

魚油酸化生成物의 DNA 損傷作用

1. 總脂質酸化生成物의 DNA 損傷作用

姜珍壇 · 卞韓錫 · 李龍雨 · 金善奉 · 朴榮浩

釜山水產大學 食品工學科
(1987년 4월 1일 수리)

The DNA Damage by Fish Oil Peroxidation Products

1. DNA Damage by the Peroxidation Products of Total Lipid Fraction Extracted from Mackerel

Jin-Hoon KANG, Han-Seok BYUN, Yong-Woo LEE,
Seon-Bong KIM, and Yeung-Ho PARK

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan
Nam-gu, Pusan, 608 Korea
(Received April 1, 1987)

The DNA damage mechanism by fish oil peroxidation was investigated through the model system of a DNA-mackerel lipid at 37°C.

Mackerel lipid peroxidation products induced a great DNA damage with the increment of its concentration, and such DNA damage in all systems examined occurred below 100 millieq·/kg in POV (peroxide value). Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and superoxide anion($\cdot\text{O}_2^-$) greatly participated in the DNA damage during peroxidation of mackerel lipid, while hydrogen peroxide(H_2O_2) and hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) did little show the DNA damage. From the results of the addition of several active oxygen scavengers to the DNA-lipid systems, singlet oxygen and superoxide anion greatly affected to the increase of POV and to the DNA damage by mackerel lipid peroxidation, respectively. It indicates that there was a close relationship between the effects of active oxygens in the mackerel lipid peroxidation and its DNA damage mechanism.

緒論

魚類, 特히 赤色肉魚類의 脂質에는 linoleic acid, arachidonic acid, eicosapentaenoic acid(EPA) 및 docosahexaenoic acid(DHA) 등의 고도불포화지방산의 함량이 비교적 많고, 또한 이를 불포화지방산은 prostaglandin의 前驅物質로서 뿐만 아니라 成人病의豫防에도 큰 몫을 차지하고 있다. 그러나 이를 고도 불포화지방산은 酸化安定性이 약하여 赤色肉魚類의高度利用에 많은 문제점을 안고 있다.

따라서 이를 赤色肉魚類의 脂質酸化에 의한 DNA損傷作用은 물론 이의 防止를 밝히는 것은 水產食品

의 有効利用과 安全性評價의 側面에서 아주 重要하다고 하겠다.

脂質의 酸化에 의한 DNA 損傷作用에 대하여서는 Reiss와 Tappel(1973)이 arachidonic acid와 calf thymus DNA를 37°C에서 反應시켜 脂質酸化에 의한 DNA의 구조변화를 調査하고 arachidonic acid와 DNA의 反應生成物에 의하여 DNA 사슬간의 水素結合이 파괴되어 热變性에 대하여 耐性을 가지는 共有結合을 形成하는 등의 DNA 損傷作用을 報告한 바 있다.

또한 Nakayama 등 (1984)은 methyl linoleate와 DNA를 反應시켰을 경우 脂質과 DNA의 相互作用

으로 DNA 上에 radical이生成되며 이들 radical은 不饱和脂肪酸을 反應시켰을 경우에만 生成된다고 報告하였다.

이밖에 金 등(1987a)이 linoleic acid의 酸化에 의하여 DNA 가 크게 損傷되었으며 이러한 作用에는 一重項酸素과 superoxide anion 등의 活性酸素種이 크게 관여한다고 報告한 바 있다.

또 脂質의 酸化過程에서는 各種의 活性酸素種이 생성되는 것으로 알려져 있는데 이들 活性酸素種은 脂質酸化의 radical 連鎖反應을 促進할 뿐만 아니라 DNA를 損傷하는 作用을 지닌다고 한다(宮川, 1984; Svingen 등, 1978; Morita 등, 1980; Nanjou 등, 1984).

