

지질산화생성물의 DNA손상작용 및 그 억제기구*

김 선 봉 · 강 진 훈 · 박 영 호

釜山水産大學 食品工學科
(1987년 7월 14일 수리)

DNA Damage of Lipid Oxidation Products and Its Inhibition Mechanism

Seon-Bong KIM, Jin-Hoon KANG, and Yeung-Ho PARK

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan,
Namgu, Pusan, 608 Korea

(Accepted July 14, 1987)

The damage of plasmid DNA by lipid peroxidation and its inhibition were investigated through the model system of DNA and linoleic acid at 37°C. The degree of DNA damage increased in proportion to the increase of concentration and peroxidation of linoleic acid. DNA damage induced from linoleic acid peroxidation was greatly inhibited by the addition of active oxygen scavengers, especially, singlet oxygen scavenger(α -tocopherol, cysteine) and superoxide anion scavenger(superoxide dismutase, ascorbic acid) in reaction system. These active oxygens, such as superoxide anion and hydrogen peroxide were rapidly generated in the early stage of peroxidation (POV below 100 meq/kg) and also scavenged by the addition of superoxide dismutase and catalase, respectively. Hydroperoxide isolated from autoxidised linoleic acid showed DNA damage. Hydroperoxide induced-DNA damage was not inhibited by active oxygen scavengers. Lipid oxidation products, malonaldehyde and hexanal, also influenced on the DNA damage. Accordingly, it is speculated that DNA damage by lipid oxidation products is due to active oxygens such as singlet oxygen and superoxide anion formed in the early stage of peroxidation, direct action of hydroperoxide and formation of low molecular carbonyl compound-DNA complex.

Furthermore, DNA damage induced by lipid peroxidation was remarkably inhibited by the addition of active oxygen scavengers and natural antioxidative fractions extracted from garlic and ginger. These antioxidative fractions also suppressed the generation of active oxygens and linoleic acid oxidation. It is assumed that the inhibition of DNA damage by garlic and ginger extracts is due to the scavenging effect of active oxygens and the inhibition of hydroperoxide and oxidation products formation.

緒 論

最近에 加工食品의 발달과 더불어 食品由來의 活性化化合物의 섭취가 날로 증가하는 추세에 있다. 특히 脂質이 酸化하게 되면 各種 活性化化合物, 즉 活性 radical 및 過酸化물을 비롯하여 低分子카르보닐化合物(malonaldehyde, hexanal 등) 등의 酸化生成物

이 生成된다. 過酸化물은 그 自體가 강한 毒性(Yamaguchi 와 Yamashita, 1979; 1980)을 나타낼 뿐만 아니라 低分子카르보닐化合物는 食品 및 生體蛋白質의 消化率 低下 및 機能性 低下에도 關여하는 것으로 알려져 있다(Ory 와 Angello, 1982). 또한, 最近에는 脂質酸化過程中에 活性酸素種 즉, 一重項酸素(1O_2), superoxide anion($\cdot O_2^-$), 水酸 radical($\cdot OH$) 및 過酸

* 이 논문은 1986년도 문교부 자유과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

化水素(H_2O_2) 등이 생성되는 것으로 밝혀지고 있는데 이들 활성酸素種은 脂質酸化의 radical連鎖反應을 促進시킬 뿐만 아니라 DNA 및 蛋白質에 損傷을 일으켜 老化나 成人病 등과 상관성이 크다고 주목되고 있다(美濃, 1985).

食品 및 生體由來의 活性化化合物이 나타내는 DNA 損傷作用에 관한 研究는 mitomycin C의 DNA와의 反應性을 밝힌 Iyer와 Szybalski(1963)의 研究結果가 밝혀진 이래로 많은 研究者들에 의하여 研究의 관심의 對象이 되어 여러 側面에서 研究가 始導되어 왔다.

그후, Morita 등(1980a, b), Nanjou 등(1984), 柏村과 森田(1984)는 各種 還元糖을 비롯하여 당질유도체 및 아미노-당의 反應生成物에 DNA 損傷作用이 있다고 報告하였으며, Bucala 등(1984)은 환원당에 의한 DNA의 화학적수식에 대하여 研究報告한 바 있다.

그리고 脂質의 酸化反應과 관련된 DNA 損傷作用에 대하여는 Nakayama 등(1984), Brawn과 Fridovich(1981), Reiss와 Tappel(1973)이 DNA分子内に radical의 生成, 酵素反應系에 의한 活性化化合物의 관여 및 脂質酸化에 따른 DNA分子의 物理·化學的인 變化 등을 調査한 정도라 하겠다.

이와 같이 食品 및 生體由來의 活性化化合物이 여러 反應系에 걸쳐서 광범위하게 DNA分子에 物理化學的으로 影響을 미치고 있으나 실제로 脂質의 酸化過程中에 生成되는 過酸化물이나 各種 活性酸素種의 DNA의 損傷에 대한 作用機構는 물론 그 効果的인 抑制機構를 分明하게 밝힌 것은 거의 없는 實情이다.

著者 등(1986)은 加工食品中에 폭넓게 分布되고 있는 melanoidin에 의하여 DNA에 損傷을 주는 헥테르고리化合物의 不活性化作用 및 그 機構를 밝힌 바 있다.

이와 같이 食品中에는 DNA에 損傷을 주는 活性化化合物도 存在하지만 이들 活性化化合物을 不活性化 또는 抑制하는 因子 또한 存在한다고 볼 수 있으므로 活性化化合物에 의한 DNA 損傷作用을 밝혀내고 더 나아가서 DNA의 損傷을 抑制할 수 있는 대책을 장구하는 것이야말로 食品의 安全性 및 老化 등의 分子的 側面에서의 解析을 위한 基礎資料의 確立에 重要하다고 하겠다.

따라서, 本 研究에서는 DNA와 linoleic acid의 反應系를 모델系로 하여 活性酸素種을 비롯한 過酸化물, malonaldehyde, hexanal 등의 脂質酸化生成物의 DNA 損傷作用을 調査함과 아울러 linoleic acid 酸化

中的 superoxide anion($\cdot O_2^-$)과 過酸化水素(H_2O_2)의 生成을 測定하였다. 또한, DNA 損傷의 抑制機構를 살피기 위하여, 마늘과 생강에서 抽出한 天然抗酸化成分의 DNA 損傷抑制能은 물론 活性酸素消去能을 調査하였다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

供試 DNA는 *E. coli* Hb101에서 抽出한 plasmid pBR 322DNA와 청어정자 DNA(Sigma Chem. Co.)이었다. 또한 DNA와의 反應에 使用한 모델脂肪酸은 linoleic acid(Sigma Chem Co)이었는데 crude한 것으로 linoleic acid가 70.6%, oleic acid 및 palmitic acid가 각각 26.5%와 2.9%를 차지하였다.

2. 實驗方法

1) *E. coli* Hb 101의 plasmid pBR 322 DNA의 抽出

本 實驗에서 使用한 DNA는 *E. coli* Hb101에서 Rodriguez와 Tait(1983)의 miniscreen法에 따라 抽出하였다.

