

## *Ginkgo biloba* 잎 추출물의 1,2,4-benzenetriol에 대한 항산화효과에 대한 연구

이영준 · 김태연 · 정해원<sup>†</sup>  
서울대학교 보건대학원

### Protective Effects of *Ginkgo Biloba* Leaf Extract(GBE) against 1,2,4-benzenetriol Induced Toxicity *in Vitro*

Young Joon Lee, Tae Yon Kim and Hai Won Chung<sup>†</sup>

School of Public Health, Seoul National University

(Received 2 February 2001 ; Accepted 20 February 2001)

#### ABSTRACT

*Ginkgo biloba* has been used for bronchitis and asthma in oriental countries and its leaf extract(GBE) contains 24% ginkgoflavone glycoside and 6% terpenoid. Flavonoids and terpenoids are known to have various antioxidant effects such as scavenging of free radicals and chelation of transitional metals. Antioxidant effect of GBE against 1,2,4-benzenetriol(BT), one of toxic metabolites of benzene, was demonstrated through sister chromatid exchange(SCE) analysis, single cell gel electrophoresis(SCGE) analysis, DNA cleavage assay and lipid peroxidation production analysis. The means of SCE frequencies at 10, 25 and 50  $\mu$ M concentration of BT were 7.72, 8.02, 9.22 respectively. In addition of GBE with concentration of 50, 200 and 500  $\mu$ g/ml, SCE frequencies were decreased significantly( $p < 0.05$ ). According to SCGE analysis, BT induced DNA damage in a dose-dependent manner at concentration of 10 and 50  $\mu$ M and the DNA damage induced by BT was significantly protected by GBE( $p < 0.001$ ). No genotoxicity was observed by GBE treatment alone on DNA cleavage. The effect of BT on lipid peroxidation product, Malondialdehyde(MDA), was increased with concentration of BT(10 and 50  $\mu$ M) and reduction in MDA was noted when GBE was added. From above results it is suggested that GBE could protect the cell and DNA from pro-oxidant effect by reactive oxygen species induced by BT.

**Keywords :** *Ginkgo biloba* extract(GBE), Sister chromatid exchange(SCE), Single cell gel electrophoresis, Lipid peroxidation, DNA cleavage, 1,2,4-benzenetriol(BT)

#### I. 서 론

*Ginkgo biloba*는 오래전부터 의학적으로 이용되었는데 기관지염 및 천식의 치료제로서, 그리고 혈액순환 장애로 인한 질병을 치료하기 위한 약제로서 사용되어 왔다. *Ginkgo biloba* 잎의 추출물에는 flavonoid인 ginkgoflavone glycosides 및 terpenoids 성분이 함유되어 있다고 알려져 있다.<sup>1)</sup>

Flavonoid와 terpenoid는 대표적인 식물성화학물질(phytochemical)로서 이들 flavonoid는 항산화작용, 생체

내 대사작용에 관여하는 각종 효소억제작용 뿐 아니라 항알러지효과, 항염효과, 항바이러스 효과 그리고 항암 효과도 있는 것으로 알려져 있으며<sup>2,3)</sup> terpenoid의 경우도 sarcoma-180 및 폐암세포의 성장을 억제하는 것으로 보고되고 있다.<sup>4)</sup>

이들 물질의 효과는 외부물질에 의해 생성된 활성산소종(Reactive oxygen species)의 작용을 무력화시키는 항산화작용을 통해 이루어진다는 것이 알려지고 있다.

활성산소종은 이온화방사선, 자외선등의 물리적으로인이나 대부분의 화학물질에 의해 생성되는 것이 알려져 있으며 이들이 DNA에 손상을 주거나 암, 노화의 원인이 되는 것으로 밝혀지고 있다.<sup>5)</sup>

현재까지는 주로 vitamin C, E, carotenoid 등의 항산화제에 대한 연구가 주를 이루었지만 최근에는 식물성 항산화물질에 대한 관심이 집중되고 있다.

