

# Linoleic acid過酸化物の DNA 損傷作用

김선봉 · 강진훈 · 변한석 · 김인수 · 박영호

釜山水産大學 食品工學科

(1987년 9월 15일 접수; 1987년 11월 19일 수리)

## The DNA Damage by Linoleic Acid Hydroperoxide

Seon-Bong KIM, Jin-Hoon KANG, Han-Seok BYUN

In-Soo KIM, and Yeung-Ho PARK

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan,  
Nam-gu, Pusan, 608 Korea

(Received September 15, 1987; Accepted November 19, 1987)

The DNA damage by linoleic acid hydroperoxide (LHPO) was investigated in a DNA-LHPO system at 37°C to elucidate the DNA damage mechanism by lipid peroxidation products. LHPO showed a great DNA damage with the increase of its concentrations. DNA was completely damaged in a LHPO-DNA(weight ratio, 2:3) system after incubation for 2 days. The degree of DNA damage by LHPO was greater than that of linoleic acid. In the quantitative analysis of DNA damage, the decreasing ratio of DNA content was 60% in 844 µg LHPO system incubated for 1 day compared to the control solution marked 30%. There were no participation of active oxygens on the DNA damage by LHPO.

### 緒 論

지질 과산화물은 지질의 산화로 생성되는 初期 反應生成物로서 食品 또는 生體內的 단백질, 아미노산 등의 構成成分과의 相互反應으로 食品劣化의 原因물질이 될 뿐만 아니라 DNA 自體에도 變化를 일으키는 것으로 알려져 있다.

脂質過酸化物の DNA 損傷作用에 대하여 Pietronigro 등(1977)은 phosphatidyl choline의 酸化速度가 첨가되는 DNA의 농도에 비례하여 감소한다고 報告함으로써 過酸化物과 DNA의 相互作用이 존재한다는 것을 시사하였으며, Fukuzumi(1975), 福住(1983) 및 Nakayama 등(1984)은 methyl linoleate와 DNA를 共存시키면 脂質의 酸化에 의하여 DNA에 radical이 生成된다고 하였는데, Nakayama 등(1984)은 DNA에 生成된 radical이 peroxy radical(ROO·)이 아니라 脂質과의 相互反應으로 生成된 것이라고 報告한 바 있다.

또한 過酸化物은 突然變異原性을 나타내는 것으로 알려져 있는데 이러한 突然變異原性은 DNA 사슬의 切斷에 起因한다고 한다(永田, 1985).

또한, 脂質의 酸化로 生成되는 過酸化物은 그 自體가 毒性(Yamaguchi and Yamashita, 1979; 1980)을 지니고 있어 이들 過酸化物의 DNA 損傷作用을 밝히는 것은 食品의 安全性評價 및 老化 등의 側面에서 아주 중요한 일이 아닐 수 없다.

金 등(1987) 및 姜 등(1987a)은 linoleic acid의 酸化에 의하여 DNA가 損傷되었고, 이러한 作用에는 活性酸素種이 크게 參與하는 것을 밝히는 동시에 linoleic acid의 酸化初期에 活性酸素種이 급격히 生成된다고 報告한 바 있다.

따라서, 本 研究에서는 脂質酸化生成物의 DNA 損傷作用 및 그 抑制機構를 밝히기 위한 研究의 일환으로 自動酸化시킨 linoleic acid에서 過酸化物을 分離하고 E. coli Hb 101에서 추출한 plasmid pBR 322 DNA와 37°C에서 反應시킨 다음 電氣泳動을 통하

여 過酸化物的 DNA 損傷作用을 검토하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 材 料

本 實驗에서 過酸化物的 分離에 使用한 脂肪酸은 linoleic acid(Sigma Chem. Co.)이었으며 또한 column chromatography를 위하여 규산(Merck 製)을 使用하였고, thin layer chromatography 用으로는 silica gel 60 G(Merck 社)를 使用하였다. 過酸化物과 反應시킨 DNA는 *E. coli* Hb101에서 抽出한 plasmid pBR 322 DNA를, DNA의 定量的 分析에서는 칭어정자의 DNA(Sigma Chem. Co.)를 각각 使用하였다.

### 2. 實驗方法

1) *E. coli* Hb 101에서의 plasmid DNA의 抽出 前報(姜 등, 1987b)에서와 같이 抽出하였다.

#### 2) DNA의 定量的 分析

DNA의 定量은 칭어정자의 DNA를 使用하여 前報(姜 등, 1987b)와 같이 行하였다.

