

## Copper-Phenanthroline 복합체에 의해 유도되는 DNA손상에 대한 양파와 마늘의 억제효과

박평심 · 이명렬<sup>†</sup>

조선대학교 식품영양학과

### The Effects of Onion and Garlic on Copper-Phenanthroline Complex Induced DNA Degradation

Pyoung-Sim Park and Myung-Yul Lee<sup>†</sup>

Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

#### Abstract

In the present study, the effects of onion and garlic on copper and 1,10-phenanthroline complex induced DNA degradation were investigated by the decreased level of thiobarbituric acid (TBA) reactive materials. Phenanthroline is specific for copper and the reaction releases TBA reactive material from DNA which can be measured by absorbance at 535nm. The levels of TBA reactive materials were decreased by adding onion or garlic homogenate into reaction mixture but the onion had more strong potency and the effect of onion was not changed by boiling. Superoxide dismutase (SOD) and catalase have no inhibitory effects on copper induced DNA damage but reduced glutathione was more effective. The activities of antioxidant enzymes and the contents of sulfhydryl groups in onion and garlic were also investigated. The activity of SOD was more higher in garlic, but catalase and glutathione peroxidase activities were higher in onion. The contents of sulfhydryl group in garlic was more abundant. This result suggested that inhibitory effects of onion on copper induced DNA damage were not by antioxidant enzymes such as SOD, catalase and glutathione peroxidase or sulfhydryl groups, but a substance which is more stable in high temperature.

**Key words** : onion, superoxide dismutase (SOD), 1,10-phenanthroline, thiobarbituric acid (TBA)

#### 서 론

호기성 세포는 대사과정에서 지질, 단백질 및 DNA의 산화적 손상을 유발할 수 있는 독성이 강한 유리산소를 생성하는데<sup>1-4)</sup>, 이는 superoxide dismutase (SOD)<sup>1-4)</sup>에 의해서 과산화수소로 전환되고, 과산화수소는 catalase<sup>1-3)</sup>와 glutathione peroxidase (GSHPx)<sup>1-5)</sup>에 의해서 제거된다. 세포내 산화적 손상산물의 증가는 여러가지 퇴행성 질환이나<sup>2)</sup>, 암 발생 및 노화<sup>2,6,7)</sup>에

도 밀접한 관련이 있으므로, 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는 SOD, catalase 및 GSHPx 등 항산화효소<sup>1-7)</sup>와 sulfhydryl기를 함유한 단백질<sup>2)</sup>, glutathione<sup>1,2)</sup>, bilirubin 및 uric acid 등<sup>2)</sup> 여러가지 생체 항산화물질과 tocopherol 및 selenium 등<sup>1-7)</sup> 항산화물에 대한 많은 실험보고가 있으며, 항산화 물질을 함유한 천연물<sup>2,8-10)</sup>에 대한 관심도 증가되고 있다. 양파 (*Allium cepa* L.)와 마늘 (*Allium sativum* L.)은 오래전부터 향신료로 사용되고 있는데, 양파에는 quercetin, quercitrin, rutin 등의 flavonoid계 색소<sup>10)</sup>, 황 함유 화합물인 allyl propyl

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

disulfide 및 diallyl disulfide 등이 함유되어 항산화작용을 가지고 있으며<sup>8,9)</sup>, 마늘의 냄새와 매운맛 성분인 allin, allicin 및 allyl sulfides 등은 항균작용, 고지혈증 억제제, 혈액응고, 동맥경화억제 및 혈당 저하작용 등<sup>10-13)</sup>이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 산소 존재하에 산소유리기를 생성하여 DNA 손상을 유발하는 구리( $\text{Cu}^{2+}$ )와 1,10-phenanthroline 반응계<sup>14-16)</sup>를 이용하여 시험관내에서 양파와 마늘의 DNA 손상 억제효과를 thiobarbituric acid (TBA) 반응성 물질량의 변화로서 비교하여 양파와 마늘의 항산화 효과를 알아 보았다.

## 재료 및 방법

### 시료의 조제

양파와 마늘을 세절하여 각각 10g씩 취해 0.1M phosphate buffer (pH 7.8) 10ml를 가하고 glass homogenator로 균질화 시킨 후 4-fold gauze로 걸러 4°C에서 10000 × g로 15분간 원심분리하여 fresh onion juice와 fresh garlic juice 시료로 사용하였고, 끓는 물속에서 5분간 증탕하여 boiled onion juice와 boiled garlic juice 시료로 사용하였다.