<sup>†</sup>Corresponding author : School of Public Health, Seoul National University 28 Yunkeun-Dong, Chongno-ku Seoul 110-799, Korea  
Tel: 02-740-8885, Fax: 02-745-9104  
E-mail: chunghw@snu.ac.kr

벤젠대사산물 중 1,2,4-benzenetriol(BT)는 다양한 활성산소종을 생성하여 생체내의 구성물질에 손상을 미치는데 염색체이상, 자매염색체교환, 소핵 등을 유발하여 DNA에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>6,9)</sup>

그러나, 현재까지 국내에서 이루어진 식물성 화학물질에 관한 연구 중에는 Ginkgo biloba 잎 추출물의 BT에 대한 항산화효과가 보고된 바 없어 이에 관한 연구가 요구된다. 따라서 본 연구에서는 Ginkgo biloba에 함유되어 있는 식물성 화학물질이 BT에 의해 생성된 활성산소종에 대해 항산화효과가 있는지를 염색체 및 DNA 손상 그리고 지질과산화 정도를 통해 구명하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Ginkgo biloba 잎 추출물의 준비

Ginkgo biloba 잎 추출물(Ginkgo biloba leaf extract: GBE)은 선경제약에서 제조한 것으로 ginkgo flavone glycosides가 24% 그리고 terpenoid가 6% 함유되어 있다. 이 추출물을 증류수에 녹여 10 mg/ml의 농도로 만들어 실험에 사용하였다.

### 2. 자매 염색분체 교환분석

우태아혈청이 함유된 RPMI 1640에 BrdU(10 µM)와 PHA를 동시 처리하여 혈액 각각 0.5 ml씩 25 cm<sup>2</sup> 넓이의 배양 flask에 넣고 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 항온기에서 24시간 배양한 후 BT는 10, 25 및 50 µM 농도로 그리고 GBE는 50, 200 및 500 µg/ml 농도로 각각 처리하여 48시간 추가배양시켰다. 배양된 혈액은 수집 전 3시간 전에 colcemid를 첨가한 후 10분간 0.075 M KCl 저장액에 처리하고, Canoy 고정액(methanol : acetic acid = 3:1)으로 2번 반복 세척하여 slide에 떨어뜨려 표본을 작성하였다. 작성된 염색체 표본을 암실에서 자연 건조시킨 후 Fluorescent plus Giemsa(FPG) 방법(Perry and Wolff(1974))에 의해 5 µg/ml의 Hoechst 33258(SIGMA)로 13분간 염색하고, black light로 10분간 조사한 후 자연건조시켜 5% Gurr's Giemsa 용액으로 다시 염색하여 각 표본당 세포는 60개씩 임의 선택하여 광학현미경(×1000)으로 관찰하였다. BT처리에 의해 세포분열이 얼마나 손상을 받는가를 확인하기 위해 RI(Replication Index)값을 다음 식에 의해 구하였다.

$$RI = (M1 + 2M2 + 3M3) / 100$$

M1, M2, M3는 각각 1, 2, 3번 분열한 세포의 %

### 3. 단세포전기영동법

Singh의 방법(1994)에 준해 시행하였다. 즉 eppendorf tube에 혈액이 포함된 배지를 넣고 BT와 GBE를 처리한 후, 3시간 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 항온기에서 배양하였다. 배양 후에는 DNA 회복을 차단하기 위해 4°C를 유지하면서 ficoll로 림프구를 분리하였다. 분리된 세포를 0.5% low melting agarose gel 75 µl과 섞어 미리 0.6% normal melting agarose gel로 덮고 4°C에서 보관된 슬라이드에 펼친 후 coverslip으로 덮어준 후 다시 4°C에서 10분간 두어 굳힌 다음 coverslip을 제거하였다. 여기에 0.5% low melting agarose gel 110 µl를 슬라이드에 펼친 후 coverslip으로 덮어준 후 다시 4°C에서 10분간 두어 굳힌 다음 coverslip을 제거하였다. 슬라이드를 차가운 lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris base, 1% N-Lauryl sarcosinate, 1% Triton X-100, pH 10)에 담가서 4°C 1시간정도 용해시켰다. 이후 3차 증류수로 슬라이드에 남아 있는 염을 제거한 후 슬라이드를 전기영동기에 올려놓고 electrophoretic buffer(300 mM NaOH, 0.1% 8-hydroxyquinoline, 2% dimethyl sulfide, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH>12.3)에 20분간 담겨 DNA의 양가닥이 풀리게 한 후 25분간 22V, 300 mA에서 전기영동을 걸었다. 이후 고알칼리 상태를 중화시키기 위해 Tris buffer(0.4 M Tris, pH 7.4)로 5분간 3회 중화시켰다. DNA가 슬라이드에 침착될 수 있도록 슬라이드를 에탄올에 적어도 1시간 이상 담가 놓았다. 슬라이드를 건조시킨 후 ethidium bromide(20 µg/ml) 60 µl로 형광염색하였다. 형광현미경을 이용하여 515-560 nm의 excitation filter와 590 nm의 barrier filter에서 400배율로 관찰하였다. 무작위로 선택된 한 농도 당 세포 60개는 이미지 분석 프로그램(Image-Pro Plus 4.0)을 통해 DNA의 손상 정도를 head를 포함한 tail의 길이로 분석하였다.

