

³²P-Postlabelling 방법을 이용한 미토마이신 C에 의하여 형성된 DNA adduct의 검출

정혜윤 · 김재현* · 박창원* · 이동권[#]

성균관대학교 약학대학, *국립보건안전연구원

(Received February 22, 1996)

Detection of DNA Adduct Formed by Mitomycin C by ³²P-Postlabelling

He Yun Jeong, Jae Hyun Kim*, Chang Won Park*, Dong Kwon Rhee[#]

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

*National Institute of Safety Research, Seoul 122-020, Korea

Abstract-Mitomycin C(MMC) has been used as an anticancer drug and behaves as an alkylating agent forming covalent cross-link between complementary strands of double strand DNA. The purpose of this research was to determine number of DNA adducts, formed *in vivo* by Mitomycin C, in mouse organs. DNAs from liver, lung, brain and pancreas were isolated and used for ³²P-postlabelling. The labeled nucleotides were separated by 2D-TLC and subjected to autoradiography. Numbers of MMC-DNA adducts were 9.9,5.4 in liver, pancreas, lung, and brain, respectively.

Keywords □ ³²P-postlabelling, DNA adduct, mitomycin C.

암은 화학물질이나 virus 에 의하여 유도되는 DNA 손상에 의해 발생하며 그 중 DNA와 화학물질의 공유 결합(adduct 형성)은 발암 과정에 있어서 중요한 초기 단계로 작용한다.¹⁾ 이러한 adduct 된 DNA는 repair 기전에 의하여 수복되지만 수복되지 않은 DNA adduct는 DNA-handling 효소의 저해 혹은 그 밖의 기전에 의하여 carcinogenesis 또는 mutagenesis에 영향을 미친다.^{2,3)} 그러므로 생체 내에서 DNA adduct의 형성을 조기에 확인하는 것은 발암성이 있는 물질을 조기에 발견하거나 기존의 발암성 물질을 재평가하는 데에 중요한 역할을 하고 있다.

DNA adduct를 검출하는 방법에는 ³²P-postlabelling 방법 뿐만 아니라, 방사성 동위원소를 실험 동물에 직접 투여하여 adduct 정도를 CBI(covalent bind-

ing index)로 측정하는 방법⁴⁾ 및 HPLC로 분석하는 방법^{5,6)} 등이 있다. 그 중에서 ³²P-postlabelling 방법은 1981년 Randerath 등⁷⁾에 의하여 창안된 이래로 현재까지 많은 연구가 진행되어 왔다. 특히 nuclease P1을 이용한 ³²P-postlabelling 방법(Fig. 1)은 기존의 ³²P-postlabelling 방법에 비하여 약 100~1000배 정도 민감도를 향상시킴으로써 비정상적인 nucleotide adduct만을 검출하는 것을 가능하게 하였다.^{8,9)} 즉, 정제된 DNA를 nucleotide 수준으로 분해시킨 후 nuclease P1을 작용시키면 정상적인 nucleotide는 deoxyribonucleoside로 분해되어 방사성 동위원소로 표지되지 않지만, 비정상적인 nucleotide adduct는 nuclease P1에 의한 'dephosphorylation' 이 진행되지 않아 T4 polynucleotide kinase와 [γ -³²P]ATP에 의하여 ³²P로 표지된다. 따라서 방사성 동위원소로 표지된 비정상적인 nucleotide adduct만이 2D-TLC에서 전개 후 autoradiography에 의하여 검출된다. Philips 등^{10,11)}은 이

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0331-290-7707 (팩스) 0331-290-8800

