

Benzo(a)pyrene에 의한 돌연변이원성과 지질과산화에 미치는 d-Limonene과 Cineole의 억제 효과에 대한 비교연구

강은미 · 박성배¹ · 김상건 · 정기화*

덕성여자대학교, ¹서울시보건환경연구원

Inhibition of Benzo(a)pyrene-Induced Mutagenicity and Lipid Peroxidation by d-Limonene and Cineole

Eun-Mee KANG, Sung-Bae PARK¹, Sang Geon KIM and Ki-Hwa JUNG*

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

¹Seoul Metropolitan Government Institute of Health and Environment, Seoul 137-130, Korea

(Received February 23, 1993; accepted March 30, 1993)

Abstract—It has been reported that d-limonene inhibits chemical-induced rat mammary cancer by the mechanism of increases in detoxification enzymes such as glutathione S transferases and that cineole fails to exhibit significant suppressive effect on chemical-induced carcinogenesis. The present study was designed to compare the effects of d-limonene and cineole on the benzo(a)pyrene (BP)-induced mutagenicity, BP metabolism and lipid peroxidation. Modified Ames assay was employed to evaluate the inhibitory effect of d-limonene and cineole on the BP-induced mutagenicity. The number of revertant-bearing wells was decreased by 44~77% in the presence of both BP and d-limonene compared with that of BP alone whereas cineole decreased the number of revertant-bearing wells by 28~45% at the concentrations between 2 μ M and 2 mM. d-Limonene suppressed BP metabolism by 16, 54 and 67% at 1, 10 and 100 μ M, respectively while cineole inhibited the metabolism by 16, 26 and 55% at the same concentrations. The EC₅₀ values for d-limonene and cineole in inhibiting lipid peroxidation were 2.0 mM and 16 mM respectively, as assayed by thiobarbituric acid method. The present study showed that d-limonene and cineole have common antimutagenic effects although d-limonene appeared to be more effective than cineole in suppressing mutation and lipid peroxidation. The results suggest that the antimutagenic effects of d-limonene and cineole may be associated with alternation in enzyme activities and with inhibition of lipid peroxidation.

Key words □ d-limonene, cineole, antimutagenicity.

Benzo(a)pyrene (BP)은 mixed function oxidation (MFO) 효소계에 의하여 diol epoxide로 대사되어 발암성 유독화합물로 전환된다(Vaca 등, 1988). 간에서 분리한 microsome분획을 이용한 분석에 따르면, BP는 cytochrome P4501A2에 의해 benzo(a)pyrene-7,8-oxide(BP-7,8-oxide)를 거쳐 benzo(a)pyrene-7,8-diol(BP-7,8-diol)로 대사되고 cytochrome P4501A1의 촉매로 활성 대사체인 (+)-syn-benzo(a)pyrene diol epoxide로 산화된다. 효소계에 의한 대사기전 이외에 BP는 비효소계의 과산화지질을 매개하여 입체화학적 측면에서 발암대사기전이 달라지기도 하며(Capdevila 등, 1980; Rahimtula와

O'Brien, 1974), quinone benzo(a)pyrene(quinone BP)으로 산화되기도 한다. Quinone BP는 hydroquinone benzo(a)pyrene 및 산소분자를 포함한 redox cycling를 통하여 \cdot OH 및 O₂ 등의 활성 산소유리라디칼의 생성을 유도하여 위해성을 증가시킨다는 보고도 있다(Hochstein과 Atallah, 1988).

일반적으로 d-limonene과 cineole을 포함하는 monoterpenoid의 생리활성에 대한 연구는 생체의 효소활성에 의한 발암억제 기전의 관점에서 진행되어 왔다. 이들 화합물은 정유의 구성성분이며, 식물에서의 생리적 기능은 정확히 밝혀져 있지는 않으나 2차 대사산물로서 호르몬과 같은 역할을 하고 음식물중의 향신료, 화장품 및 의약품 등의 첨가제로 사용되고 있다(Boland 등,

*To whom correspondence should be addressed.