### 4. DNA 가닥절단 분석

Plasmid pBR322(Gibco, BRL)에 CuSO<sub>4</sub>(200 µM)와 FeSO<sub>4</sub>(200 µM), BT(500 µM), GBE(200 µg/ml)를 처리하여 37°C 항온기에서 1시간 배양시킨 후 Ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에서 20분간 전기영동을 하여 DNA 가닥 절단의 정도를 관찰한다. DNA 가닥 절단의 양성 대조군으로는 Bleomycin(150 µM)-Fe(200 µM) 혼합물에 의한 DNA 가닥 손상을 이용하였다.

### 5. 지질과산화 분석(TBA assay)

Hermann 등(1990)의 방법에 따라 Thiobarbituric

Acid(TBA)와 반응하는 Malondialdehyde(MDA)의 양으로 측정하였다. 지질과산화물 알아보기 위해 포유류 세포인 Chinese Hamster Ovary Cell(CHO-K1세포)을 25 cm<sup>2</sup> 넓이의 배양 flask에 3.6×10<sup>5</sup>개의 세포를 심고 BT를 농도별(10, 50 μM)로 처리하고 GBE(200 μg/ml)를 각각 처리한 후 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C항온기에서 18시간 배양하였다. Trypsin을 처리하여 수집한 세포들에 0.9% saline 1ml씩을 넣고 homogenizer로 1분간 분쇄한 다음 그 중 일정량을 취하여 Bradford method<sup>10)</sup>에 따라 단백질을 정량하고 남은 sample 양과 1:1이 되도록 TBA 시약(0.375% TBA+30% TCA+0.25N HCl)을 넣어 잘 섞은 다음 100°C에서 15분간 끓인 후 800에서 10분간 원심분리를 하였다. 상등액을 취해서 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. Extinction coefficient로서 156 mM-1 cm<sup>-1</sup>를 사용하여 흡광도 값을 nmol로 환산하였다.<sup>11)</sup>

6. 통계 분석

SPSS 9.0을 이용하여 자매염색분체 교환빈도에서 BT의 농도에 따른 차이와 GBE 처리군과의 빈도차이를 log 변환한 후 student's t-test를 하였다. 또한, 단세포전기영동법에서 BT에 의한 DNA 손상과 GBE에 대한 DNA 손상 보호효과를 보기 위해서는 비모수 방법인 Mann-Whitney 검정을 하였다.

III. 결 과

1. BT와 GBE에 의한 자매염색분체 교환빈도의 변화

Table 1에서 보는 바와 같이 BT의 농도가 10, 25 및 50 μM로 증가함에 따라 자매염색분체의 교환빈도가 세포당 각각 7.72, 8.02, 9.22로 점차 증가함을 볼 수가 있었고 대조군의 5.08과 비교하였을 때 유의하게 증가하였음을 알 수 있다(p<0.001). GBE의 농도가 50~

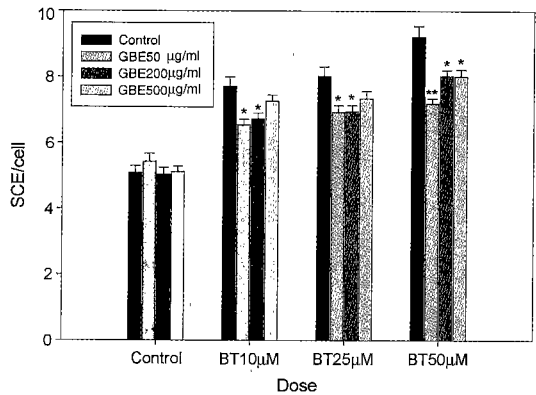


Fig. 1. The protective effect of GBE on SCE frequencies induced by 1,2,4-benzenetriol in human lymphocytes. Error bars indicated standard error of the mean of 60 cells (\*p<0.05, \*\*p<0.001).

