ƒ ‹ F | Œ fi a ‹ ˙ ' e › ß • | , §U−M^D‹ ª¤s ›p eƒ¤"G

¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡ ¡
¡ ¡@ ¡@ ¡@ ¡@ ¡@ ¡@ ¡@ ¡@ ¡@ ¡@ ¡@ ¡@ ¡@¡@¡@

« ¤¥

§ > „Œ¥ « e · ¿ · œ , ¥¤ · ¤ª(phenolic structure)" " / ƒX¡"¥ „fiæ / ˘ £ / O " " § fi æ / ˘ ¿†¡ CM«¤ª¤¥(tannic acid / ¿¥ƒ"¥ Ñ´"«" † { ¥« ƒn " § Xanthine / Xanthine oxidase ' ·¥"ƒ ¥ (Superoxide anion)¡C¤ / /¡A Pyrogallol < O ‡ „ »"¥ Ñ´"«¡A¤ ƒ‡ƒ ¯Øfi æ ˘ /†¿Bfiæƒ ¥ † M £ " ¥fI ø¤«C ƒ¤« ¡ °"<ª ¤«¥Xtrihydroxyl benzene ¥ifl < Ofi æ˘ > / ˘' ‡¥ ¶•¡C¥H / § , ~ ‰ F˜"«5-Fluorouracil ƒb†Bfiæƒ ¥ "" „ / ¡U¥i > §C¤ ' ‡ ƒ¤„ DNA » P fl‰Ł¥ / j / /"l«‰Ł"¶ fi¡Cƒ «Æ¡A§ > – N – "Qc‡y> ¤ ƒbortho- ' ¿para-dihydroxybenzyl group " " fæ / ˘ > ¤ ƒ ¡Cƒ] ƒ „ ¥‰¥H-catechol- (ortho-) estrogen < ¥D¡A– ·Q¤ ƒ¤cƒbfi æ / ˘ £ / Ø"ƒ ¥ †£¥˝' ¿ƒ ¥ –¡ £ ‹ '¡°C

Estrogen / ¿ ¤ Ñ´˝«Catechol-estrogen

Estrogen ƒ b / H ¯ Ø " " ¥ D > n ¤ ‰†(graafian follicles)¡wB ¯Ø(corpus luteum) / ¿ Ł‰(placenta)¡Cƒb¥ ˝ ‡ / W¥ Ñ ¥ D n<‰ – – ¥ ˝ "¤¶†ƒ / ¿¤ '—"" ¥ ˝ " ‡o¤¡A ¤ ^ « P ¶ ‡ ƒ˝ / W‰ / ¿ l fi c ¥•"ƒ ‹ Y¡ C £ / F / ¥˝¡' ‰tS¥~ estrogen ƒ ¤ / / ƒ A`(o¥ ˆcontraceptice drugs)' ¿estrogen replacement therapy / w ‡ Qs"¤ ¥ ¿¡Cestrogen "¥ N ˘ ¥S‡t oxidative metabolism(hydroxylation < ¥D >n)¡Bglucuronidation¡Bsulfonation / ¿o-methylation¡A¥ D nƒb x ƒ" cytochrome P450 ¶ ° / ˘ U / ¡˘C2‡hydroxyestrogen¡B4-hydroxyestrogeng < Oestrogen "" hydroxylation ¥D† £«¡C

Estrogen ƒb > Pøflg¥˝""¤ ƒ / W¥ i ˘¥receptor-mediated processes ¥ h ¤¿E ... W˝¡A' ¿†£¥˝ electrophilic species »P DNA ƒ @ » ø ` † cancer(Nandi, S., 1995)(Liehr, J. G., 1990)(Dwivedy, I., 1992)¡C..—" " † ´ / ¿† >Mƒb' "Ł.. ¯ S " estrogen "–¡p / U• ¦£ "breast cancer "" ¥˝†v(Bernstein, L., 1993) ¡A ¤

estrodiol ¥ i ¥ H ¤ ° ¿ E ø † › M " " ... W ¥ ¤ ^ ¡ · A ƒ ¢ f ¤ d i o l " W ¥ N ` ´ £ " ‰ ' fi ˜ " § (Preston, M. S., 1990)(Paquette, B., 1996)¡ C ¤ ƒ 4-hydroxy-estrodiol ƒ b › „ « · ¯ ƒ ~ ‰ Œ ... 0 « « ¡ ™ " U › P œ ¡ ' ° " « (Li, J. J.,1987) (Liehr, J. G.,1986)¡ A ƒ < 2-hydroxyestrodiol ¥ H ´ ¸ 2-hydroxy estrone fl ¥ F › P œ ¡ ' ° ¡ Æ ifl ƒ] < 4-hydroxyestrodiol ´ æ _ ¤ ƒ ‡ § ƒ n " " O-methylation " " ¥ N ´ ‡ t v (Li, S. A., 1989) (Roy. D., 1990)¡ Af 4-hydroxyestrodiol ´ ¶ hydroquinoe ´ ¸ quinone ´ ¶ § ¡ " " fi æ ¾ ` › ‡ † £ ¥ ˝ ƒ ¥ ¡ A ^ " ‰ – ' ¸ ¶ – D ‡ N Af ¤ ¶ ¸ (Liehr, J. G., 1999)¡ C

Estrogen ƒ b § ƒ ~ · ` Æ " " ´ k „ ¾ ´ ƒ ¥ ‡ ' œ ª " " ´ ƒ " « Œ ™ " G ¡ A y ƒ fl " " ´ W ^ – ƒ fl P « ¥ ¤ E ¥ trogen « Æ „ ´ ƒ " fl e fl f ƒ " ' † v " " · ´ ¡ Af b § ƒ ~ · ` Æ " " ´ k estrogen ¤ ¥ ¸ „ fl ° ƒ ' ° ´ ¯ ƒ fl f ´ ¸ « a " < ° fl e fl f " " ƒ " ' ¡ A ¯ ª † { ¥ X ƒ ‡ 50 ¢ M " " · ´ ¡ C a

Mestrogen „ ' ´ ƒ " « Œ " „ @ Œ » ¤ ¤ ´ £ † M ¡ ¡ A estrogen „ fl ¢ F ¥ " " § ¯ ' M § fi æ ˘ < ¡ ' ° ¥ ´ ƒ b † Æ ‡ Q ¥ X ¤ ^ – · Q ¡ Œ Estrogen ' ¯ ¸ g « Æ ´ k ˘ ‡ ¥ Q ´ W { ¥ i › § C LDL " " › ¨ ¤ ^ ´ " HDL " " ¿ @ ¡ A ƒ fi ‡ \ ƒ h ª ¤ ª ¥ ¡ A fi æ ˘ « < § C – K fl ¢ F ¥ (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)" " † ¿ n ƒ b " < ° fl w ´ ˘ " " ƒ ¤ ƒ] § Œ " ¤ « › n ¤ ƒ ¡ A LDL " " fi æ ˘ ¥ D › n o ¥ ˝ ' " → ` f Œ ‰ Ł ´ ¸ fl ¢ F ¥ fi ´ " " ` x T ´ Œ § fl ‰ Ł ¥ Ifi æ ˘ ´ ˘ ‡ ¡ A ‡ Q fi æ ˘ " " LDL ¡ A] < Apo-B ´ ´ " " ´ i » (Lysine) ´ ¸ † fi » ˜ (Histidine) ¥ ¥ ¿ q † i » ˜ ‡ Q fi æ ˘ ƒ › P ¥ ¿ q ¸ † · ´ ¡ A ‡ Q fi æ ˘ " " LDL ´ £ ƒ b « LDL ¤ ¯ Ø (Receptor) ¿ ® { ƒ ‡ Q ł < ¥ ~ ¤ " « ¡ A] ƒ „ fi ' ‡ Q ¥ ¤ ‰ † › M (Macrophage) §] ‰ ¡ Æ H › P § ¸ ƒ ¤ " Ẅ j † › M (Foam cell)¡ A ‡ « Æ ƒ] † › M ´ ˜ ' æ j ¶ Œ ł ´ ¸ ox- LDL ¡ Af ƒ ¤ fl " · ‡ (Fatty streak)¡ A « ƒ › · ` " < ° fl w ´ ˘ § † { ¶ H ¡ C ƒ < ¤ s « ¥ X „ ' « a " < ° fl e fl f " " ... v T ¶ fl · ´ 25 ¢ M ƒ 50 ¢ M ¡ C ƒ Estrogen ƒ b ´ ˘ · " c ´ W (^ " c phenolic structure)¥ i ' M " ˜ ´ ˘ ‡ ¡ A fi ‰ ´ @ H + › ´ l § ¸ ƒ ¤ ^ ƒ ¥ ¡ A] ƒ „ estrogen " " ƒ ¥ † M ffl ´ O " " ... v T ¥ ifl ¥ ‰ – – „ Ifi æ ˘ ¶ if " " ƒ › · ` ¡ C ƒ ‡ « ¤ s « ¥ X estrodiol ƒ b LDL „ Ifi æ ˘ ' M £ \- tocopherol ¡ B ]-carotene ´ æ , ß ¡ A ‡ § ƒ n " " § fi æ ˘ fl ´ O (Stacey, A., 1996, 1998)¡ C ‡ o ' ¸ ‡ \ ¥ ¥ H , ˜ ¯ ¸ g « Æ ´ E strogen " " ´ ' „ ´ ƒ " ™ " « O @ fi " G ¡ A Estrogen „ ' ƒ ¥ † M £ ' § fi æ ˘ fl ´ O " " ¤ ` ´ £ † M ¡ ¡ Af ¥ B › n ´ • V " " ¥ h « ¤ s – · Q ¡ A] <