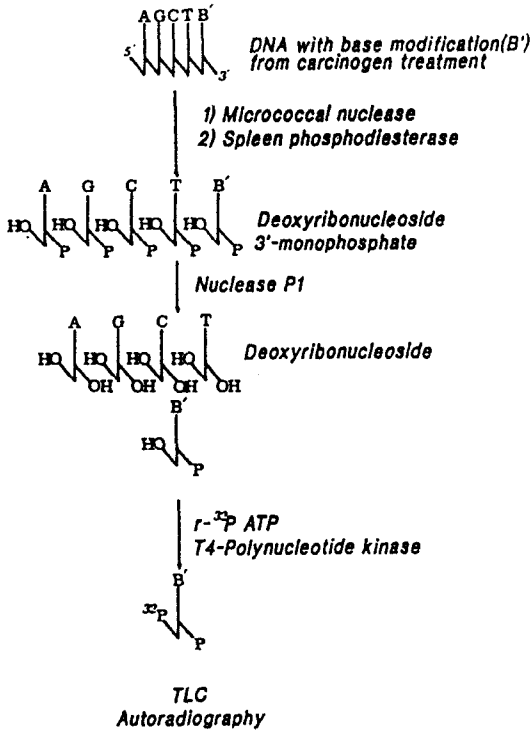


Fig. 1 — Nuclease P1 mediated ³²P-postlabelling methods for DNA adduct detection.

nuclease P1을 이용한 ³²P-postlabelling 방법을, 흡연이나 직업적으로 발암물질에 노출된 사람에게 발암 정도의 평가 및 발암 여부 확인에 사용하였다.

Mitomycin C(MMC)는 *Streptomyces caespitosus*에서 분리한 antibiotic으로, 분자 구조 내에 하나의 quinone group과 하나의 aziridine ring을 보유하며, 임상적으로 fluorouracil, doxorubicin과 함께 gastric adenocarcinoma를 완화하는 방법으로 응용된다. Mitomycin C의 작용은, *in vivo*에서 대단히 반응성이 큰 hydroquinone 유도체로의 환원에 의존하며, hydroquinone 유도체는 bifunctional alkylating agent로서, double strand DNA의 complementary strands 사이에 상보적인 cross-link를 형성한다. Mitomycin C는 암세포에 대하여 세포의 성장을 억제하는 효과를 나타내지만 동시에 정상 세포에 대해서도 세포 독성 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.

Mitomycin C의 암세포에 대한 성장 억제 작용에 관하여, Uchibayashi 등(1994)은 과온증(hyperthermia)과 연합하여 adriamycin과 mitomycin C가 단독

투여시에 각각 종양의 성장을 억제하였으며, adriamycin과 mitomycin C의 병용 투여가 고온증과 연합하였을 때, 전이된 암세포의 성장에 대하여 상가적인 억제 효과(additive inhibitory effects)를 나타내었다고 보고하였다¹²⁾ 또 Rahman(1994)은, *in vitro*에서 사람의 방광암 세포에 대하여, 고에너지 충격파(high energy shock wave)를 단독으로 노출했을 때와 항암제들과 병행하여 노출했을 때의 세포 독성 효과(cytotoxic effect)를 비교한 실험에서, 암세포에 대한 고에너지 충격파의 세포 독성 효과는, mitomycin C, cisplatin, methotrexate 또는 adriamycin과 같은 항암제의 병용 투여에 의하여 상가적으로 증가되었다고 보고하였다.¹³⁾ 또한 Xu 등(1994)은 사람의 방광암 세포주들(J82와 SCaBER)의 mitomycin C에 대한 민감도의 차이를 일으키는 기전을 설명하기 위한 실험에서, SCaBER가 J82 보다 mitomycin C에 대하여 낮은 민감도를 나타낸 것은, SCaBER에서 mitomycin C에 의하여 유도된 DNA 와의 interstrand cross-link의 형성이 현저하게 적었기 때문이라고 보고하였다.¹⁴⁾

반면에, mitomycin C의 정상 세포에 대한 세포 독성 작용에 대하여 보고된 논문을 보면, Hoorn 등(1995)은 배양된 폐동맥 내피 세포에 대해서 mitomycin C의 투여가 농도 의존적인 세포 독성 효과를 나타내었다고 보고하였다. 이들은 mitomycin C의 투여가 세포의 증식을 억제하였으며, 이러한 mitomycin C의 세포 증식에 대한 억제 효과는, mitomycin C가 DNA와 cross-link를 형성하여 세포 분열을 저해하였기 때문이라고 보고하였다.¹⁵⁾

이상과 같이 Mitomycin C는 alkylating agent로서, *in vitro*^{16,17)} 및 *in vivo*¹⁸⁾에서 DNA adduct를 형성하는 것으로 보고되어 있으나, *in vivo*에서 형성된 DNA adduct의 숫자 및 각 장기에서의 DNA adduct의 형성 정도는 밝혀지지 않았다.