Table 1. The protective effect of GBE on sister chromatid exchange(SCE) induced by 1,2,4-benzenetriol

Dose	Frequency of sister chromatid exchange			Replication index(RI) <sup>c</sup>
	Mean ± SE <sup>a</sup>	Mean ± SE <sup>b</sup>	p-value	
Control	5.08 ± 0.22	1.56 ± 0.05		2.13
Ginkgo 50 μg/ml	5.43 ± 0.25	1.63 ± 0.05	0.18	2.10
Ginkgo 200 μg/ml	5.03 ± 0.22	1.56 ± 0.04	0.50	2.06
Ginkgo 500 μg/ml	5.12 ± 0.17	1.60 ± 0.03	0.28	2.08
BT10 μM	7.72 ± 0.28	2.00 ± 0.04		2.09
+ Ginkgo 50 μg/ml	6.55 ± 0.17	1.86 ± 0.03	0.0011	2.08
+ Ginkgo 200 μg/ml	6.73 ± 0.18	1.88 ± 0.03	0.0064	2.09
+ Ginkgo 500 μg/ml	7.27 ± 0.19	1.96 ± 0.02	0.20	2.05
BT25 μM	8.02 ± 0.29	2.04 ± 0.04		2.05
+ Ginkgo 50 μg/ml	6.93 ± 0.21	1.91 ± 0.03	0.0026	2.10
+ Ginkgo 200 μg/ml	6.95 ± 0.19	1.91 ± 0.03	0.0032	2.06
+ Ginkgo 500 μg/ml	7.35 ± 0.23	1.96 ± 0.03	0.055	2.03
BT50 μM	9.22 ± 0.33	2.18 ± 0.03		2.03
+ Ginkgo 50 μg/ml	7.2 ± 0.16	1.96 ± 0.02	p<0.001	2.09
+ Ginkgo 200 μg/ml	8.03 ± 0.18	2.07 ± 0.02	0.0033	2.08
+ Ginkgo 500 μg/ml	8.02 ± 0.21	2.06 ± 0.02	0.0027	2.06

<sup>a</sup>represents meanstandard error of 60 cells.

<sup>b</sup>log transformed means and standard error.

<sup>c</sup>the average number of replications completed by the metaphase cells examined.

500 µg/ml에서는 자매염색분체 교환빈도가 대조군에 비해 차이가 나지 않았다. GBE 처리에 의해 BT에 의한 염색체 손상이 감소되는 것을 볼 수 있고, GBE의 농도에 따른 보호효과의 차이는 나타나지 않았다(Table 1, Fig. 1).

2. 단세포 전기영동법을 통한 GBE의 항산화효과

Table 2에서 보는 바와 같이 BT의 농도가 증가하면서 tail의 길이가 증가하는 것을 볼 수 있었다(p<0.001). 또한 GBE는 BT에 의한 DNA손상을 감소시키는 것으로 나타났으며 GBE농도(50~500 µg/ml)에 따른 보호효

Table 2. The effect of GBE on DNA damage induced by 1,2,4-benzenetriol in human lymphocytes detected by single cell gel electrophoresis analysis

Treatment	Tail length(µm)		p-value <sup>b</sup>
	Mean ± SE <sup>a</sup>	Median	
Control	28.10 ± 1.52	22.33	
Ginkgo 50 µg/ml	23.44 ± 0.72	21.85	0.426
Ginkgo 200 µg/ml	24.50 ± 1.12	20.66	0.020
Ginkgo 500 µg/ml	25.85 ± 1.23	21.14	0.185
BT 10M	37.49 ± 1.88	35.15	
+ Ginkgo 50 µg/ml	29.52 ± 1.49	23.16	<0.001
+ Ginkgo 200 µg/ml	28.19 ± 1.81	22.68	<0.001
+ Ginkgo 500 µg/ml	29.60 ± 1.81	23.75	<0.001
BT 50M	42.82 ± 1.83	40.06	
+ Ginkgo 50 µg/ml	31.63 ± 1.74	27.19	<0.001
+ Ginkgo 200 µg/ml	30.41 ± 1.69	24.58	<0.001
+ Ginkgo 500 µg/ml	33.54 ± 2.13	25.41	<0.001

<sup>a</sup>represents meanstandard error of 60 cells.