그러나 脂質酸化에 의한 DNA 損傷作用이나 活性酸素種에 의한 DNA 損傷作用 등은 아직까지 그 機構가 分明하게 밝혀진 바 없고, 또한 DNA 損傷作用에 대한 研究가 주로 모델脂肪酸과 DNA의 反應을 바탕으로 이루어진 것일 뿐 高度不饱和脂肪酸이 많은 赤色肉魚類脂質의 酸化에 의한 DNA 損傷作用에 대한 연구는 거의 없다.

따라서, 本研究에서는 고등어를 試料魚로 하여抽出한 脂質을 *E. coli* Hb 101에서 分離한 plasmid pBR 322 DNA 와 37°C에서 反應시킨 다음, 經時的인 DNA의 損傷程度를 agarose gel 電氣泳動을 통하여 調査하였다. 또한, 이와 함께 脂質과 DNA의 反應系에 일정 농도의 活性酸素消去劑를 첨가하여 DNA損傷에 대한 活性酸素種의 영향을 比較·檢討하였다.

實驗材料 및 實驗方法

1. 實驗材料

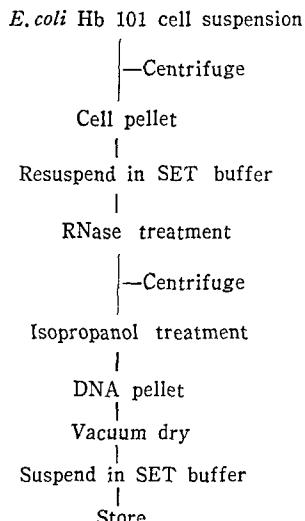
脂質의 抽出에 사용한 고등어(*Scomber japonicus*)는 1986年 8月 10日에 釜山共同魚市場에서 鮮度良好한 것을 購入하였으며 體重은 290~510 g, 體長은 30~37 cm 이었고 粗脂質含量은 9.5%이었다. 또한 本 實驗에서 agarose gel 電氣泳動分析을 위하여 사용한 DNA는 *E. coli* Hb 101에서抽出한 plasmid pBR 322 DNA 이었으며 DNA 定量分析에서는 청어정자의 DNA(Sigma Chem. Co.)를 使用하였다. 또한, 活性酸素種의 영향을 조사하기 위하여 사용한 活性酸素消去劑는 α -tocopherol(United States Biochem. Co.), cysteine(Hayashi Chem. Co.), Superoxide dismutase(SOD, Toyobo Chem. Co.), ascorbic acid (Hayashi Chem. Co.), tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris,

Sigma Chem. Co.), mannitol(Kanto Chem. Co.) 및 catalase(Sigma Chem. Co.) 등이었다.

2. 實驗方法

1) Plasmid pBR 322 DNA의 抽出

本 實驗에서 使用한 DNA는 *E. coli* Hb 101에서 Rodriguez 와 Tait(1983)의 miniscreen法에 따라 抽出하였다(Scheme 1).



Scheme 1. Isolation of plasmid DNA from *E. coli* Hb 101.

2) DNA와 脂質의 反應

고등어脂質은 15 mM NaCl과 1.5 mM sodium citrate를 함유하는 0.1×SSC buffer(standard sodium citrate buffer, pH 7.2) 1.6 배량과 함께 sonicator(경일초음파공업)로 균일하게 혼탁시키고抽出한 DNA 600 μ g(TE buffer, pH 7.6에 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 水平式電氣泳動裝置를 이용하여 實施하였는데 agarose의 농도는 1%로 하였다.

Agarose(半井化學, 日本)는 Tris-acetate 원충액(0.4 M Tris, 0.2 M sodium acetate, 0.18 M EDTA, 100 μ g/ml ethidium bromide 含有)을 使用하여 70°C 이상의 恒溫水槽內에서 용해시켰으며 電氣泳動은 7 v/cm의 전압으로 2시간 동안 實시하였다. DNA band의 检출은 254 nm의 단파장용 자외선등을 사용

魚油酸化生成物의 DNA 損傷作用

하였으며 gel plate 上의 試料注入口當 注加한 DNA 量은 15 μg 이었다. 한편, 本 實驗에서의 DNA 損傷 程度는 電氣泳動上의 DNA band 的 變化로서 나타내었다.