2) DNA와 linoleic acid의 反應

Linoleic acid를 15mM NaCl과 1.5mM sodium citrate를 含有하는 0.1XSSC buffer(standard sodium citrate buffer, pH7.2) 1.6배량과 함께 sonicator(경일초음파공업)로 均一하게 懸탁시키고 抽出한 DNA 600 μ g(TE buffer, pH7.6에 용해)과 混和한 다음 37°C에서 일정시간 反應시켰다.

3) Agarose gel 電氣泳動에 의한 DNA의 檢索
Agarose gel 電氣泳動은 Dillon 등(1985)의 方法에 따라 agarose(牛井化學, 日本)를 Tris-acetate buffer (0.4M Tris, 0.2M Sodium acetate, 0.18M EDTA, 100 μ g/ml ethidium bromide 含有)에 용해시켜 1%로 調整하여 實施하였는데 7v/cm의 전압으로 2時間동안 行하고 DNA band의 檢出은 2600Å의 단파장용자의선등(Spectronics Co., New York)을 使用하여 行하였다. 한편, DNA 損傷程度는 電氣泳動上的 DNA band의 變化로서 나타내었다.

4) 活性酸素種의 分析

Superoxide anion($\cdot O_2^-$)과 過酸化水素(H_2O_2)의 生成은 각각 Ponti 등(1978) 및 Hozumi(1969)의 方法

에 따라 測定하였다.

5) DNA 損傷의 定量的 分析

Linoleic acid 와의 反應後 DNA 의 定量은 由岐(1984)의 方法에 따라 實施하고 損傷의 程度는 反應前의 DNA 量을 100%로 하여, 經時的인 DNA의 量的인 變化를 감소율로 나타내었다.

6) Deoxyribonuclease I (DNase I)에 의한 DNA의 加水分野

DNA 의 加水分解는 DNase I (Sigma chem Co.) 를 利用하여 Reiss 와 Tappel(1973)의 方法에 따라 實施하였다.

7) 過酸化物價(Peroxide value, POV)와 共軛 diene 의 測定

POV 와 共軛 diene 은 A. O. A. C法(1984) 및 日本 標準油脂分析試驗法(1981)에 따라 測定하였다.

8) Linoleic acid 의 自動酸化와 過酸化物의 分離 및 檢出

0.9g 의 linoleic acid 를 100ml 삼각플라스크에 취하여 37°C에서 貯藏하여 두고 POV가 1,000 millieq/kg 이 上回할 때까지 수시로 흔들여 주면서 自動酸化시켰다. 이를 Gamage 등(1971)의 矽酸 column chromatography 에 의하여 過酸化物을 分離하였으며 이때의 POV 는 3,750millieq./kg 이었다.

9) 天然抗酸化成分의 抽出

마늘 및 생강의 抗酸化成分은 下등(1986)의 方法에 따라 抽出하였다.

實驗 結果

1. Linoleic acid 酸化에 의한 DNA 損傷 作用

Linoleic acid 의 濃도가 2, 6, 10, 12mM 로 되게끔 0.1×SSC buffer(pH 7.0) 으로 懸탁, 조건한 다음 600 μg/40μl 의 DNA 와 각각 37°C에서 反應시킨 結果는 Fig. 1과 같다.

本 實驗에서 나타난 DNA 의 形態는 Form I (covalently closed circular), Form II (open circular) 및 Form III (linear) DNA 이었으며, gel plate 上의 移動度는 Form I, Form III, Form II 의 順으로 나타났다. 그림에서와 같이 linoleic acid 의 存在下에서 plas-

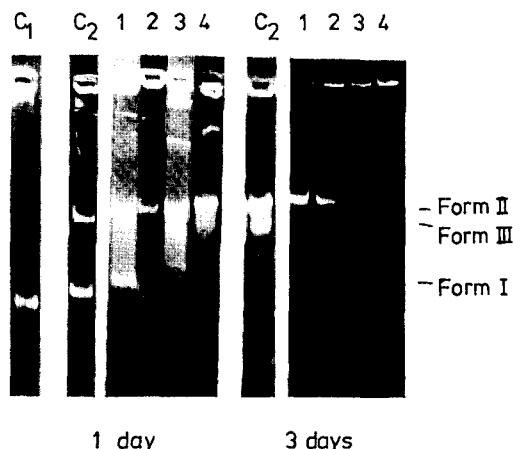


Fig. 1. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with linoleic acid at 37°C. pBR 322 DNA was incubated with each concentration of linoleic acid at 37°C. C₁, DNA only(600μg, not incubated); C₂, DNA only(600μg, incubated): 1, C₁+linoleic acid(2mM, LA); 2, C₁+LA(6mM); 3, C₁+LA(10mM); 4, C₁+LA(12mM).

mid DNA 가 크게 損傷되었으며 이러한 作用은 linoleic acid 의 濃도가 증가할수록 크게 나타났다. 즉 反應 1日째에 6mM 의 濃도(lane 2)에서 Form I DNA 가 Form II DNA 로 이행되었으며 10mM 濃도(lane 3)에서는 Form III DNA 의 生成이 확인되었다. 反應 3日째에는 linoleic acid 를 첨가하지 않은 對照區(C₂)에서도 DNA 가 다소 損傷되어 Form II DNA 가 확인되었으나 linoleic acid 를 첨가한 反應系에서는 Form III DNA 의 生成이 없이 DNA band 가 Form II 의 형태로 점차 사라져 DNA 의 損傷이 linoleic acid 의 存在下에서 한층 倍加되는 것을 알 수 있다.

Table 1. Dose-response of linoleic acid on the DNA damage during peroxidation at 37°C (%)

Concentrations of linoleic acid	Incubation time, days			
	1	2	3	4
None	30.0	46.0	54.0	62.4
2 mM	47.2	70.4	80.4	92.4
6 mM	58.8	71.2	81.2	94.8
10 mM	67.6	75.6	83.6	97.2
12 mM	68.8	77.2	87.6	97.2

Forty microliters of reaction mixtures containing DNA(600 μg) and each concentration of linoleic acid was incubated at 37°C, and then 10 μl of aliquot was analyzed for determining the degree of DNA damage.

Table 2. Changes in POV and conjugated diene bonds during peroxidation of linoleic acid at 37°C

Linoleic acid concentrations	POV(millieq/kg)					Conjugated diene bonds (O.D. at 233nm)			
	0	1 days	2 days	3 days	4 days	1 days	2 days	3 days	4 days
2 mM	10.8	12.5	21.5	28.6	32.5	0.16	0.29	0.46	0.45
6 mM	10.8	20.2	29.8	35.4	37.6	0.17	0.29	0.44	0.46
10 mM	10.8	36.8	40.3	68.5	71.5	0.23	0.42	0.55	0.65
12 mM	10.8	48.3	68.2	70.2	95.4	0.41	0.64	0.89	1.04

Forty microliters of each concentration of linoleic acid was incubated at 37°C, and then 10 μ l of aliquot was used for the analysis of POV and conjugated diene bonds.