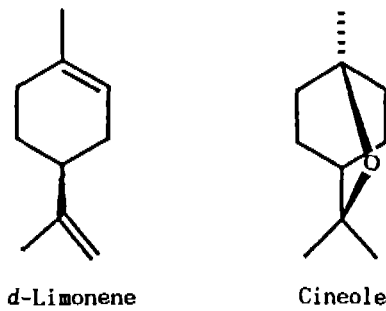


Fig. 1. Structures of d-limonene and cineole.

1991; Harborne 등, 1984). 이들물질은 2개의 isoprene 이 head and tail 축합반응을 통하여 형성되며, 그 구조적 특징에 따라, monocyclic, bicyclic 및 acyclic form으로 구분된다(Fig. 1). d-Limonene은 화학적 발암물질인 7,14-dimethylbenzo(a)anthracene(DMBA)으로 유도한 종양을 유의성있게 억제한다는 연구보고가 있으며, glutathione S-transferases(GST) 활성화에 의한 발암대사체의 제거가 그 기전중의 하나인 것으로 제안된 바 있다(Elson 등, 1988).

Flanam과 Lehman-Mckeeman(1991)의 Ames assay에 의한 위해도 평가연구에 의하면 d-limonene과 d-limonene-1,2-oxide는 유전독성이 없는 안전한 물질임은 물론이며, Elegbede 등 (1986)은 d-limonene이 DMBA로 유도된 랫트의 유방암을 유의성있게 억제하는 효과를 갖는다는 연구를 하였다. 그외 d-limonene이 면역반응의 조절작용과 cytochrome P450 유도효과로 인하여 화학적 방어물질로 작용할 수 있는지에 대해 관심이 모아지고 있다(Evans 등, 1987; Austin 등, 1988). Cineole은 생체내 cytochrome P450 효소 유도 작용이 있음이 알려져 있고, 항산화 작용도 보고된 바 있다(Chadha와 Madyas-tha, 1984; Austin 등, 1988; Jori 등, 1969). Cineole과 d-limonene은 동일한 monoterpene계에 속하는 구조 이성체이며 비슷한 생리활성을 갖고 있지만, Cineole은 종양을 유의성 있게 억제하지 못한 것으로 보고되었다(Russin 등, 1989). 본 연구에서는 화학적 발암물질의 대사기전과 관련된 d-limonene과 cineole의 생리활성 효과를 생화학적 실험방법으로 비교 검색하였다. 즉 이들 monoterpeneoid는 BP가 활성 유리라디칼과 화학적 발암전구물질의 활성대사체로 전환되는 것을 억제함으로써 항산화적 항돌연변이 효과를 갖는다는 가설하에 d-limonene과 cineole의 유전독성 제어의 생리활성을 돌연변이원성 실험, BP의 활성 대사체로의 전환을 및 지질과 산화에 미치는 효과를 통하여 검증함으로써 이들 화합물의 효능을 비교하였다.

실험방법

재료

d-Limonene(purity 97%, Aldrich chemical Co., Milwaukee, WI, U.S.A.), cineole(Sigma chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.). *Salmonella typhimurium* TA98은 Dr. Bruce N. Ames(Biochemistry department, University of California, Berkeley, CA, U.S.A.)로부터 제공 받았다. 균주 배양용 nutrient broth No. 2 (Oxoid), 세포독성실험용 nutrient broth(Difco), 균주확인용 sensi disc; ampicillin disc, blank disc(Becton Dickson), crystal violet(Merck), Aroclor 1254(Alltech associates, Inc.), benzo(a)pyrene, nicotine adenine dinucleotide phosphate, d-glucose 6-phosphate, protein assay kit, l-histidine, d-biotin, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, ascorbic acid, 6-thiobarbituric acid, corn oil, bromocresolpurple(Sigma chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), n-butanol(Wako pure chemical indu., Ltd. Osaka, Japan), dimethylsulfoxide(Aldrich, chemical. Co., Milwaukee, WI, U.S.A.), benzo(a)pyrene의 대사에 사용된 S9 mix용 S9 cofactor; magnesium chloride(6 hydrate), potassium chloride, d-glucose 6-phosphate, reduced nicotine adenine dinucleotide phosphate, reduced nicotine adenine dinucleotide, sodium phosphate(dibasic), sodium phosphate(monobasic, 2 hydrate) (일본 오리엔탈 효모공업 주식회사), magnesium sulfate(7 hydrate), magnesium chloride(6 hydrate), sodium ammonium phosphate(4 hydrate), citric acid monohydrate, sodium phosphate(monobasic, 1 hydrate), sodium phosphate(dibasic anhydrous), potassium chloride, dextrose, sodium phosphate(monobasic, dibasic) 등은 시판 특급품을 사용하였다. 랫트의 간 homogenate를 9000×g로 원심분리한 상정액을 S9 분획으로 사용하였다.