4) 고등어脂質의 抽出

試料고등어中の 脂質은 Folch 등 (1951)의 方法에 따라 抽出하였다.

5) 過酸化物價(Peroxide value, POV)의 測定

過酸化物價는 A.O.A.C法(1984)에 따라 測定하였다.

實驗結果 및 考察

고등어脂質의 酸化에 의한 DNA 損傷作用

Fig. 1은 고등어에서 抽出한 脂質의 最終濃度를 각각 225 μg , 450 μg , 675 μg 이 되도록 조절하고 DNA 600 μg 과 37°C에서 反應시키면서 經時的인 DNA 損傷程度를 調査한 結果이다.

그림에서 알 수 있듯이 反應系內의 全體的인 脂質含量이 많아 gel plate 上의 DNA의 移動度가 짧아졌으며 DNA band의 形태도 DNA만의 對照區(C_1)와는 아주 다르게 檢出되었다. 또한 고등어 脂質의 含量이 증가함에 따라 DNA의 損傷程度도 더욱 커지는 것을 알 수 있었다. 특히 反應 3日째에는 對照區(C_2)에서 Form II DNA(open circular DNA)의 形態

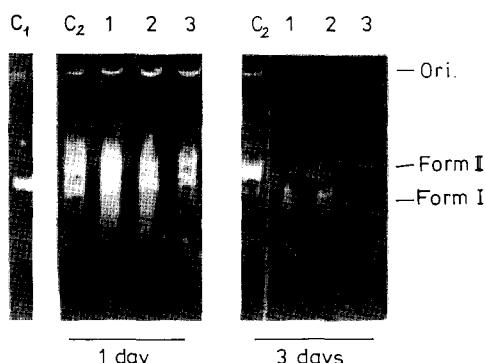


Fig. 1. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with mackerel lipid at 37°C. pBR 322 DNA was incubated with each concentration of mackerel lipid at 37°C.

C_1 , DNA only(600 μg , not incubated); C_2 , DNA only (600 μg , incubated); 1, C_1 + lipid(225 μg); 2, C_1 + lipid(450 μg); 3, C_1 + lipid(675 μg).

Table 1. Influence of mackerel lipid on the DNA damage during peroxidation at 37°C (%)

Concentrations of mackerel lipid	Incubation time, days			
	1	2	3	4
None	30.0	46.0	54.0	62.4
225 μg	32.4	49.7	61.9	70.5
450 μg	39.6	57.4	62.9	71.9
675 μg	48.9	68.2	70.8	79.4
900 μg	58.6	72.6	78.9	83.4

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

로 존재한 反面, 脂質을 첨가한 것은 거의 切斷되어 agarose gel 上에서 DNA band 가 檢出되지 않았다.

이러한 DNA 損傷의 程度를 定量的으로 比較하여 보면 反應 4日째 DNA 만의 對照區가 62.4%의 감소율을 나타낸 反面, 脂質을 첨가한 것은 모두 70%以上의 감소율을 나타내었다(Table 1).

또한, Fig. 2는 고등어脂質酸化過程中의 POV變化를 나타낸 것인데 脂質의 농도가 증가함에 따라 POV

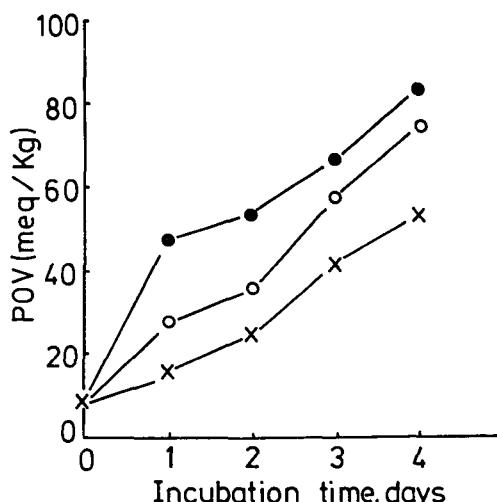


Fig. 2. Changes in peroxide value(POV) on the dose-response of mackerel lipid peroxidation at 37°C.