Estrogen ` M ¥ i ¥ H › § C ⁄ ƒ ″ fl e fl f ƒ⁄¡]O• | ·£ ‟¤¯ ø o¥˝‟″ƒM I

ƒ ¥ ' w, qP¥˝“«¶¸fi‘

ƒ ¥ (free radical)‹ O « ¥ ƒ ƒ b „ q ⁄ l › y ⁄W¤ª ƒ ‡⁄ £lƒ¤¸¡ C„q⁄l ƒ] ¤ ¥ b I ` ¡«DA–ø ƒ b 10^{-2}~10^{-9} ‹ §¶¡¡ A •¥⁄£^ ›w (Karnovsky, 1994) ¡C ƒb» fi æ † ›¡MA¥⁄Dn‟″ƒ ¥ ″ ^ ‹ ‹ ¡⁄ ° ⁄fiæ (Reactive oxygen species; ROS) ¡A§ Y x« ¥Hfi æ ‹ ⁄⁄ ‟″ƒ ¥ » P ¥ N ˘ †£ A« ¥ ¦A¡ G Ifiæ⁄ †B (H_2O_2) ¡ BW fiæƒ ¥ (¡E O_2^-) ¡B† Bfiæƒ ¥ (¡E OH) (Punchard and Kelly, 1996) ¡C‹ ¡ 'fiæ ⁄ l ¤ƒ ‡‟« ⁄ ˘ ‡fl¡ A¥ O§ »¥˝‟«¯ Ø ″¥¤ ⁄l‟«‰Ł¡ Aƒp DNA¡ BRNA¡ B‡ ¥ ‰Ł¡ B fl ‰Ł¡ B` ^ »P» ^ fl ¡¥A‡yƒ¤† ›M' ¸† ´ ·‟″¶ fi ¡Aƒ › Y L‟¸kI‡›z · _' ¸› « s ƒX¤ ¤ « · ƒ„¶A¸fiN oƒ ⁄˘¡ Bfl flƒ¡ B øfl g¥ ¥˝ (Fig. 1) (Poli et al., 1993) ¡C

‹ ¡ 'fiæ ⁄l§ »DNA¡ A¥ ifl ‡yƒ ¤ Æ I (purine) ⁄ ¸ Æ (pyrimidine) ˘P ⁄˘ ˙› „¢ (Dizaroglu, 1991 ¡F Shigenaga, & Ames, 1991) ¡A DNA ‡ ‟ ' ¸´ ø ‟´_ ı¡ B DNA »P DNA ‹ ⁄ ‡s¡ B¥H⁄ ¸ DNA »P F æ‟″‡ ¥ ‰Ł⁄ ⁄l‹ ⁄ ‡s¡ C¤ ƒp: ‡ ` TÆ I (guanine)¤ ¤ ¡E OH § »¡ A• |§ ¸ƒ¤ 8-hydroxyguanine (8-OHdG) ¡A¶ iƒ ... v̄T DNA ‰ »s⁄ ¡A G ¡ T ¿ ø » ,t (Cheng et al., 1992) ¡C DNA ″c‟″§ ¯ ¡A ‡yƒ¤‹ ¯ (Kunchino, Y., 1987; Shibutani, S., 1991) (Cheng,K.C, 1992) ¡A ˘ƒ ‡yƒ¤ † ›M› ⁄ ` (apoptosis) (Buttke, 1994) ¡B' ¸ ø⁄˘ ¥ (Satoh, 1998; Peterhans, 1997; Umezawa,1997) ¡C

‹ ¡ 'fiæ ⁄l⁄] | • lfi ` ‡ ¥‰Ł¡ A´ ¥ i » ˜ ...^‟″fiæ⁄˘› „¢§ ¥ ¸¡ B‹ ¡ 'fiæyƒ¤ peptide ´ _ı¡ B' ¸»Pfl ‰Ł⁄ ¸″ ⁄ ⁄˘ƒX‟«fiæ⁄ ˘ ƒ‟« ˘ ‡ ¥¡ A‡yƒ¤‡ ¥ ‰Łfiæ⁄˘⁄ ¸ ⁄˘ (carbonylation) ¡F ]ƒ ¤˘‡ ¥ ‰Ł‹ ⁄‹` p † (cross linkage) ¡B⁄ , ¡B ' ° (denature) ƒ ¥ ¥h‹ ¦ ° (Buttke, 1994) ¡C† ›M‰⁄‟″† ƒ¤»P¥˝† z ‹‟″A Ð ` ›«›n¡ A^ ¥ † ›M‰⁄ ‹ ^ » fl »P† ›M‟ ›–¤ ¯Ø (receptor) ‟″§ ¸ƒ¤¡ A »P⁄ G fl ¯ T‰ B¶ ›M¶ ˙ ¤t¡ C¸ ƒ ‹ ¡ 'fiæ ⁄l• | 'M† ›M‰⁄⁄W‟″ƒ h,⁄£„ ¦Mfl ‟ »˜ (Polyunsaturated fatty acid;

PUFA) ⁄ ˘ ‡ † £ ¥ ˝ fl‰Ł(lipid peroxidation)¡ A ƒ § ƒƒ‰Łƒ ¥ ¡Afl ‰Łƒ

¥ »fP æ ⁄ ˘‡ƒ¥„ L fiæ⁄ƒ ¥ (peroxyl radicals; ROO¡E) »P„ L fiæ⁄†B

(hydrogen peroxide)¡Eƒ „ L fiæ⁄ƒ ¥ ¥ i ¥ H ƒ A ¥ h § »ƒfh⁄", »ƒ(PUFA)¡A

ƒ ‡yƒ¤‡ ŚŒ⁄ ˘‡¡Aƒ„⁄ ˘‡‡ †"†"£" « ‹ ⁄⁄(malonyldialdehyde; MDA) ¥fl

‰ Ł „ fiæ"‹& ƒfi" " ˙^ ¡A¶iƒ › P ‰M ‡ q ‡ z ' ° § ¯ ¦ †»P‡M"M ›–¤ ¯Ø

‰ ⁄ † X ›¡ §C• l fi ` † ›(Barber and Bernheim, 1967)¡Cfl ‰ Ł„L"ikæ ‡ |»P¯Ø

⁄"""‡ ¥ ‰Ł¡ B »fl¡ fi »˜§ ¥ ¡A‡yƒ¤† › M ¡'A˚ ˘ƒ ‡yƒ¤† ›Mƒ " '(Shimasaki et

al., 1995) ¡C

‹ ª ¤ s ⁄ˆfiæƒŒ ¥ ¥i› P † ›M¶ ¸l (cell injury) »P† ›Mƒ " ' (cell death)⁄§

‰ ,'"¡A¤ ⁄£¶ ¨»Pƒ ⁄ „L {(aging process)ƒ‡ˆ ¡A¤ ˆ ‰–' ¸¶ ¡ –ƒ»P‡\ƒhfl e fl‹

ˆ (Fig 2)¡A¥] § t fl ° ƒ«(Ischemia reperfusion)¡B fl¤(Knight, 1995)¡Bˆ › •ª

' °ˆ , "'¢(Chapman, M. L., 1989)¡B" · fi fl¤(Smith, C. D., 1991)¡B(Gladstone, I.

M., 1994)¡B' ‹ ¸⁄fl¤(Yoritaka, A;,1996)¡B ° fl "‹ ˘(Uchida,K., 1994)¡C

† B fi æƒ¥

‹ ¡' °fiæ⁄ ⁄l(ROS)⁄⁄¡A¥H†Bfiæƒ ¥ ¤ªƒ‡,ß¤ ¥L‹ ¡' °fiæ⁄ ⁄l ""⁄ ˘‡' °¡A¤ˆ

‹ ⁄"¥˝' °fi æ˘ £O""¥ D › ¤ •(Jean. C., 1999)¡Cƒ b fiæ† ›M""¥ N´„L {⁄⁄¡A¶Wfiæ

ƒ ¥ (¡EO$_2^-$) »P„ L fiæ⁄†B (H_2O_2)¥˝ƒ¤¡Q„Lƒh""¥˝ƒ¤• | Bƒ‡ ¯Ø⁄"‡ " ⁄ ¸´ø

" DNA ´ _ı' ¸› „¢DNA ˘P ¡A¶iƒ ‡yƒ¤DNA •l¶¸¡C¶Wfiæƒ ¥ „»PL fiæ⁄†B

‹ ¥ifl Bƒ‡ ¯Ø‹ ¯ ' ¸ ø⁄˘¡Cƒbƒ‡ ¯Ø⁄"¡A¶Wfiæƒ ¥ „»PL fiæ⁄†B""‹ r' °¤ ƒ

' ¤ ,g¥ ¯ K ⁄l""¶°⁄˘¯ ƒ¤ "« ⁄ ˘‡' °†Bfiæƒ ¥ (Miral, 1991)¡C

¯K‹ ƒs' ⁄H¯Ø⁄"ƒ Ü „L· " ˜ ⁄,fl ⁄⁄‡ ƒh""⁄ @ ¡ A¤ƒ ~ H¤¯Ø⁄⁄¯K""¥ §¡§t

¶q‹ 4-5 §J (Wriggleworth, 1980)¡Cƒb1894 ƒ~¡AFenton ¥⁄H· ¥X¯ K ⁄l»P„ L fiæ⁄˘

†B⁄ ˘‡«Æ• |† ¥˝ƒ ¥ ¡A⁄ ¥X¯ K ⁄l""fi æ˘` › fl ⁄O»Pƒ Ü ‹ ¡' °fiæ⁄ ⁄l† ¥˝ƒ‡«D

– ` K⁄""^ «Y¡]Fenton, 1894¡¡ˆCƒ «Æ ϕ{†Bfiæƒ ¥ (¡EOH) ‹ ƒ„⁄ ˘‡⁄⁄¤ª–j

fi æ ⁄ ˘ fl ⊘"'(Haber, 1934)¡ A ƒƒ ¥XFenton reaction (Eq. 1)¡C

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + ¡EOH \qquad \text{(Eq. 1)}$$

Gutteridge »P Bannister ϕ{ Fe^{3+}-EDTA »P H_2O_2 § ¥ ¸¡A• | † ¥˝fiæƒ ¥ (¡E OH)¡C (Eq 2, 3, 4, 5) (Okezie I. Aruoma, , 1989)¡C

$$Fe^{3+}\text{- EDTA} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{2+}\text{- EDTA} + 2H^+ + O_2^- \qquad \text{(Eq.2)}$$

$$Fe^{3+}\text{- EDTA} + O_2^- \longrightarrow Fe^{2+}\text{- EDTA} + O_2 \qquad \text{(Eq. 3)}$$

$$Fe^{2+}\text{- EDTA} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+}\text{- EDTA} + ¡EOH + OH^- \qquad \text{(Eq. 4)}$$