본 연구에서는 nuclease P1을 이용한 ³²P-postlabelling 방법을 이용하여, 조직간에 발암 가능성을 비교하기 위하여, 각 장기별로 DNA adduct 형성의 차이를 비교 검토하였다.

실험재료 및 방법

시약 - [γ -³²P]ATP(3000 Ci/mmole)는 Amersham으로부터 구입하였으며, mitomycin C, pro-

teinase K, ribonuclease A, micrococcal nuclease, spleen phosphodiesterase, T4 polynucleotide kinase, nuclease P1, potato apyrase는 Sigma로부터 구입하였고 기타 시약은 특급(G.R)을 사용하였다.

실험동물 - 생후 5주령의 건강 상태가 양호한 ICR 제 웅성 생쥐(33±2g)를 실험에 사용하였으며 동물에 검체를 투여하기 전에 12시간 동안 절식시키고 물은 자유롭게 섭취시켰다. 그 후 검체를 투여한 다음 장기를 적출하여 DNA 분리정제에 사용하였다.

시약의 제조 - Nuclease P1(5 µg/µl) 용액의 제조는, nuclease P1 분말 1.1 mg(280 units/mg solid)에 0.05 M sodium acetate(pH 5.0), 0.06 mM ZnCl₂ 용액 110 µl를 가하여 0°C에서 녹인 다음, 110 µl의 glycerol을 넣고 잘 혼합하여 nuclease P1의 5 µg/µl 용액으로 만든 다음 -20°C에 보관하였다. 또한 potato apyrase(0.56 unit/µl) 용액의 제조는, 25 mM sodium acetate(pH 5.0) 용액 27 µl에 potato apyrase 0.03 mg protein/30 µl(168 units/30 µl) 용액 3 µl를 가하여 potato apyrase 0.56 unit/µl (16.8 unit/30 µl)로 희석한 다음, 이 용액을 사용할 때 반응액에 3.14 µl(1.76 unit)씩 가하였다.

시약의 투여 - 주사용 증류수에 녹인 mitomycin C를 ICR 생쥐에 0.5 mg/kg씩 24시간 간격으로 2회 정맥 내로 투여하고, 최종 투여 후 4시간 만에 경추탈구하여 간, 폐, 뇌, 췌장을 적출하였다.

조직으로부터 DNA 분리 정제 - Kim 등의 방법¹⁹⁾에 따라 DNA를 분리 정제하였다. 즉, 적출된 장기 중 0.3 g씩을 떼어내어 phenol·chloroform 추출법에 의하여 DNA를 분리 정제하였다.

DNA의 정량¹⁹⁾ - TE buffer(10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid)에 녹인 DNA 용액을 260 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도가 1일 때를 50 Mg/ml로 환산하여 정량하였다.

³²P-Postlabelling에 의한 분석

DNA의 분해-Eppendorff tube에 DNA 10 µg에 해당하는 양의 TE buffer에 녹인 DNA 용액을 넣고, 240 mM sodium succinate 용액 1 µl와 120 mM CaCl₂ 용액 1 µl를 가하고 micrococcal nuclease(1 µg/µl) 5 µl(0.6 unit에 해당)를 가하여 잘 혼합한 다음, spleen phosphodiesterase(1 µg/µl) 5 µl(0.01 unit에 해당)를 가하여 다시 잘 혼합해 주었다. 혼합된 용액을 37°C

water bath에서 3시간 동안 incubation 하였다.