#### 3) Linoleic acid의 自動酸化

0.9g의 linoleic acid를 10 ml 용량의 삼각플라스크에 취하여 37°C에 貯藏하여 두고 POV가 1,000 millieq/kg이 약간 上廻할 때까지 수시로 흔들어 주면서 自動酸化시켰다.

#### 4) 過酸化物的 分離 및 檢出

過酸化物的 分離는 Gamage 등(1971)의 硅酸 column chromatography에 의하여 實施하였다. 硅酸을 acetone으로 數回 洗淨한 後, 흡인, 여과 및 風乾하고 110°C에서 2시간 加熱하여 活性化시켰다. 20% methanol/benzene(v/v)용액을 活性化된 硅酸에 대하여 0.8배의 비율로 가하여 교반하였다. 2배량의 2% methanol/benzene 용액을 가하여 현탁시킨 다음 column( $\phi 2\text{ cm} \times 1.5\text{ m}$ )에 채우고 自動酸化된 linoleic acid 4g을 소량의 benzene 용액에 녹여 column에 주입시켰다. 용출액은 2% methanol/benzene을 사용하였으며 용출속도는 2~3 ml/min이었다. 過酸化物的 용출범위는 300~500 ml 내에 속하였는데 용출후 감압건조하여 용매를 제거한 것을 試料 過酸化物로 使用하였으며 이때의 POV는 3,750 millieq/kg이었다. 過酸化物的 檢出은 溶出液 2~10  $\mu\text{l}$ 를 silica gel 60G로 도포한 TLC plate 위에 spot하고 hexane/ether/acetic acid(8:7:0.1)의 전개용매로 전개하였

으며 전개종료 후 용매를 제거하고 plate를 紫外線燈下에서 檢出을 行하였다. 供體二重結合을 가지는 過酸化物을 黃酸으로 분무하여 이에 나타나는 band의  $R_f$  값을 Otte(1965)가 구한 linoleic acid 過酸化物的  $R_f$  값과 比較함으로써 過酸化物的 生成을 確認하였다(Fig. 1).

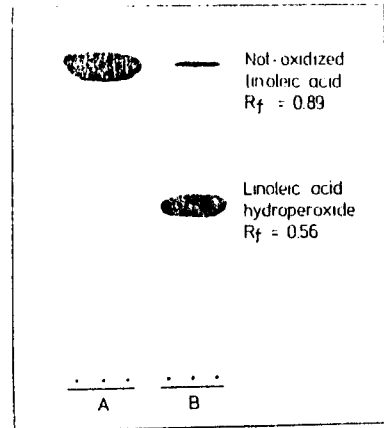


Fig. 1. TLC chromatogram of linoleic acid hydroperoxide.

A: Sample linoleic acid

B: Linoleic acid hydroperoxide

#### 5) 過酸化物과 DNA의 反應

Linoleic acid로부터 分離한 過酸化物을 0.1×SSC buffer(standard sodium citrate buffer, pH 7.2)에 현탁시켜 211, 422, 633 및 844  $\mu\text{g}$ 으로 調節하고 각각 600  $\mu\text{g}$ 의 DNA와 37°C의 恆溫槽內에서 反應시켰다. 또한 本 反應系에 各種의 活性酸素消去劑를 첨가하고 37°C에 反應시키면서 過酸化物的 DNA 損傷作用에 대한 活性酸素種의 영향도 調査하였다.

#### 6) Agarose gel 電氣泳動

Agarose gel 電氣泳動은 1% agarose를 使用하여 前報(姜 등, 1987b)와 同一한 方法으로 行하였다.

## 結果 및 考察

### 1. Linoleic acid 過酸化物的의 DNA 損傷作用

POV 3,750 millieq/kg의 過酸化物을 DNA와 濃度別로 反應시키고 경시적인 DNA 損傷作用을 調査한 結果는 Fig. 2와 같다.

本 實驗에서 檢出된 DNA band는 前報(姜 등, 1987b)와 같이 Form I (covalently closed circular), Form II (open circular), Form III (linear) DNA로

Linoleic acid 過酸化物的 DNA 損傷作用

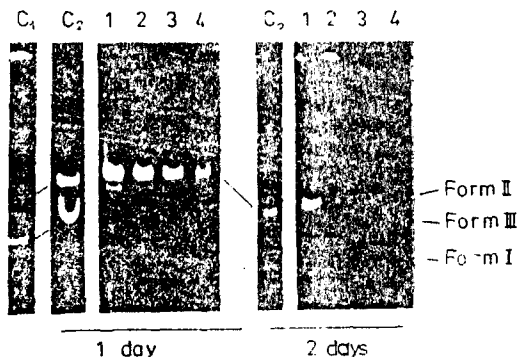


Fig. 2. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with linoleic acid hydroperoxide at 37°C.