<sup>b</sup>Mann-Whitney U test.

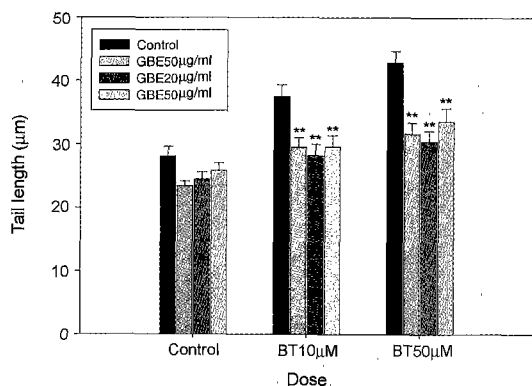


Fig. 2. The inhibitory effect of GBE on DNA damage induced by 1,2,4-benzenetriol. The values are mean and standard error of tail length(µm) in each 60 cells (\*\*Mann-Whitney, p<0.001).

과의 차이는 나타나지 않았다(Table 2, Fig. 2).

3. DNA 가닥절단에 대한 GBE의 효과

Plasmid pBR322에 GBE만을 단독 처리한 경우 DNA 손상은 나타나지 않았으며, Plasmid DNA에 GBE를 구리 혹은 철 이온과 같이 처리했을 때 DNA 가닥의 손상은 전혀 관찰되지 않았다(Table 3, Fig. 3, 4). DNA에 BT와 GBE만을 처리한 경우에는 DNA에 아무런 영향이 없었으나, 구리 또는 철 이온을 첨가하였을 때 모두 DNA의 절단이 일어났다.

4. 지질과산화에 의해 생성되는 MDA 양에 대한 GBE의 효과

CHO 세포에 BT 10, 50 µM의 농도와 GBE 200 µg/ml의 농도로 부여한 후 18시간 후에 TBA(Thiobarbituric acid) 분석을 시행하여 지질과산화에 의해 생성된 MDA

Table 3. Effect of GBE on cleavage of plasmid DNA by 1,2,4-benzenetriol in the present of Fe or Cu

No.	Test agents	Result
1	GBE	-
2	BT	-
3	Fe	-
4	Cu	-
5	BT+Fe	-
6	BT+Cu	++
7	GBE+BT	-
8	GBE+Fe	-
9	GBE+Cu	-
10	GBE+BT+Fe	+
11	GBE+BT+Cu	+

- : negative + : weak positive ++ : strong positive

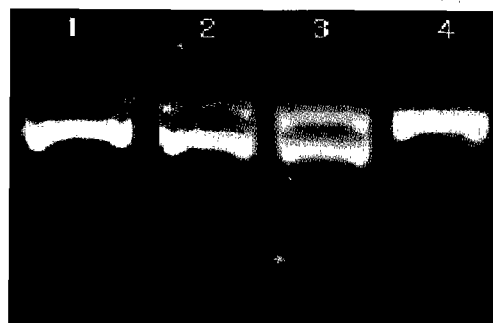
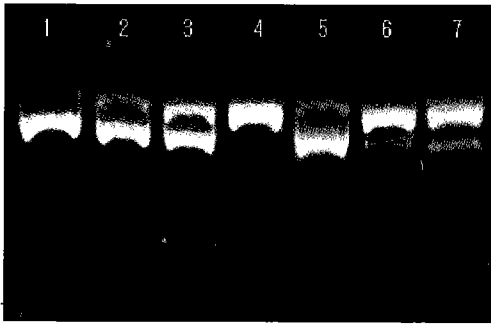
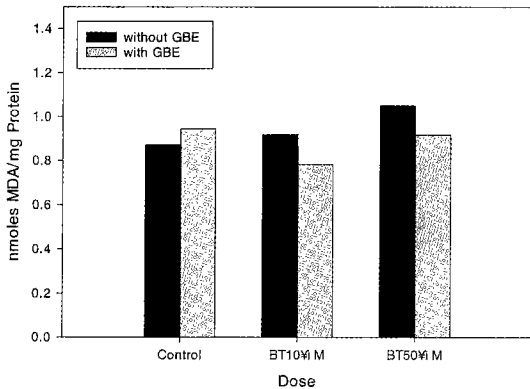


Fig. 3. Agarose gel electrophoretic patterns of plasmid DNA in the presence of Cu(0.2 mM), Fe(0.2 mM) ion.: Lane 1, no addition(DNA control); Lane 2, GBE; Lane 3, GBE plus Fe; Lane 4, GBE plus Cu.