Nuclease P1 처리 - 위 용액에 0.25 M sodium acetate(pH 5.0) 용액 3.0 µl와 0.3 mM ZnCl₂ 용액 1.8 µl를 가하여 잘 혼합한 다음, nuclease P1(5 µg/µl) 1.2 µl를 가하여 다시 잘 혼합하여 37°C에서 40분간 incubation하였다. incubation 후 0.5 M Tris base 용액 2.4 µl를 가하였다.

³²P-Postlabelling - Nuclease P1으로 처리한 용액에, 2.4 µl의 L buffer(pH 7.6, 200 mM Bicine-NaOH, 100 mM MgCl₂, 100 mM dithiothreitol, 10 mM spermidine), 2.0 µl의 [γ -³²P]ATP(10 µci/µl), 0.6 µl의 T4 polynucleotide kinase(100 unit/0.0125 ml)와 1 µl의 물을 가하였다. 이것을 37°C에서 30분간 incubation한 다음, potato apyrase 용액(0.56 unit/µl) 3.14 µl를 가하고 37°C에서 30분간 계속해서 incubation 하였다.

2D-TLC(two dimensional thin layer chromatography) 및 autoradiography - 반응액 중 15 µl를 12 cm×12 cm PEI cellulose sheet의 왼쪽 가장자리에 모세관으로 점적한 다음, 1 M acetic acid(NH₄OH로 pH 3.5로 맞춘 용액)로 전개(D1)한 후 10분간 100% methanol에 담그어 salt를 제거하고 상온에서 건조하였다. 이 PEI cellulose를 포화된 ammonium sulfate(pH 3.5)로 다시 전개(D2)한 다음 상온에서 건조하고 autoradiography 하였다.

결과 및 고찰

항암제 사용시의 가장 큰 관심은 환자가 항암제에 대해 얼마나 용인할수 있는지(tolerable) 또한 생명을 얼마나 연장하는지에 집중되어 왔다. 따라서 항암제의 특성인 세포독성 또는 발암가능성에 대해서는 연구가 큰 진전을 보이지 않고있다. 또한 어떤 형태의 DNA adduct가 *in vivo*에서 가장 큰 문제가 되며 발암성과 연관이 있는지 연구된바 없다. 따라서 본연구에서는 Mitomycin C의 발암성을 규명하기 위해 *in vivo*에서 postlabeling 방법을 이용하여 DNA adduct의 형성을 검출하고자 하였다.

Mitomycin C를 ICR 생쥐에 2일간 반복하여 정맥 내로 투여(0.5 mg/kg/day)한 다음, 제 2회 투여 후 4시간 만에 생쥐를 경추탈구하여 치사시키고, 간, 폐, 뇌, 췌장을 적출하여 DNA를 분리 정제하였다. Fig.

2는 이렇게 하여 분리 정제된 DNA를 ³²P-postlabelling하고 2D-TLC(용매조건 D1 : 1M ammonium acetate pH 3.5, D2 : saturated ammonium

sulfate, pH 3.5)로 전개한 다음 autoradiography한 결과를 나타낸 것이다. Mitomycin C를 투여한 생쥐의 간에서 분리한 DNA의 경우, 대조군 생쥐의 간에서 분

