

## Linoleic acid 酸化生成物の DNA손상작용에 있어서의 活性酸素種의 역할

김선봉 · 강진훈 · 이용우 · 김인수 · 박영호  
부산수산대학 식품공학과

### The Role of Active Oxygen on DNA Damage by Linoleic Acid Peroxidation Products

Seon-Bong Kim, Jin-Hoon Kang, Yong-Woo Lee, In-Soo Kim and Yeung-Ho Park

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan

#### Abstract

The present paper was carried out to investigate the effects of active oxygen radicals on the DNA damage by linoleic acid peroxidation by using active oxygen scavengers in a linoleic acid-DNA system. DNA was greatly damaged by linoleic acid peroxidation, and the DNA damage was inhibited by the addition of active oxygen scavengers. Among active oxygen scavengers tested,  $\alpha$ -tocopherol and superoxide dismutase greatly inhibited the DNA damage, but catalase and tris (hydroxymethyl) aminomethane didn't show such effects. Accordingly, singlet oxygen and superoxide anion greatly affected to the DNA damage occurring during linoleic acid peroxidation, and hydrogen peroxide was shown to participate in DNA damage in the early stage of peroxidation. And, the DNA damage by active oxygen radicals was mainly induced in the early stage of linoleic acid peroxidation.

#### 서 론

불포화화합물의 산화로 생성되는 活性酸素種 즉, 일중항산소( $^1O_2$ ), superoxide anion( $\cdot O_2^-$ ), 과산화수소수( $H_2O_2$ ) 및 水酸radical( $\cdot OH$ ) 등은 식품 및 생체성분 중의 지질산화의 radical 연쇄반응을 촉진할 뿐 만 아니라 DNA 및 단백질에도 손상을 일으켜 발암을 비롯하여 老化, 動脈硬化 등의 성인병에도 관여하는 것으로 알려져 있어 많은 연구자들의 관심의 대상이 되고 있다.

이러한 活性酸素種의 DNA손상작용에 대하여서는 Morita등<sup>(1,2,3)</sup> 및 Nanjou등<sup>(4)</sup>이 당질 및 그 유도체의 자동산화로 생성하는 活性酸素種의 DNA손상작용을 보고하였으며, Ueda 등<sup>(5,6)</sup>이 mitomycinC의 DNA손상작용에 대한 活性酸素種의 영향을 보고한 바 있으나 지질산화로 생성되는 活性酸素種의 DNA손상작용에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 차등<sup>(7)</sup>의 연구에서 linoleic acid의 산화로 DNA가 크게 손상되는 것을 밝힌데 이어 지질산화에 의한 DNA손상작용기구를 구명하기 위하여 linoleic acid와 DNA의 반응계에 각종의 活性酸素消去劑를 첨가하여 37°C에서 반응시키고 경시적인

DNA손상정도를 agarose gel 전기영동을 통하여 비교·검토하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

본 실험에서 사용한 活性酸素消去劑는  $\alpha$ -tocopherol(United States Biochem. Co.), cysteine (Hayashi Chem. Co.), superoxide dismutase(SOD, Toyobo Co.), ascorbic acid(Hayashi Chem. Co.), tris(hydroxymethyl)amimomethane(Tris, Sigma Chem. Co.), mannitol(Kanto chem. Co.) 및 catalase(Sigma chem. Co.)등 이었으며 모델반응계로 사용한 linoleic acid와 DNA는 Sigma chem. Co.에서 購入한 것을 사용하였다. 한편, DNA의 정량을 위해서는 청어정자의 DNA(Sigma Chem. Co.)를 사용하였고 전기영동에 사용한 agarose는 半井化學(日本)에서 購入하였다.

##### Plasmid pBR 322DNA의 추출

Rodriguez와 Tait의 miniscreen法<sup>(8)</sup>에 따라 추출하였다.