Table 1 은 linoleic acid 의 농도에 따른 DNA 의 損傷程度를 定量的으로 分析한 結果인데 6mM 以上의 농도에서는 反應1日째 50% 以上의 감소율을 나타내었으며 反應4日째에는 90% 以上이 감소되어 DNA 損傷에 대한 linoleic acid 의 영향은 아주 크다고 하겠다.

한편, linoleic acid 의 酸化度를 測定하여 Table 2 에 나타내었다. 그 結果, linoleic acid 의 농도가 증가함에 따라 POV 가 증가하였으나 全般的으로 反應4日 동안 100milieq./kg 以下로 그다지 酸化가 進行되지 않았다. 또한, 共軛 diene 의 變化에 있어서도 POV 의 變化와 同一한 경향을 나타내었다.

2. DNA 의 加水分解에 의한 構造變化

Linoleic acid 의 酸化에 의한 DNA 의 構造變化를 알기 위하여 80 μ g 의 DNA 와 5 μ g 의 DNase I 을 2, 6, 10, 12mM 농도의 linoleic acid 와 37°C에서 反應시킨 結果를 Fig.2에 나타내었다. DNA 와 DNase I 의 反應系에서는 linoleic acid 添加區에 비하여 吸光度의 上昇이 빨라 DNA 의 加水分解가 빠르게 進行되었으나 linoleic acid 添加區에서는 그 濃度の 증가에 따라 吸光度의 上昇이 완만하여 linoleic acid 의 酸化에 따라 DNA 와의 相互反應이 存在한다는 것이 입증되었다.

3. 脂質酸化生成物의 DNA 損傷作用

1) 活性酸素種의 DNA 損傷作用

各種 活性酸素消去劑를 DNA 와 linoleic acid 의 反應系에 添加하고 이들 消去劑에 의한 DNA 損傷抑制能을 比較·檢討하여 活性酸素種의 DNA 損傷作用을 調査하였다. 本 實驗에서 使用한 一重項酸素消去劑는 α -tocopherol(Sigma chem. Co.)와 cysteine(Hayashi Co.), superoxide anion 消去劑는 superoxide dismutase(SOD, Toyobo chem. Co.)와 ascorbic acid(Hayashi Co.), 過酸化水素消去劑는 catalase(Sigma

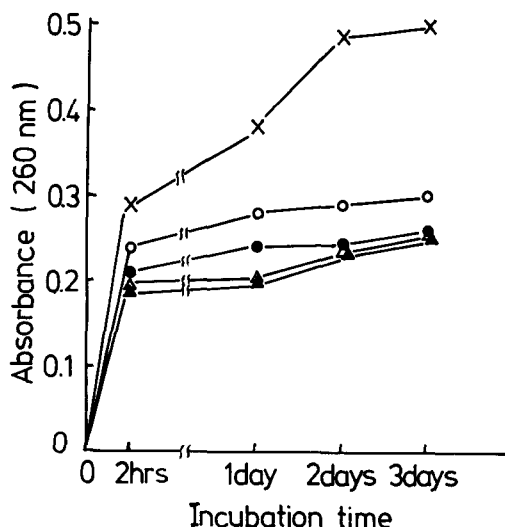


Fig. 2. Hydrolysis of deoxyribonucleic acid (DNA) by deoxyribonuclease I (DNase I) during linoleic acid peroxidation at 37°C.

Forty microliters of reaction mixtures containing DNA (80 μ g), DNase I (5 μ g) and each concentration of linoleic acid was incubated at 37°C, and then 10 μ l of aliquot was used for DNA hydrolysis.

Two millimoles (○—○), 6mM (●—●), 10 mM (△—△) or 12mM (▲—▲) of linoleic acid was incubated with DNA and DNase I, and control solution of DNA and DNase I (×—×) was maintained at 37°C.

chem Co.), 그리고 水酸 radical 消去劑는 Tris(Sigma chem Co.)와 mannitol(Hayashi Co.) 등을 使用하였다.

Fig. 3은 反應 3日째의 結果인데 對照區(C₂)에서는 Form I DNA 가 Form II DNA 로 完全히 移行되어 DNA 損傷이 큰 것으로 나타났으며 活性酸素消去劑를 添加한 反應系에서는 DNA 의 損傷이 크게 抑制되는 것으로 나타났다. 그中에서도 α -tocopherol

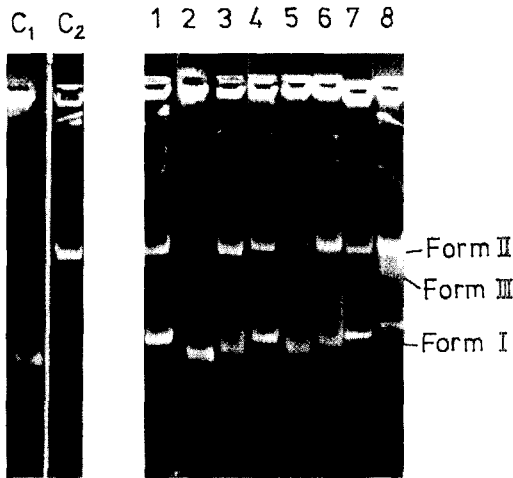


Fig. 3. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with linoleic acid in the presence of the active oxygen scavengers at 37°C.

pBR 322 DNA was incubated with linoleic acid and each concentration of the active oxygen scavenger at 37°C for 3 days.

C₁, DNA only(600µg); C₂, C₁+linoleic acid (6mM); 1, C₂+BHT(0.5mM); 2, C₂+α-tocopherol(220 µg); 3, C₂+cysteine(10mM); 4, C₂+ascorbic acid(1mM); 5, C₂+superoxide dismutase(1µg); 6, C₂+tris (hydroxymethyl)aminomethane (10mM); 7, C₂+mannitol(10mM); 8, C₂+catalase(40µg).

(lane 2) 과 SOD(lane 5)를添加한反應系에서 Form I DNA가 상당량 잔존되어 DNA損傷이 크게抑制되었고, 水酸 radical 및 過酸化水素消去劑는 DNA損傷抑制能이 그다지 크지 않았다.

Table 3은 活性酸素消去劑의 存在下에서 linoleic

acid의 酸化度를 測定한 結果인데, 全般的으로 linoleic acid만의 對照區에 比하여 活性酸素消去劑의 添加에 의하여 過酸化物의 生成이 크게 抑制되었으며 그 中에서도 α-tocopherol, BHT 및 SOD가 抗酸化能이 뛰어나서 反應 4日째의 POV가 對照區의 約 50%에 불과하였다. 또한, 共軛 diene의 生成을 測定한 結果에서도 그 增加가 α-tocopherol, BHT 및 SOD의 添加에 의하여 抑制되는 傾向을 나타내었으나 共軛 diene의 증가속도와 POV의 그것이 반드시 一致하지 않았고 POV의 경우에 比하여 各 反應系間에 酸化度의 差異는 그다지 뚜렷하지 않았다.