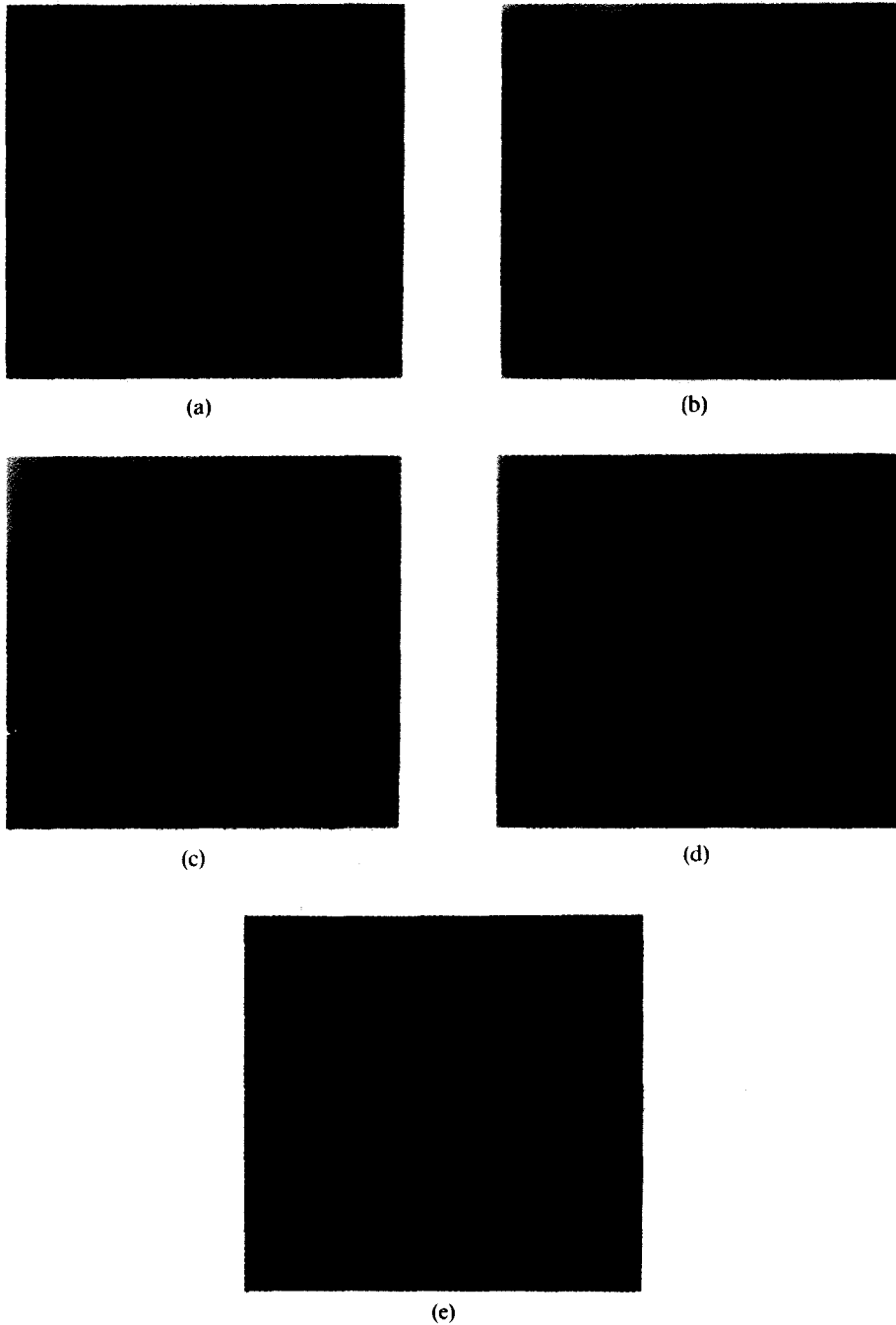


Fig. 2— Autoradiograms of PEI-cellulose maps of ³²P-labeled Mitomycin C-DNA adducts. Samples were (a)liver DNA from control mouse, (b-e)DNAs from various organs of Mitomycin C-treated mouse. (a) Control (b) Liver (c) Pancreas (d) Lung (e) Brain

