

Vitamin A와 E 투여가 흰쥐 간조직 DNA와 Aflatoxin B₁ 과의 결합에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생화학교실

홍 영 숙

= ABSTRACT =

Reduction in Binding of Aflatoxin B₁ to Rat Liver DNA by Vitamin A and E Pretreatment

Young—Sook Hong

Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University

We examined pattern of covalent modification of DNA produced in rat liver after exposure to single dose of aflatoxin B₁. DNA-bound aflatoxin B₁ adducts obtained from rat liver microsomes were hydrolyzed with weak acid to yield 2,3-dihydro-3-hydroxy-(N⁷-guanyl) aflatoxin B₁ as major product. This adduct was derived from the aflatoxin B₁, 2,3-dioxide and accounted for approximately 80% of the carcinogen-derived radioactivity incorporated into DNA. Acid hydrolysis of the nucleic acid-aflatoxin B₁ adducts also yielded 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-aflatoxin B₁ and other minor products.

Vitamin A and E pretreatment of rats resulted in reduction in the level of hepatic AFB₁-DNA adducts to two-third of the control value. Therefore, administration of vitamin A and E to rats changes in AFB₁ metabolism probably decreased modification of DNA during this experiment.

서 론

Aflatoxin (AFB₁)은 genus *Aspergillus* 로 여러종 속에서 대사산물로 형성되며 흰쥐, 무지개송어 및 오리에서 간암을 일으키는 능력을 갖고 있다¹⁾. 역학적 자료에서 이런 mycotoxin 은 사람에서도 간암을 일으킨다

고 지적 하였다²⁾.

AFB₁ 과 세포속에 거대분자는 공유결합을하며 이런 상호작용은 microsomal 효소에 의하여 반드시 대사적으로 활성화 되어야만 한다³⁾. 이렇게 활성화된 화합물은 2,3-vinyl ether 결합이 산화되어 형성된 반응성이 매우 강한 aflatoxin B₁-2,3-dioxide 이다^{4,5,6)}.

DNA 속에 guanine 의 N⁷ 원자는 in vitro 나 in vivo

* 본 연구는 문교부 연구비에 의하여 수행된 것임.

에서 공유결합을 하므로써 변화되는 중요한 위치이다⁷⁾⁸⁾⁹⁾. Aflatoxin B₁-DNA 를 가수분해하면 AFB₁-N⁷-GUA 을 생성한다. 酸에 의하여 가수분해된 2개의 다른 생성물은 AFB₁-N⁷-GUA 로 부터 형성되며 이런 생성물은 대부분 AFB₁-FAPY 유도체들이고 7, 9-위치에 치환된 imidazole ring 이 분리되므로 형성된다. 이와같은 유도체들의 구조는 밝혀져 있다⁸⁾⁹⁾. AFB₁과 흰쥐 간조직 DNA 가 결합하여 형성된 생성물은 in vivo 에서 AFB₁이 대사적으로 활성화 되어야하며 이들 대사산물중의 하나는 친핵체 (nucleophilic)인 guanine 의 N⁷원자와 공유결합 하므로써 반응성이 높은 친전자체 (electrophilic) 가 되고, 또한 양하전을 가진 imidazole ring 들은 자연적으로 가수분해되며 7, 9-위치에 치환된 purine 들이 화학적으로 변형 된다는 것을 지적하는 것이다.

In vitro 에서 microsomal 효소에 의하여 활성화된 AFB₁¹⁰⁾과 DNA 의 adenine 분자가 결합된다는 것이 지적되었다. 그러나 이런 생성물은 아직 완전히 분리확인 되지 않았다.

AFB₁은 포유동물과 박테리아 세포에서 강력한 변이 유발소가 될려면 반드시 대사적으로 활성화를 필요로 하지만¹¹⁾¹²⁾ 돌연변이와 발암현상은 DNA 와 covalent modification 이 어떤 역할을 하는지는 확실히 밝혀지지 않았다.