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

C<sub>1</sub>, DNA only(600 µg, not incubated); C<sub>2</sub>, DNA only(600 µg, incubated); 1, C<sub>1</sub>+LHPO (211 µg); 2, C<sub>1</sub>+LHPO(422 µg); 3, C<sub>1</sub>+LHPO (633 µg); 4, C<sub>1</sub>+LHPO(844 µg).

나타났으며 電氣泳動的인 移動度는 Form I, Form III, Form II DNA의 順으로 나타났다(Osterman, 1984).

反應 1日째 DNA 만 反應시킨 對照區(C<sub>2</sub>)에서는 Form I DNA가 상당량 존재한 데 비하여 211 µg의 過酸化물을 反應시킨 경우(lane 1)에 Form I DNA가 완전히 사라지고 Form III DNA가 형성되어 Form I DNA의 二重鎖가 동시에 손상되는 것을 알 수 있으며, 422 µg 이상의 농도에서는 Form III DNA의 생성이 없이 Form II DNA의 형태로 점차 손상되어 過酸化물과의 反應에 의하여 그 濃度가 증가함에 따라 DNA의 損傷作用이 빠르게 進行되는 것으로 나타났다. 反應 2日째에는 422 µg 이상의 過酸化물을 첨가한 反應系의 DNA는 완전히 손상되어 gel plate 상에서 DNA band가 나타나지 않았다.

以上の 結果를 金 등(1987)이 linoleic acid의 酸化에 의한 DNA 損傷作用을 調査한 結果에 있어 DNA 사슬의 손상이 반응 3日째 크게 일어나는 事實과 比較할 때 linoleic acid의 경우에 비하여 過酸化물의 DNA 損傷作用이 더욱 빠르게 나타나는 것이 밝혀졌다.

한편, 過酸化물의 DNA 損傷能을 定量的으로 比較하여 Table 1에 나타내었다. 그 결과, Fig. 2와 마찬가지로 過酸化물의 DNA 損傷作用이 큰 것으로 나타났으며, 또한 過酸化물의 量이 많을수록 DNA 損傷能이 더욱 크게 나타났다. 즉, 反應 1日에 對照區가 30%의 감소율을 나타낸 反面, 過酸化물의 濃度가

Table 1. Influence of linoleic acid hydroperoxide(LHPO) on the DNA damage at 37°C (%)

Concentrations of LHPO	Incubation time, days			
	1	2	3	4
None	30.0	46.0	54.0	62.4
211 µg	32.1	45.8	54.9	63.5
422 µg	48.0	52.7	60.8	69.6
633 µg	53.2	61.9	78.8	80.1
844 µg	60.0	68.9	85.8	92.7

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

844 µg 일 경우는 對照區의 2배 량에 달하는 60%의 감소율을 나타내어 DNA가 크게 損傷되는 것으로 나타났었다.

2. 過酸化물의 DNA 損傷作用에 대한 活性酸素種의 影響

過酸化물의 DNA 損傷作用에 대한 活性酸素種의 影響을 調査하기 위하여 DNA(600 µg)와 過酸化물(211 µg) 및 各種 活性酸素消去劑를 混和시켜 37°C에서 6시간 反應시킨 結果는 Fig. 3과 같다.

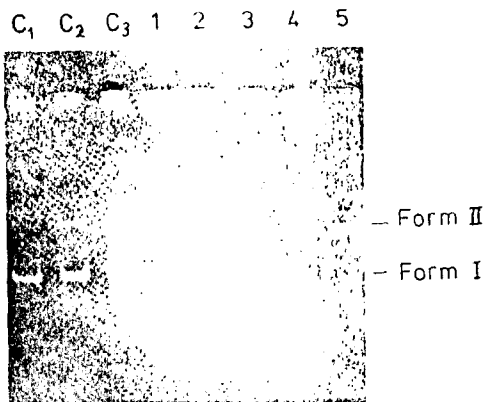


Fig. 3. Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNA incubated with linoleic acid hydroperoxide in the presence of the active oxygen scavengers at 37°C.

pBR 322 DNA was incubated with linoleic acid hydroperoxide(422 µg, LHPO) and each concentration of the active oxygen scavengers 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>+LHPO (422 µg); 1, C<sub>3</sub>+BHT(0.5 mM); 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(10 mM); 5, C<sub>3</sub>+catalase(40 µg).