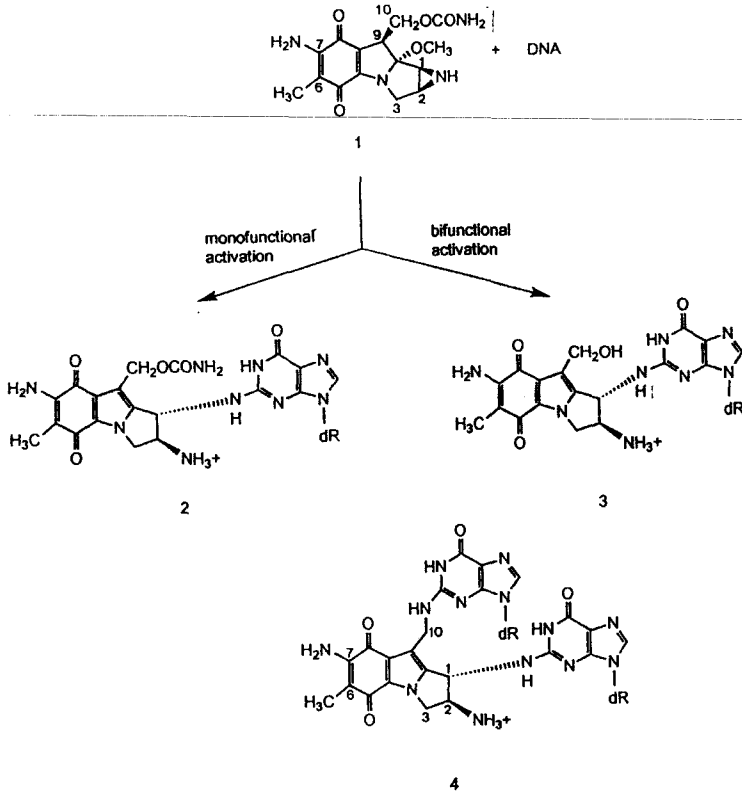


Fig. 3 — Formation of DNA adducts by mitomycin C upon reductive activation

(1, the structure of mitomycin C: 2 and 3, mono adducts: 4, bis adduct) (Borowy-Borowski, H. etc., 1990²⁰).

리한 DNA에서 볼 수 없는 9개의 비정상적인 DNA adduct spot을 관찰할 수 있었다. 채장에서 9개의 adduct spot이 관찰되었으나 그 강도는 간의 경우에 비하여 1/3 정도로 약하였다. 폐에서는 5개의 DNA adduct spot이 나타났으며, 뇌에서는 4개의 DNA adduct spot이 관찰되었다.

강력한 항암제이며 항생제인 mitomycin C(MMC)는 임상적으로 위암, 췌장암, 폐암, 경부암, 방광암 및 유방암의 치료에 사용되는 약물이다.²⁰ 또한 mitomycin C는 흰 쥐에서 발암성을 일으키고, 숫컷 생쥐의 정원 세포에서 돌연변이를 일으키며, *in vivo*로 약물 투여 후 흰 쥐와 생쥐의 골수와 고환에서, 그리고 사람의 임파구에서 sister chromatid exchange를 유발하는 것으로 보고되어 있다.^{20, 21}

Mitomycin C는 *in vitro*에서 화학적 또는 효소적으로 환원되어 DNA와 반응하여, 환원 조건에 따라 한 가지 또는 두 가지 이상의 adduct를 형성한다.^{16, 17} 즉 Fig. 3에서 보는 바와 같이 mitomycin C는 *in vitro*에서

alkylating agent로서, mitomycin C의 C-1 또는 C-10이 DNA 염기 중 guanine의 N² 위치와 반응하면 mono adduct인 2 또는 3을 형성하며, mitomycin C의 C-1과 C-10 양쪽에서 환원적으로 활성화(bifunctional activation)하면 bis adduct인 4를 형성한다. 여기에서 adduct 3은 mitomycin C의 10번 위치가 guanine 대신 H₂O와 반응할 때 형성된다. 또한 일반적으로 DNA에 손상을 주는 약물은 DNA와의 반응에서 4개의 mononucleotide 중 한 가지에 선택성을 나타내는데, mitomycin C는 guanine의 N² 위치에 대단히 선택적으로 결합한다고 보고되어 있다.^{16, 17, 22} 한편 Borowyborowski 등은 *in vitro*에서 mitomycin C의 cross-link 형성에는 CG · CG sequence가 필수적이라고 보고하였다.²³

반면에 *in vivo*에서 Reddy 등¹⁸)은 ³²P-postlabelling 방법을 이용하여 mitomycin C에 의한 DNA adduct 형성을 여러 조직에서 연구하였다. Reddy 등은 9 mg/kg의 mitomycin C를 ICR 생쥐에 복강 내로 투여한 후