Ames assay

Salmonella typhimurium TA98균주를 사용하여 Ames assay의 원리에 따라 Green 등 (1976)이 수정한 방법을 이용하였다. 배양접시가 아닌 microwell plate(96-well microtitration dish: γ -irradiated Flow Lab)를 사용하여 직접적인 활성 변이원을 검출하였다. 단 배양혼합액 중의 l-histidine 농도는 Ames assay 원법에서는 2 ml의 top agar중에 0.5 mM l-histidine, d-biotin 용액을 200 μ l 첨가하였다. 가해진 l-histidine에 의해서 l-histidine 요구주인 균주가 수회의 증식을 하게 되고, 그러한 증식중에 일어나는 DNA복제에 BP와 같은 변이원성물질이 작용하여 돌연변이를 일으키게 된다. 본 실험에서는 minimal glucose agar plate대신 배양혼합액을 사용하고, 반응혼합액 용량도 다르기 때문에 가해지는 l-histidine의 농도와 더불어 균액의 농도도 달라져야 했다. 따라서 0.01%로 조제한 l-histidine 용액을 100 ml 배양혼합액에 각각 0.25, 0.5, 1.2 및 4 ml씩 가하여 5종류의 배양혼합액을 각각 균액 10, 25 및 50 μ l를 사용하여 실험조건을 결정했다. 반응혼합액에서 microwell plate로 분주된 세균

(*l*-histidine 요구주)은 24시간의 배양중에 일정량의 *l*-histidine에 의해서 수회의 증식을 하게되고, 96개의 well중 일부의 well에서는 BP에 의해서 변이를 일으키고, 그외의 well에서는 well내의 *l*-histidine이 고갈되면 사멸했다. 이때 *l*-histidine이 들어있지않은 선택배지를 가해주면, *l*-histidine 비요구주로 변이된 well에서는 세균들이 *l*-histidine을 자체합성하여 계속 증식하지만, 변이가 일어나지 않은 well에서는 세균들의 증식이 정지했다. 따라서 변이된 세균에서는 glucose를 이용한 대사활동으로 pH가 저하되어 BCP에 의하여 청색에서 황색의 well(revertant-bearing well)로 되었다. 선택 배지를 가한 뒤 결과판정까지의 배양시간을 일정하게할 필요가 있었다.

Benzo(a)pyrene의 정량

Benzo(a)pyrene의 대사조건은 시험관에 4% S9 mix 1 ml와 BP 400 μ M 0.1 ml를 넣고 잘 혼합한 뒤 수조진탕기에서 0, 15, 30, 45 및 60분간 37°C에서 반응시킨 뒤 2 ml ethyl acetate로 두번씩 BP를 추출하여 vial로 옮겨 질소증기하에 증발시킨 후 측정직전에 ethyl acetate 100 μ l (내부표준물질 : diphenhydramin 50 ppm)를 가하여 잘 섞어 반응액중 d-limonene 또는 cineole을 넣거나 넣지않은 상태에서 잔량의 BP를 (gas chromatography C Hewlett packard 5890 with capillary column holder and injection system)로 정량하였다. 실험회수는 각 3회 실시하여 평균치와 표준편차를 구하였으며 유의성 검정은 Student's t-test로 하였다.