**Fig. 4.** Agarose gel electrophoretic patterns of plasmid DNA in the presence of BT(500 uM), Cu(0.2 mM), Fe(0.2 mM) ion.: Lane 1, DNA control; Lane 2, BT; Lane 3, BT plus Fe; Lane 4, BT plus Cu; Lane 5, BT plus GBE; Lane 6, BT plus GBE, Fe; Lane 7, BT plus GBE, Cu.



**Fig. 5.** Effect of GBE on the lipid peroxidation induced by 1,2,4-benzotriol.

의 양을 측정하였다. 대조군의 MDA 양 0.87에 대해 BT의 농도가 증가할수록 0.92, 1.05로 MDA의 양이 증가하고 있는 것을 볼 수 있으며 GBE의 처리에 의해 MDA 양이 0.78, 0.91로 각각 감소한 것을 알 수 있었다(Fig. 5).

#### IV. 고 찰

자연계의 식물내에 존재하고 있는 식물성 화학물질들은 일상생활에서 음식이나 차, 음료수등을 통해 우리들에게 섭취되어지고 있다. 천연물을 이용한 의약품의 제조는 인위적으로 만들어진 다른 합성물질보다는 자연 상태에서 생성된 물질이므로 인체에 대한 거부감이나 부작용 등의 위해작용이 나타날 가능성이 적어서 식물성 화학물질들을 이용한 신약개발이 증가하고 있는 추세이다. 그 중 한 종류인 terpenoid는 Ehrlich ascites

tumor, sarcoma-180, Lewis lung tumor의 성장을 억제하는 것으로 알려졌으며 alkaloid의 항암효과를 이용한 치료가 많이 사용되고 있다. Coumarin의 경우 이를 혈액응고 예방에 사용하고 있으며 최근의 연구에서는 항암효과와 면역조절기능, 항박테리아 효과가 있음이 발표되었을 뿐만 아니라 flavonoid와 phenolic은 항암, 항바이러스, 항박테리아 효과와 더불어 radical 소거효과 및 항산화효과를 가지고 있는 것이 보고되었다.<sup>2,3,12,13)</sup>

*Ginkgo biloba*는 중국과 동양에서 오래 전부터 의학적으로 이용되어 왔는데 특히 중국에서는 기관지염 및 천식의 치료제로서 사용되어져 왔고 유럽에서는 말초혈관이 폐색되어 나타나는 노인들에게서 혈액순환장애로 인한 뇌혈관질환과 같은 질환을 치료하기 위한 약재로서 사용하여 오고 있다.<sup>14)</sup> 본 실험에 사용한 *Ginkgo biloba* 잎의 추출물은 표준추출법에 의한 것으로 ginkgoflavone glycosides 24%, terpenoids 6%의 성분이 함유되어 있고 이 두 물질이 가장 중요한 구성물질로 알려져 있다.<sup>1)</sup>

본 연구결과 자매염색분체 교환빈도에 있어서는 BT의 농도에 따라 빈도가 증가하는 양-반응 관계를 보이고 있다. 그러나 GBE 자체만으로는 DNA에 손상을 주지 않는 것으로 보이며 BT에 대한 GBE의 항산화효과도 관찰되었다. 즉, GBE의 구성성분인 flavonoid와 terpenoid의 작용에 의해 BT에 의해 생성된 활성산소종에 의한 손상이 저지되는 것으로 판단된다.

단세포전기영동법을 이용한 실험에서도 BT의 농도변화에 따라 DNA 손상정도가 증가하는 양-반응관계가 보이고 있다. GBE만을 처리한 군에서는 DNA 손상이 나타나지 않아 자매염색분체 교환실험결과와 동일한 양상을 보여주었다. GBE는 BT에 의한 DNA 손상을 감소시키는 것으로 나타났지만 양-반응관계는 없는 것으로 나타나고 있다.