` ` ⁄ ˘ ‡ƒ¡<

$$Fe^{3+} + 2H_2O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + ¡EOH + H^+ + H_2O + O_2 \qquad \text{(Eq. 5)}$$

„ ¥h"'< ª ¤ ⁄¡Aƒ „ " „ L · " »Pfiæ„fl ¯ S ƒ ¥œ¡•A¥⁄¥i† ¥˝§tfiæƒ ¥ ¡A‡ y ƒ¥fiæfi ` fi »'˝ _ı (Ehrenfled, 1987; Tan, 1992; Stubb, 1987)¡C Mƒ ¡A ¶Wfiæƒ ¥ (¡EO_2^-) • |¶ °⁄ ˘¡EO_2^-† ¥˝ OH^-¡A« P ¤fl‰Ł„Ifi æ˘ (lipid peroxidation) (Floyd , 1990)¡C

,v¡B < ª ¤ s ¥ "»P/Ł w

†Bfiæƒ ¥ ¤ ª ƒ ‡"« ˘ ‡fl ⁄O¡A¥i§ »¥˝"«¯ Ø"' ‰Ł¡A‡ y¤† > M¸† ´·"'¶ fi ˙⁄¡C G†Bfiæƒ ¥ "'† ¥˝⁄ ƒsƒb¡A¤˘ „¯– o ⁄ ƒw¡'¥ ¥˝"« „ ⁄⁄"' ⁄ j ⁄ p ⁄⁄¥ifl£ƒ¤< ƒ ¥ § »"'¥ …¬¡C⁄ j ⁄ ⁄ Ip‰‡Ł¡¥fl ‰Ł¡B` ^ ¡Bfi »˜‡£ ƒ ƒ¯ ' ° ¸<¡A¯ p ⁄ ⁄ l†•"|¤«h ¤ > ¡„Cƒ]ƒ„¥ » ‰ g ‰ ⁄ †Bfiæƒ ¥ >P Estrogen "' † " c §¯¥˝⁄§⁄ " R ¸⁄ EstProgen ƒb † C⁄W⁄ £ P¤fi æ˘` >¤⁄ ƒ ⁄ WMƒ £ ¥ fl ⊘"ƒ' t §'¡°C

§ fi ˘ Ƥ/Ł“k

ˆ ˜«~

Estrone (E1)¡ BÂ-estradiol(E2)¡ B2-hydroxyestrodiol(2oh-E2)¡ B4-hydroxyestrodiol (4oh- E2)¡ B4-hydroxyestrone(4oh-E1)¡ BFerrous Sulfate¡ Blinoleic acid¡ BTrizma-HCl¡ B potassium chloride¡ Bsarkosyl¡ Bthiobarbituric acid¡ Bbutanol¡ BAmpicillin¡ B phenol/$CHCl_3$¡ BIsopopanol ` ° ¶ƒ Sigma ⁄ ‰ ¥¡ Q Hydrogen Peroxide ` ° ¶ƒfi qY (Shimakyu) ⁄ ‰ ¥¡ pBR322 ‰ Ł ¯ Øg¥ QIAGEN Plasmid Maxi Kit fl ´ ⁄ ƒ ¡ C

‡ ¡ B¥ h fi æfi ` fi›˜“”¶¸fi‘

pBR322 “ ” ‰Ł Ø´ «‹

¤œ5µl plasmid DNA »P 100 µl competent cell † V ƒ X « Æ ' ƒB⁄W R,m 30 ⁄ ˜`¡ A ƒ A 37¢ J ¶ 2 ⁄ ˜`¡ CM« Æ ' ƒ BW5R,m̃`¡ C¤ œ ƒ „ †G¶ ' ' §t Ampicillin “ ” i⁄W¡ A' 37¢J„ ƒ] i«Æ¡ A˘ [„ ƒ ‡L´ fi«Ł ¥ ƒ¤ (Sambrook, 1989)¡ C

‰ŁØ DNA “ ” • L ¶»s‡˘

‹ Dœ Ampicillin plate ⁄ W ⁄ § ‡ ⁄@ (pBR322 transfected cell)¡ A 3 ml LB medium (§t 40µg/ml Ampicillin) ⁄⁄¡ A „ j '] ¡ A«Æ' 15 ml ´ ⁄”⁄⁄¡ A´ ⁄ 3,000 rpm 10 ⁄ ˜`¡ A¥ h ⁄ W¶M¡ A G N ¤ I “«⁄m 1.5 ml • ¶q´ ⁄”⁄⁄¡ A¤C” ¥ [ ⁄ ƒB 100µl solution I¡ A 200µl solution II¡ A • fi †V ƒ X § ¡ ˆ¡ «A ¥ [ ƒ B 150µl solution III¡ A » · • L fi ¶ • n ¤ •» A G⁄ ¶M«Æ ⁄W 10 ⁄ ˜`¡ A 4¢J ´ ⁄ 12,000 rpm 10 ⁄ ˜`¡ A N⁄W¶M¶G § ƒ 1.5 ml • L¶q´ ⁄ ” ⁄⁄¡ A¥ ƒ J2 › ¿ Ø¿n 20¢J · „ s¡ A 70¢J ⁄⁄¤ I 15 ⁄ ˜`¡ A 4¢J ´ ⁄ 12,000 rpm 10 ⁄ ˜`¡ A¥h⁄W¶M¶ «Æ¡ A N DNA › •fi¡ A¥H 100µl ´ ⁄ ł N DNA • ¥X¡ A ¥ [ ⁄ J ¥¯ Ø phenol/$CHCl_3$ (1:1)¡ A¿ E fl P _œ5V ƒ X`¡ A« • ¯´ ⁄ 12,000 rpm 10 ⁄ ˜`¡ A¤ œ ⁄ W¶M¡ A ƒb¥ [⁄ J ¥Ø phenol/ $CHCl_3$

(1:1)¡ A ¿ E fl P _ ¢ ¥ ƒ X¡ A« • ¯´ ⁄ 12,000 rpm 10 ⁄ ˜`¡ A¤ œ ⁄ WM¡ A G ƒ b ¥ ⁄ 2 › ¿ Ø¿ n-20¢J · „ s¡ A 20¢J ⁄ ⁄ ¤ I „ ¡ A ƒ A¢J´ ⁄ 12,000 rpm 10 ⁄ ˜`¡ A¥ h ⁄ W M ¡ « Æ¡ A-N DNA › • fi¡ A¥ H 100 µl TE buffer pH 8.0¢J • » § ¡ A æ, -20 ƒ B ‰ c « Ø s¡ ¯ C ¥ ¸

‰ ŁØ DNA “ ” / j ¶ » s ‡ ˘

‹ Ð œ Ampicillin plate ⁄ W ⁄ § ‡ ⁄ @ (pBR322 transfected cell)¡ A 5 ml LB medium (§ t 40µg/ml Ampicillin) ⁄ ⁄ ¡ A „ j '] ¡ A « 100µl ƒ 250ml LB medium (§ t 40µg/ml Ampicillin)¡ A 37¢ J 12 ⁄ p fi « Æ A 4 ¢J´ ⁄ 3,000rpm 15 ⁄ ˜`¡ C ¤ œ ¤ † ¤ H 10ml Buffer P1¡ A ¥ [ ⁄ J 10ml Buffer P2¡ A ¥ B n fi 5 ƒ, « Æ' æ , ¤ ˙ 5 ¯ ⁄ ˜`¡ A ¥ [⁄ J 10ml Buffer P3¡ A • fi 5 ƒ ¡ æ ƒ B ⁄ W 20 ⁄ `Ø¡ C´ ⁄ 12,000 rpm 4¢J 30 ⁄ ˜`¡ A¤ œ W † MG¡ A ƒ A ƒ, ´ ⁄ 12,000 rpm 4¢J 15 ⁄ ˜`¡ C QIAGEN-tip ¥ ¥ H Buffer QBT ¥ ¿ ¯ « Æ¡ A ¥ [ ⁄ J § t ‰ ¯ Ø DNA “” ⁄ W † MG¡ A ¥ H Buffer QC 30ml ¤ R~ QIAGEN-tip ¤ ƒ, ¡ A ƒ A ¥ H 15ml Buffer QF ¤ R~ ¥ X ‰ ŁØ DNA ¡ C ƒ „ » † G ¥ ⁄ W 10.5ml Isopopanol † ¥ X § ¡ ˆ « Æ¡ A´ ⁄ 12,000 rpm 4¢J 30 ⁄ ˜`¡ A ¥ h ⁄ W † MG « Æ¡ A-N DNA › • fi¡ A ¥ H 1.5ml TE buffer pH 8.0¢J • » ⁄ § ¡ A' æ, -20 ƒ B ‰ c « O ƒ ‡ ¡ ˘ G ¥ ¸

¥ h fi æ fi fi ˜ “ ¶ ¸ fi‘

¤ œ 2µl fl ´ ⁄ ˘ „ L “ ¶ W pBR322 DNA¡ A ⁄ § O ¥ H £ ¥ ¯ ¿ @ « « » P ¯ K “ ˜ ´ H2O P¡ A¤ ƒ b 37¢J incubator ⁄ ˘ ‡ 30 ⁄ ˜ « Æ¡ A¤ œ 20µl ¥ ⁄ J 2 µl “ ” „ q “ « ¡ ¥ H 1% “” ˆ £ fl ‰ ƒ pBR322 DNA (100ng)“” ´ « « ‹ ƒ ¡ (Fig. 7)¡ C