**DNA와 linoleic acid의 반응**

Linoleic acid를 0.1×SSC buffer(15mM NaCl과 1.5mM sodium citrate를 함유, pH 7.2)와 함께 sonicator로 균일하게 현탁시키고, 추출한 DNA(TE buffer, pH 7.6에 용해)와 혼합한 다음 37°C에서 일정 시간 반응시켰다. 또한, 본 반응계에 일정한 농도로 조제한 活性酸素消去劑를 첨가한 후 37°C에서 반응시키고 DNA의 손상에 대한 活性酸素種의 영향을 조사하였다.

**Agarose gel 전기영동분석**

Agarose gel 전기영동은 Dillon등<sup>10)</sup>의 방법에 따라 실시하였으며 agarose의 농도는 1%로 하였다.

과산화물가(peroxide value,POV)와 공액diene의 측정  
과산화물가는 A. O. A. C法<sup>10)</sup>, 공액diene은 日本基準  
油脂分析試験法<sup>11)</sup>에 따라 실시하였다.

**DNA의 정량**

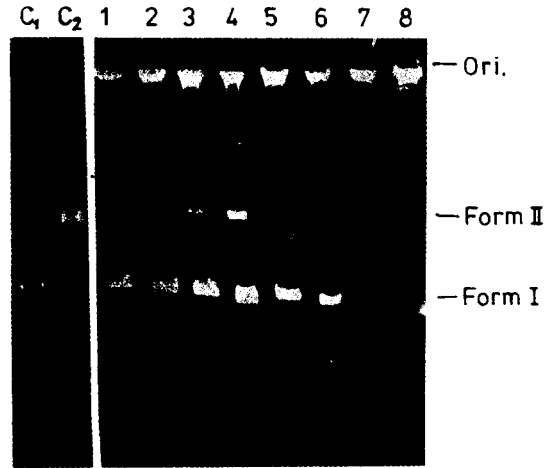
DNA의 정량은 山岐<sup>12)</sup>의 방법에 따라 행하였다. DNA손상정도는 반응전의 DNA량을 100%로 하고 그 감소율로 나타내었다.

**결과 및 고찰**

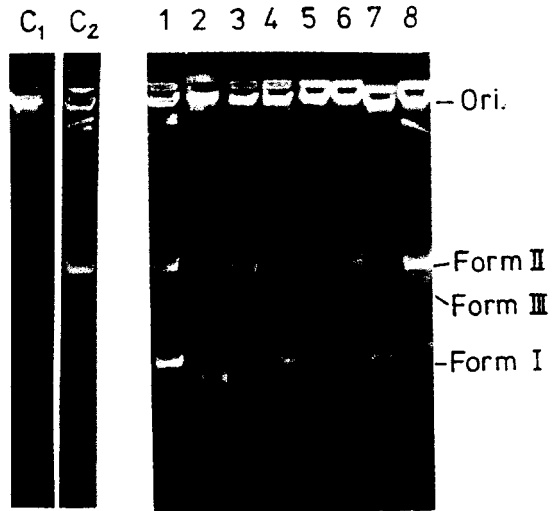
지질산화로 생성되는 活性酸素種의 DNA손상작용을 조사하기 위하여 각종의 活性酸素消去劑를 DNA와 linoleic acid의 반응계에 첨가하고 이들 소거제에 의한 DNA손상억제능을 살펴 본 결과는 Fig.1 및 Fig.2와 같다.

본 실험에서 사용한 活性酸素消去劑로서 일중항산소 소거제는 α-tocopherol과 cysteine, superoxide anion소거제는 SOD와 ascorbic acid, 水酸radical소거제는 Tris와 mannitol, 과산화수소소거제는 catalase를 사용하였다.