Plasmid pBR322 DNA에 직접 1,2,4-benzotriol (BT)와 Fe, Cu 이온, GBE 등을 처리하여 DNA 절단 정도를 조사하였다. BT와 Cu 이온이 동시에 존재하였을 때 DNA 대부분이 open-circular 형태로 전환된 것이 관찰되어 Cu-BT 혼합물이 산화효과를 지님을 알 수 있었다. Jain 등(1999)과 Yoshino 등(1999)은 flavonoids가 Cu 이온과 동시에 존재하는 조건하에서는 DNA가 전자 친화적인 구조를 가지고 있어서 활성산소종의 공격대상이 되기 때문에 DNA 손상을 유도한다고 보고하였다.<sup>15,16)</sup> 그러나, 본 실험에서는 flavonoid 성분을 함유하고 있는 GBE의 단독 처리 및 Fe 혹은 Cu와 동시처리한 경우에도 DNA 가닥 절단은 전혀 관찰되지 않았다. 즉 Jain 등(1999)과 Yoshino 등(1999)은

flavonoid 자체만을 사용하여 처리하여 얻은 결과이고 본 연구에 사용된 GBE의 경우 flavonoid 외에 다른 구성성분들이 함유되어 있기 때문에 나타난 차이라고 볼 수 있다. 또한 DNA에 BT와 GBE만을 처리한 경우에는 DNA에 아무런 영향이 없었으나, 구리 또는 철 이온을 동시에 첨가하였을 때는 DNA의 절단이 일어나 이 두 가지 금속이온이 자유라디칼에 의한 손상을 주도한다는 것을 확인할 수 있었다. 그런데 이러한 결과는 자매염색분체 교환빈도 분석법이나 단세포전기영동법을 통해 분석한 결과와는 일치하지 않는다. 이는 DNA 가닥절단 실험에서는 GBE와 BT 및 금속이온을 DNA에 직접 처리하였고 자매염색분체 교환빈도 분석법과 단세포전기영동법에서는 세포를 배양액에서 배양시키면서 간접적으로 대상물질들을 처리하여 그 처리 조건이 서로 상이하기 때문이다. 즉 GBE의 항산화효과는 배양액 내의 다른 물질들과의 상호작용 또는 세포 내의 대사기전을 통해 나타날 수 있다는 것을 암시한다.

TBA 분석 결과, GBE를 처리한 대조군의 MDA 양은 GBE를 처리하지 않은 대조군보다 약간 증가하였고 이를 BT 10  $\mu$ M 처리군과 비교했을 때는 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 각 처리군마다의 세포수의 불균등 또는 GBE 단독처리시의 세포독성이 원인이라 추측된다. 하지만 자매염색분체 교환빈도 및 단세포전기영동에 의한 결과와 마찬가지로 GBE와 BT를 동시에 처리하였을 때는 BT에 대한 보호효과를 확인할 수 있었다.

이상에서와 같이 본 연구결과 GBE가 BT에 대해 보호효과를 가지고 있는 것으로 나타났으며 Rong 등(1996)의 연구에서도 GBE의 농도별로 zymosan과 2',7-dichlorofluorescein diacetate에 의해 유도된 J774 cell의 산화적 손상(Oxidative burst)에 대한 보호효과가 있음이 입증되어 본 연구와 유사한 결과를 보이고 있다.<sup>17)</sup> 따라서 GBE는 BT에 의한 DNA 손상 및 자매염색분체교환 유발 그리고 지질과산화 유발에 있어 활성산소종의 영향 즉, 산화적 손상을 방지함으로써 보호효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

## V. 요약 및 결론

본 연구는 BT에 의한 세포손상과 및 GBE의 항산화효과, 보호효과여부를 조사하기 위해 사람 림프수와 CHO 세포주, plasmid DNA에 처리하여 자매 염색분체 교환빈도 분석과 단세포전기영동법, TBA assay, DNA 가닥절단법을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 자매 염색분체 교환빈도(SCE)는 BT 농도가 10, 25, 50  $\mu$ M로 증가함에 따라 GBE에 의해 SCE 빈도가 유의하게 감소하고 있어 GBE의 항산화효과를 확인하였다.

2. 단세포전기영동법을 통한 분석을 통해 BT의 농도에 따라 DNA 손상정도가 증가하였으며 BT에 의한 DNA 손상을 감소시키는 것을 알 수 있었다.