Two hundred microliters of each concentration of mackerel lipid was incubated at 37°C, and then 50 μl of aliquot was used for POV analyses. Twenty-one micrograms (X-X), 42 μg (○-○) or 63 μg (●-●) of mackerel lipid was maintained at 37°C.

의 생성이 더욱 커졌으나 linoleic acid의 경우(金等, 1987 a)와 마찬가지로 전반적으로 POV가 100 millieq./kg을 넘지 않았다.

以上의 결과 고등어脂質의 酸化에 의한 DNA 損傷作用은 脂質濃度가 증가할수록 더욱 크게 나타났는데 이러한 결과는 前報(金等, 1987 a)에서 보고한 linoleic acid 산화에 의한 DNA 損傷作用보다 다소 큰 것을 알 수 있었으며 이는 고등어脂質에 수종의 不飽和脂肪酸이 함유되어 있기 때문으로 생각된다. 또한, 上記의 DNA 損傷作用은 고등어脂質의 POV가 100 millieq./kg을 넘지 않은 상태에서 크게 일어나는 것으로 보아 linoleic acid 산화의 경우와 마찬가지로活性酸素種이 크게 관여할 것으로 생각된다.

活性酸素種의 DNA 損傷作用

따라서, 本 實驗에서는 고등어지질의 산화과정에서 생성하는 活性酸素種이 DNA 損傷作用에 미치는 영향을 조사하기 위하여 항산화제인 BHT(lane 1), 一重項酸素消去劑인 α -tocopherol과 cysteine(lane 2, 3), superoxide anion消去劑인 ascorbic acid(lane 4), 水酸 radical消去劑인 Tris 와 mannitol(lane 5, 6) 및 과산화수소소거제인 catalase(lane 7) 등의 活性酸素消去劑를 고등어지질과 DNA의 반응계에 첨가하고 경시적인 DNA 損傷程度를 조사하였는데 그 결과는 Fig. 3 및 4와 같다.

Fig. 3은反應2일째의 결과를 나타낸 것인데 linoleic acid의 경우(金等, 1987 b)와 마찬가지로 對照區에 비하여 DNA損傷이 活性酸素消去剤를 첨가한 반응계에서 크게 억제되었다. 즉, 지질과 DNA를 반응시킨 對照區(C₂)에서는 Form II DNA가 약하게 검출된 반면, 活性酸素消去剤를 첨가한 反應系에서는 Form I DNA(covalently closed circular DNA)가 많이 존재하는 것을 알 수 있으며 그중에서도 一重項酸素消去剤인 α -tocopherol과 cysteine의 DNA損傷抑制能이 가장 커 BHT와 ascorbic acid도 큰 것으로 나타났다.

한편, 3日의 反應에서는 對照區(C₂)의 DNA band는 완전히 사라졌고 活性酸素消去剤를 添加한 경우에는 Form I DNA가 확인된 것은 BHT(lane 1), cysteine(lane 3), ascorbic acid(lane 4) 등의 添加區이었다(Fig. 4).

이것으로 보아 고등어脂質의 DNA 損傷作用에도 linoleic acid의 경우(金等, 1987 a)와 마찬가지로 一重項酸素과 superoxide anion이 가장 크게 관여하는 것을 알 수 있다. 이밖에 過酸化水素와 水酸 radical

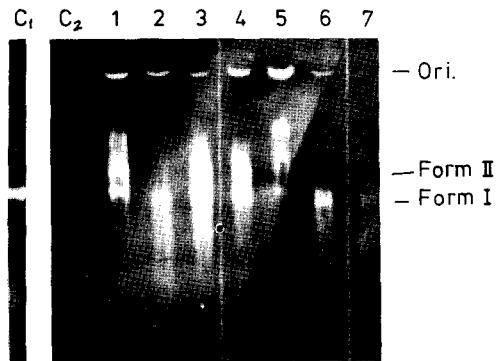


Fig. 3. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with mackerel lipid in the presence of the active oxygen scavengers at 37°C. pBR 322 DNA was incubated with each concentration of the active oxygen scavenger and mackerel lipid at 37°C for 2 days.