이 논문에서는 AFB₁에 의하여 흰쥐 간조직에서 공유결합된 DNA 생성물 형성에 대한 자료를 보고 하려고 한다. AFB₁을 치사량 이하의 량을 투여한 흰쥐 간장 DNA 로 부터 얻은 생성물을 측정해서 N⁷-guanine 부위의 DNA 결합을 분석하고 in vivo 로 vitamin A 와 E 의 투여가 AFB₁과 DNA 상호작용에 미치는 영향을 측정하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1) 시약

Vitamin A acetate 와 vitamin E는 E. Merk (W. Germany) 를 사용 하였다. Aflatoxin B₁-¹⁴C (Sp. activity 180mCi/mmol)은 New England Nuclear (U.S.A)에서 구입 하였다. Aflatoxin B₁은 Aldrich chemical Co. (W. Germany), Ribonuclease A 와 NA DH는 Sigma Co.(U.S.A), Nuclease P₁은 Yamasa Shoyuco (JAPAN) 을 사용하였다. 그의 시약은 reag-ent grade 를 사용 하였다.

2) 실험동물 및 실험군

전 실험을 통하여 체중 150 g 내외의 음성 흰쥐 (spr-

ague dawley) 를 사용 하였다. Vitamin A 는 2,000 I.U./100 g 체중 / day, vitamin E는 12mg/100 g 체중 / day 를 stomach tube 를 통하여 2주간 경구 투여 하였다.

AFB₁은 0.6 mg/kg 체중과 0.06 μ Ci ¹⁴C-AFB₁ 을 복강내로 주사한후 2시간후에 동물을 희생 시켰다. 핵산의 분리 :

흰쥐에서 절제한 간을 0.25 M sucrose-2mM CaCl₂ -0.05 M Tri-HCl (pH 7.0) 24 ml로 homogenize 하여 여과 하였다. 간 무게의 9배 부피에 25% Triton X-100 이 최종농도가 5% 가 되도록 넣은 후 1,000 g 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거 하였다. 침전물을 0.05 M Tris-HCl (pH 6.5) 에 용해시키고 5% SDS 와 4 M NaCl 이 최종농도가 각각 1% 와 1 M 이 되도록 가하였다. CHCl₃: isoamylalcohol, 24:1 인 용매를 동량 가하여 추출한후 7,000 g에서 10분간 원심 분리 하였다. 상층액에 3배 부피의 ethanol 을 가하고 생성된 침전물을 ethanol 로 2회 씻은후 진공에서 말렸다.

RNA 의 제거 :

분리한 핵산을 0.5 mg/ml 이 되도록 0.1 M NaCl -0.05 M Tris-HCl (pH 7.0) 에 용해시킨 후 RNase A 를 100 μ g/ml 이 되도록 넣어 37°C에서 30분간 incubation 시켰다. Incubation 후 4 M NaCl -0.05 M Tris-HCl (pH 7.0) 의 최종농도가 0.8 M 이 되도록 가해주고 3배 부피의 ethanol 을 가하고 생성된 침전물을 ethanol 로 씻은후 진공에서 건조시켰다.

AFB₁-DNA 의 가수분해 :

분리한 DNA 를 1.0 mg/ml 이 되도록 탈이온수에 용해시키고 1 N HCl 의 최종농도가 0.1 N 되도록 가한 후 90°C에서 10분간 가열하였다. 이것을 냉각시키고 0.5 M CH₃ COOK (pH 5.0) 의 최종농도가 50mM 이 되도록 가한후 1 N NaOH 로 pH 5.0 가 되도록 하였다. 100 μ g nuclease P₁/10 mg DNA 를 가한후 40°C에서 2시간 incubation 하였다.

AFB₁ metabolite 부분은 waters gradient HPLC 와 μ Bondapak C₁₈ Column 으로 분리 하였다.

실험 결과

흰쥐 간 DNA에서 공유결합된 AFB₁ 유도체

Chart 1 은 0.6 mg/kg 과 0.06 μ Ci 의 AFB₁ 투여 2 시간후 흰쥐 간 DNA에서 얻어진 AFB₁ 가수분해 생성물을 분석한 결과이다. Peak 의 구조가 알려지지 않은 화합물들은 편의상 A 에서 I까지 표시 하였다. 가장 양이 많은 가수분해물은 fraction 75에서 80 까지로