12시간만에 얻은 조직(방광, 뇌, 결장, 식도, 심장, 신장, 폐, 뇌, 난소, 췌장, 소장, 비장, 위, 갑상선)으로부터 DNA를 분리하여 ³²P-postlabelling 하고 2D-TLC(용매조건 D1 : 1.8 M Lithium formate, 4.25 M urea, pH 3.5, D2 : 0.26 M LiCl, 0.16 M Tris-HCl, 2.6 M urea, pH 8.0, 이어서 1.7 M phosphate buffer, pH 6.0)로 전개하였을 때, 방광에서는 대조군에서 볼 수 없는 10개의 DNA adduct spot이 확인되었으나, 다른 조직에서는 명확한 DNA adduct pattern은 확인되지 않았다고 보고하였다. 즉 뇌, 갑상선, 비장을 제외한 11개의 조직(방광, 결장, 식도, 심장, 신장, 간, 폐, 난소, 췌장, 소장, 위)에서 전체 adduct의 수준은 2배 이내에서 변화하였으며(9.6~21.9 adducts/10⁷ nucleotides), adduct들의 모양은 방광의 경우와 유사하였다. 특이한 것은 뇌에서 DNA adduct 형성이 매우 적었는데(0.7 adduct/10⁷ nucleotides) 이것은 mitomycin C가 혈액 뇌관문을 통과하기 어렵기 때문이라고 보고하였다.

본 실험에서 ³²P-postlabelling에 의하여 DNA adduct 형성 정도를 조직간에 비교한 결과, 뇌에서 DNA adduct가 특히 적게 형성된 것은 Reddy 등¹⁸⁾의 보고와 일치하였다. 그러나 *in vivo*에서 mitomycin C에 의하여 형성된 DNA adduct가 어떤 구조이며 *in vitro*에서 mitomycin C에 의하여 형성된 DNA adduct와 동일한지의 여부는 확인되지 않았다. 그러나 *in vivo* 실험에서 더 많은 수의 DNA adduct가 형성된 것으로 미루어 보아 DNA adduct 형성에 *in vivo*에서 *in vitro*에서 보다 많은 대사기능이 참여한 것으로 사료된다.

결 론

항암제로 사용되고 있는 mitomycin C를 음성 ICR 생쥐에 투여한 후 여러 조직에서 형성된 DNA adduct를 ³²P-postlabelling 방법으로 측정하였을 때, mitomycin C에 의하여 형성된 DNA adduct가 조직간에 분포된 수준은 간>췌장>폐>뇌의 순서였으며, 이 때 형성된 DNA adduct의 숫자는 각각 9개, 9개, 5개, 4개였다.

문 헌

- 1) Watson, W. P. : Post-radiolabelling for detecting DNA damage, *Mutagenesis* **2**, 319 (1987).
- 2) Stumpf, R., Margison, G. P., Montesano, R.

- and Pegg, A. E. : Formation and loss of alkylated purines from DNA of hamster liver after administration of dimethylnitrosamine. *Cancer Research* **39**, 50 (1979).
- 3) Den Engelse, L., Menkveld, G. J., Brij, R. J. D. and Tates, A. D. : Formation and stability of alkylated pyrimidine and purines and alkylphosphotriesters in liver DNA of adult rats treated with ethylnitrosourea or dimethylnitrosamine. *Carcinogenesis* **7**, 393 (1979).
- 4) Lutz, W. K. : *In vitro* covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis. *Mutation Research* **65**, 289 (1979).
- 5) Park, J. W. and Amies, B. N. : 7-Methyl-guanine adducts in DNA are normally present at high levels and increase on aging: analysis by HPLC with electrochemical detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7467 (1988).
- 6) Shields, P. G., Povey, A. C., Wilson, V. L. and Harris, C. C. : Combined high performance liquid chromatography/³²P-postlabeling assay of N⁷-methyldeoxy-guanosine. *Cancer Research* **50**, 6580 (1990).
- 7) Randerath, K., Reddy, M. V. and Gupta, R. C. : ³²P-labeling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6126 (1981).
- 8) Reddy, M. V. and Randerath, K. : Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-post-labeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* **7**, 1543 (1986).
- 9) Reddy, M. V. and Randerath, K. : ³²P-post-labeling assay for carcinogen-DNA adducts: Nuclease P1-mediated enhancement of its sensitivity and applications. *Environmental Health Perspectives* **76**, 41 (1987).
- 10) Philips, D. H., Hower, A., Martin, C. N., Garner, R. C. and King, M. M. : Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking. *Nature* **336**, 790 (1988).
- 11) Philips, D. H., Hemminki, K., Alhonen, A., Hower, A. and Grover, P. H. : Monitoring occupational exposure to carcinogens. *Mutation Research* **20**, 4531 (1988).
- 12) Uchibayashi, T., Lee, S. W., Kunimi, K.,