C₁, DNA only(600 μ g); C₂, C₁+mackerel lipid (225 μ g); 1, C₁+BHT(0.5 mM); 2, C₁+ α -tocopherol (220 μ g); 3, C₁+cysteine (10 mM); 4, C₁+ascorbic acid(1 mM); 5, C₁+tris(hydroxymethyl)aminomethane (10 mM); 6, C₁+mannitol (10 mM); 7, C₁+catalase(40 μ g).

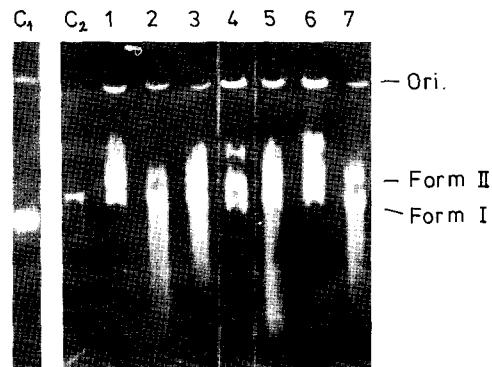


Fig. 4. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with mackerel lipid in the presence of the active oxygen scavengers at 37°C. pBR 322 DNA was incubated with each concentration of the active oxygen scavenger and mackerel lipid at 37°C for 3 days. Concentrations of DNA, lipid and the active oxygen scavengers are the same as in Fig. 3.

의 消去剤를 添加한 것에서는 DNA band가 1日以後에 거의 완전히 消失된 것을 알 수 있었는데 이들水酸 radical이나 過酸化水素는 反應初期에 DNA損

魚油酸化生成物의 DNA 損傷作用

Table 2. Influences of the active oxygen scavengers on the DNA damage during mackerel lipid peroxidation at 37°C(%)

	Incubation time, days			
	1	2	3	4
DNA only	30.0	46.0	54.0	62.4
DNA+linoleate	56.3	79.5	86.4	94.0
BHT	23.2	30.1	32.3	45.0
α -Tocopherol	18.1	20.5	24.8	28.5
Cysteine	23.0	31.7	24.2	48.2
Ascorbic acid	20.5	23.8	27.5	33.8
Tris*	31.0	41.2	28.9	58.4
Mannitol	32.5	40.8	51.7	61.3
Catalase	28.4	35.5	53.7	59.4

Concentrations of the active oxygen scavengers are the same as in Fig. 4. Forty microliters of reaction mixture containing DNA(600 μg), linoleic acid(6 mM) and each concentration of the active oxygen scavenger was incubated at 37°C, and then 10 μl of aliquot was analyzed for determining the degree of DNA damage.

*Tris means tris(hydroxymethyl) aminomethane.

傷作用을 가지는 것으로推定된다.

Table 2는 DNA의 損傷程度를定量的으로 分析한 결과이다. 즉, DNA와 脂質의 反應系에서는 反應 4日째 약 94%의 DNA가 감소하여 DNA가 크게 損傷되는 결과를 나타낸 반면, 活性酸素消去劑를 添加하는 경우에는 全般的으로 反應 4日째까지 감소율이 60%以下이었다. 특히 一重項酸素消去剤과 superoxide anion消去剤의 添加에 의해서는 反應 4日째의 DNA 감소율이 28%와 33%에 불과하여 一重項酸素와 superoxide anion이 DNA損傷에 가장 큰 영향을 미친다는 것으로 나타났다.

