Fig. 2에 나타내었다. Tail%DNA의 경우 국산 녹용(65%)이 수입 녹용(33%)보다 DNA 손상 감소효과가 2배나 크게 나왔으며, tail moment의 경우도 국산 녹용(69%)이 수입 녹용(37%)보다 DNA 손상 감소효과가 크게 나왔다.

동의보감에 의하면 생강과 대추는 모든 약재들이 가지고 있는 독성을 중화하는 작용이 있다고 알려져 있다.<sup>16)</sup> 당귀(Angelica gigas)는 세포면역 개선작용, 항염증 및 혈소판 응집 억제와 혈액 순환 개선 작용 그리고 항균작용이 있고,<sup>16)</sup> 생강



**Fig. 1.** DNA damage (relative score, %) of domestic antler on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced human lymphocytes. N: negative control (PBS), P: positive control (100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). All values are mean±SE (n=100). Bars with different letters are significantly different at p<0.05 after LSD test.



**Fig. 2.** Comparison of inhibitory effect of imported antler (RA, RA+H), domestic antler (DA, DA+H) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. P: positive control (100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), N: negative control (PBS), RA: Russian Antler, RA+H: Russian Antler+Herbs, DA: Domestic Antler, DA+H: Domestic Antler+Herbs. All values are mean±SE (n=100). Bars with different letters are significantly different at p<0.05 after LSD test.

(*Zingiber officinale ROSC.*)은 항염작용, 항응혈작용, 혈중 cholesterol 상승 억제 작용이 있으며,<sup>17)</sup> 대추(*Zizyphus jujuba Miller var. inermis Rehd.*)는 천연자양 강장제로써 위장을 튼튼하게 하며 빈혈 개선작용<sup>16)</sup> 및 백혈구내의 c-AMP함량을 상승시켜 기관지 천식작용을 완화 시키는 역할을 한다<sup>17)</sup>고 한다. 한약재 열수추출물의 항산화 효과를 검증한 연구에서도 당귀는 대조군에 비해 전자공여능(80%)과 OH 소거 효과(62%)가 모두 50% 이상의 좋은 효과를 보였으며 생강 또한 전자공여능(65%)과 OH 소거 효과(41%)가 비교적 40% 이상의 효과를 보였다.<sup>18)</sup> 녹용에 위와 같은 약재(당귀, 생강, 대추)들을 첨가하여 산화적 손상에 대한 DNA 손상 감소효과를 살펴본 결과, Tail%DNA의 경우 국산 녹용에 약재를 첨가한 시료(79%)가 수입 녹용에 약재를 첨가한 시료(57%)보다 1.4배 정도의 감소효과가 크게 나타났으며 tail moment의 경우도 국산 녹용+약재 시료(77%)가 수입 녹용+약재 시료(59%)보다 인체 임파구 DNA 손상 감소효과가 크게 나타났다(Fig. 1). 녹용에 약재를 첨가하였을 때가 녹용만을 비교한 실험 결과보다 DNA 손상 감소효과가 1.5~2배 정도 증가하였는데 이는 당귀, 생강, 대추의 약재들이 가지고 있는 효능이 녹용과 상승효과를 가져오는 것으로 사료된다.

### 요약 및 결론

녹용의 수요는 해마다 늘어나 세계 총 생산량의 80%를 수입할 정도로 증가하고 있는 실정이며, 수입 녹용은 뉴질랜드, 러시아, 캐나다산이 주를 이루고 있다. 뉴질랜드 녹용은 우리나라에 가장 많이 수입되고 있지만 기후적 특성상 생산된 녹용의 질이 매우 우수하여 비싼 가격에 수입되고 있는 녹용은 러시아산이다. 현재 국산 녹용의 시장 점유율은 20%가 조금 넘고 있지만 매년 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 녹용의 약리적 효능에 대해서는 많이 알려져 있지만 그 효능을 뒷받침할 연구보고는 그리 많지 않으며, 특히 항독성·항돌연변이 관련 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 그 일환으로 단시간에 간단하며 민감하게 DNA 손상을 분석하는 comet assay를 통해 human

lymphocytes에서 산화적 손상에 대한 녹용의 DNA 손상 감소효과를 살펴보았다. 녹용은 250 mg/ml 농도에서 DNA 손상 감소효과가 50% 이상 보였고, 국산 녹용이 수입 녹용보다 DNA 손상 감소효과가 컸으며 녹용에 약재를 첨가하면 약재의 효능이 더해져 DNA 손상 감소효과가 증가하였다.

### 참 고 문 헌

- 1) 강춘기, 김성환. 녹용의 영양·생화학적 고찰. 한국식품영양학회지 1989; 2: 65-71.
- 2) 배대식. 동물의 발육에 미치는 녹용의 효과에 관한 연구; 제1보 녹용의 투여수준이 병아리의 중체량, 사료요구율 및 장기발육에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 1975; 17: 571-576.
- 3) 배대식. 동물발육에 미치는 녹용의 효과에 관한 연구; 제2보 녹용의 투여가 병아리의 장기발육과 혈액상에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 1976; 18: 342-348.
- 4) 배대식. 동물발육에 미치는 녹용의 효과에 관한 연구; 제3보 녹용의 투여가 종계의 조정능력에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 1977; 19: 407-412.
- 5) 김길원, 박시원. 녹용추출액의 조절작용에 관한 연구. 한국생화학회지 1982; 15: 151-157.
- 6) 안덕균, 심상도. 녹용이 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 대한본초학회지 1998; 13: 1-23.
- 7) 심상도, 안덕균. 녹용이 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 대한본초학회지 1999; 14: 153-166.
- 8) Anthony TD. Antioxidants and disease prevention. *Mol Aspects of Med* 1994; 15: 293-376.
- 9) Singh P, McCoy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-191.
- 10) Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Micogel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 1994; 307: 323-333.
- 11) Melissa R, Jing X, Karen E, George L. Disparate effects of similar phenolic phytochemicals as inhibitors of oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res* 2001; 485: 309-318.
- 12) Mostafa N, Wilson JA, Michael E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 1210-1218.

- 13) 박유경, 전은재, 강명희. Comet assay를 이용한 flavonoids와 항산화 비타민의 인체임파구 세포 DNA 손상 보호 효과. 한국영양학회지 2001; 36: 125-132.
  - 14) Zhu C, Loft S. Effects of brussels sprouts extracts on hydrogen peroxide-induced DNA strand breaks in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology* 2001; 39: 1191-1197.
  - 15) 전은재, 김정신, 박유경, 김태석, 강명희. Comet assay를 이용한 케일, 명일엽, 당근, 돌미나리 녹즙의 Chinese Hamster Lung 세포 DNA 손상 보호 효과. 한국영양학회지 2003; 36: 24-31.
  - 16) 신재용. 내마음대로 달여 마시는 건강약재. 서울: 도서출판 삶과 꿈, 1997; pp 48-52.
  - 17) 신민교. 원색임상분초학. 서울; 영림사, 1996; pp 284.
  - 18) 남석현, 강미영. 한약재 열수추출물의 항산화효과 검정. 한국응용생명화학학회지 2000; 43: 141-147.
-