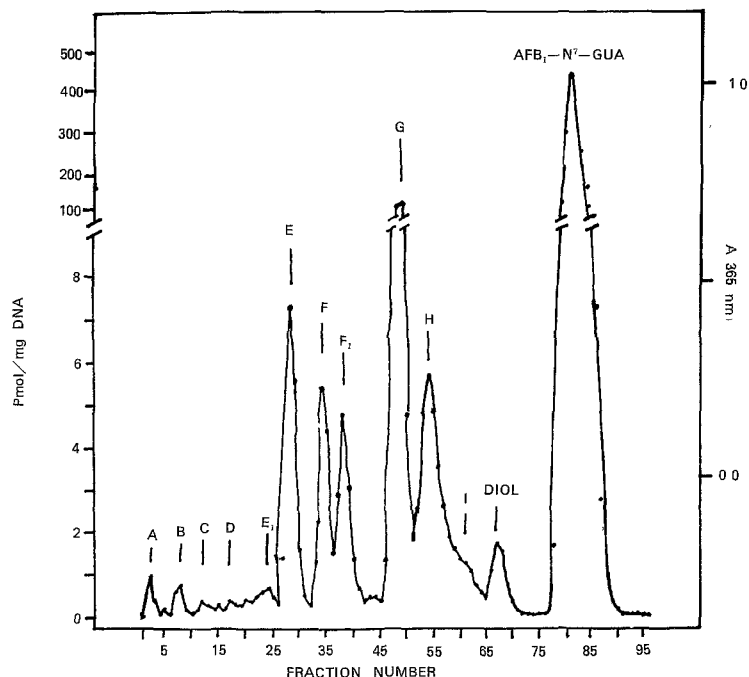


Chart 1. High-pressure chromatography pattern of [¹⁴C] AFB₁ hydrolysis products obtained from rat liver DNA 2hr after administration of [¹⁴C] AFB₁ (0.6 mg/kg). The amounts of AFB₁ derivatives (Pmol) in each 30-drop fraction per mg of DNA analyzed are shown.

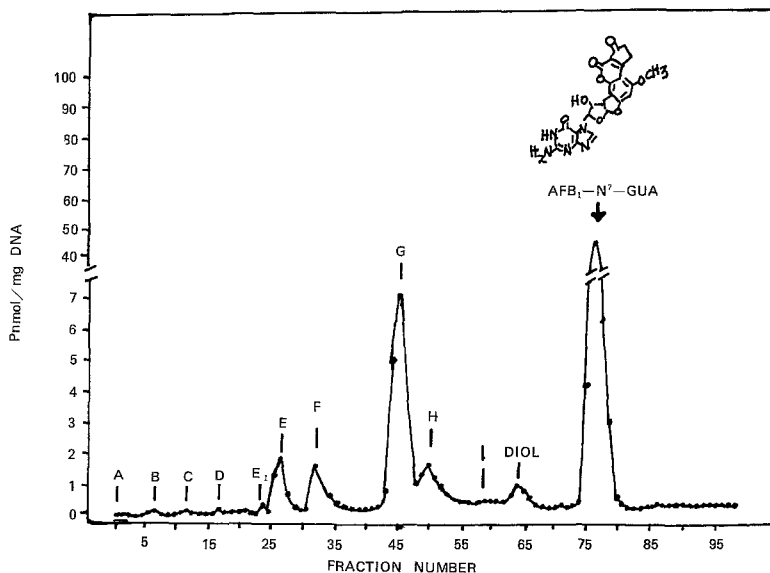


Chart 2. High-pressure chromatography pattern of [¹⁴C] AFB₁ hydrolysis products obtained from administered vitamin A rat liver DNA after administration of [¹⁴C] AFB₁ (0.6 mg/kg). The amounts of AFB₁ derivatives (Pmol) in each 30-drop fraction per mg of DNA analyzed are shown.

Table 1. Concentration of aflatoxin derivatives hydrolyzed from AFB₁-modified DNA isolated from administered vitamin A, vitamin E and AFB₁ (0.6mg/kg) rat liver.