$\text{Cu}^{2+}$ 와 1,10-phenanthroline에 의해 DNA 손상유발에 대한 양파와 마늘의 효과 측정

$\text{Cu}^{2+}$ 와 1,10-phenanthroline에 의한 DNA 손상은 Guttridge<sup>19)</sup>의 방법에 따라 TBA 반응성 물질량으로 측정하였다. 즉 chelex resin 처리한 증류수로 세척한 시험관에 0.1% (v/v) mercaptoethanol을 함유한 0.25M phosphate buffer (pH 6.4) 300 $\mu$ l, DNA 용액 (calf thymus DNA 1mg/ml DW) 400 $\mu$ l, 1,10-phenanthroline 용액 (0.364 mg/ml in ethanol) 100 $\mu$ l, 100mM sodium azide 50 $\mu$ l 및 copper 용액 (cupric chloride 1 $\mu$ g/ml DW) 50 $\mu$ l를 가하고 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 0.1mM EDTA 100 $\mu$ l를 가하여 반응을 정지시키고 0.5% (w/v) TBA 500 $\mu$ l, 28% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 500 $\mu$ l를 가하고 100°C에서 60분간 가열한 후 즉시 냉각시켜 535nm에서 흡광도를 측정하였으며, 상기 반응조건에 양파와 마늘의 시료액을 각각 50 $\mu$ l씩을 반응액에 첨가하고 흡광도를 측정하여 흡광도 감소율로서 양파와 마늘의 DNA 손상 억제효과를 관찰 하였다.

### 항산화효소 활성 측정

SOD 활성도는 Crapo 등의 방법<sup>20)</sup>에 의해서 cytochrome c 환원량을 측정하여 cytochrome c의 환원 속도를 50% 억제하는 효소의 양을 1unit로 표시하였고, catalase 활성도는 Abei의 방법<sup>21)</sup>에 따라  $\text{H}_2\text{O}_2$  분해량을 240nm에서 측정하여, 효소의 활성도는 1분 동안에 1 $\mu$ M의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 분해시키는 효소의 양을 1unit로 하였으며, GSHPx 활성은 Flohe 등의 방법<sup>22)</sup>에 의해 NADPH 소모량을 측정하였으며 단백질의 정량은 Lowry 등의 방법<sup>23)</sup>에 의하여 측정하였다.

### Sulfhydryl group 측정

Sulfhydryl group은 Harbeeb 등의 방법<sup>24)</sup>에 의해 N'-N-dithio bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)와 반응하여 생성되는 2-nitro-5-thiobenzoate을 412nm에서 측정하여 이의 흡광계수를 13.6 mM<sup>-1</sup> Cm<sup>-1</sup>로 간주하여 계산 하였으며, 비단백질성 sulfhydryl group은 50% TCA를 가하여 단백질을 침전시킨 후 상청액을 시료로 이용 하였다.

## 결과 및 고찰

양파와 마늘의  $\text{Cu}^{2+}$ 와 1,10-phenanthroline에 의한 DNA 산화적 손상에 대한 억제효과

구리나 철이온은 산소의 대사에 관여하는 단백질의 catalytic center에서 자주 발견되는 미량원소로 구리를 함유하고 있는 단백질인 Cu, Zn-SOD, cytochrome oxidase 및 ceruloplasmin 등은 항산화작용을 나타낸다.<sup>16-20)</sup>

구리이온은 또한 아미노기에 쉽게 결합하는데, 아미노기에 결합된 구리이온은 산소 유리기를 생성하므로 류마치스성 관절염과 같은 퇴행성 질환은 구리이온의 증가와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>16-20)</sup>

금속 착염체인 1,10-phenanthroline은 구리와 산소 존재하에 DNA를 손상시켜 TBA 반응성 물질을 생성하는데<sup>14,15)</sup>, DNA 손상기전에 산소유리기가 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>14,15,20)</sup> 따라서 본 실험은 시험관내에서 양파와 마늘의  $\text{Cu}^{2+}$ 와 1,10-phenanthroline에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 억제효과를 TBA 반응성 물질량의 변화로서 측정한 결과, 양파균질액 첨가군은 양파나 마늘을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 TBA 반응성 물질이 36.06%가 감소되었고, 마늘균질액의 첨가

군은 20.41%가 억제되어 DNA손상에 대한 억제효과는 양파가 마늘보다 큰것으로 나타났다. 또한 양파와 마늘균질액을 100°C에서 5분간 가열한 시료의 DNA손상에 대한 억제효과는 양파는 33.61%, 마늘은 11.49%를 억제하여 열을 가한 시료에서도 양파가 마늘보다 강한 손상 억제효과를 나타냈으며, 시료에 열을 가한 DNA손상 억제효과가 양파는 6.79% 감소된 반면에, 마늘은 43.70%가 감소되어 (Table 1, Fig. 1) 양파에서는 비교적 고온에서도 안정된 물질이 Cu<sup>2+</sup>와 phenanthroline에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 억제효과를 나타내는 것으로 여겨진다.