반응1일에 linoleic acid와 DNA를 반응시킨 대조구(C<sub>2</sub>)에서는 Form I DNA(covalently closed circular DNA)로 이행하였는데 반하여 活性酸素消去劑를 첨가한 반응계에서는 DNA의 손상이 크게 억제되었으며, 그중 cysteine과 ascorbic acid첨가구(lane 3, 4)에서는 일부 Form I DNA가 단쇄절단(單鎖切斷)을 일으켜 Form II DNA로 이행하였지만 BHT, α-tocopherol 및 SOD첨가구(lane 1,2 및 5)에서는 뛰어난 억제효과를 나타내었다(Fig.1). 반응3일째의 결과에 있어서도 가장 크게 억제하였다. 그러나 水酸radical 消去劑인



**Fig. 1. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with linoleic acid in the presence of the active oxygen scavengers at 37°C**  
pBR 322 DNA was incubated with linoleic acid and each concentration of the active oxygen scavengers at 37°C for 1 day.  
C<sub>1</sub>, DNA only(600μg); C<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>+linoleic acid(6mM); 1, C<sub>2</sub>+BHT(0.5mM); 2, C<sub>2</sub>+α-tocopherol(220 μg); 3, C<sub>2</sub>+cysteine(10mM); 4, C<sub>2</sub>+ascorbic acid(1mM); 5, C<sub>2</sub>+superoxide dismutase(1 μg); 6, C<sub>2</sub>+tris (hydroxymethyl)-aminomethane(10 mM); 7, C<sub>2</sub>+mannitol (10mM); 8, C<sub>2</sub>+catalase (40 μg).



**Fig. 2. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with linoleic acid in the presence of the active oxygen scavengers at 37°C**  
pBR 322 DNA was incubated with linoleic acid and each concentration of the active oxygen scavenger at 37°C for 3 days.  
Experimental conditions are the same as in Fig. 1.

$\alpha$ -tocopherol과 SOD를 첨가한 경우가 DNA손상을 Tris와 manaitol(lane 6, 7) 및 과산화수소소거제인 catalase(lane 8)를 첨가한 경우는 다른 반응계에 비하여 DNA손상억제능이 약한 것을 알 수 있다(Fig. 2).

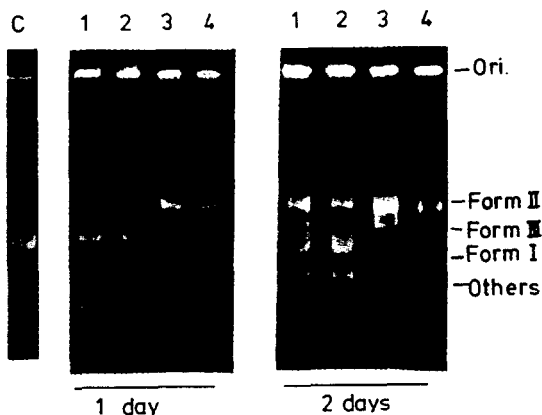
한편, Fig. 3은 2종류의 活性酸素消去劑를 동시에 DNA와 linoleic acid의 반응계에 첨가하여 이들 活性酸素種의 DNA손상에 대한 상승작용을 조사한 결과인데 SOD와  $\alpha$ -tocopherol 첨가구(lane 1) 및 SOD와 Tris첨가구(lane 2)에서는 반응2일째까지 Form I DNA가 상당량 유지되는 것을 알 수 있으나 SOD와 catalase(lane 3) 및 catalase와 Tris(lane 4)의 첨가구에서는 Form I DNA가 완전히 절단되어 Form III DNA가 형성되거나 Form II DNA의 형태로 소실되어 DNA손상억제효과가 적은 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 DNA손상작용에 대한 活性酸素種의 영향에 있어 일중항산소와 superoxide anion의 영향이 가장 크고 水酸radical과 과산화수소는 그다지 뚜렷한 영향을 나타내지 않는 것을 간접적으로 증명하고 있다. 또한, SOD와 catalase의 첨가구에서 SOD가 첨가됨에도 불구하고 SOD와 Tris의 첨가구에 비하여 DNA손상억제효과가 낮은 것은 Tris에 비하여 catalase가 SOD와 함께 DNA손상억제에 대한 상승효과가 적은 것으로 생각할 수 있고 linoleic acid의 산화에 대한 活性酸素種

의 영향이 일중항산소, superoxide anion, 水酸radical, 과산화수소의 順으로 큰 것으로 추정된다.