2) Linoleic acid 酸化中の 活性酸素種의 生成

Table 4는 linoleic acid의 酸化過程에서 生成되는 活性酸素種中 superoxide anion(·O₂⁻)의 生成과 그 에 대한 SOD의 消去能을 測定한 結果이다. 全般的 으로 linoleic acid의 농도가 증가할수록 superoxide anion의 生成量이 많았는데 12mM의 경우 貯藏 1日 째 最高値인 0.375에 달하였다가 以後 급속하게 감 소하였으며 10mM 농도에서는 貯藏 1日 以後 그 生成 量이 급격하게 증가하여 貯藏 4日째에는 0.35를 나타 내었다. 또한, 2, 6, 10, 12 mM로 조절한 linoleic acid 용액에 SOD 1µg을 混合시키고 經時的으로 superoxide anion을 測定한 結果, superoxide anion이 SOD의 첨가로 크게 消去되었는데 12mM 농도의 경우, 反應 1日에 最高値가 0.045로, SOD無添加區의 0.375에 比하여 88% 消去되었다.

한편, 過酸化水素(H₂O₂)의 生成을 測定한 結查는 Table 5와 같다.

Superoxide anion의 경우와 마찬가지로 linoleic acid의 농도가 증가함에 따라 過酸化水素의 生成速度 가 빨랐으나 全般的으로 貯藏初期에 급격히 生成되어

Table 3. Antioxidative activity of active oxygen scavengers during linoleic acid peroxidation at 37°C

Active oxygen scavengers	POV (millieq/kg)					Conjugated diene bonds(O.D. at 233nm)			
	0	1 days	2 days	3 days	4 days	1 days	2 days	3 days	4 days
Linoleic acid only	10.8	20.2	29.8	35.4	37.6	0.17	0.29	0.44	0.46
BHT	10.8	13.5	17.3	20.5	19.8	0.12	0.17	0.23	0.33
α-Tocopherol	10.8	11.2	13.3	18.9	17.6	0.13	0.19	0.26	0.28
SOD	10.8	12.5	19.4	20.2	25.4	0.12	0.13	0.18	0.27
Tris*	10.8	18.6	22.4	32.0	36.2	0.13	0.22	0.31	0.35
Catalase	10.8	18.7	23.5	30.8	34.6	0.18	0.24	0.32	0.44

*Tris means tris(hydroxymethyl) aminomethane. The concentrations of each active oxygen scavengers are the same as in Fig. 3. Two hundred microliters of reaction mixture containing linoleic acid(6 mM) and each concentration of active oxygen scavengers incubated at 37°C, and then 50 microliters of aliquot was used for the analysis of POV and conjugated diene bonds.

Table 4. The formation of superoxide anion during peroxidation of linoleic acid with and without superoxide dismutase(SOD) at 37°C (O.D. at 560nm)

Linoleic acid concentration	Not added SOD				Added SOD			
	2 hr	1 day	2 days	3 days	2 hr	1 day	2 days	3 days
2 mM	0.035	0.042	0.052	0.047	0.015	0.020	0.022	0.010
6 mM	0.049	0.062	0.071	0.052	0.020	0.025	0.025	0.030
10 mM	0.075	0.082	0.024	0.350	0.025	0.032	0.028	0.025
12 mM	0.060	0.375	0.265	0.165	0.035	0.045	0.085	0.080

Forty microliters of each concentration of linoleic acid was incubated with or without SOD(1μg) at 37°C and then 10 microliters of aliquot was used for superoxide anion analysis.

Table 5. The formation of hydrogen peroxide during peroxidation of linoleic acid with and without catalase at 37°C (O.D. at 410nm)

Linoleic acid concentration	Not added catalase					*Added catalase			
	2 hr	1 day	2 days	3 days	4 days	2 hr	1 day	2 days	3 days
2 mM	0.071	0.105	0.120	0.060	0.050	0.024	0.020	0.013	0.002
6 mM	0.075	0.120	0.130	0.060	0.055	0.024	0.039	0.036	0.020
10 mM	0.075	0.120	0.140	0.050	0.050	0.018	0.019	0.020	0.019
12 mM	0.080	0.235	0.125	0.062	0.045	0.018	0.027	0.037	0.025

*The amount of catalase added was 40 micrograms in reaction systems. Experimental conditions are the same as in Table 4.

2日內에 最高值에 달한 以後 빠르게 감소하였다. 즉, 12mM의 경우는 貯藏1日, 그외의 농도에서는 2日에 最高值에 달하여 superoxide anion의 生成樣式과는 다소 다른 것으로 나타났다. 한편, 過酸化水素의 生成에 대한 catalase의 영향에 있어서도 SOD와 마찬가지로 生成된 過酸化水素가 상당히 消去되는 結果를 나타내었다.

이상의 결과에서 一重項酸素와 superoxide anion의 DNA 損傷作用이 가장 큰 것으로 나타났으며 水酸 radical과 過酸化水素는 그다지 뚜렷한 영향을 나타내지 않았다. 또한, linoleic acid 酸化中 superoxide anion과 過酸化水素의 生成은 酸化初期에 급격하게 生成하였다가 2日以後에 급격하게 감소하였는데 過酸化水素의 生成이 superoxide anion보다 다소 빠른 것으로 나타났다. 그리고, 이들 活性酸素種의 生成은 SOD와 catalase에 의하여 크게 消去되었다.

3) 過酸化物的 DNA 損傷作用

脂質酸化過程에서의 初期反應生成物인 過酸化物的 DNA 損傷作用을 밝히기 위하여 自動酸化시킨 linoleic acid에서 分離한 過酸化物을 0.1×SSC buffer (pH 7.2)에 현탁시키고 211, 422, 633, 844 μg의 농도로 조절한 다음 600μg의 DNA와 反應시킨 結果를 Fig.4에 나타내었다.

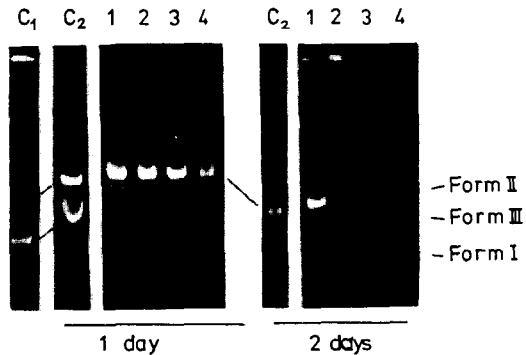


Fig. 4. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with linoleic acid hydroperoxide at 37°C.

pBR 322 DNA was incubated with each concentration of linoleic acid hydroperoxide (LHPO) at 37°C.

C₁, DNA only(600μg, not incubated); C₂, DNA only(600μg, incubated); 1, C₁+LHPO(211μg); 2, C₁+LHPO(422μg); 3, C₁+LHPO(633μg); 4, C₁+LHPO(844μg).