¶ L¡ B § fi æ / ˘ ¡ ' ° · œ,

fi 1991 ƒ~Tamura ¥ ⁄ H ‟ ⁄¡ŁA'k§Q¥ĘFenton reaction (Fe^{2+}/H_2O_2)fi æ˘ linoleic acid¡C¥ H ⁄ £ Ff¿℃‟« œ ' w ... «~ŀinoleic acid (1.5mg/L)¡B50mM Trizma-HCl/150 mM potassium chloride buffer (pH 7.4)¡B0.2% sarkosyl¡B200µM Ferrous sulfate¡Bl00µM hydrogen peroxide ¥ H ⁄ ¸ ¥ h ´⁄40µlƒ℃ ” »†GC ƒ „ † V ¥X"«'æ,m ' 37¢J"‟fl M &⁄'76 ⁄ fi¡G ⁄F⁄ " Ffiæ›‟ «¡A‹ fi 1979 ƒ~Ohkawa ¥ H' †¬¡Æ§ ¥¸thiobarbituric acid (TBA)⁄ "R⁄ Ł‰G¬Nƒ„« ·œ† V ƒ ¥X»(40µl)† ¥X40µl 8% sarkosyl¡B300 µl 1M acetate buffer (pH 5.0)¥ H¸300 µl 0.67% TBA¡ A ƒ b – N ¤'æ,m' 90¢J 60 ⁄ ˜`¡Gfb• » † G • ¯ « ›ƒ¡A«‹ł•J1«dŁ„ ¦M†G"‹ butanol • »G† ¥X«Æ¡A ´ ⁄ 3000 ´ 10 ⁄ ˜`¡A¤œbutanol ⁄ W ... ŁH⁄¥ Ł«‹ › p ‟"‰32nm · ‰l¥œ›¨ (Toshihiko O, 1992)¡C

†G

/@B¥ h fi æfi ` fi ˜»´_ ı“”/ “R

(⁄@) Fenton Reaction ' / ¥ h fi æfi ` fi »˜ †”c«‹ƒ¡“”§ ¯

˘ Ł„ Fenton Reaction „ ' ¥ h fi æ fi ` fi»¡˜A‡¥ntonS¶¸fi' Reaction " " ⁄ ˘ † ¥ ¥Hfiæf¥´†¥B¡Aƒ †Bfiæf ¥ • | Š »¶W`†– ‰Ł¯Ø DNA¡A• ¶ W ` † –‰ĐNZA ¤ ¤ ¶ fi¸Yfi ¡ A ¥ h fi æ fi`«fi »˜ı •‹| ¥¶W ` † «‹(super coiled)¡A´ ¯ ƒ¤¶ } ' æ Š (open circular)¡ B ‰^«‹(linear)¡B ‹ ˘ ƒ ' ⁄ø‹(fragmentation)¡C¥ „g¥ ¥ ƒ †B¥fn fi æ fi ` fi ª»¥ ¥X¤ ¤ ª ƒ ¥D‟Yh –a (band)‹ ` † «‹ (super coiled) (from I)¡Aƒ›n"‟ –a‹ ¤ ƒ†† " fl°⁄(nick) "‟¶ } ' æ Š (nicked open circular) (from II)¡A¤Sƒ† " ‰ «‹(linear) DNA (from III)¡CŠ › ¿ %¥Ł¸ØpBR322 (100ng) ¥ ł‡W0.35 % $H_2O_2$ ¥H⁄ ¸ ⁄ £ Ff¿℃‟« K ´ ±¤37ƒbJ ⁄ ˘†30 ⁄ ˜ ‹Æ¡A˘ Ł„ ¤ ¥ fiæ fi ` fi «›ˇ ƒ ı ¥‹Q o ł H K ´⁄"1"¿ @ ...W¥[¡ A ¥ h fi æ fi`"‟fi« »˜¡ ⁄ ¥‹• | ¥ W`‹«¡A´ ¯ ƒ¤¶ } ' æ Š ¡ B‰^«‹¡A‹ ƒ ƒb¤¨¯ K ´ ±¿@«

‹ 40μM fi ¡ A ¥ h fi æ fi ` fi»¡˜C ‹ø‹ q‹F fl ¤ ˇ ¤«Œ™„Œ¡¯[„¥i

¤ ¶ W ` ‡ ‰DNAØƒbFenton Reaction ™”‹ ˇ ‡‹¡U A ¥ h fi æ fi`«fi »ƒ˜

¯ ™”‹ ¥ ‹ – ¡ Š ¸ ¡ ©GŠFenton Reaction ™”‹ ˇ‡™ ‹”p× 0.35% H_2O_2

»P40μM ™ ” ¤ ¨ ¯ K ´ ‹ l ¿ @ « ©ƒ¡bÆ„¥ˇi ‡™{ ”„A‹U¤ ¶ W‡– ««‹¥hfiæfi

` fi»¡˜A ´ ¯ ƒ ¤ ¶ '¡æŠ¸" ‰™¡«B ‹ ˇ ƒ '‹ø(fragmentation) (Fig.

1)¡C

(/G) ¯ K ´ / l „ ¥ h fi æfi ` fi ˜»‡yƒ¤ †”c«‹ƒ¡/§§ ¯

„ L ¥ h ‹ ª ¤ s ‹ ‹ ™ ¥ ¯ K ´ ‹ l ‡ W¡ƒsÆƒb¥©G‡£¥˝‹l¶¤™”ƒ ¥

¤ › ™ƒsƒ b ¥ • | ‡ y ƒ ¤ ¥ h fi æ fi ` ¡fiA»˜«H ƒ¡™”¤ ¨¯¯ K ´‹l¿@« ™”‹W

‹ ¡Aƒb‹ ˇ‡37¢J/30 ‹ ˜«Æ A ¥ h fi æ fi ` fi »¥™”¡«Æ ƒ¡W ‡–« ‹

¯ ƒ¤¶ } ' æ Š (Fig. 2)¡C

(/T) Estrone »Pâ-estradiol ƒ b † B fi æƒ ¥ “¡” ™¡/U§C‡ B fi æƒ¥„

¥ h fi æfi » ˜ ™´_ ı

ƒ b „ L ¥ h ™ ‹”ª¡Æ«Estrone ™X »Pâ-estradiol ƒbŠ C – K « fl (‡LDL)

„Ifi æ ‹ ˇ „ Œ ¯‹-tocopherol ¥hŠ ¤ fl ‰Ł„Ifi æˇƒ ‡ ŠƒŸ”fi ™G¡ ŒG‹ ŠO˜ [

„ ƒb‹ £ Ł¿« ™” Estrone »Pâ-estradiol ¡A»P0.35% H_2O_2 ‹ ¸40μM ™ ” ¤ ¯K´

‹ l ¿ @ «‹37¢J/30 ‹ ˜ ` ‹”„A™U¥ i ˇ [ „ ¤ ¥ h fi æ ™”fi¡»Š˜¤˝ ¶ ¸fi`

' ‰'¡MC ¥ h fi æ fi`™”fi« »˜ƒ ‹ ¡æA‹ ø ‹ q ‹ ”¥¡·A¶‹ ¦æŠ ¸ ™‹» P ‰^««

... Wh¡AƒbEstrone »Pâ-estradiol ‹ 0.5£gM ¥ H « ¶Łƒ¿ @ «™.:W¥ [¡A¶ W ‡–««

‡ Q « O fl d ƒ¤Ferrous ion reaction ' £¥˝”†Bfiæƒ ¥ Š (Fig.3~6)¡C¤ †

™ G ª¥Estrone »Pâ-estradiol ¤ªƒ «O¯@¥ h fi æ fi ` ¡ÆŠK˜ ¤¤†Bfiæƒ ¥

™”Š »™”fl ‹O¡C

(¥|) Catecholestrogen § ¤ Fenton Reaction ' / _¥'h fi æfi » ˜_ ı

– ·QCatecholestrogen ‹ O § _ ¥ ¤ ª ƒ ‡ « O @¥¡A§æK ' ¤fi ¤»˜ †Bfiæƒ ¥ " " § »˜C"§ ⁄O» ¥ H £ƒ Catecholestrogen ¡G2-hydroxyestradiol¡B4-hydroxyestradiol ¡B4-hydroxyestrone »P 0.35 % H_2O_2 ⁄ ¸40μM " " ¯ K ´ ⁄ ¿@37¢J/30‡⁄ ˜ ` ‹"¡A⁄AU¥ h fi æ fi`"fi«‹»˜ ƒ ¡ ⁄¥‹ ‹ p‹⁄ ø ‹ q ⁄ ˘ · ⁄‹¡A¶ ¤S'ƒ‡ ¸"‹⁄] ‡"¥⁄ ¡Aƒ O¶W ` ‡ «‹‡ v " ¥W¥ ‡ Q ƒfl‹U¤ (Fig.7~12)¡C

⁄ æß Estrone (E1)¡Bâ-estradiol(E2)¡B2-hydroxyestrodiol(2oh-E2)¡B 4-hydroxyestrodiol (4oh- E2)¡B4-hydroxyestrone(4oh-E1)»P Fenton reaction ⁄ ˘‡37¢J/30 ⁄ ˜ ` « Æ " " ¶ W‡ DNA¡%L¯Ø† G¯3.0£gM â-estradiol(E2)»P Fenton reaction ⁄ ˘‡«Æ¡A¶ W ` ‡ – «‹ DNAØƒ‡100 ¢M"ƒ fld¡C Estrone (E1)' 3.0£gM ¿ @ «⁄»P Fenton reaction ⁄ ˘‡«Æ¡A ⁄ ƒ, "G¶¨ƒ‡50~60¢M" " ¶ W ` ‡ –«DNAØ fld¡C Catecholestrogen "2-hydroxyestrodiol (2oh-E2)¡B4-hydroxyestrodiol (4oh- E2)¡B4-hydroxy estrone(4oh-E1) ' 3.0£gM ¿ @ «⁄»P Fenton reaction ⁄ ˘‡«Æ¡A60~70 ¢M¶ W ` ‡ – «‹ DNAØƒ fld¡C G Estrone (E1)¡Bâ-estradiol(E2)¡B catechol estrogen ⁄ æß ¢{¡Aâ-estradiol(E2)§ ¤ Fenton reaction ' ƒ¥"'† fiæ ƒ ¥ ' "⁄"¥ h fi æ fi ` fi»"G‡_ƒ¡fiA catecholestrogen ƒ,⁄§¡A Estrone (E1)"fi˜"GƒAƒ,⁄§¡Cƒ Estrone (E1) H ¿ @ "... W[¡A§ ¤ fi˜ "G` %w¡Cƒ catecholestrogen ⁄⁄"4-hydroxyestrone(4oh-E1)⁄ ¦ H ¿ @ "... W[¡A§ ¤ fi˜"G` %w¡C

Reference

Ayres, S., Tang, M. and Subbiah, M. T. R. 17â-Estradiol as an antioxidant; some distinct features when compared with common fat-solube antioxidants. J. Lab. Clin. Med. 1996; 128:367-375

Ayres, S., Abplanalp, W., Liu, J. H. and Subbiah, M. T. R. Mechanisms involved in the protective effect of 17â-Estradiol on lipid peroxidation and DNA damage.