Groups	Concentration (Pmol/mg DNA 10 ²)											Total		
	A	B	C	D	E ₁	E	F	F ₁	G	H	I		Diol	AFB ₁ -N ⁷ -GUA
Aflatoxin B ₁ (AFB ₁)	0.9	0.8	0.4	0.4	0.7	7.3 (1.2)	6.3 (1)	4.7 (8)	130 (21)	6.7 (1)	1.5	2.6	460 (74)	622.3
Vitamin A + AFB ₁	0	0.1	0	0.1	0.1	2.2 2	1.8 (1.7)	0	7.0 (6)	1.5 (1.4)	0.2 (1.1)	1.2	46 (43)	108.0
Vitamin E + AFB ₁	0	0.1	0	0.1	0.1	1.7 (1.4)	3.0 (2.5)	0	7.2 (4)	2.0 (1.7)	0.5	1.5	52 (44)	119.4

Numbers in parentheses, percentage of the total bound material represented by each peak. Values below 0.5% are not indicated.

DNA 속에 있는 guanine N⁷에 치환된 AFB₁-N⁷-GUA이다.

Peak F와 G의 화합물은 AFB₁-N⁷-GUA의 화학적 변화에 의한 생성물로 생각되며 이와같은 화합물들의 구조들은 miller⁴⁾ 등에 의하여 제시된 바 있다 (chart 4). 즉 Peak G는 aflatoxin form amidopyrimidine 유도체고 Peak F는 imidazole ring이 열린 구조와 연관이 있다고 보고하였다. Peak H는 AFB₁ 대사 산물인 AFP₁에서 형성된 N⁷-guanine-aflatoxin의 다른 공유결합 물질이다¹³⁾. 이와같이 O-methyl기가 떨어져나간 대사산물의 활성화는 AFB₁의 활성화 과정과 유사한 2,3-vinyl ether 결합의 산화라고 생각된다. Peak E는 아직 밝혀지지는 않았지만 aflatoxin M₁과 같은 aflatoxin 대사산물의 활성화로 형성된 다른 N⁷-guanine 유도체로 추측된다.

그외에 다른 생성물은 aflatoxin 대사산물로 부터 형성된 유도체들이다.

Vitamin A와 E를 투여한 흰쥐 간 DNA에서 공유결합된 AFB₁ 유도체.

Table 1과 chart 2 및 3는 2,000 I.U./day의 vitamin A와 12 mg/day의 vitamin E를 in vivo로 2주간 투여하고 0.6 mg/kg과 0.06 μCi의 AFB₁을 주사한지 2시간후에 흰쥐 간 DNA에서 얻은 AFB₁가 수분해 생성물의 chromatographic pattern을 나타낸 것이다.

Vitamin A와 E를 투여한 군에서 DNA와 공유결합된 총 aflatoxin 유도체들은 각각 17% 및 19% 결합 되었으며 aflatoxin B₁만 투여한 군에 비하면 83% 및 81% 감소 하였다 (chart 2, 3). Peak E는 각각 30% 및 23%가 DNA와 결합되어 약 70% 이상이 감소 하였다. Peak F₁은 완전히 없어졌고 이는 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy aflatoxin B₁으로 알려져 있으며 DIOL과 같은 유도체이고 핵산과 같이 공유결합을 하지않는 화합물이다. Peak G와 H도 DNA와의 결합이 약 70%이상 감소 하였다. 이들 Peak는 Lin등⁹에 의하여 화학적으로 비슷한 구조를 갖는다고 제시하였다. AFB₁-N⁷-GUA은 aflatoxin B₁만 투여한군에 비교하여 vitamin A와 E를 투여한 군에서 10%와 11%로 약 90%가 DNA와의 상호작용이 감소됨을 관찰할 수 있었다.

고 찰

AFB₁은 in vitro나 in vivo에서 주로 guanine의 N⁷원자에 DNA와 공유결합을 하고 있다고 알려져 왔다. 세포내 거대분자와 AFB₁과 공유결합물의 확인은