즉, 反應1日째 DNA만의 對照區(C₂)에서는 Form I DNA가 상당량 존재한데 비하여 211μg의 過酸化物을 反應시킨 경우(lane 1)에 Form I DNA가 완전히 사라지고 Form III DNA가 形成되어 Form I DNA의 二重鎖가 동시에 切斷되는 것을 알 수 있으며 422

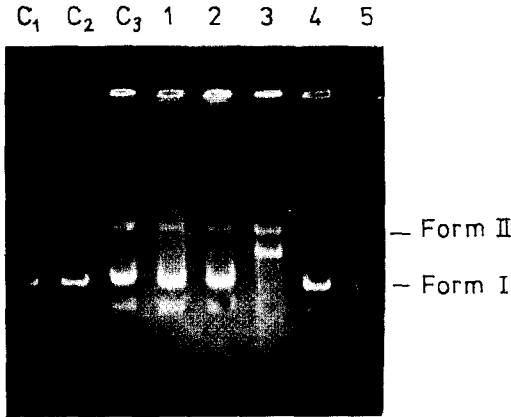


Fig. 5. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with linoleic acid hydroperoxide in the presence of active oxygen scavengers at 37°C.

pBR 322 DNA was incubated with linoleic hydroperoxide (422 μ g, LHPO) and each concentration of the active oxygen scavengers at 37°C for 6hrs,

C₁, DNA only(600 μ g, not incubated); C₂, DNA only(600 μ g, incubated); C₃, C₁+ LHPO(422 μ g); 1, C₃+BHT(0.5mM); 2, C₃+ α -tocopherol (220 μ g); 3, C₃+superoxide dismutase(1 μ g); 4, C₃+tris(hydroxymethyl) aminomethane(10mM); 5, C₃+catalase (40 μ g).

μ g 이상의 농도에서는 Form II의 형태로 점차 사라져 DNA 損傷能이 크게 나타났다. 또한, 反應 2日째는 422 μ g 이상의 反應系에서는 DNA가 完全히 손상되어 gel plate 上에서 DNA band가 檢出되지 않았다.

한편, 過酸化物的 DNA 損傷作用에 대한 活性酸素種의 影響을 調査한 것은 Fig. 5와 같다. 6時間의 反應에서는 DNA 損傷이 크게 일어나지 않았으며 過酸化物和 DNA를 反應시킨 對照區(C₂)와 이들의 反應系에 活性酸素消去劑를 添加한 反應系(lane, 1, 2, 3, 4 및 5)에서 檢出된 DNA band가 거의 비슷한 形態를 취하고 있어 過酸化物的 DNA 損傷作用에는 活性酸素種의 關係가 거의 없는 것으로 나타났다.

4) Malonaldehyde와 hexanal의 DNA 損傷作用

脂質酸化의 二次反應生成物에 의한 DNA 損傷作用을 調査하기 위하여 1, 1, 3, 3-tetraethoxyprapane 으로부터 조제한 malonaldehyde와 市販 hexanal을 各各 0.08, 0.16, 0.24, 0.32, 0.40 및 0.48M로 조절하여 600 μ g의 DNA와 37°C에서 反應시키고 2日 동안의 DNA 損傷作用을 調査한 것은 Fig. 6과 같다.

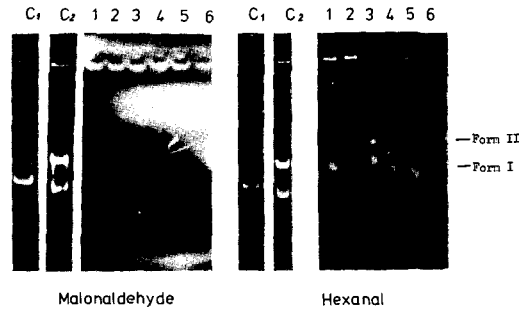


Fig. 6. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with malonaldehyde (MA) or hexanal(HA) at 37°C for 2 days. C₁, DNA only(600 μ g, not incubated); C₂, DNA only(600 μ g, incubated); 1, C₁+0.08 M of MA or HA; 2, C₁+0.16M of MA or HA; 3, C₁+0.24M of MA or HA; 4, C₁+0.3M of MA or HA; 5, C₁+0.40M of MA or HA; 6, C₁+0.48M of MA or HA.

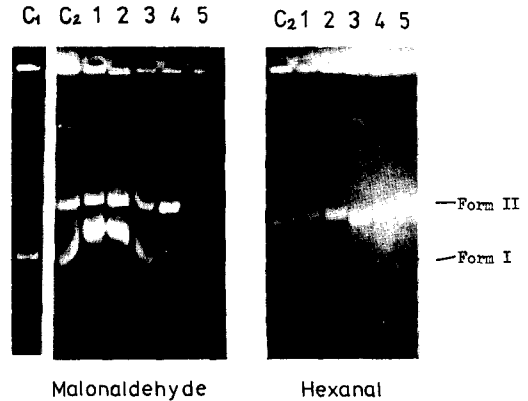


Fig. 7. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with malonaldehyde or hexanal in the presence of the active oxygen scavengers at 37°C for 1 days.

pBR 322 DNA was incubated with malonaldehyde(MA), hexanal(HA) and each concentration of the active oxygen scavengers at 37°C.

C₁, DNA only(600 μ g); C₂, C₁+0.16M of MA or HA; 1, C₂+0.5mM of BHT; 2, C₂+220 μ g of α -tocopherol; 3, C₂+1 μ g of superoxide dismutase; 4, C₂+10mM of tris (hydroxymethyl) aminomethane; 5, C₂+40 μ g of catalase.

全般的으로 malonaldehyde를 DNA에 反應시킴으로써 螢光物質인 ethidium bromide와의 結合에 의한 DNA의 發色이 그다지 뚜렷하지 않았으나 DNA

가 다소 損傷되는 것으로 나타났으며, 그러한 作用은 malonaldehyde의 농도가 증가함에 따라 커졌다. Hexanal의 경우도 malonaldehyde와 동일한 경향을 나타내었으나 DNA 損傷程度에 있어 hexanal의 농도에 따른 差異는 電氣泳動上에서는 찾아볼 수 없었다.

한편, malonaldehyde와 hexanal의 DNA 損傷作用에 대한 活性酸素種의 영향을 調査한 結果를 Fig.7에 나타내었는데 Fig.6의 結果와 마찬가지로 DNA의 發色이 약하였으나 全般的으로 對照區와 活性酸素消去劑添加區의 DNA 損傷程度의 差異는 거의 없는 것으로 나타나 이들 化合物에 의한 DNA 損傷作用에는 活性酸素種이 거의 關係하지 않는 것을 알 수 있다.