그림에서와 같이 6시간의 反應에서는 DNA 損傷이 크게 일어나지 않았으며, 過酸化物和 DNA 損傷 反應시킨 對照區(C<sub>2</sub>)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 형태를 취하고 있는 것으로 보아 過酸化物の DNA 損傷作用에는 活性酸素種의 関여가 없는 것으로 생각된다.

前報에서 著者 등은 linoleic acid의 酸化初期에 活性酸素種이 生成된다는 것을 밝혔고(姜 등, 1987a), 또한 生成된 이들 活性酸素種이 linoleic acid의 酸化初期에 있어서 DNA의 손상작용에 크게 関여한다고 밝힌 바 있다(金 등, 1987).

이와 같이, linoleic acid 過酸化物에 의한 DNA 손상작용을 調査한 결과, 過酸化物の 供試量이 가장 적었을 때에도 DNA 손상이 빠르게 進行되었으며, 이러한 작용은 linoleic acid의 산화에 의한 DNA 손상작용보다 크게 나타났다. 또한, agarose gel 상의 DNA 구조의 변화과정을 통하여, 과산화물에 의하여 DNA의 2重鎖가 동시에 손상을 받는 것으로 나타났으며 이러한 작용에는 活性酸素種의 영향은 거의 없는 것으로 나타나, linoleic acid의 초기산화에 의한 DNA 손상작용과는 달리 linoleic acid 과산화물의 직접작용에 의한 것으로 추정된다.

### 要 約

脂質酸化生成物の DNA 損傷作用機構를 밝힐 目的으로 自動酸化시킨 linoleic acid로부터 過酸化物を 分離하고 DNA와 37°C에서 反應시켜 經시적인 過酸化物の DNA 損傷作用을 調査한 結果는 다음과 같다.

過酸化物の 濃도가 增加함에 따라 DNA가 크게 損傷되었으며, 反應 2日째에는 422 μg 이상의 濃도에서는 DNA가 더욱 크게 損傷을 받아 gel plate 상에서는 DNA band가 檢出되지 않았다. 또, 이러한 DNA 損傷能을 定量的으로 分析한 結果, 反應 1日에 對照區가 30%의 감소율을 나타낸 反面, 844 μg의 濃도에서는 2배량인 60%의 감소율을 나타내었다. 過酸化物과 DNA의 反應系에 各種 活性酸素消去劑를 첨가한 結果, 過酸化物の DNA 損傷作用에 대한 活性酸素種의 영향은 나타나지 않았다.

### 文 獻

Fukuzumi, K. 1985. The cause of cancer itself-liperoxide and DNA radical. p.26. Proc.

Jap. Cancer Assoc., The 34th Ann. Meet.  
 Gamage, R.T., T. Mori and S. Matsushita. 1971. Effects of linoleic acid hydroperoxides and their secondary products on the growth of *Escherichia coli*. Agric. Biol. Chem. 35, 33-39.  
 福住一雄. 1983. 油脂と癌豫防(1), 胃癌の豫防(その1). 油脂 36, 68-72.  
 姜珍燮·康東敏·崔守安·金善奉·朴榮浩. 1987a. Linoleic acid 酸化에 의한 活性酸素種의 生成. 한 국식품과학회지 인쇄중.  
 姜珍燮·于韓錫·李龍雨·金善奉·朴榮浩. 1987b. 魚油 酸化生成物の DNA 損傷作用, 1. 總脂質酸化 生成物の DNA 損傷作用. 韓水誌 20(3), 213-218.  
 金善奉·姜珍燮·李龍雨·金仁珠·朴榮浩. 1987. Linoleic acid 酸化生成物の DNA 損傷作用에 있어서의 活性酸素種의 역할. 한국식품과학회지 19(4), 311-316.  
 水田親義. 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・嶋崎井勝 編). 262-264. 學會出版センター. 東京.  
 Nakayama, T., M. Kodama and C. Nagata. 1984. Free radical formation in DNA by lipid peroxidation. Agric. Biol. Chem. 48(2), 571-572.  
 Osterman, L.A. 1984. Electrophoresis of nucleic acid. Methods of protein and nucleic acid research. 104-106. Springer-Verlag. New York.  
 Otte, K. 1965. Identification of some lipid peroxides by thin layer chromatography. J. Lipid Res. 6, 449-454.  
 Pietronigro, O.D., W.B.G. Jones, K. Kalty and H.B. Dempoula. 1977. Interaction of DNA and ribosome as a model for membrane mediated DNA damage. Nature 267, 79-81.  
 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 (7), 1675-1678.