American Physiological Society, 26 Feb. 1998, E1002-E1008

Bao, T. Z. and Conney, A. H. Functional role of estrogen metabolism in target cells : revieq and perspectives. Carcinogenesis. Vol.19 nol.1 pp.1-27, 1998

Bradlow, H. L., Telang, N. T., Sepkovic, D. W. and Osborne, M. P. 2-Hydroxyestrone : the “good” estrogen. J. Endocrinology (1996) 150, S259-S265

Constantine, S. A. M., Deodutta, R. and Joachim, G. L. Concentration dependence of prooxidant and antioxidant properties of catecholestrogens. Archives of biochemistry and Biophysics. Vol. 360, No. 1 , December 1, pp. 105-112, 1998

Dubey, R. K., Gillespie, D. G., Jackson, E. K., Keller, P. J. 17â-Estradiol, its metabolites, amd Progesterone onhibit cardiac fibroblast growth. Hypertension. 1998;31(part2):522-528

Feigelson, H. S. and Henderson, B. E. Estrogen and breast cancer. Carcinogenesis vol.17 no.11 pp.2279-2284, 1996

Keaney, J. F., Shwarery, G. T., Nicolosi, R. J., Loscalzo, J., Foxall, T. L. and Vita, J. A. Lipids:17â-estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine

Liehr, J. G. 4-Hydroxylation of oestrogens as a marker for mammary tumours. Biochemical Society Transactions. vol. 27, 318-323, 1999

Mobley, J. A., Bhat, A. S. and Brueggemeier, R. W. Measurement of oxidative DNA damage by catecholestrogens and analogues in vitro. Chem. Res. Toxicol. 1999, 12, 270-277

Shwarery, G. T., Vita, J. A. and Keaney, J. F. Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17â-estradiol:Requirement for Estradiol Modification. Circulation. Vul.95(6), pp.1378-1385, 18 Mar,1997

Stack, D. W., Byun, J., Gross, M. L., Rogan, E. G. and Cavalieri, E. L. Molecular characteristics of catechol Estrogen Quinones in Reactions with Deoxyribonucleosides. Chem. Res. Toxicol. 1996,9, 851-859

Thibodeau, P. A. and Paquette, B. DNA damage induced by catecholestrogens in the presence of copper (II):generation of reactive oxygen species and enhancement by NADH. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 27, Nos. 11/12, pp. 1367-1377, 1999

Toshihiko, O., Hirotaka, K., Yoshihide,H., Hideaki, H. and Takayuki, S. A novel antioxidant isolated from Young green barley leaves. J. Agric. Food Chem. 1992, 40, 1135-1138

Wiseman, H. Importance of estrogen xenoestrogen and phytoestrogen metabolism in breast cancer risk. Biochemical Society Transactions. vol.27, 299-304, 1999

Yumiko, Y. and Hiroshi, O. Synergistic induction of DNA strand breakage by carechol-estrogen and nitric oxide: implications for hormonal carcinogesis. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 24, No. 2, pp. 341-348, 1998

Figure 1.

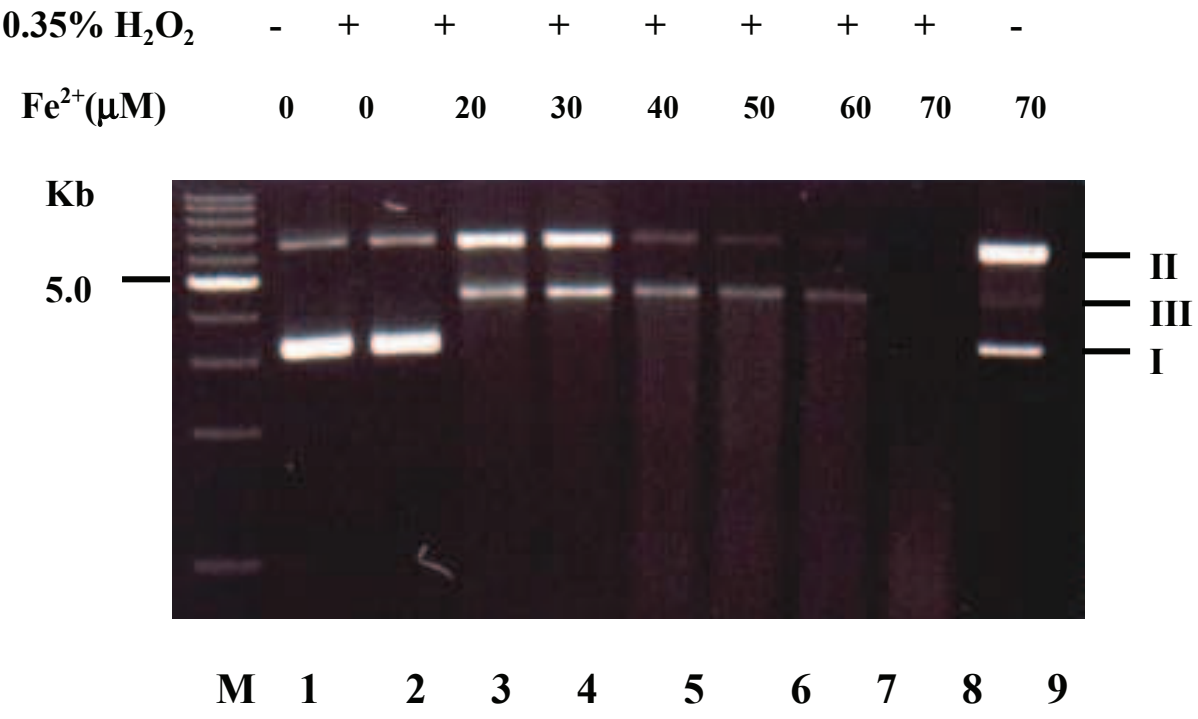
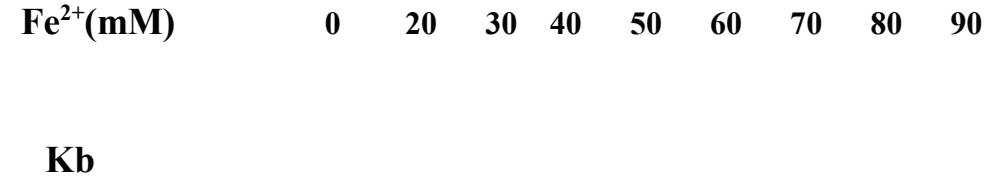


Figure 2.



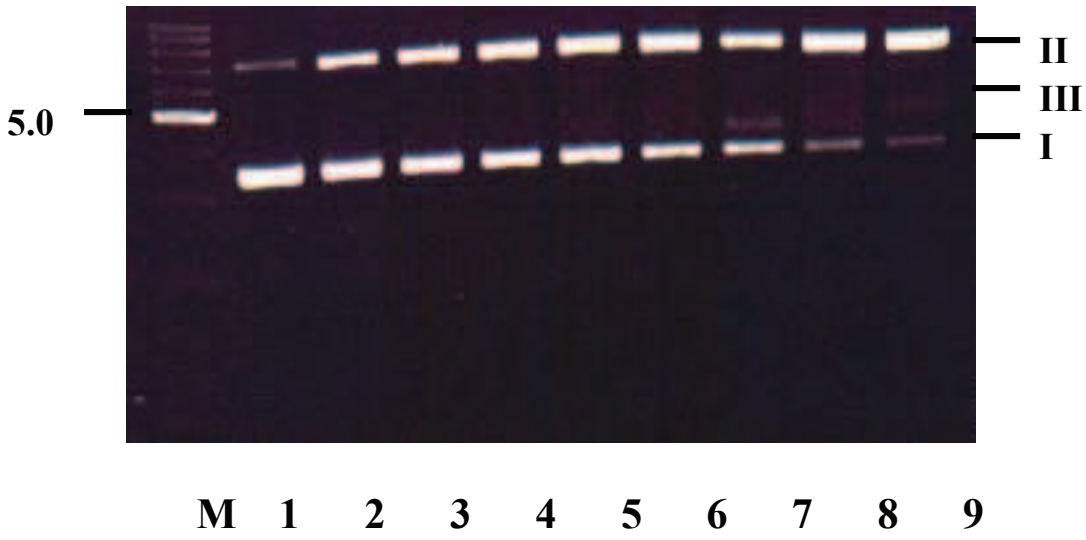


Figure 3.