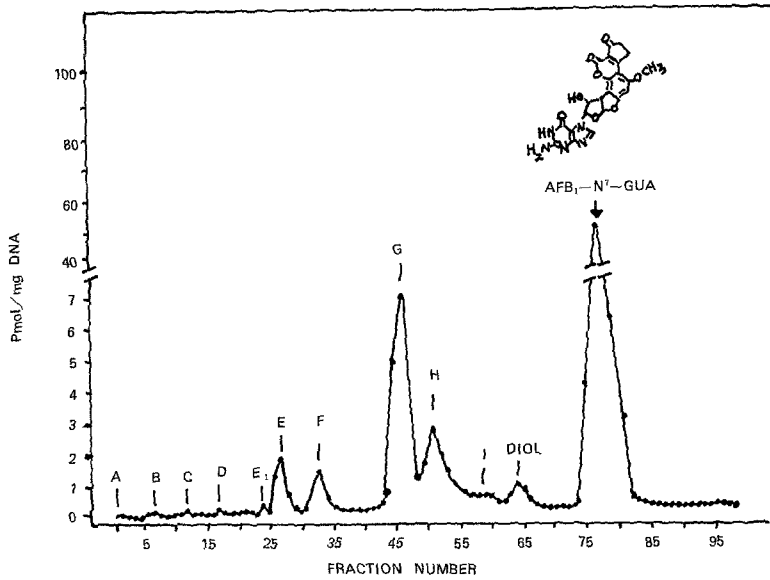


Chart 3. High-pressure chromatography pattern of $[^{14}\text{C}]\text{AFB}_1$ hydrolysis products obtained from administered vitamin E rat liver DNA 2 hr after administration of $[^{14}\text{C}]\text{AFB}_1$ (0.6 mg/kg). The amounts of AFB₁ derivatives (Pmol) in each 30-drop fraction per mg of DNA analyzed are shown.

최종적으로 형성되는 분자의 확인과 이들 상호작용으로 DNA 재생과정이나 mutation 과 같은 세포내 반응을 좀더 연구하기 위해서 꼭 필요하다.

원위 간 DNA에서 AFB₁과의 공유결합 물질이 형성됨을 발견하였다. 이들 화합물의 주요한 결합 부위는 AFB₁이 활성화된 유도체들과 이들 대사산물중의 하나인 AFP₁들이 DNA 분자의 guanine N⁷원자의 covalent modification으로 일어난다.

AFB₁-2,3-epoxide와같이 반응성이 큰 분자는 in vivo에서 DNA나 다른 세포내 거대분자와 상당량 결합되므로 DNA와만이 결합해서 한가지 생성물을 형성한다고 생각하지는 않는다⁴⁾¹⁴⁾. N⁷-생성물이 현저히 많이 생성되는 것은 이 위치가 alkylating agent¹⁵⁾에 의한 공격의 주요 부위인 친핵성 (nucleophilicity)을 갖는것과 다른 친핵의 중심부¹⁶⁾의 접근하기 어려운 DNA의 helical 구조 때문에 초래한 결과일 가능성이 있다.

0.6 mg/kg의 AFB₁을 주사한 간 DNA와의 modification은 2시간후에 측정했으며 이때 투여한 AFB₁의 약 1%가 간 DNA와 공유결합 하였다. AFB₁-DNA를 가수분해하여 chromatographic 분석결과는 적어도 12개의 유도체가 나타났으며 이들 농도는 0.4~460 Pmol/mg DNA였다. 전에 보고에 의하면⁷⁾⁹⁾¹¹⁾ AFB₁투여 2시간후 간 DNA와의 공유결합된 주된 생

성물은 AFB₁-N⁷-GUA로 80%를 차지했고, 그외 다른 생성물은 AFP₁-N⁷-GUA과 aflatoxin M-guanine이라고 추측되는 Peak E가 7~8%를 차지한다고 보고하였다.

Vitamin A와 E를 투여한 간 DNA와의 modification을 보면 나머지 9개의 유도체들 중에 하나인 DIOL은 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-AFB₁이라고 확인되었고, Peak F와 Peak G는 AFB₁-N⁷-GUA이며 AFP₁-N⁷-GUA과 Peak E (AFM₁-N⁷-GUA)로 연관을 갖고 있다.

AFB₁대사 작용의 변화와 AFB₁-N⁷-GUA이 DNA에서 제거되는 속도는 반복해서 투여한 AFB₁량이 DNA를 손상시키는 정도에 달려있다고 생각된다. 원위에다 AFB₁을 투여하면 간 P-450 mixed-function oxidase¹⁸⁾가 유도되고 P-450의 유도물질인 phenobarbitone을 투여하면 AFB₁이 세포내 거대분자와의 결합이 감소하였다.