4. 天然抗酸化成分의 DNA 損傷抑制作用

1) 생강 및 마늘抽出物の DNA 損傷抑制作用

Fig.8은 생강과 마늘抽出物の 最終濃도가 185, 370, 550 및 740 μ g이 되도록 DNA와 linoleic acid의 反應系에 混和시켜 37°C에서 反應시키고 DNA 損傷程度를 調査한 結果이다. 생강抽出物の 경우 反應 2日째 對照區(C₂)에서는 Form I DNA가 完全히 손상되어 Form II, Form III DNA로 차례로 移行되었으나 생강抽出物을 添加한 反應系에서는 DNA가 거의 損傷을 받지 않은 상태로 나타났으며 그 濃度の 증가에 따라 DNA 損傷抑制能이 더욱 커졌다. 마늘의 경우에서도 DNA 損傷抑制能이 큰 것으로 나타났으나 생강抽出物の 경우에 비하여서는 많이 떨어지는 것을 알 수 있다. 즉, 370 μ g 이하에서는 對照區와 비슷한 程度로 DNA가 損傷되었으며 555 μ g 이상의 濃도에서만 Form I DNA가 많이 維持되었다.

한편, 생강 및 마늘抽出物の 抗酸化力을 調査한 것은 Table 6과 같은데 兩抽出物の 抗酸化力이 뛰어난 反應 4日 동안 20milleq/kg 이하의 POV를 나타내

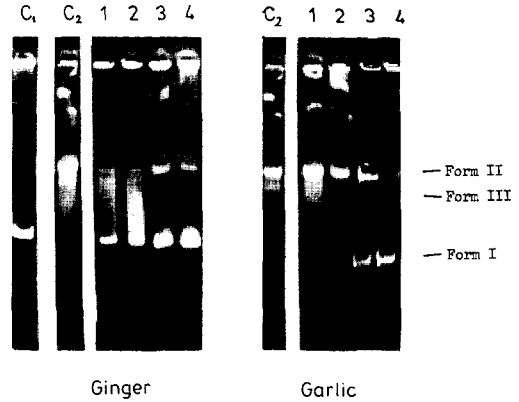


Fig.8. Agarose gel electrophoretic patterns of plasmid pBR 322 DNA incubated with linoleic acid in the presence of ginger and garlic extracts at 37°C.

pBR 322 DNA was incubated with linoleic acid and each concentration of ginger or garlic extract at 37°C for 2 days.

C₁, DNA only(600 μ g); C₂, C₁+linoleic acid (6mM); 1, C₂+185 μ g of ginger or garlic extract; 2, C₂+370 μ g of ginger or garlic extract; 3, C₂+555 μ g of ginger or garlic extract; 4, C₂+740 μ g of ginger or garlic extract.

었으며 全般的으로 對照區에 비하여 2~3倍 以下の 낮은 POV를 나타내었다.

2) 생강 및 마늘抽出物の 活性酸素消去作用

以上과 같이 이들 抽出物の DNA 損傷抑制能이 linoleic acid의 酸化初期에도 큰 것으로 보아 反應初期에 급격히 生成하는 活性酸素種의 消去能도 클 것으로 豫想된다.

따라서, 이들 抽出物을 linoleic acid와 混合시키고 superoxide anion과 過酸化水素의 生成을 測定하

Table 6. Antioxidative activity of ginger and garlic extracts during linoleic acid peroxidation at 37°C (POV, millieq/kg)

Incubation time	Linoleic acid only	Ginger extracts (μ g)				Garlic extracts (μ g)			
		185	370	555	740	185	370	555	740
1 days	22.3	10.4	6.8	6.4	10.1	9.8	7.8	12.0	8.5
2 days	34.5	15.4	9.6	10.2	10.0	13.2	10.2	11.2	8.6
3 days	38.9	20.8	12.2	11.8	9.8	22.4	18.6	15.4	11.4
4 days	67.2	23.4	16.8	15.0	11.5	31.0	22.1	19.8	14.5

Two hundred microliters of reaction mixture containing linoleic acid(2.8 mM) and each concentration of extract was incubated at 37°C, and then 50 microliters of aliquot was used for POV analysis. Before incubation, POV of linoleic acid was 6.5.

Table 7. Scavenging effect of superoxide anion by the addition of ginger and garlic extracts during linoleic acid peroxidation at 37°C (O. D. at 560nm)

Incubation time	Linoleic acid, only	Ginger extracts (μg)				Garlic extracts (μg)			
		185	370	555	740	185	370	555	740
2 hrs	0.049	0.025	0.023	0.025	0.023	0.036	0.003	0.031	0.031
1 day	0.026	0.031	0.029	0.028	0.026	0.034	0.036	0.029	0.029
2 days	0.071	0.029	0.027	0.035	0.032	0.035	0.039	0.035	0.028
3 days	0.052	0.041	0.038	0.036	0.035	0.042	0.040	0.039	0.037

Forty microliters of reaction mixture containing linoleic acid(6 mM) and each concentration of extract was incubated at 37°C, and then 10 microliters of aliquot was used for superoxide anion analysis.

Table 8. Scavenging effect of hydrogen peroxide by the addition of ginger and garlic extracts during linoleic acid peroxidation at 37°C (O. D. at 410nm)

Incubation time	Linoleic acid, only	Ginger extracts (μg)				Garlic extracts (μg)			
		185	370	555	740	185	370	555	740
2 hrs	0.075	0.023	0.019	0.022	0.018	0.039	0.033	0.029	0.028
1 days	0.120	0.035	0.028	0.025	0.021	0.042	0.037	0.042	0.033
2 days	0.130	0.037	0.035	0.032	0.030	0.044	0.051	0.045	0.040
3 days	0.060	0.039	0.037	0.034	0.033	0.043	0.046	0.043	0.042

Forty microliters of reaction mixture containing linoleic acid(6mM) and each concentration of extract was incubated at 37°C, and then 10 microliters of aliquot was used for hodrogen peroxide analysis.

었는데 superoxide anion의 消去能을 나타낸 結果는 Table 7과 같다.

表에서와 같이 對照區에서는 反應初期에 빠르게 生成하였다가 2日째에 最高値에 달한 反面, 兩抽出物을 첨가한 反應系에서는 濃도에 관계없이 그 生成量이 크게 감소되었다. 그러나, 이같은 活性酸素消去能은 生薑抽出物이 마늘抽出物보다 훨씬 크게 나타났다.

또한, 過酸化水素의 消去能을 測定한 結果는 Table 8과 같은데 Table 7과 마찬가지로 兩抽出物의 濃도에 관계없이 過酸化水素消去能이 컸으며 生薑抽出物의 消去能이 마늘抽出物보다 큰 것으로 나타났다.

考 察

一般的으로 油脂는 酸化安定性이 약하여 食品의 加工·貯藏 및 調理中에 쉽게 酸化하여 異味·異臭 및 變色 등으로 食品의 品質低下는 물론 radical 및 過氧化物 등의 各種 活性化化合物을 生成하는 것으로 알려져 있다 (太田, 1979). 그리고, 油脂의 酸化로 生成되는 活性化化合物이 최근에 成人病, 老化 및 發癌 등과 밀접한 關係가 있는 것으로 報告되고 있고 (美濃, 1985), 그러한 反應은 주로 DNA의 構造變化와 깊은 관련이 있는 것으로 報告되고 있어(美濃,

1985; 永田, 1985) 관심이 집중되고 있다.