0.35% H_2O_2	-	+	+	+	+	+	+	-	-
40μM Fe^{2+}	-	+	+	+	+	+	-	+	-
E1 (i M)	0	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.0	2.0	2.0

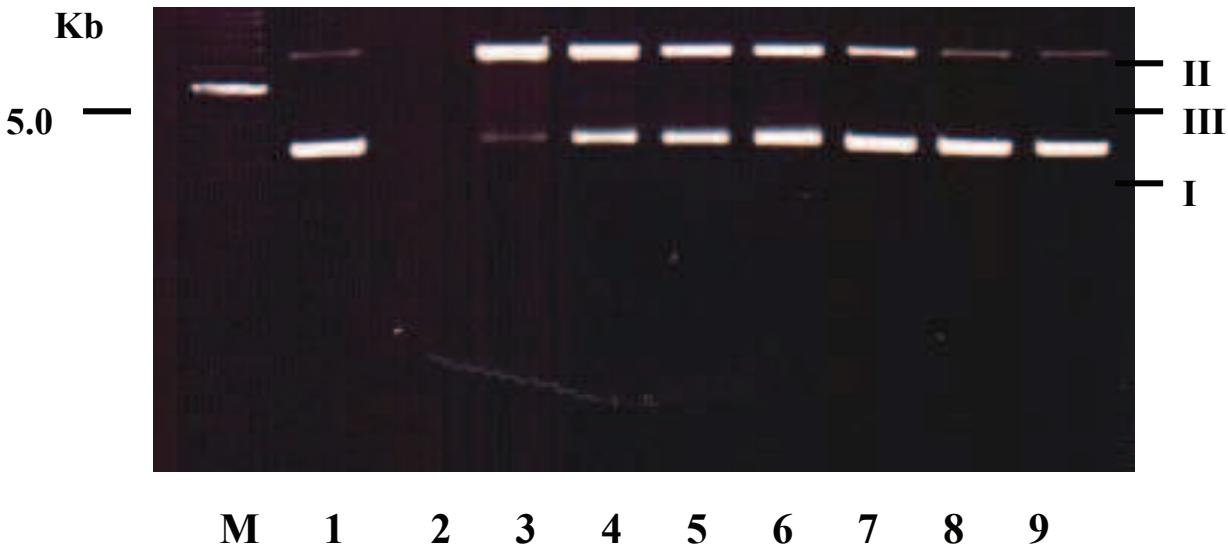


Figure 4

0.35% H_2O_2	-	+	+	+	+	+	+	-	-
40μM Fe^{2+}	-	+	+	+	+	+	-	+	-

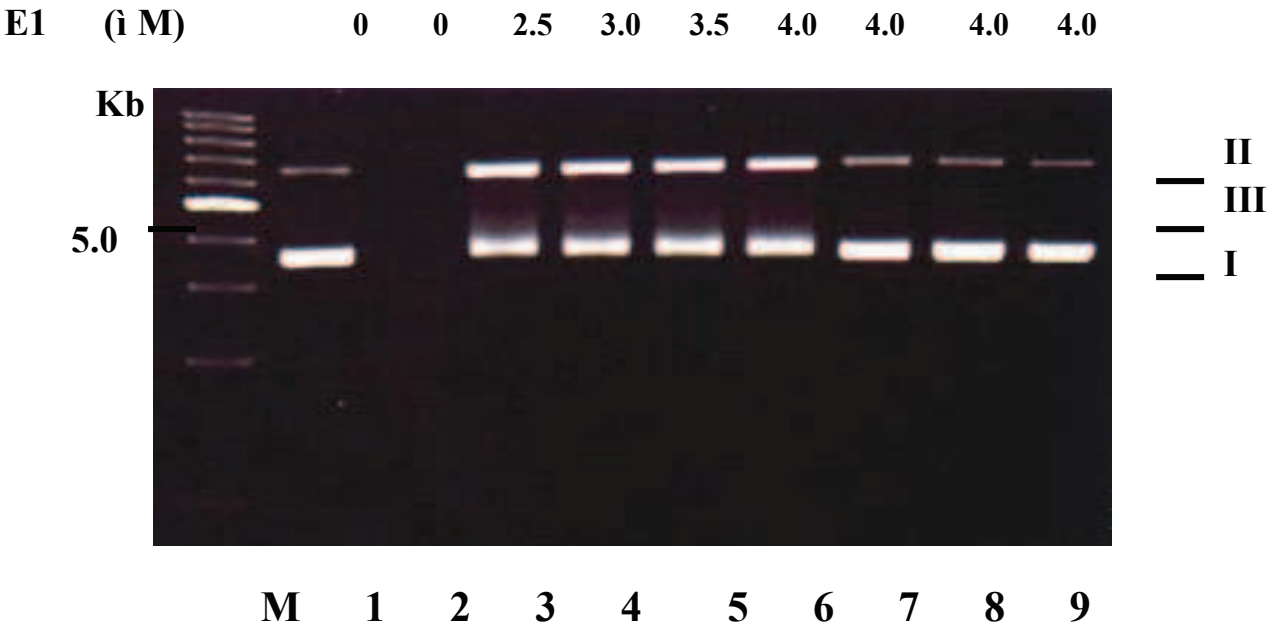


Figure 5.

0.35% H_2O_2	-	+	+	+	+	+	+	-	-
40µM Fe^{2+}	-	+	+	+	+	+	-	+	-

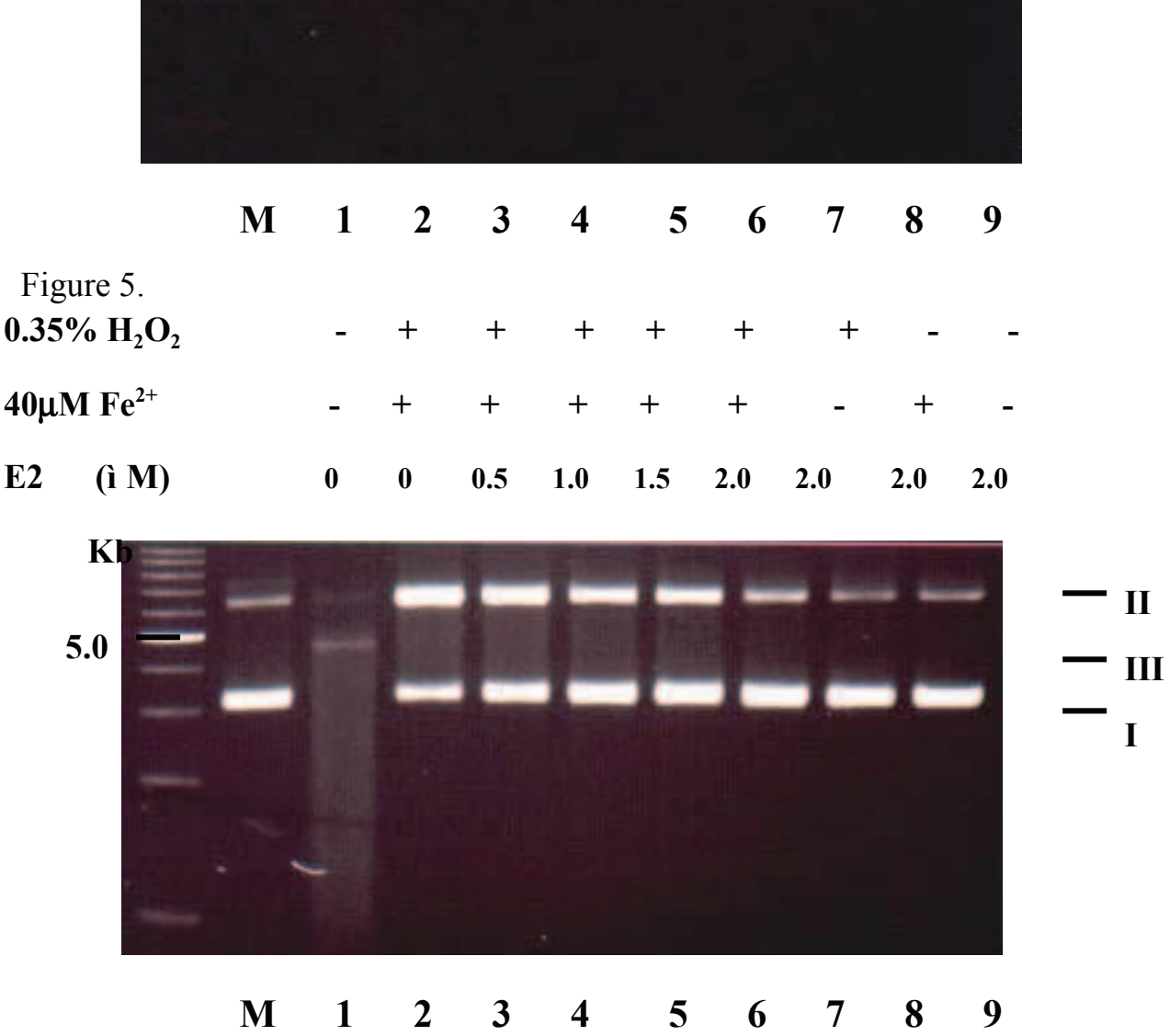


Figure 6.

0.35% H_2O_2	-	+	+	+	+	+	+	-	-
40µM Fe^{2+}	-	+	+	+	+	+	-	+	-

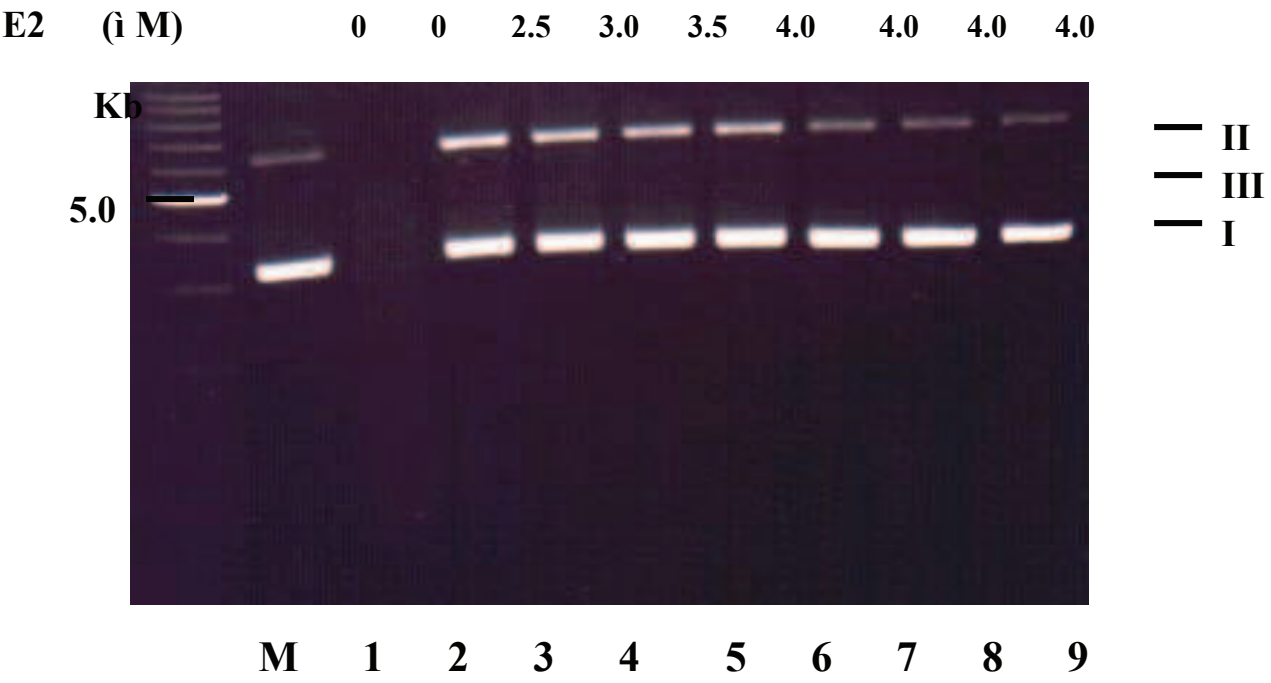


Figure 7.