#### 양파와 마늘의 항산화효소 활성도

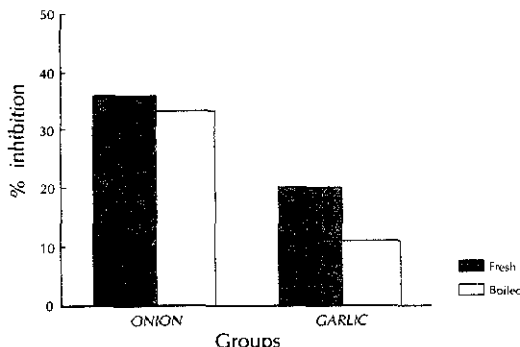
**Table 1. Effects of onion and garlic on copper-phenanthroline induced DNA damage**

Groups	DNA degradation	
	As35 nm	% inhibition
Control	0.1636	-
Onion	Fresh	0.1046
	Boiled	0.1086
Garlic	Fresh	0.1303
	Boiled	0.1449

The reaction mixtures contain 25mM phosphate buffer (pH 6.4), calf thymus DNA 400ug, 1,10-phenanthroline 36.4mg, sodium azide 5mM and cupric chloride 50ng in final volume 1ml. 50ul homogenate (50% w/v in 100mM phosphate buffer, pH 7.4) were added to reaction mixture and incubated in 37°C for 60min

DNA damage was determined by TBA method and detail method was described in material and methods

Values are means of three independent determinations



**Fig. 1. Effects of onion and garlic on copper-phenanthroline induced DNA damage.**

Table 2는 양파와 마늘에서 항산화효소인 SOD, catalase 및 GSHPx 활성도를 측정했으므로, SOD활성도는 마늘이 양파에 비해 약 1.4배 높은 1600.00 ± 89.24 U/g tissue를 나타냈으나, catalase와 GSHPx 활성도는 양파가 마늘에 비해 각각 약 1.7배 및 25.0배 높은 7.22 ± 0.38 U/g tissue 및 132.22 ± 1.98 U/g tissue를 나타냈다. 따라서 catalase와 GSHPx활성도가 양파가 마늘에 비해 더 높기 때문에 양파의 항산화 작용에 이들 효소가 관여될 것으로 사료되나, 본실험에서 양파와 마늘 균질액을 100°C에서 5분간 가열한 시료에서 이들 항산화효소 활성은 거의 소실되었으며, DNA손상 억제효과는 양파에서 6.79%만이 감소된 반면에, 마늘은 43.70%가 감소되어 양파에서 Cu<sup>2+</sup>에 의한 DNA손상 억제효과는 SOD, catalase 및 GSHPx에 의한 효과가 아닌 것으로 여겨진다.

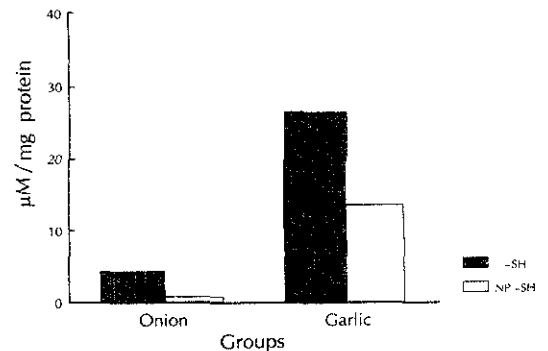
#### 양파와 마늘의 sulfhydryl group량

Fig. 2는 양파와 마늘의 sulfhydryl groups(-SH)를 DTNB반응으로 측정한 결과 총 -SH양이 양파는 4.27

**Table 2. The activities of antioxidant enzymes in garlic and onion (Mean ± S.D., n=5)**

Groups	Enzyme activities (U/g tissue)	
	Garlic	Onion
SOD	1600.00 ± 89.24	1111.11 ± 74.95
Catalase	4.23 ± 0.44	7.22 ± 0.38
GSHPx	5.35 ± 0.23	132.22 ± 1.98

SOD : superoxide dismutase, GSHPx : glutathione peroxidase



**Fig. 2. The contents of sulfhydryl groups in onion and garlic. T-SH ; total sulfhydryl, NP-SH ; nonprotein sulfhydryl group**

uM/mg protein, 마늘은 26.63uM/mg protein이었고, 비단백성 -SH는 양파 1.08uM/mg protein, 마늘 13.85 uM/mg protein.으로써 총-SH양과 비단백성 -SH양은 마늘이 양파보다 많았다. 따라서 본 실험에서 양파가 마늘보다 Cu<sup>2+</sup>에 의한 DNA손상 억제효과가 더 큰것은 -SH량에 의한 결과는 아닌것으로 생각된다.