이러한 脂質酸化에 의한 DNA 損傷作用機構를 밝히기 위하여 linoleic acid와 plasmid DNA의 反應系를 통하여 調査한 結果, linoleic acid의 酸化에 의하여 DNA가 損傷되는 것이 밝혀졌다. linoleic acid의 酸化에 의한 DNA의 損傷程度는 linoleic acid의 酸化程度와 linoleic acid의 共存量에 비례하여 증가하였다(Fig.1). 또한, linoleic acid의 酸化初期(POV 100 millieq/kg 以下)에도 DNA의 損傷이 進行되어 酸化初期에 生成되는 活性酸素種의 關係가 시사되었다. 그래서, 各種 活性酸素消去劑를 反應系에 가하여 DNA 損傷作用에 대한 活性酸素種의 關係를 檢討한 結果(Fig.3) 一重項酸素消去劑인 α -tocopherol과 superoxide anion 消去劑인 superoxide dismutase(SOD)의 첨가에서 DNA의 損傷이 크게 抑制되는 것으로 보아 脂質酸化初期의 DNA 損傷作用에는 一重項酸素와 superoxide anion의 關係가 큰 것으로 밝혀졌다. 한편, 過酸化水素消去劑인 catalase의 첨가에 의하여 DNA 損傷抑制能이 거의 없었던 것으로 미루어 보아(Fig.3) 過酸化水素는 DNA 損傷에 대하여 反應初期에 關係하거나 그 自身이 직접 關係하지 않고 共存하는 superoxide anion과의 相互反應으로 生成되는 一重項酸素가 關係한 것으로 推定된다. 또한, 本 實驗에서 脂質酸化初期의 DNA 損傷作用에 活性酸素種이 크게 關係하는 것으로 밝혀져서

linoleic acid-DNA 反應系에 있어서 活性酸素種의 經시적인 生成量을 測定한 結果, linoleic acid의 酸化初期에 superoxide anion과 過酸化水素 등의 活性酸素種이 생성되어 일정시간 이후로는 감소한다는 것이 밝혀졌다(Table 4 및 Table 5). 이와 같이 linoleic acid의 酸化初期에는 過酸化物的 生成 및 蓄積에 關係하는 peroxy radical 등의 free radical 보다 活性酸素種이 우세하게 參與할 것으로 생각된다.

脂質의 酸化가 더욱 進行되면 過酸化物的 生成 및 分解가 일어나 各種 酸化生成物을 生成하게 된다. 특히, 過酸化물은 그 自體가 毒性을 나타낼 뿐만 아니라 生體機能에도 장애를 주는 것으로 알려져 있으므로(Yamaguchi와 Yamashita, 1979; 1980), DNA 損傷作用 또한 檢討하여 보았다. 그 結果, linoleic acid의 過酸化물은 그 濃도가 적은 경우에도 DNA 損傷作用을 나타내었으며 이러한 作用은 linoleic acid 그 自體의 酸化에 의한 경우보다 더 크게 나타났다(Fig.4). 또한, 過酸化物的 DNA 損傷作用에는 活性酸素種의 影響은 거의 없어(Fig.5), 活性酸素種보다 過酸化物的 生成과 關聯되는 peroxy radical, alkoxy radical 등의 free radical이 더욱 큰 影響을 미칠 것으로 생각된다.

한편, 過酸化물이 分解하게 되면 各種 카르보닐化合物이 生成되는데 脂質酸化生成物中에서 代表的인 低分子카르보닐化合物로 알려져 있는 malonaldehyde와 hexanal을 사용하여 DNA 損傷作用 여부를 살펴본 結果, 이들 化合物에 의하여 DNA가 損傷되었다(Fig.6). 이들 化合物을 첨가한 反應系에서 全般的으로 DNA의 發色이 약하게 나타나 malonaldehyde, hexanal과 DNA 사이에 相互反應이 存在하는 것을 意味하며 또, 이러한 發色強度의 弱화가 DNA와 ethidium bromide와의 intercalation 反應이 저해되는 데서 起因하는 것(永田, 1985; Reiss 등 1972)으로 생각해 볼 때 malonaldehyde와 hexanal의 DNA 損傷作用이 DNA의 가지절단에 의한다고 보다 DNA와의 複合體形成에 의한 것으로 推定된다.

以上에서와 같이 脂質酸化生成물에 의한 DNA 損傷作用은 脂質酸化初期에 生成되는 一重項酸素 및 superoxide anion 등의 活性酸素種을 비롯하여 脂質 過酸化物的 직접작용 및 저분자카르보닐과 DNA와의 複合體形成 등에 의하여 起因된다고 생각된다.

따라서 脂質酸化生成물에 의한 DNA 損傷을 効果적으로 抑制하기 위하여는 脂質의 酸化를 방지하여 活性酸素種, 過酸化물 및 二次反應生成物 등의 生成을 抑制 또는 生成된 이들 反應生成물을 効果적으로

不活性化시키는 것이 必要하다고 하겠다. 현재까지 脂質의 酸化防止를 위하여 많이 使用되고 있는 BHA, BHT 등의 合成抗酸化劑는 그 自體가 毒性을 가지고 있기 때문에(日本藥學會, 1980) 家庭에서 常用하는 마늘과 생강을 使用하여 DNA 損傷抑制能을 調査하였다. 그 結果, 생강과 마늘의 抽出物에 DNA 損傷抑制能이 우수한 것으로 밝혀졌다(Fig. 8). 이들 抽出物은 POV의 증가를 억제(Table 6)함과 아울러 活性酸素消去能도 좋은 것으로 밝혀졌다(Table 7,8). 活性酸素消去能에 있어서는 생강抽出物이 마늘抽出物보다 더욱 우수한 것으로 나타났다. 따라서, 생강 및 마늘抽出物은 脂質의 酸化를 抑制하여 酸化生成物の 生成을 抑制하고 또한, 生成된 脂質由來의 各種 free radical을 비롯한 活性酸素種의 消去能 등에 起因하여 DNA 損傷抑制能을 갖는다고 생각된다. 특히, 活性酸素種은 脂質의 酸化에 의해서 뿐만 아니라 糖質 및 그 誘導體의 自動酸化 등 여러 種類의 酸化過程에서도 生成되기 때문에(Morita 등, 1980 a, b; Watanabe 등, 1986; Bucala 등 1984; Morita 등 1982; Ueda 등, 1981; 1982; Hashimoto 등, 1985; Lloyd 등, 1978) 이들 天然食品의 섭취는 食品의 安全性評價는 물론 DNA 損傷에 의한 老化, 成人病 등의 豫防을 위한 基礎資料로서 活用되리라 기대된다.