한편, 活性酸素種의 DNA손상정도를 정량적으로 분석한 결과는 Table 1에 나타내었는데 전기영동상의 결과와 비슷한 경향을 나타내어 DNA와 linoleic acid의 대조구에서 반응1일에 42.8%의 감소율을 나타낸 반면,  $\alpha$ -tocopherol과 SOD첨가구에서는 12.5% 및 28.6%로 DNA손상을 크게 억제하였다. 그리고, Tris와 catalase첨가구에서도 대조구에 비하여 다소 DNA손상이 억제되었으나 그다지 뛰어나지는 않았다.

이상, linoleic acid의 산화에 의한 DNA손상에 미치는 活性酸素種의 영향을 살펴본 결과 일중항산소와 superoxide anion의 영향이 가장 컸으며 그중에서도 일중항산소의 영향이 더 컸다. 또한, 과산화수소나 水酸radical은 다소 영향력이 떨어졌는데 이것은 과산화수소가 DNA손상에 미치는 영향이 지질산화의 초기반응에 관여하거나 또는 일중항산소의 수명이 活性酸素種中에서 가장 짧음에도 불구하고 반응기간동안 다른 活性酸素보다 DNA손상에 큰 영향을 미치는 것으로 보아 과산화수소가 DNA손상작용에 직접 관여하지 않고 共存하는 superoxide anion과의 상호반응으로 생성된 일중항산소가 DNA손상에 크게 영향을 미치는 것으로 생각된다.

Fig. 4는 linoleic acid와 活性酸素消去劑를 혼합하여 1일간 반응시킨 용액을 다시 DNA와 함께 6시간 동안 37°C에서 반응시키고 DNA손상의 정도를 조사한 결과



**Fig. 3. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with linoleic acid in the presence of the active oxygen scavengers at 37°C**

pBR 322 DNA was incubated with linoleic acid(6mM) and each concentration of the active oxygen scavengers at 37°C.

C, DNA only(600  $\mu$ ); 1, Linoleic acid(6mM, LA)+superoxide dismutase(1  $\mu$ ) and  $\alpha$ -tocopherol(220  $\mu$ ); 2, LA+superoxide dismutase(1  $\mu$ ) and tris(hydroxymethyl) aminomethane(10mM, Tris); 3, LA+superoxide dismutase(1  $\mu$ ) and catalase(40  $\mu$ ); 4, LA+catalase (40  $\mu$ ) and Tris(10 mM).

**Table 1. Influences of the active oxygen scavengers on the DNA damage during linoleic acid peroxidation at 37°C**

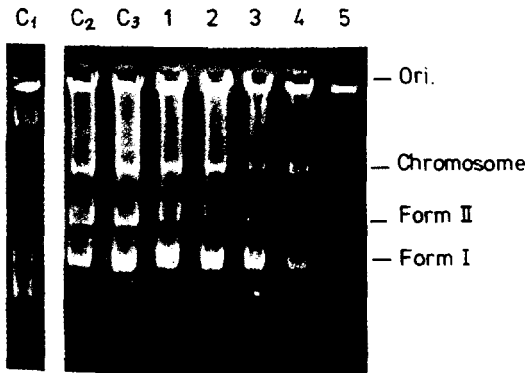
	Incubation time, days			
	1	2	3	4
DNA only	42.0	54.9	56.7	62.5
DNA + linoleate	42.8	56.7	60.7	66.5
BHT	33.0	39.7	58.0	58.0
$\alpha$ -Tocopherol	12.5	22.3	29.5	42.0
SOD*	28.6	35.3	40.6	44.2
Tris**	41.1	53.6	58.9	59.8
Catalase	33.0	40.8	60.3	62.1

Concentrations of the active oxygen scavengers are the same as in Fig. 1.

Forty microliters of reaction mixture containing DNA(600  $\mu$ ), linoleic acid(6mM) and each concentration of active oxygen scavenger was incubated at 37°C, and then 10  $\mu$ l of aliquot was analyzed for determining the degree of DNA damage.