TBA법에 의한 항산화 실험

과산화지질의 분해로 생성되는 malonedialdehyde (MDA)는 산성조건하에서 두분자의 thiobarbituric acid (TBA)와 축합하여 적색물질을 형성하는데 535 nm부근에서 최대 흡광치의 검출이 가능하였다. 본 실험에서는 Austin 등 및 Wills 등의 방법을 변형하여 다음과 같이 과산화지질의 형성을 유도하였다(Austin 등, 1988 ; Wills 등, 1985). 시험관에 0.02 M 인산완충액(pH 7.4) 500 μ l, S9 25, 50, 100 및 200 μ l(protein 28.12 mg/ml), 1 mM FeSO₄, 1 mM ascorbic acid로 반응을 야기시키고 5, 10, 15, 30, 45 및 60분간 37°C의 수조진탕기에서 배양하여 TCA-TBA-HCl시액*(TTH)을 가하고 100°C 수욕상에서 15분 가온 후 실온으로 냉각시키고 n-butanol을 가하여 진탕 추출한 뒤 3000×g에서 10분간 원심분리하여 535 nm에서 Beckman DU70 spectrophotometer로 측정하여 과산화지질(nmole MDA/mg protein)을 산출하였다>(*TTH : 15% w/v trichloroacetic acid ; 0.375% w/v TBA ; 0.25N-HCl).

약물에 의한 항산화활성의 측정은 시험관에 0.02 M 인산 완충액(pH 7.4) 500 μ l, S9 100 μ l(protein 28.12 mg/ml), d-limonene과 cineole을 각각 가하여 항산화활성을 측정하였다. 1 mM FeSO₄, 1 mM ascorbic acid로 반응을 야기시키고 30분간 37°C의 수조진탕기에서 배양하여 생성되는 과산화지질을 각 3회 측정하여 평균치와

표준편차를 구하였다. 항산화활성에 대한 EC₅₀은 과산화지질 형성억제율로 부터 산출하였다.

S9분획에서 불포화지방산으로 부터 라디칼에 의한 과산화지질의 형성을 측정하여 약물에 의한 항산화활성도를 정량하였다. 실험조건으로부터 S9의 양, 기질농도 및 배양시간을 최적화하기 위하여 예비실험을 실시하였다. 25, 50, 100 및 200 μ l의 S9(28.12 mg protein/ml)에 대하여 형성된 과산화지질(nmol MDA)을 종속변수로 하였을 때 직선회귀 방정식은 높은 직선성을 보였다($r=0.998$). 이후의 측정에서는 S9 기질양을 100 μ l(protein 으로서 2.81 mg)로 정하였다. S9 100 μ l를 사용하여 0, 10, 15, 30, 45 및 60분간의 배양시간에 대한 1/과산화지질(nmol MDA/mg)의 수치를 함수로 계산하였을 때 반응시간 30분까지 높은 직선성을 유지하였다($r=0.998$). 따라서 과산화지질형성 조건은 S9 100 μ l(protein 2.82 mg)와 배양시간 30분으로 정하였다.

실험결과

Benzo(a)pyrene의 돌연변이에 미치는 효과

Benzo(a)pyrene의 농도와 mutation rate의 관계를 측정하기 위하여 BP 0, 0.08, 0.8, 8 및 80 μ M 농도를 S9 mix에 첨가하였다. 사용된 약물 농도하에서 관찰된 plate당 revertant-bearing wells의 평균수는 9, 12, 42 및 82로 BP의 농도를 증가시키에 따라 대조군에 비하여 현저하게 증가되었고 0.8 μ M 이상의 농도에서 revertant-bearing wells 수는 대조군과 유의성 있는 차이가 있었다. BP농도(log μ M)와 revertant-bearing wells간의 회귀직선방정식은 $Y=24.1X+33.6$ 이었으며 상관관계는 $r=0.98$ 이었다.