3. GBE를 단독 처리한 경우 plasmid DNA의 가닥 절단은 나타나지 않았으며, Plasmid DNA에 flavonoid와 구리 혹은 철 이온을 같이 처리했을 때도 DNA 가닥의 손상은 전혀 관찰되지 않았다. DNA에 BT와 GBE를 동시에 처리한 경우에는 DNA에 아무런 영향이 없었으나, 구리 또는 철 이온을 첨가하였을 때 모두 DNA의 절단이 일어났다.

4. BT에 의한 손상과 GBE의 보호효과를 지질과산화 분석을 통해 알아본 결과 GBE의 처리에 의해 항산화효과를 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 볼 때 GBE는 BT에 의한 DNA 손상 및 자매염색분체교환 유발 그리고 지질과산화 유발에 있어 활성산소종의 영향 즉, 산화적 손상을 방지함으로써 보호효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 1999년도 한국과학재단 특정기초 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 1) S. W. Ha, C. J. Yi, C. K. Cho, M. J. Cho, K. H. Shin and C. I. Park: Enhancement of radiation effect by *Ginkgo biloba* extract in C3H mouse fibrosarcoma, *Radiotherapy and Oncology*, **41**, 163-167, 1996.
- 2) E. Middleton jr, C. Kandswami: The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer, *The flavonoid: Advances in research since*, 1986, 619-652, 1993.
- 3) B. Havsteen: Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, *Biochemical Pharmacology*, **32**, 7, 1141-1148, 1983.
- 4) T. B. Ng, F. Liu and Z. T. Wang: Antioxidative activity of natural products from plants, *Life Science*, **66**(8), 709-723, 2000.
- 5) D. Anderson: Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage, *Mutat. Res.*, **350**, 103-108, 1996
- 6) Tsutsui T., Hayashi N., Maizumi H., Huff J., Barrett J.C.: Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid

- exchanges and unscheduled DNA synthesis in syrian hamster embryo cells. *Mutat. Res.*, **373**, 113-123, 1997.
- 7) Zhang L., Robertson M., Kolachana P., Davison A.J., Smith M.T.: The benzene metabolite, 1, 2, 4-benzenetriol induces micronuclei and oxidative DNA damage in human lymphocytes and HL60 cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, **21**, 339-348, 1993.
  - 8) Zhang L., Rothman N.: Interphase cytogenetics of workers exposed to benzene. *Environ. Health. perspect.* **104**(suppl 6), 1325-1329, 1996.
  - 9) Zhang L., Venkatesh P., Robertson M.L.: Smith M.T., Detection of 1, 2, 4-benzenetriol induced aneuploidy and microtubule disruption by fluorescence in situ hybridization and immunocytochemistry. *Mutat. Res.*, **320**, 315-327, 1994.
  - 10) M. T. Smith, H. Thor, P. Hartzell and S. Orrenius: The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes, *Biochem. Pharmac.*, **31**, 1, 19-26, 1982.
  - 11) A. Ottolenghi: Interaction of Ascorbic Acid and Mitochondrial lipides, *Archs. Biochem. Biophys.*, **79**, 355-363, 1959.
  - 12) F. Liu, T. B. Ng: Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medical herbs, *Life sciences*, **66**(8), 725-732, 2000.
  - 13) V. A. Kostyuk and A. I. Potapovich: Antiradical and Chelating Effects in Flavonoid Protection against Silica-induced Cell Injury, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **355**(1), 43-48, 1998.
  - 14) M. W. Dion, Hussey D. H., Doorn J. F., Vigliotti A. P., Wen B. C. and Anderson B.: Preliminary results of a pilot study of pentoxifylline in the treatment of late radiation soft tissue necrosis, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **19**, 401-407, 1990.
  - 15) A. Jain, M. C. Martin, Nazneen P., N.U. Khan, J.H. Parish and S.M. Hadi: Reactivities of Flavonoids with Different Hydroxyl Substituents for the Cleavage of DNA in the Presence of Cu(II), *Phytother. Res.*, **13**, 609-612, 1999.
  - 16) M. Yoshino, M. Haneda, M. Naruse and K. Murakami: Prooxidant activity of Flavonoids: Copper-Dependent Strand Breaks and the formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in DNA, *Molecular Genetics and Metabolism*, **68**, 468-472, 1999.
  - 17) Y. Q. Rong, Z. H. Geng, B. H. S. Lau: GINKGO BILOBA attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells, *Free Radical Biology & Medicine*, **20**(1), 121-127, 1996.