\* SOD means superoxide dismutase

\*\* Tris means tris(hydroxymethyl) aminomethane



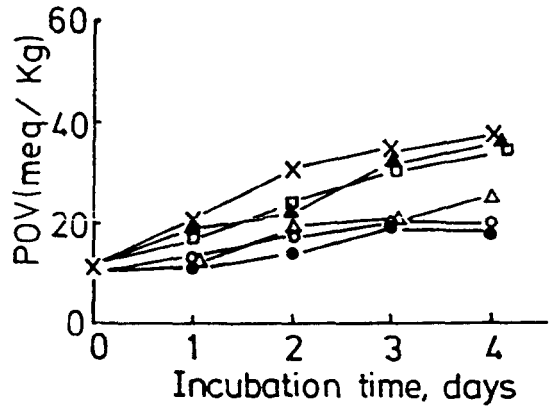
**Fig. 4. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with oxidized linoleic acid in the presence of the active oxygen scavengers at 37°C**  
 Linoleic acid was incubated with each concentration of the active oxygen scavengers at 37°C for 1 day, and then the oxidized linoleic acid was incubated with pBR 322 DNA at 37°C for 6 hrs.  
 C<sub>1</sub>, DNA only (600 μg, not incubated); C<sub>2</sub>, DNA only (600 μg, incubated); C<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>+linoleic acid(6mM); 1, C<sub>3</sub>+BHT (0.5mM); 2, C<sub>3</sub>+α-tocopherol(220 μg); 3, C<sub>3</sub>+superoxide dismutase(1 μg); 4, C<sub>3</sub>+tris(hydroxymethyl) aminomethane(10mM); 5, C<sub>3</sub>+catalase(40 μg).

이다.

앞서 linoleic acid와 DNA가 공존하는 경우와는 달리 본 반응액에서의 DNA손상작용은 거의 일어나지 않았다. 이것은 지질산화과정중에 생성되는 活性酸素種의 DNA에 대한 영향은 DNA가 共存하는 경우에만 나타나고 DNA와 linoleic acid와의 상호반응으로 생성되는 radical이 linoleic acid단독의 용액내에서는 생성되지 않거나 活性酸素種의 수명이 짧아 일단 반응계에서 벗어난 경우에는 활성이 소실되거나 活性酸素 그 자체가 소멸되는 것으로 생각된다.

Nakayama 등<sup>(13)</sup>은 methyl linoleate를 DNA와 반응시키고 ESR(Electron spin resonance)의 signal을 조사한 결과 methyl linoleate와 DNA의 혼합체에서만 radical이 생성되었고 DNA 단독 또는 methyl linoleate 단독의 용액에서는 생성되지 않아 DNA상에 생긴 radical이 methyl linoleate와의 상호반응으로 생성된 것이라고 보고한 바 있다.

Fig. 5는 linoleic acid와 活性酸素消去劑를 혼합시키고 POV의 경시적인 변화를 측정된 결과인데 전반적으로 linoleic acid만의 대조구에 비하여 活性酸素消去劑를 첨가한 반응계에서의 과산화물의 생성이 크게 억제되었다. 그중에서 α-tocopherol, BHT 및 SOD가 항산화능이 뛰어나서 반응4일째의 POV가 대조구의 약 40%에 불과하였다.



**Fig. 5. Changes in peroxide value(POV) of linoleic acid in the presence of the active oxygen scavengers during the peroxidation at 37°C**

Two hundred microliters of reaction mixture containing linoleic acid (6mM) and each concentration of the active oxygen scavengers at 37°C, and then 50 μl of aliquot was used for POV analyses.

Six millimole linoleic acid only (X-X), 0.5mM BHT (O-O), 220μg α tocopherol (●-●), 1μg superoxide dismutase(Δ-Δ), 10mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (▲-▲) or 40 μg catalase (□-□) was maintained at 37°C.

또한, Fig. 5와 동일한 조건으로 공액diene의 생성을 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. POV의 경우와 마찬가지로 공액diene의 증가는 α-tocopherol, BHT 및 SOD의 첨가에 의하여 억제되는 경향을 나타내었다. 그러나 공액 diene의 증가속도와 POV의 증가 속도가 반드시 비례하지는 않았다.