이런 결과와 같이 vitamin A와 E의 투여도 AFB₁대사 과정의 변화로 DNA의 modification을 감소시킨다고 추측된다. 또한 DNA로부터 AFB₁생성물들을 빨리 제거하기 위하여 재생효소의 유도증가, 핵산대사의 증가, 간 chromatin의 구조 변화등으로 AFB₁에 의한 손상을 감소 시키는데 공헌한다고 생각된다. 또 유동물의 세포에서 DNA로부터 O⁶-methyl-guanine

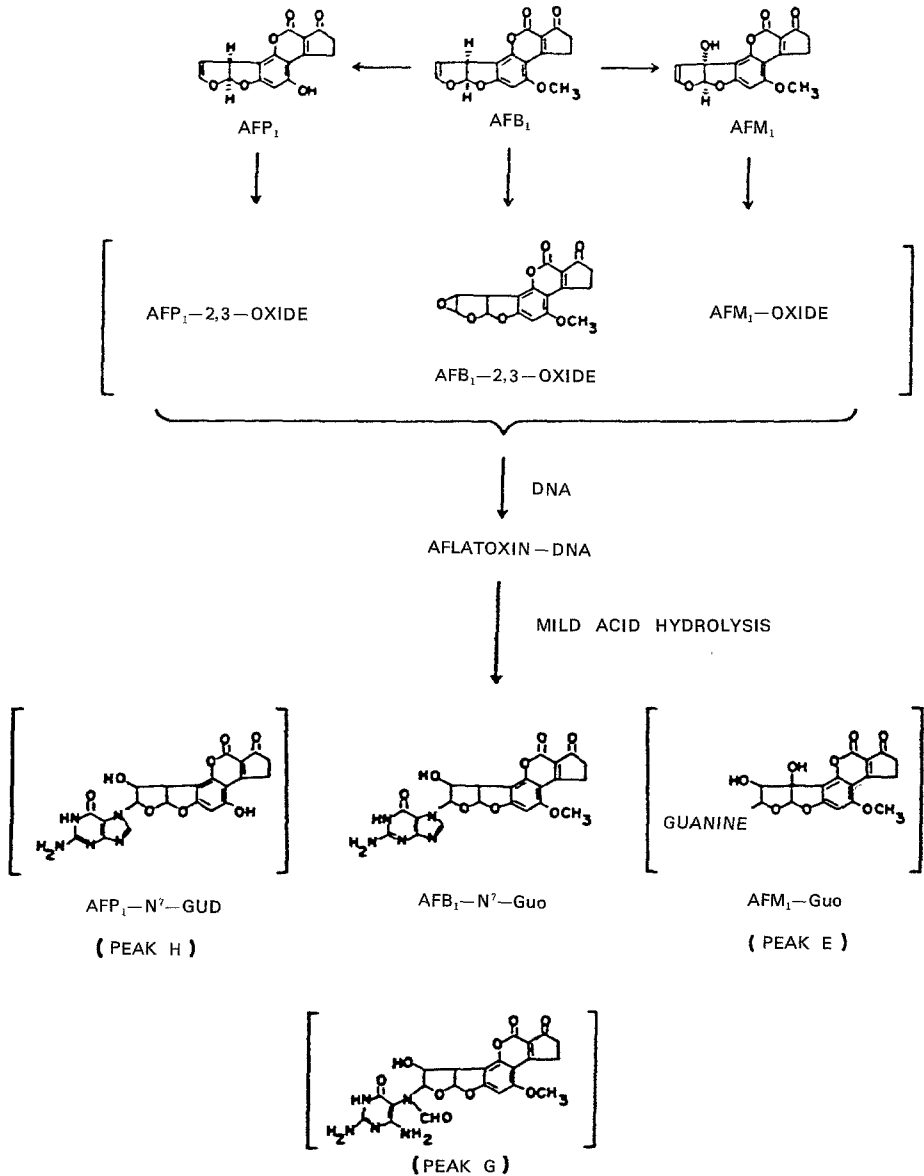


Chart 4. Proposed pathways of metabolic activation and DNA binding of AFB₁. AFP₁, aflatoxin P₁; AFM₁, aflatoxin M₁; AFP₁-2,3-oxide, aflatoxin P₁-2,3-oxide; AFB₁-2,3-oxide, aflatoxin B₁-2,3-oxide; AFM₁-oxide, aflatoxin M₁-oxide.