SOD, catalase 및 glutathione의 Cu<sup>2+</sup>에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 억제효과

Table 3은 SOD, catalase 및 glutathione의 Cu<sup>2+</sup>에 의한 DNA산화적 손상에 대한 억제효과를 알아본 것으로, 반응액에 SOD (150U/ml) 단독첨가나, catalase

Table 3. Effects of catalase, SOD and GSH on copper-phenanthroline induced DNA damage

Groups	DNA damage	
	A535 nm	% inhibition
Control	0.1520	-
CAT	0.1471	3.22
SOD	0.1507	0.85
CAT + SOD	0.1511	0.55
GSH	0.1254	17.46

The reaction mixtures contain 25mM phosphate buffer (pH 6.4), calf thymus DNA 400ug, 1,10-phenanthroline 36.4mg, sodium azide 5mM and cupric chloride 50ng final volume 1ml

Additions were made at the following concentration : 500U catalase (CAT), 150U superoxide dismutase (SOD) and 1mM reduced glutathione (GSH)and incubated in 37°C for 60min DNA damage was determined by TBA method and detail method was described in materials and methods

Values are means of of three independent determinations

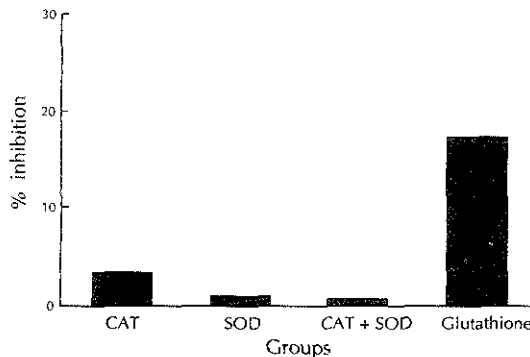


Fig. 3. Effects of antioxidant enzymes and glutathione on copper-phenanthroline induced DNA damage.

(500/ml)와 SOD(150U/ml) 병용첨가는 Cu<sup>2+</sup>의 DNA 손상에 대한 영향은 없었다. 그러나 catalase단독 첨가로는 DNA손상을 대조군에 비하여 3.22% 억제하였으며, 환원 glutathione(GSH)(1mM/ml)단독첨가로 DNA 손상을 17.46% 억제하여, DNA의 산화적 손상에 대해 SOD는 영향을 미치지 못했고, catalase는 약간의 손상 억제효과를 나타낸 반면에 GSH가 가장 강한 억제효과를 나타내어 Cu<sup>2+</sup>-phenanthroline복합체에 의하여 유발된 DNA손상은 superoxide나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성보다는 hydroxyl radicals의 생성에 의한 손상인 것을 보여 주고 있다(Fig. 3). 그러나 본실험에서 양파의 DNA손상 억제 효과는 비단백성 -SH양이 양파보다 마늘이 더 높으며, 양파의 glutathione량이 실험에 사용한 양에 비하여 1/1000 이하로 대단히 적기 때문에 양파의 효과가 glutathione에 의한 원인은 아닌것으로 사료된다.

이상의 실험결과 양파는 마늘보다 더 강한 Cu<sup>2+</sup>-phenanthroline복합체에 의한 DNA손상 억제효과를 나타냈는데, 양파에서 DNA손상 억제를 나타내는 물질은 SOD, GSHPx 및 catalase와 같은 항산화효소나 sulfhydryl기에 의한 작용이 아닌 내열성이 있는 물질로 이에 대한 지속적인 연구가 있어야 할 것으로 생각 된다.

## 요 약

양파와 마늘이 산화적 DNA 손상에 미치는 영향을 시험관내에서 Cu<sup>2+</sup>와 phenanthroline에 의해 유리된 TBA반응물을 측정하여 관찰한 결과 양파가 마늘보다 더 강한 TBA반응물 억제효과를 나타냈으며, 양파의 효과는 시료를 가열하여도 변화가 적었다. 항산화효소인 SOD활성은 마늘에서, catalase와 glutathione peroxidase 활성도는 양파에서 더 높았고, -SH 기는 마늘에서 더 많았다. Cu<sup>2+</sup>와 phenanthroline에 의한 산화적 DNA 손상에 대해 SOD와 catalase는 영향이 적고, glutathione은 영향이 비교적 큰것으로 나타나 양파의 마늘보다 더 큰 DNA손상 억제효과는 항산화효소나, -SH 기에 의한것이 아니며, 특히 양파에 열을 가해도 DNA손상 억제 효과의 감소가 적은점으로 보아 비교적 고온에서 안정된 물질이 Cu<sup>2+</sup>와 phenanthroline에 의한 DNA손상 억제효과를 나타내는 것으로 사료된다.