이상, linoleic acid산화중의 POV가 活性酸素消去劑, 특히 일중항산소소거제인 α-tocopherol, superoxide anion 소거제인 SOD의 첨가로 그 증가가 크게 억제되었는데 이같은 결과는 이들 소거제의 첨가로 linoleic의 산화에 의한 DNA손상이 크게 억제되었다는 점과 동일한 결과인 것을 알 수 있다. 따라서, 活性酸素種의 DNA손상작용과 지질산화에 대한 活性酸素種의 반응기구 간에는 깊은 관련이 있을 것으로 생각된다.

이상과 같은 活性酸素種의 DNA손상작용 기구에 대하여 Inoue<sup>(14)</sup>는 linoleic acid의 산화에 의한 DNA사슬의 절단작용은 DNA염기중 guanine부근에서 특이적으로 일어나며 이와 같은 작용에서는 酸素radical이 크게 관여한다고 보고하였으며 또한, Brawn과 Fridovich<sup>(15)</sup>는 水酸radical이 비특이적으로 pyrimidine 및 purine化合物과 반응하는데 일중항산소는 핵산성분중 guanine과 그에 관련된 purine유도체와 용이하게 반응한다고 보고하고 있다.

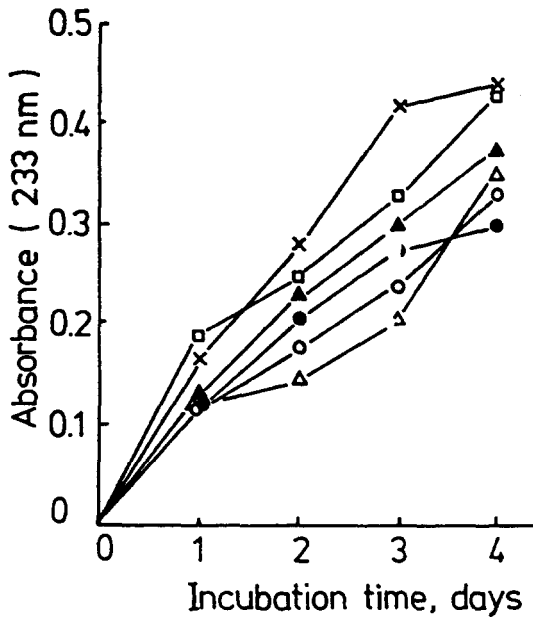


Fig. 6. Influence of the active oxygen scavengers on the changes in conjugated diene bonds during linoleic acid peroxidation at 37°C

Experimental conditions are the same as in Fig. 5.

본 실험의 결과로 볼 때 linoleic acid와 DNA의 반응 1일째의 경우 대조구에서는 Form I DNA가 linoleic acid의 산화에 의하여 단쇄절단을 일으켜 Form II DNA만 형성되었는데 반하여 活性酸素消去劑를 첨가한 반응계에서는 대부분이 Form I DNA를 그대로 유지하여 대조구의 단쇄절단이 억제되는 것을 알 수 있었다. 이같은 결과는 供試한 活性酸素消去劑가 linoleic acid의 산화에 의한 DNA사슬의 무작위적인 절단을 방지하는 것을 의미하며 다시 말하면 linoleic acid산화중 생성한 活性酸素種이 DNA사슬의 절단에 크게 관여하는 것을 뜻한다. 특히, 供試한 活性酸素消去劑中 일중항산소소거제인  $\alpha$ -tocopherol의 DNA손상억제능이 반응 3일까지 크게 유지되는 것으로 보아 다른 活性酸素種보다 일중항산소가 DNA손상작용에 가장 크게 관여하는 것을 알 수 있다. 반면에, 水酸radical과 과산화수소의 소거제를 첨가한 경우에는 대조구에 비하여서는 DNA손상이 억제되었으나 그다지 뛰어난 억제능을 나타내지 않아 이들 活性酸素는 linoleic acid산화초기의 DNA손상작용에 관여하는 것으로 생각된다. 또한, 上記한 活性酸素消去劑의 DNA손상억제능이 linoleic acid산화중의 POV의 증가에 대한 活性酸素消去劑의 억제능과 동일한 경향을 나타내어, 지질산화반응이나 이로 인한 DNA손상작용에 대한 活性酸素種의

반응기구에는 서로 연관성이 있을 것으로 생각된다.