- Ohkawa, M., Endo, Y., Noguchi, M., Sasaki, T. : Studies of effects of anticancer agents in combination with/without hyperthermia on metastasized human bladder cancer cells chick embryos using polymerase chain reaction technique. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **35**, S84 (1994).
- 13) Rahman, M. : *In vitro* effects of high energy shock wave alone and combined with anticancer drugs on human bladder cancer cells. *Urol. Int.* **53**, 12 (1994).
- 14) Xu, B. H., Gupta, V., Singh, S. V. : Mechanism of different sensitivity of human bladder cancer cells to mitomycin C and its analogue. *Br. J. Cancer* **69**, 242 (1994).
- 15) Hoorn, C. M., Wagner, J. G., Petry, T. W., Roth, R. A. : Toxicity of mitomycin C toward cultured pulmonary artery endothelium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **130**, 87 (1995).
- 16) Tomasz, M., Chowdary, D., Lipman, R., Shimotakahara, S., Veiro, D., Walker, V. and Verdine, G. L. : Reaction of DNA with chemically and enzymatically activated mitomycin C: Isolation and structure of the major covalent adduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6702 (1986).
- 17) Tomasz, M., Lipman, R., Chowdary, D., Pawlak, J., Verdine, G. L. and Nakanishi, K. : Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science* **235**, 1204 (1987).
- 18) Reddy, M. V. and Randerath, K. : ³²P-Analysis of DNA adducts in somatic and reproductive tissues of rats treated with the anticancer antibiotic, mitomycin C. *Mutation Research* **179**, 75 (1987).
- 19) Kim, J. H., Park, C. W., Park, J. S., Hong, Y. T., Kim, H. J., Lee, J. H., Lee, H. S. and Rhee, D. K. : Application of the ³²P-Postlabelling Technique: A study on detection of DNA adduct induced by azo dyes and flavonoid compounds. *The Journal of Applied Pharmacology* **1**, 58 (1993).
- 20) Doll, R. C., Weiss, R. B. and Issell, B. F. : Mitomycin: Ten years after approval for marketing. *J. Clin. Oncol.* **3**, 276 (1985).
- 21) IARC Monographs. Mitomycin C. In: IARC Monographs on the Evaluation of the Risk of Chemicals to Man: Some Naturally occurring Substances. International Agency for Research on Cancer. Lyon. **10**, 171 (1979).
- 22) Tomasz, M., Lipman, R., McGuinness, B. F. and Nakanishi, K. : Isolation and characterization of major adduct between mitomycin C and DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5892 (1988).
- 23) Borowy-Borowski, H., Lipman, R. and Tomasz, M. : Recognition between mitomycin C and specific DNA sequences for cross-link formation. *Biochemistry* **29**, 2999 (1990).
- 24) Kim, J. H., Rhee, H. B., Kim, P. Y., Kim, S. H., Rhee, D. K., Hong, S. R., Kweon, O. C., Choi, E. S. : DNA 및 단백질의 공유결합과 발암성간의 상관관계에 관한 연구(I). 국립보건안전연구원보 **2**, 11 (1989).