Salmonella typhimurium TA 98을 이용하여 BP의 돌연변이원성에 대한 d-limonene과 cineole의 항돌연변이 효과를 측정하였다(Table I). S9존재하에 d-limonene 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M 및 2 mM 농도에서 기질인 BP가 없는 상태에서의 revertant bearing wells의 숫자는

Table I. Effect of d-limonene or cineole on benzo(a)pyrene-induced mutagenicity

Compound		Revertant bearing wells/plate			
		2 μ M ^a	20 μ M ^a	200 μ M ^a	2 mM ^a
d-Limonene	+BAP	46±8*	35±7*	28±2*	23±3*
	-BAP	10±2	8±5	8±2	8±2
Cineole	+BAP	54±5*	50±4*	44±5*	42±7*
	-BAP	8±2	9±2	8±2	9±3

Assay was carried out with Salmonella typhimurium TA98 in the medium containing various concentrations of monoterpeneoids in the presence or absence of BP.

Values represent mean±S.D.(n=4).

*Significantly different from the BP treated group(P<0.05).

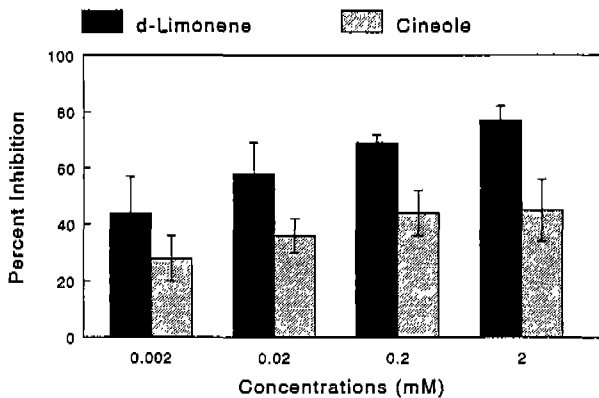


Fig. 2. Percent inhibition of benzo(a)pyrene-induced mutagenesis by d-limonene or cineole as assayed by Ames test. Assay was performed with *S. typhimurium* TA 98 in the presence of S9 mix. Data are mean \pm S.D.(n=4).

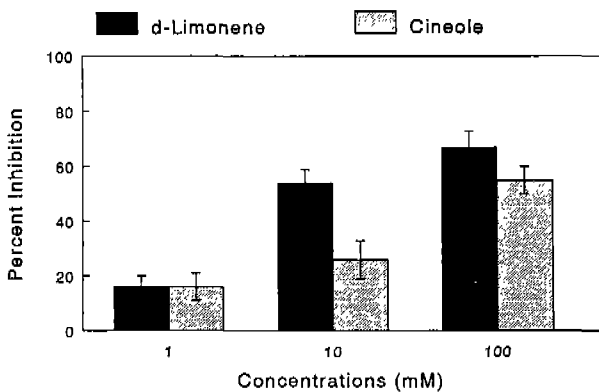


Fig. 3. Effects of d-limonene or cineole on benzo(a)pyrene metabolism. Data are mean \pm S.D.(n=3).

well당 8~10개 사이였고 BP 8 μ M의 첨가와 함께 d-limonene을 0, 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M 및 2 mM의 농도를 가하였을 때 revertant-bearing wells의 수는 각각 73 \pm 9, 46 \pm 8, 35 \pm 7, 28 \pm 2 및 23 \pm 3개로 나타났다. 20 mM 농도에서는 d-limonene과 cineole이 모두 세포독성을 나타내 항돌연변이 작용을 측정할 수 없었다. Table I에 나타낸 바와 같이 돌연변이활성 억제율은 각각의 농도에서 44%, 58%, 69% 및 77%이었다. 50%의 억제율을 보인 d-limonene의 농도는 약 2 mM였다. 한편 BP 8 μ M과 cineole 0, 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M 및 2 mM를 각각 well에 가하였을 때는 revertant-bearing wells의 수는 73 \pm 9, 54 \pm 5, 50 \pm 4, 44 \pm 5 및 42 \pm 7로 나타났으며 그 돌연변이활성 억제율은 각각 28%, 36%, 44% 및 45%였다. Cineole을 가하였을 때 50% 이상의 저해율을 관찰할 수 없었으며, 돌연변이를 억제하는 효능은 d-limonene에 비하여 약한 것으로 나타났다(Fig. 2).

Benzo(a)pyrene의 대사에 미치는 효과

Table II. EC₅₀ of d-limonene or cineole on the inhibition of lipid peroxidation.