이 제거되는 속도의 증가는 alkylating 과 arylating agent¹⁹⁾²⁰⁾를 반복해서 투여한 결과가 보고 되었다.

AFB₁ 이나 다른 xenobiotics 가 DNA 와 covalent modification 으로 형성된 화합물 그리고 이들 화합물들의 생화학적 효과와의 관계는 알려져 있지 않다. 간 DNA 와 공유결합된 유도체들은 간암 물질인 aromatic

amine 으로 N-methyl-4-aminoazobenzene²¹⁾ 과 2-acetylaminofluorene²²⁾ 에 의하여 형성된다. N-methyl-4-amino-azobenzene 에 의하여 형성된 DNA 의 주요한 생성물은 N-(deoxyguanosine 8-yl)-N-methyl-4-aminoazobenzene²³⁾ 로써 확인 되었다. 2-Acetylaminofluorene 은 DNA 속에서 gua

nine의 C⁸과 N²원자에 공유결합 생성물을 형성한다²⁸⁾. N²원자에 생성물은 in vivo에서 간 DNA와의 지속성 생성물이다.

DNA와 발암물질의 공유결합적 상호작용이 많이 확인되는 것은 DNA와 결합된 물질과 phenotypic 효과 사이에 복잡한 관계가 있다는 증거이다. AFB₁과 Xenobiotics의 상호작용으로 형성된 생성물이 확인되거나 반응과정의 분자 단계가 밝혀진다면 돌연변이와 neoplasia의 원인이 되는 생화학적 그들의 역할이 밝혀지게 될 것이다.

결 론

AFB₁(0.6 mg/kg 및 0.06 μCi)을 주사하고 2시간 후에 흰쥐 간 DNA의 공유결합된 화합물과 vitamin A(2,000 I.U./day)와 vitamin E(12 mg/day)를 2주간 투여하고 간 DNA와 covalent modification의 chromatographic 분석 결과를 나타냈다.

AFB₁과 흰쥐 간 DNA와 형성된 covalent modification에 주요 생성물은 2,3-dihydro-3-hydroxy(N⁷-guanyl) aflatoxin B₁이고 그의 부생성물로는 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-aflatoxin B₁ 등이 형성되었다.

Vitamin A와 E를 투여한 흰쥐에서 AFB₁과 DNA와 covalent modification은 거의 80% 이상 감소되었고 주요 생성물인 2,3-dihydro-3-hydroxy(N⁷-guanyl) aflatoxin B₁의 DNA와 modification은 약 90% 감소하였다.

REFERENCES

- 1) Wogan, G.N.: Aflatoxin carcinogenesis. *Methods cancer Res.*, 1973; 8: 309-344.
- 2) Wogan, G.N.: The induction of liver cell cancer by chemicals. In: H.M. Cameron, D. A., Linsell, and G.P. Warwick (eds), *Livercell cancer*, pp 121-151, Amsterdam: Elsevier/North Holland Pub. Co., 1976.
- 3) Garner, R.C.: Microsome dependent binding of Aflatoxin B₁ to DNA, RNA, Polyribonucleotides and protein in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 1973; 6: 125-129.
- 4) Swenson, D.H., Lin, J., Miller, E.C. and Miller, J.A.: Aflatoxin B₁-2,3-oxide as a probable intermediate in the covalent binding of Aflatoxin B₁ and B₂ to rat liver DNA and ribosomal RNA in vivo. *Cancer Res.*, 1977; 37: 172-181.
- 5) Swenson, D.H., Miller, E.L., and Miller, J.A.: Aflatoxin B₁ 2,3-oxide: Evidence for its formation in rat liver in vivo and by human microsomes in vitro. *Biochem. Biophys. Res., Commun.*, 1974; 60: 1036-1043.
- 6) Swenson, D.H., Miller, J.A., and Miller, E. L. 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxy-aflatoxin B₁: An acid hydrolysis formed by hamster and rat liver microsomes in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973; 53: 1260-1276.
- 7) Croy, R.G., Essigmann, J.M., Reinhold, V.N., and Wogan, G.N. Identification of the principal aflatoxin B₁-DNA adduct formed in vivo in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.*, 1978; 75: 1745-1749.
- 8) Essigmann, J.M., Croy, R.G., Nadzan, A.M., Busby, W.F., Reinhold, V.N., Buchi, G., and Wogan, G.N. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B₁ in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977; 74: 1870-1874.
- 9) Lin, J., Miller, J.A., and Miller, E.C. 2,3-Dihydro-2-(guan-7-yl) 3-hydroxy-aflatoxin B₁, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B₁-DNA or ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsome mediated reactions and in rat liver in vivo. *Cancer Res.*, 1977; 37: 4430-4438.
- 10) Essigmann, J.M., Donahue, P.R., Story, D.L., Wogan, G.N., and Brunengraber, H. Use of the isolated perfused rat liver to study carcinogen-DNA adduct formation from aflatoxin B₁ and steigmatocystin. *Cancer Res.*, 1980; 40: 4085-4091.
- 11) D'Andrea, A.D., and Haseltine, W.A.: Modification of DNA by aflatoxin B₁ creates alkali labile lesions in DNA at positions of guanine and adenine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1978; 75: 4120-4124.
- 12) Garner, R.C.: Reduction of binding of [¹⁴C] aflatoxin B₁ to rat liver microsomal metabolite of aflatoxin B₁. *Br. J. Cancer*, 1975; 28: 544-551.
- 13) Croy, R.G., and Wogan, G.N.: Identification