또한, Fig. 5는 過酸化物價(POV)의 變化를 나타낸 것인데 α -tocopherol, BHT와 ascorbic acid 등의 添加區에서 POV의 증가가 가장 크게 抑制되었으며 Tris와 catalase의 添加區는 對照區에 비하여 다소 抑制能이 컸으나 그다지 큰 영향을 미치지 않았다.

이와 같이 linoleic acid에 各種活性酸素消去剤를 첨가하여 linoleic acid의 酸化에 대한活性酸素種의 영향을 살펴본結果, superoxide anion과 一重項酸素가 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타나 linoleic acid의 酸化에 의한DNA損傷作用에 미치는活性酸素種의 영향과 동일한結果를 나타내었다.

이와 같은脂質酸化中의活性酸素種의生成에 대하여 Kellogg와 Fridovich(1975)는 superoxide anion과 過酸化水素는 式(1)의 反應으로 一重項酸素를生成한다고 報告하였으며

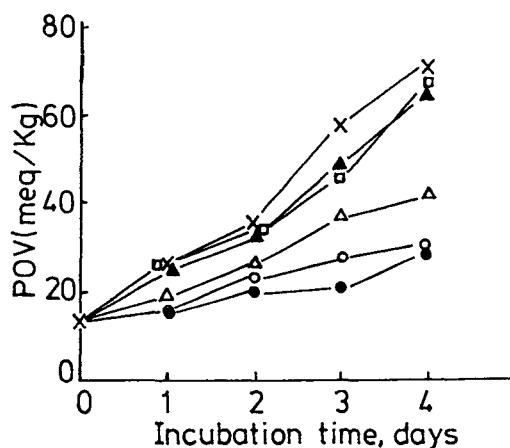
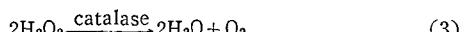
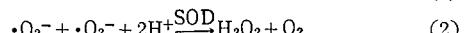
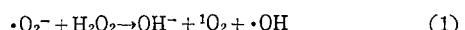


Fig. 5. Changes in peroxide value (POV) of mackerel lipid in the presence of the active oxygen scavengers during peroxidation at 37°C.

Two hundred microliters of reaction mixture containing mackerel lipid(415 μg) and each concentration of the active oxygen scavenger at 37°C, and then 50 μl of aliquot was used for POV analyses.

Four hundred and fifteen microliters mackerel lipid only($\times-\times$), 0.5 mM BHT, 220 μg α -tocopherol($\bullet-\bullet$), 1 mM ascorbic acid($\triangle-\triangle$), 10 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane ($\blacktriangle-\blacktriangle$) or 40 μg catalase ($\square-\square$) was maintained at 37°C.



生成한 superoxide anion은 式(2)와 같이 SOD의 不均一化作用에 의하여 過酸化水素와 分子狀酸素을 生成하며 過酸化水素는 다시 catalase에 의하여 分解되는데 式(3) 이와 같은反應은 生體內에서도進行되고 한다(McCord와 Fridovich, 1969; 山倉, 1985; 美濃, 1985). 또한, 金等(1987a, b)은 linoleic acid의 酸化에 의하여 일어나는DNA損傷作用은活性酸素種이 크게 관여하며 이를活性酸素種中 superoxide anion과 一重項酸素의 生成은 反應初期에 빠르게進行되는 것을 報告한 바 있다.

따라서, linoleic acid를 포함한 高度不饱和脂肪酸을 많이 含有하고 있는 고등어脂質의 酸化에 의한DNA損傷作用도 linoleic acid와 마찬가지로活性酸素種이 크게 관여하며 本實驗結果, 一重項酸素와 superoxide anion의 DNA損傷作用이 가장 큰 것으로 보아 그反應機構가 linoleic acid의 경우(金 등, 1987 b)와 동일할 것으로 생각된다.