한편, 지질산화생성물에는 活性酸素種外에도 過酸化물과 malonaldehyde, hexanal 등의 2차산화생성물 등도 생성되는데 이들에 의한 DNA손상작용도 예상되어 이에 대하여서도 검토중에 있다.

## 요 약

지질산화에 의한 DNA손상작용기구를 구명하기 위하여 linoleic acid와 DNA의 반응계에 各種의 活性酸素消去劑를 첨가하여 37°C에서 반응시키고 linoleic acid 산화에 의하여 생성하는 活性酸素種의 DNA손상작용을 조사하였는데 다음과 같은 결과를 얻었다.

첨가한 活性酸素消去劑中  $\alpha$ -tocopherol과 SOD가 DNA손상을 크게 억제하여 linoleic acid산화에 의한 DNA손상작용에는 일중항산소와 superoxide anion이 크게 영향을 미쳤으며 그중에서도 일중항산소가 더욱 크게 영향을 미친 것으로 나타났다. 반면에, 水酸radical과 과산화수소는 DNA손상에 크게 영향을 미치지 않았다. 또한, linoleic acid와 DNA가 共存하는 경우에만 DNA의 손상이 일어난다는 것을 알 수 있었다.

活性酸素消去劑를 첨가한 반응계에서 linoleic acid만의 대조구에 비하여 POV와 공액diene의 증가를 크게 억제하였으며 그중에서도 SOD와  $\alpha$ -tocopherol의 항산화능이 가장 큰 것으로 나타나 지질산화과정에서의 活性酸素種의 관여는 각각 다른 형태로 이루어지는 것을 알 수 있었다.

## 문 헌

- Morita, J., N. Kashimura and T. Komano: *Agric. Biol. Chem.*, **44**(4), 883 (1980)
- Morita, J., N. Kashimura and T. Komano: *Agric. Biol. Chem.*, **44**(12), 2971 (1980)
- Morita, J., T. Okugawa and T. Komano: *Agric. Biol. Chem.*, **46**(1), 279 (1982)
- Nanjou, S., S. Fujii, K. Tanaka, K. Ueda and T. Komano: *Agric. Biol. Chem.*, **48** (11), 2865 (1984)
- Ueda, K., J. Morita and T. Komano: *of Antibiotics*, **34**(3), 317 (1981)
- Ueda, K., J. Morita and T. Komano: *J. of Antibiotics*, **35**(10), 1380 (1982)
- 朴榮浩·姜珍堦·朴震宇·洪龍基·金善奉: 한국식품과학회 제36차 학술발표회 초록(1987)
- Rodriguez, R. L. and Robert C. Tait: "Recombinant

- DNA Techniques; An Introduction*" (R. L. Rodriguez and R. C. Tait ed.), pp. 50, Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts (1983) .
9. Dillon, J. R., G. S. Benzonsen and K. H. Yeung: "*Recombinant DNA Methodology*" (J. R. Dillon, A. Nasim and E. R. Nestmann ed.) pp. 13, Willy and Sins. Inc., New York (1985)
  10. A. O. A. C.: *Official Methods of Analysis*. 14th ed., Assoc. of Office. Cancer Res., **44**, 2848 (1984)
  11. 日本油化學協會編, 基本油脂分析試驗法. pp. 2, 14, 15, 41 (1981)
  12. 由岐英剛: 生化學分析法. 由岐英剛編. pp. 276, 南江堂, 東京 (1984)
  13. Nakayama, T., M. Kodama and C. Nagata: *Agric. Biol. Chem.*, **48**(2), 571 (1984)
  14. Inoue, S.: *FEBS Letter*, **172**, 231 (1984)
  15. Brawn, K. and I. Fridovich: *Arch. Biochem. Biophys.* **206**(2), 414 (1981)

---

(1987년 3월 16일 접수)