- of an aflatoxin B₁-DNA adduct formed in vivo in rat liver. Proc. Am. Soc. Cancer Res., 1979; 20: 182.
- 14) Garner, R.C. and Wright, C.M.: Binding of [¹⁴C] aflatoxin B₁ to cellular macromolecules in the rat and hamster. Chem. Biol. Interact. 1977; 11: 123-131.
- 15) Lawley, P.D.: In screening tests in chemical carcinogenesis, eds. Montesano, R., Barsch, H. and Tomatis, L. (International Agency for Research on Cancer, Lyon, France) pp 181-208, 1976.
- 16) Singer, B.: In progress in nucleic acid research and molecular biology, ed. Cohn. (Academic Press, New York), vol 15. 1975; pp 219-284.
- 17) Wogan, G.N., Croy, R.G., Essigmann, J.M., Groopman, J.D., Thilly, W.G., Skopek, T.R., and Liber, H.L.: Mechanism of action of aflatoxin B₁ and sterigmatocystin: relationships of macromolecular binding to carcinogenicity and mutagenicity. In: P.E. Emmelot and E. Kreik (eds.). Environmental carcinogens: Occurrence, Risk Evaluation and Mechanisms. pp 97-121. Amsterdam: Elsevier/North Holland Pub. Co., 1979.
- 18) Schabort, J.C. and Steyn, M.: Substrate and PB inducible aflatoxin-4-hydroxylation and aflatoxin metabolism. Biochem. Pharmacol., 1969; 18: 2241-2252.
- 19) Buckley, J.D., O'Connor, D.J. and Craig, A. W.: Pretreatment with acetylaminofluorene enhances repair of O⁶-methylguanine in DNA. Nature (Lond.), 1979; 281: 403-404.
- 20) Montesano, R., Bersel, H., and Margison, G. P.: Increased excision of O⁶-methylguanine from rat liver DNA after chronic administration of dimethylnitrosamine. Cancer Res., 1979; 39: 1798-1802.
- 21) Warwick, G.P. and Roberts, J.J. Persistent binding of butter yellow metabolites to rat liver DNA. Nature (Lond.), 1967; 213: 1206-1207.
- 22) Kreik, E.: Persistent binding of a new reaction product of the carcinogen N-hydroxy-N-2-acetylaminofluorene with guanine in rat liver DNA in vivo. Cancer. Res., 1972; 32: 2041-2048.
- 23) Lin, J.K., Miller, J.A., and Miller, E.C.: Structures of hepatic nucleic acid bound dyes in rats given the carcinogen N-methyl-4-aminoazobenzene. Cancer Res., 1975; 35: 844-850.
- 24) Westra, J.G., Kriek, E., and Hittenhausen, H.: Identification of the persistently bound form of the carcinogen N-acetyl-2-amino-fluorene to rat liver DNA in vivo. Chem. Biol. Interact., 1976; 15: 149-164.
-