Compound	EC ₅₀
d-Limonene	2.0 mM
Cineole	15.8 mM

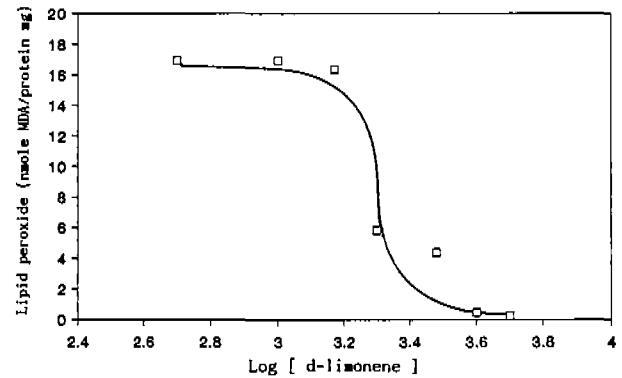


Fig. 4. Inhibition of lipid peroxidation by d-limonene. Assay mixture contained 1 mM FeSO₄, 1 mM ascorbate and S9 fraction. MDA produced in this system was quantified by TBA method.

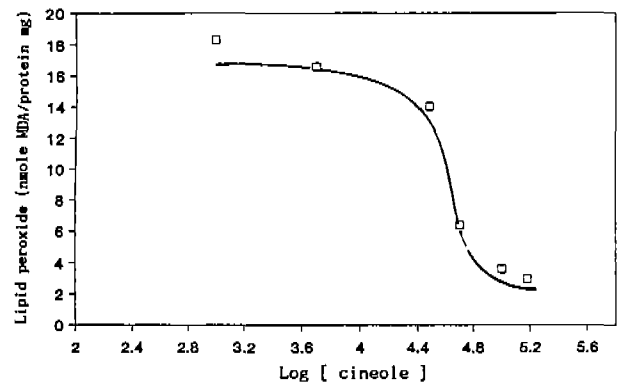


Fig. 5. Inhibition of lipid peroxidation by cineole. Assay was carried out as described in Fig. 4.

BP대사에 관여하는 S9 mix 효소계에서는 BP를 d-limonene 0, 1 mM, 10 mM 및 100 mM과 혼합하여 배양한 경우 각각의 농도에서 0.22 \pm 0.05(22%), 0.36 \pm 0.04(38%), 0.74 \pm 0.05(76%) 및 0.85 \pm 0.06(89%)로서 d-limonene의 농도 증가에 따라 대사되지 않은 BP의 농도도 증가되었다. 억제율은 1 mM, 10 mM, 100 mM 농도에서 각각 16, 54 및 67%로 나타났다(Fig. 3).

Cineole의 경우는 0, 1 mM, 10 mM 및 100 mM의 농도에서 0.22 \pm 0.05(22%), 0.37 \pm 0.05(38%), 0.48 \pm 0.07(50%) 및 0.77 \pm 0.05(80%)로 나타나 cineole에 의한 억제율은 각각의 농도에서 16, 26 및 55%였다(Fig. 3).

지질과산화에 미치는 효과

S9분획 (28.12 mg protein/ml)과 1 mM FeSO₄/ascorbate로부터 유도된 과산화지질의 산화를 MDA의 생성을 측정함으로써 정량한 결과 d-limonene의 억제효과는 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM 및 5 mM에서 각각 16.91±0.57, 5.81±0.37, 4.35±0.46, 0.45±0.18 및 0.22±0.23 (nmol MDA/mg)이었으며 항산화활성도의 EC₅₀는 Fig. 3와 Table II에 보인 바와 같이 2 mM로 나타났다.

동일한 조건하에서 cineole에 의한 억제효과는 1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM 및 100 mM의 농도에서 각각 18.26±0.67, 16.57±0.60, 13.99±0.47 6.37±0.44 및 3.56±0.60이었으며, 항산화활성도 EC₅₀는 16 mM였다.