要 約

高度不飽和脂肪酸含量이 높은 赤色肉魚類脂質의 酸化에 의한 DNA 損傷作用機構을 調査하기 위하여 고등어를 試料로 하여抽出한 脂質을 plasmid pBR 322 DNA 와 37°C에서 反應시켜 經時의 DNA 損傷程度를 調査하였으며 이와 함께 脂質과 DNA의 反應系에 各種 活性酸素消去劑를 一定濃度 씩 添加하고 脂質酸化로 일어나는 DNA 損傷에 대한 活性酸素種의 영향을 比較·検討하였다.

고등어脂質의 濃度가 클수록 DNA 損傷作用이 커졌으며 이러한作用은 고등어脂質의 POV가 100millieq./kg以下에서 進行된 것으로 나타났다. 또한活性酸素種中一重項酸素(1O_2)와 superoxide anion($\cdot O_2^-$)의 DNA 損傷作用이 가장 커으며 水酸 radical과 過酸化水素는 反應1日以後 거의 영향을 미치지 않아 反應初期의 DNA 損傷作用에 관여할 것으로 생각된다.

또한, 고등어脂質의 酸化에 대한活性酸素種의 영향을 살펴 본結果, DNA 損傷에 대한結果와 마찬가지로 一重項酸素와 superoxide anion의 영향이 큰 것으로 보아 고등어脂質의 酸化反應이나 DNA 損傷作用에 있어서活性酸素種의 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다.

文 獻

- A.O.A.C. 1984. Official Methods of Analysis. 14th ed., Assoc. of Office. Agri. Chemists. p. 507. Washington D.C.
- Dillon, J.R., G.S. Bonzonson and K.H. Yeung. 1985. "Gel electrophoresis. Recombinant DNA Methodology" (J.R. Dillon, A. Nasim and E.R. Nestman ed.) pp.13—29, Willy and Sons, Inc., New York.
- Folch, J., I. Ascoli, M. Lees, J.A. Meath and F.N. Lebaron. 1951. Preparation of lipid extracts from brain tissue. J. Biol. Chem., 191, 833—841.
- Kellogg, E.W. and I. Fridovich. 1975. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid

peroxidation by a xanthine oxidase system.

J. Biol. Chem., 250(22), 8812—8817.

金善奉·姜珍燭·金仁洙·洪龍基·朴榮浩. 1987a.

Linoleic acid의 酸化에 의한 DNA 損傷作用.

한국식품과학회지 투고중.

金善奉·姜珍燭·李龍雨·朴震宇·朴榮浩. 1987b.

Linoleic acid 酸化生成物의 DNA 損傷作用에 있어서의活性酸素種의 역할. 한국식품과학회지 투고중.

McCord, J.M. and I. Fridovich. 1969: The utility of superoxide dismutase in studying free radicals reaction. J. Biol. Chem., 244, 6056.

美濃眞. 1985. 老化, 化學同人, 東京, 27—52.

宮川高明. 1984. 酸素酸化反應とその防止の機構. ニューフードーインダストリ, 26(10), 49—64.

Morita, J., N. Kashimura and T. Komano. 1980. Inactivation of bacteriophage $\phi x174$ by D-fructose 6-phosphate. Agric. Biol. Chem., 44(4), 883—890.

Nanjou, S., S. Fujii, K. Tanaka, K. Ueda and T. Komano. 1984. Induction of strand breakage in $\phi x174$ 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.

Reiss, U. and A.L. Tappel. 1973. Fluorescent product formation and changes in structure of DNA reacted with peroxidizing arachidonic acid. Lipids, 8(4), 199—202.

Rodriguez, R.L. and Robert C. Tait(1983): Rapid isolation of plasmid DNA (miniscreen). "Recombinant DNA Techniques; An Introduction" (R.L. Rodriguez and R.C. Tait ed.), Addison-Wesley Publishing Co., Massachusetts, 50—51.

山倉文幸. 1985. 何が酸素毒性を引き起こすのが— $\cdot O_2^-$ とSODをめぐる最近の話題. 化學と工業 38(2), 113—115.