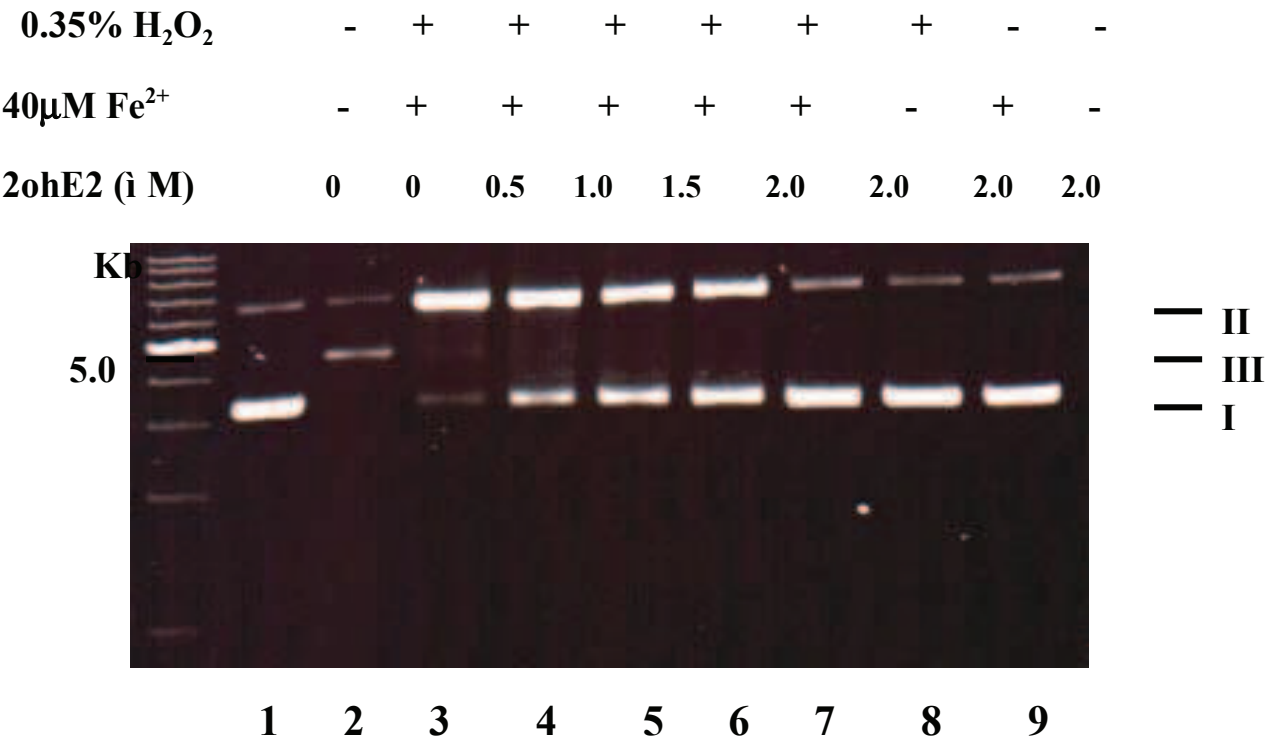


Figure 8

0.35% H_2O_2 - + + + + + + - -

40µM Fe^{2+} - + + + + + - + -

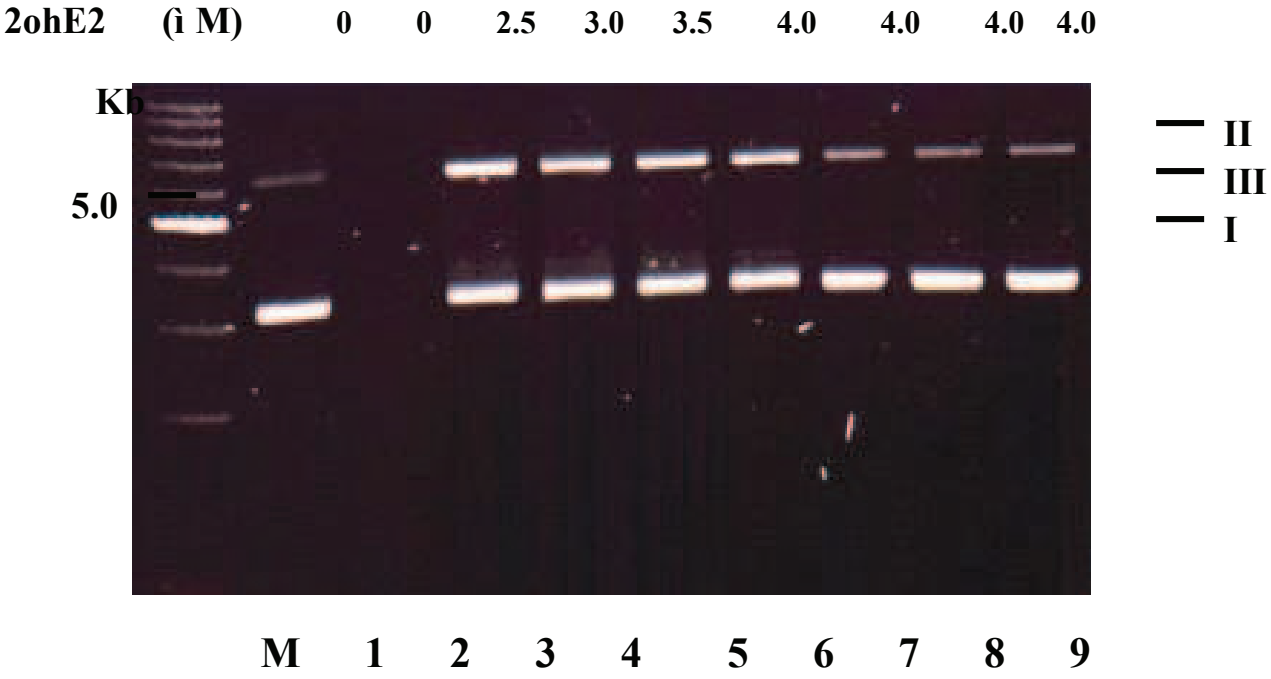


Figure 9.