고 찰

Elegbede 등 (1986)과 Elson 등 (1988)은 d-limonene이 DMBA로 유도된 유방암의 회복에 효과가 있다고 보고한 바 있고, Mehta와 Moon (1991)은 initiator로는 DMBA를, promoter로는 TPA를 사용하여 실험한 결과 d-limonene은 anti-initiator로 작용할 수 있다고 제안하였다. 한편 Gould (1991)은 DMBA로 유도한 종양에 대하여 d-limonene 이외에 cineole의 효과를 연구하였으나, d-limonene과 같은 유의성 있는 억제작용을 얻지 못하였다. 이어서 d-limonene의 종양억제기전을 연구하기 위하여 대사활성화와 해독화 효소 유도작용을 검토하여 d-limonene이 간 cytochrome P450 효소와 GST활성을 증가시킴을 관찰하였고, sobrerol과의 구조활성 비교 연구로부터 d-limonene의 종양억제 효과는 해독화 효소 (GST)의 활성화 유도에 의하여 발암성 대사산물이 유전 및 그 밖의 조직으로 이동되는 것을 억제한다고 발표하였다. 그러나 cineole을 이용한 동물실험에서 d-limonene과 같은 항종양작용은 보고되지 않았다. 또한 생체내 항산화적 항암효과의 기전은 여러가지 요인에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다. 즉 항산화제로서 효과를 나타내기까지 장기간 발암물질과 공존해 있어야 하며, 발암물질과 항산화성 물질의 투여 시기 등의 영향으로 항산화제로서 직접적인 억제 효과를 얻기 어려울 수도 있을 것이다. 본 실험에서 얻은 바와 같이 cineole은 약 16~55%의 대사억제율을 보임으로써 d-limonene과 cineole 두 물질간의 BP대사에 미치는 영향에서는 큰차이를 발견할 수 없었다. Revertant bearing well수를 측정함으로써 얻은 두 약물의 BP에 의해 유발된 변이원성의 억제율의 차이는 2 μM~20 mM의 농도에서 d-limonene이 cineole에 비해 16-32%가량 더 효율적이었다. 이상의 결과는 기존에 보고된 항돌연변이원성 효과와 항암효과의 높은 상관성을 지지하는 결과로 생각된다.

지질과산화의 억제에 미치는 효과에서는 d-limonene이 cineole에 비하여 월등히 효율적으로 나타났다 (EC₅₀ 2 mM vs. 16 mM). 이같은 우수한 항산화효능이 d-limonene에만 있는 것으로 보고된 항암효과와도 깊은 관계가

있을 것으로 생각된다. 이들 화합물이 대사억제에 미치는 효과 및 항돌연변이효과는 S9 mix 효소활성의 변화에 관여함으로써 BP의 BPDE로의 전환을 방해할 수 있을 것으로 추측된다. Cytochrome P450 등 1차효소계의 활성화 기전이외에도 포합반응 등 다른 기전을 통하여 항암효과가 발현될 수도 있으므로 GST의 발현 등을 더욱 면밀히 고찰하는 것이 필요할 것으로 본다. Gould (1991)의 발표에 의하면 d-limonene이 GST의 발현을 유도증가시키는 것으로 보고되었는 바 이들 효소에 의한 해독화 작용이 항암효과에 기여할 수 있을 것으로 예측된다.