## 문헌

1. Fridovich, I. : Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, **15**, 247(1986)
2. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : Roles of free radicals and catalytic metal ions in human disease. In *"Methods in enzymology"*, Fleischer, S. and Packer, L. (eds.), Academic Press, New York, **136**, 1(1990)
3. Fred, J., Yost, J. and Fridovich, I. : Superoxide and hydrogen peroxide in oxygen damage. *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 514(1976)
4. Fridovich, I. : Superoxide dismutases. *J. Biol. Chem.*, **264**, 7761(1989)
5. Meister, A. and Anderson, M. E. : Glutathione peroxidase. *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 711(1983)
6. Harman, D. : Free radicals and the origination, evolution and present status of the free radical theory of aging. in *"Free radicals in molecular biology, aging, and disease"*, Armstrong, D., Sohal, R. S., Culter, R. G. and Slater, T. F. (eds.), Raven Press, New York, p. 27(1984)
7. Kensler, T., Bush, D. and Kozumbo, W. : Antitumor promotor effects of a copper coordination compound with superoxide dismutase like activity in mouse epidermis. In *"Oxygen radicals and their scavenger systems"*, Greenwald, R. A. and Cohen, G. (eds.), Elsevier Science Publishing Co., New York, p.173(1983)
8. Pratt, D. E. and Watts, B. W. : The antioxidant activity of vegetable extracts, I. Flavone aglycones. *J. Food Sci.*, **29**, 27(1964)
9. Pratt, D. E. : Lipid antioxidants in plant tissue. *J. Food Sci.*, **30**, 737(1965)
10. 赤松金芳 : 新訂 和漢藥, 東京, 醫齒學出版社, p.587 (1974)
11. Uchida, Y., Takehaski, T. and Sato, N. : The characteristics of the antibacterial activity of garlic. *Japan J. Antibiot.*, **84**, 547(1976)
12. Yamata, Y. and Azuma, K. : Evaluation of the *in vitro* antifungal activity of allicin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **11**, 743(1977)
13. Jain, R. C. and Vyas, C. R. : Garlic in alloxan induced diabetic rabbits. *Am. J. Clin. Nutri.*, **28**, 684(1975)
14. Pope, L. M., Reich, K. A., Graham, D. R. and Sigman, D. S. : Products of DNA cleavage by the 1, 10-phenanthroline copper complex. *Biochemistry*, **257**, 1212(1982)
15. Gutteridge, J. M. C. and Halliwell, B. : The role of superoxide and hydroxy radicals in the degradation of DNA and deoxyribose induced by a copper phenanthroline complex. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2801 (1982)
16. Samuni, A., Chevion, M. and Czapski, G. : Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals. *J. Biol. Chem.*, **256**, 12632(1981)
17. Gutteridge, J. M. C. and Wilkins, S. : Copper salt-dependent hydroxyl radical formation. Damage to proteins acting as antioxidants. *Biochem. Biophys. Acta.*, **759**, 38(1983)
18. Gutteridge, J. M. C. : Antioxidant properties of ceruloplasmin towards iron and copper-dependent oxygen radical formation. *FEBS Lett.*, **157**, 37(1983)
19. Robert, A., Greenwald. : Assay for catalytic trace copper in biological fluids. CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, New York, p.395 (1989)
20. Crapo, C. H., McCord, J. M. and Fridovich, I. : Preparation and assay of superoxide dismutase. In *"Methods in enzymology"*, Fleischer, S. and Packer, L. (eds.), Academic Press, New York, p.53, p.382(1978)
21. Abei, H. : Catalase. In *"Methods of enzymatic analysis"*, Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. and Grabl, M. (eds.), 3rd ed., Verlag Chemie., p.273(1983)
22. Flohe, L., Wolfeng, A. and Gunzler, W. A. : Assay of glutathione peroxidase. In *"Methods in enzymology"*, Packer, L. (ed.), Academic Press, New York, p.105, p. 114(1984)
23. Lowry, C. H., Rsenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256(1951)
24. Habeeb, A. F. S. A. : Reaction of protein sulfhydryl groups. In *"Methods in enzymology"*, Hirs, C. H. W. and Timasheff, S. N. (eds.), Academic Press, New York, p.25, p.457(1972)

(1992년 1월 15일 접수)