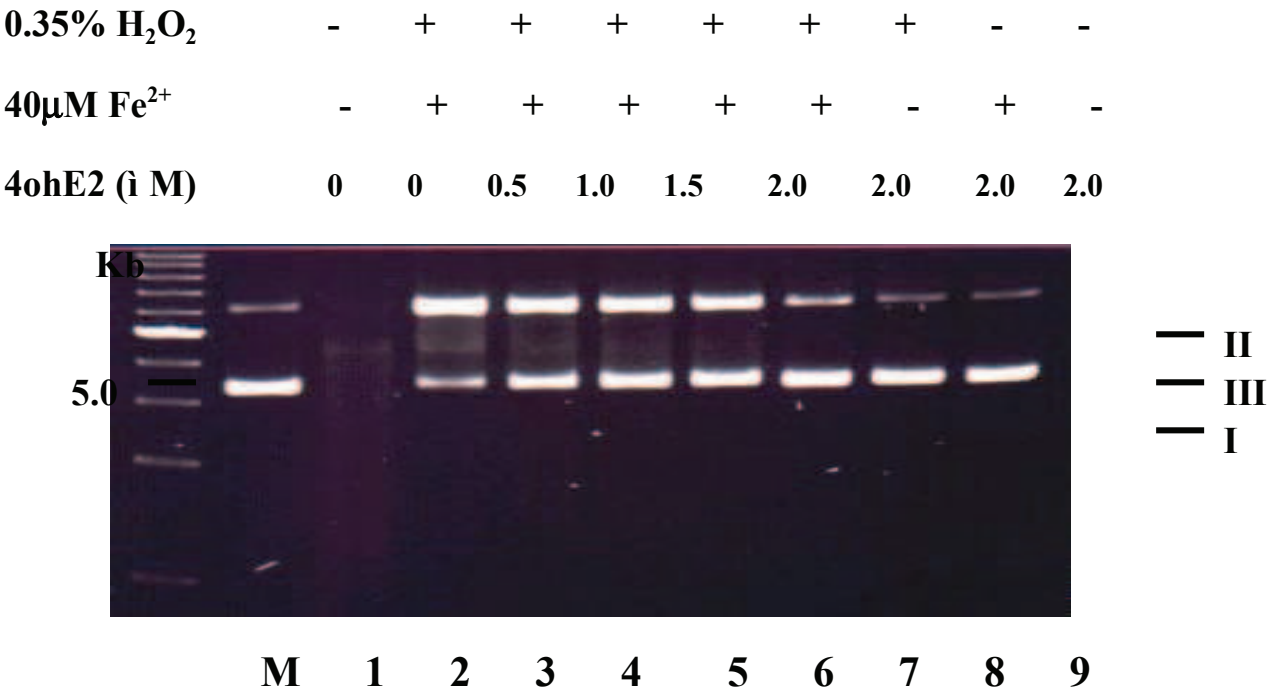


Figure 10

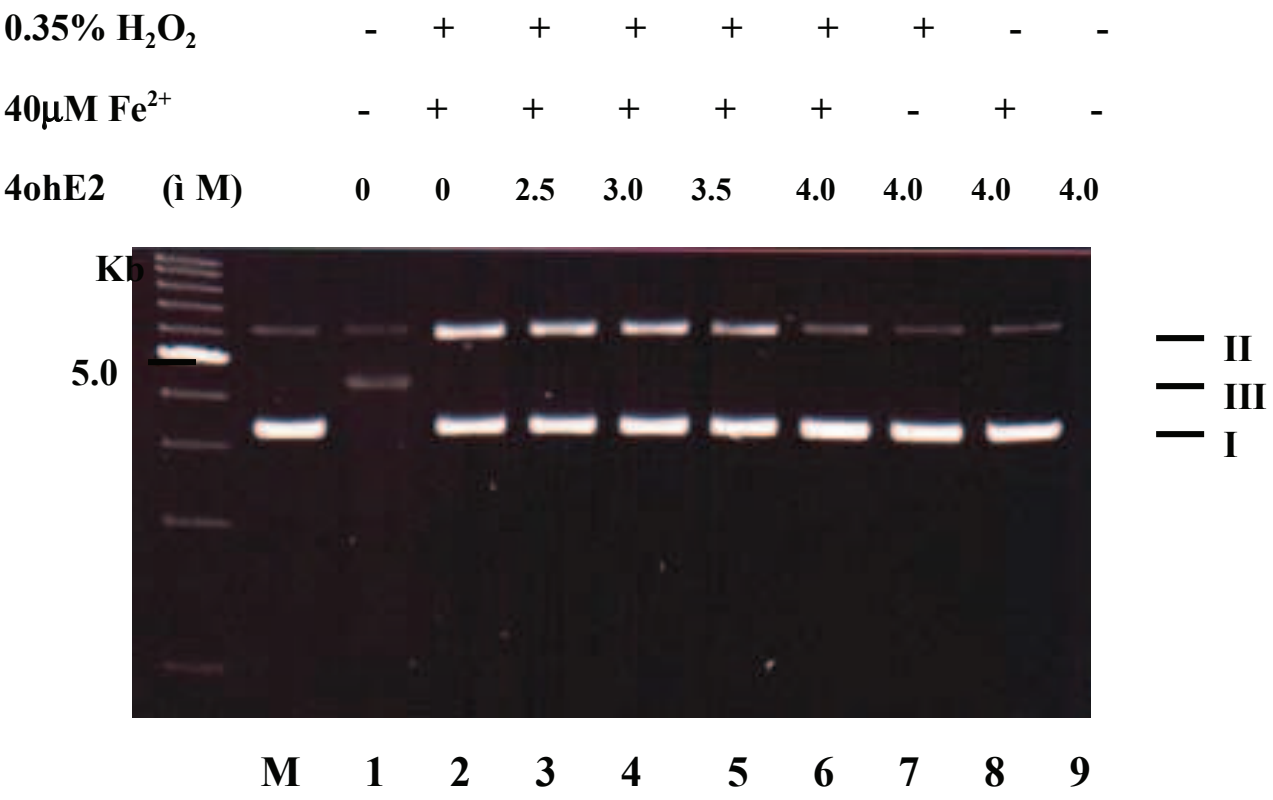


Figure 11

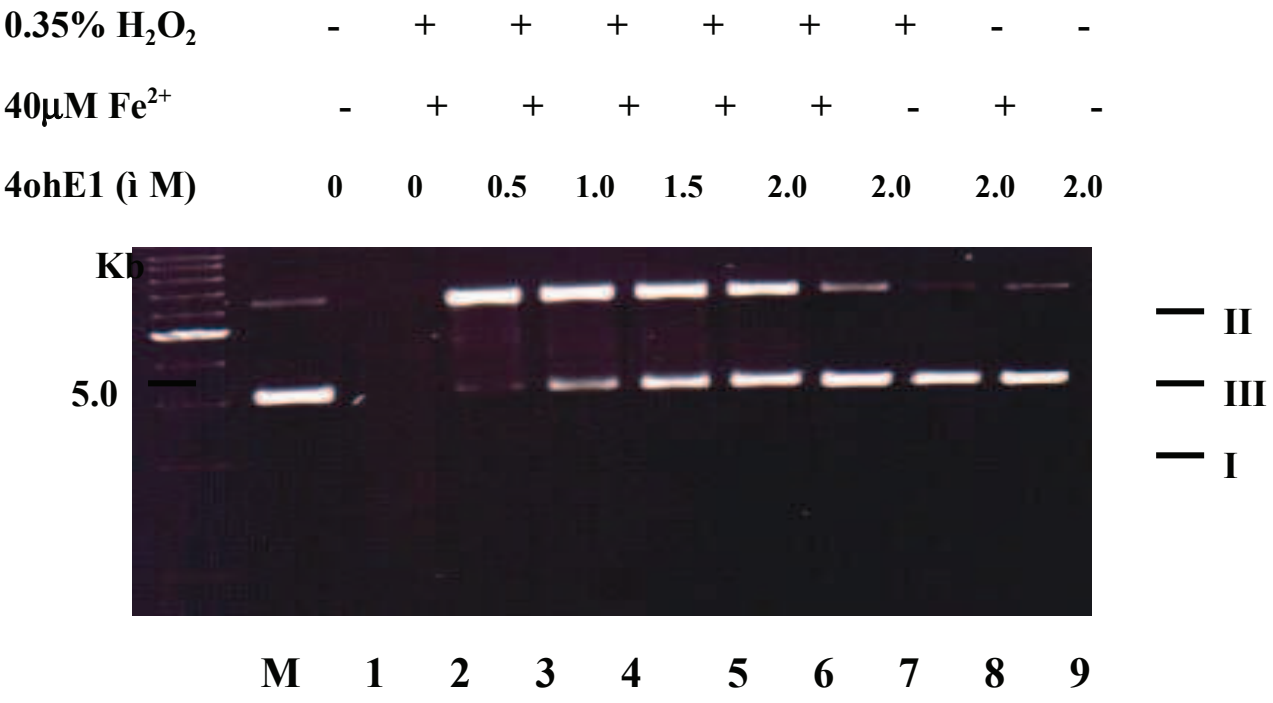
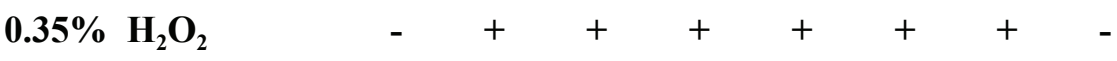
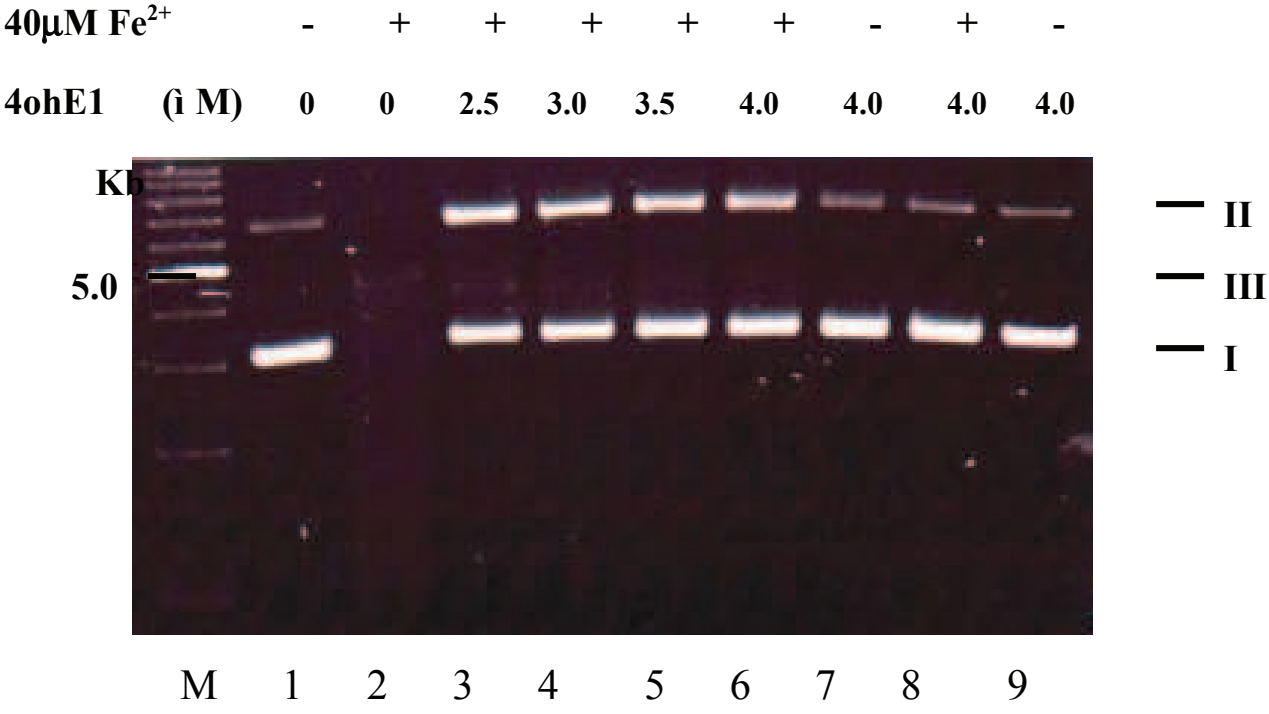


Figure 12



-


40μM Fe2+ - + + + + + - + -
4ohE1 (ì M) 0 0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.0 4.0 4.0
Kb
5.0
II
III
I
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9