참고문헌

- Abraham, S.K., Mahajan, S. and Kesavan, P.C. (1986). Inhibitory effects of dietary vegetables on the in vivo clastogenicity of cyclophosphamide. *Mutat. Res.* **172**, 51-54.
- Austin, C.A., Shephard, E.A., Pike, S.F., Rabin, B.R. and Phillips, I.R. (1988). The effect of terpenoid compounds on cytochrome P-450 levels in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 2223-2229.
- Boland, D.J., Brophy, J.J. and House, A.P.N. (1991). *Eucalyptus Leaf Oils*. Inkata press, Melbourne, Sydney.
- Capdevila, J., Renneberg, R., Proug, R.A. and Estabrook, R.W. (1980). Multiple products of polycyclic hydrocarbon metabolism, Genetic and environmental factors in experimental and human cancer. (H.V. Gelboin Ed.), pp. 45. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo.
- Chadha, A. and Madyastha, K.M. (1984). Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. *Xenobiotica.* **14**, 365-374.
- Elegbede, J.A., Elson, C.E., Tanner, M.A., Qureshi, A. and Gould, M.N. (1986). Regression of rat primary mammary tumors following dietary d-limonene. *J. Natl. Cancer Inst.* **76**, 323-325.
- Elegbede, J.A., Maltzman, T.H., Verma, A.K., Tanner, M.A., Elson, C.E. and Gould, M.N. (1986). Mouse skin tumor promoting activity of orange peel oil and d-limonene. *Carcinogenesis.* **7**, 2047-2049.
- Elson, C.E., Mltzman, T.H., Boston, J.L., Tanner, M.A. and Gould, M.N. (1988). Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA induced rat mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis.* **9**, 331-332.
- Evans, D.L., Miller, D.M., Jacobsen, K.L. and Bush, P.B. (1987). Modulation of immuneresponses in mice by d-limonene. *J. Toxicol. Environ. Health.* **20**, 51-66.
- Flanam, W.G. and Lehman-McKeeman, L.D. (1991). The human relevance of the renal tumor-inducing potential of d-limonene in male rats: implications for risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* **13**, 70-86.
- Gatehouse, D.G. and Delow, G.F. (1979). The development of a "Microtitre R" fluctuation test for the detection of indirect mutagens, and its use in the evaluation of mixed enzyme induction of the liver. *Mutat. Res.* **60**, 239-252.
- Green, M.H.L., Muried, W.J. and Bridges, B.A. (1976). Use of simplified fluctuation test to detect low levels of muta-

- gens. *Mutat. Res.* **38**, 33-42.
- Gould, M.N. (1991). Chemoprevention and treatment of experimental mammarycancers by limonene. *Proceedings of the American Association for Cancer Research.* **32**, 474-475.
- Harborne, J.B. (1984). *Phytochemical Method*, 2nd ed., Chapman and hall, London.
- Hochstein, P. and Atallah, A.S. (1988). The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mutat. Res.* **202**, 363-375.
- Mcneil, J.M. and Wills, E.D. (1985). Formation of mutagenic products of benzo(a)pyrene mediated by lipid peroxidation. *Life Chemistry Reports.* **3**, 150-153.
- Jori, A., Bianchetti, A. and Porestini, P.E. (1969). Effect of essential oils on drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **18**, 2081-2085.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173-215.
- Mehta, R.G. and Moon, R.C. (1991). Characterization of effective chemopreventive agents in mammary gland in vitro using an initiation-promotion protocol. *Anticancer Res.* **11**, 593-596.
- Ong, T., Whong, W.Z., Stewart, J.D. and Brockman, H.E. (1986). Chlorophylli: A potent Antimutagen against environmental and dietary complex mixture. *Mutat. Res.* **173**, 111-115.
- Rahimtula, A.D. and O'Brien, P.J. (1974). Hydroperoxide catalyzed liver microsomal aromatic hydroxylation reactions involving cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 440-447.
- Russin, W.A., Hoesly, J.D., Elson, C.E., Tanner, M.A. and Gould, M.N. (1989). Inhibition of rat mammary carcinogenesis by monoterpenoid. *Carcinogenesis.* **10**, 2161-2164.
- Sakai, Y., Nagas, H., Ose, Y., Kito, H., Sato, T., Kawai, M. and Mizuno, M. (1990). Inhibitory action of peony root extract on the mutagenicity of benzo(a)pyrene. *Mutat. Res.* **244**, 129-134.
- Vaca, C.E., Wilhelm, J. and Harms-Ringdahl, M. (1988). Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review, *Mutat. Res.* **195**, 137-149.
- Watabe, T., Hiratsuka, A., Isobe, M. and Ozawa, N. (1980). Metabolism of d-limoneneby hepatic microsomes to non-mutagenic epoxides toward *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1068-1071.
- Wattenberg, L.W. (1972). Inhibition of carcinogenic and toxic effects of polyclic hydrocarbons by phenolic antioxidants and ethoxyquin. *J. Natl. Cancer Inst.* **48**, 1425-1430.