要 約

지질산화생성물에 의한 DNA 손상작용 및 그 억제 기구를 밝히기 위하여 linoleic acid와 plasmid DNA와의 모델계를 통하여 검토하였는데, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. Linoleic acid의 산화에 의하여 DNA가 손상되었으며, 그 정도는 linoleic acid의 양이 많을수록 크게 나타났다.
2. Linoleic acid의 산화에 의한 DNA 손상작용은 POV 100 meq/kg 이하인 산화초기에서도 빠르게 진행되었다. 산화초기의 DNA 손상작용에는 활성산소종의 參與가 크게 나타났는데, 그 중에서도 일중항산소와 superoxide anion의 影響이 큰 것으로 나타났다.
3. 지질 2차반응생성물인 malonaldehyde와 hexanal의 DNA 손상작용은 linoleic acid경우와는 달리 활성산소종과는 무관하였으며 DNA와의 복합체형성에 의하였다.
4. Linoleic acid hydroperoxide의 DNA 손상작용은 linoleic acid의 초기산화에 의한 DNA 손상작용

보다 크게 나타났고, 활성산소종의 영향은 없었다.

5. 지질산화생성물에 의한 DNA 손상작용은 천연 항산화성분(마늘 및 생강추출물) 및 활성산소소거제(α -tocopherol 및 superoxide dismutase)의 첨가에 의하여 크게 억제되었다. 특히, 마늘 및 생강추출물은 활성산소종의 생성을 비롯하여 공액 diene 및 POV의 증가 또한 크게 억제하였다.

文 獻

- A. O. A. C. 1984. Official Methods of Analysis. 14th ed. p.507. Assoc. of Office. Anal. Chemists, Washington, D. C.
- Brawn, K. and I. Fridovich. 1981. DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. Arch. Biochem. Biophys. 206(2), 414—419.
- Bucala, R., P. Model and A. Cerami 1984. Modification of DNA by reducing sugars; A possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 105—109.
- 卞韓錫·尹好東·金善奉·朴榮浩. 1986. 생강추출물의 魚油에 대한 抗酸化效果. 韓水誌 19(4), 327—332.
- Dillon, J. R., G. S. Benzonsen and K. H. Yeung. 1985. Gel electrophoresis. "Recombinant DNA Methodology" (J. R. Dillon, A. Nasim and E. R. Nestmann ed.) pp.13—29. Willy and Sons Inc. New York.
- Gamage, R. T., T. Mori and S. Matsushita. 1971. Effects of linoleic acid hydroperoxide and their secondary products on the growth of *Escherichia coli*. Agric. Biol. Chem. 35, 33—39.
- Hashimoto, Y., H. Iijima, Y. Nazaki and K. Shudo. 1985. Two bases are eliminated from DNA by the treatment with bleomycin or with hemin-intercalations. Nucleic acid Research. Symposium Series No.16, 193—196.
- Hozumi, M. M. 1969. Production of hydrogen peroxide by 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. Gann 50, 83—90.
- Iyer, V. N. and W. Szybalski. 1963. A molecular mechanism of mitomycin action; Linking of complementary DNA strands. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 50, 355—362.
- Kim, S. B., F. Hayase and H. Kato 1986. De-smutagenic effects of melanoidins against amino acid and protein pyrolyzates. Developments in Food Sci. 13, 383—392.
- Lloyd, R. S., C. W. Haidle and D. L. Robberson. 1978. Bleomycin-specific fragmentation of double stranded DNA. Biochemistry 17(10), 1890—1896.
- 美濃眞. 1985. 老化につなる化學反應. pp.27—52. 老化. 化學同人. 東京.
- Morita, J., N. Kashimura and T. Komano. 1980a. Inactivation of bacteriophage ϕ x 174 by Dfructose-6-phosphate. Agric. Biol. Chem. 44(4), 883—890.
- Morita, J., N. Kashimura and T. Komano. 1980b. The mechanism of inactivation of bacteriophage ϕ x 174 by autoxidizable synthetic polysaccharides. Agric. Biol. Chem. 44(12), 2971—2978.
- 永田親義. 1985. 變異原性および發がん, "過酸化脂質と生體" (内山充, 松尾芳光, 嵯峨井勝編). 262—264. 學會山版センター. 東京.
- Nanjou, S., S. Fujii, K. Tanaka, K. Ueda and T. Komano. 1984. Induction of strand breakage in ϕ x 174 RFI DNA by aminosugar derivatives. Agric. Biol. Chem. 48(11), 2865—2867.
- Nakayama, T., M. Kodama and C. Nagata. 1984. Free radical formation in DNA by lipid peroxidation. Agric. Biol. Chem. 48(2), 571—572.
- 柏村直樹·森田潤司. 1984. 核酸を切断する糖質誘導體. 有機合成化學 42(6), 523—535.
- 日本藥學. 1980. 酸化防止劑 "衛生試驗法註解". pp. 345. 全原出版(株). 東京.
- 日本油化學協會編. 1981. 基準油脂分析試驗法. 2, 14, 15, 71.
- Ory, R. C. and A. J. ST. Angelo. 1982. Effects of lipid oxidation on proteins of oil seeds. in "Food Protein Deterioration" J. P. Cherry ed. pp.55—65. ACS Symposium Series 206. Washington, D. C.
- 太田靜行. 1979. 油脂および油脂系食品の劣化と問題

- 點. 油脂食品の劣化とその防止(太田静行編). 1—7. 幸書房. 東京.
- Ponti, V., M. U. Dianzani, K. Cheeseman and T. F. Slater. 1978. Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulphate. *Chem. Biol. Interaction* 23. 281—291.
- Reiss, U., A. L. Tappel and K. S. Chio. 1972. DNA-malonaldehyde reaction: Formation of fluorescent products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 921—926.
- Rodriguez, R. L. and R. C. Tait. 1983. Rapid isolation of plasmid DNA(miniscreen). "Recombinant DNA Techniques; An Introduction" (R.L. Rodriguez and R. C. Tait ed.). pp. 50—51. Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts.
- Ueda, K., J. Morita and T. Komano. 1981. Induction of single strand scission in bacteriophage λ 174 replicative form DNA by mitomycin C. *The J. of Antibiotics* 34(3), 317—321.
- Ueda, K., J. Morita and T. Komano. 1982. Phage inactivation and DNA strand scission activities of 7-N-(p-hydroxyphenyl) mitomycin C. *The J. of Antibiotics* 35(10), 1380—1386.
- Watanabe, K., N. Kashige, Y. Nakashima, M. Hayashida and K. Sumoto. 1986. DNA strand scission by D-glucosamine and its phosphates in plasmid pBR 322. *Agric. Biol. Chem.* 50 (6), 1459—1465.
- Yamaguchi, T. and Y. Yamashita. 1979. Mutagenic activity of autoxidized linoleic and linolenic acid. *Agric. Biol. Chem.* 43, 2225—2226.
- Yamaguchi, T. and Y. Yamashita. 1980. Mutagenicity of hydroperoxides of fatty acids and some hydrocarbons. *Agric. Biol. Chem.* 44, 1675—1678.
- 由岐英剛. 1984. DNAおよびRNAの定量. 生化学分析法. 由岐英剛編. pp.276—279. 南江堂. 東京.