

Aflatoxin B₁ 투여 마우스의 간 기능 효소 및 간 손상에 미치는 항 산화비타민의 효과

박선자¹⁾, 박정현²⁾, 박종선¹⁾, 서숙재³⁾, 정덕화²⁾

- Abstract -

Key Concept : Aflatoxin B₁, Hepatotoxic, Antioxidant vitamin

The Effect of Antioxidant Vitamins on Liver Function Enzymes and Hepatic Damage of Aflatoxin B₁ treated mice

Park, Seon Ja¹⁾, Park, Jung Hyun²⁾, Park, Jong Sun¹⁾, Seo, Sook Jae³⁾, and Chung, Duck Hwa²⁾

Aflatoxin B₁(AFB₁) is a potent hepatotoxic and hepatocarcinogenic mycotoxin in human beings. It is accumulated in animal tissues and injured cell through variable metabolic pathway. This study was conducted to determine the effect of antioxidant vitamins on liver function enzymes and hepatic damage of AFB₁ treated mice. The 6 weeks old male ICR mice were randomly separated 6 groups, vehicle solvent or vitamin C(10 mg/kg/day) and vitamin E(63.8 mg/kg/day) were administered by interaperitoneal(i.p.) injection and 1 hr later, vehicle solution(DMSO) or AFB₁(0.4 mg/kg) were injected. The results obtained as follow ; The levels of liver function enzymes such as GOT, GPT, LDH, and alkaline phosphatase, in sera of mice were remarkably elevated by treatment with AFB₁ only. However, those enzymes were significantly alleviated by co-treatment with antioxidant vitamins($p < 0.01$). Especially the levels of LDH and ALK phosphatase were similar to those of control groups($p < 0.01$). The transmission electron microscopy(TEM) image of intracellular microrganelles on the liver cell of mice was also degenerated extremely by treatment with AFB₁, but vitamin C and vitamin E gave good effects on cellular deformation. The intracellular microrganelles such as mitochondria, endoplasmic reticulum, nucleus and nucleic membrane were nearly disappeared the cellular deformation by antioxidant vitamins co-administration. With above results, we could estimated that antioxidant vitamins blocked AFB₁ induced hepatic cell damage.

* 1) Department of Nursing, Chinju Health College

2) Department of Food Science & Technology, Gyeongsang National University

3) Department of Biology, Gyeongsang National University

Corresponding author : 박선자

1. 서 론

Aflatoxin은 발암성이 강하다는 것 이외에도 돌연변이성(mutagenicity), 기형발생성(teratogenicity) 등이 있으며, 생활환경에서 그 생성 균주의 자연오염이 용이하고 열에 대하여 저항성이 커서 280~300℃에서 분해되는 등 일반 식품과 같은 가공, 처리로는 불가능하다는 점 등으로 더욱 위생상의 문제를 크게 하고 있다.

Patterson(1973)에 의하면 aflatoxin은 종에 따라 감수성에 차이가 있는데 사람, 쥐, 무지개 송어, 기니아피그, 원숭이 등에서 원발성 간 세포암을 유발하는 발암 인자로 알려져 있다. Aflatoxin은 여러 가지 유사체들이 있는데 그 중 가장 많은 것이 aflatoxin B₁ 이고 가장 강력한 발암성을 나타낸다. Krishnamarchari, Bhat, Nagajaran and Tilak(1975)은 aflatoxin이 드물게 급성 중독을 일으키는 것으로 보고되고 있다. 그 예로서 인도 서부 지역에서 수주 동안 하루에 2~6mg의 aflatoxin을 섭취한 사람에게서 급성 간 질환을 관찰할 수 있었다는 보고가 있다. 또한 작은 양으로 장시간 노출 시에는 원발성 간암을 유발할 가능성이 있다. 보고된 바에 의하면 소아에서의 Reye 증후군과 Kwashiorkor 환자에서 다량의 aflatoxin 이 검출되어져 학계의 관심을 끌었다 Hendrickse, Coulter and Lamplugh, 1982). Aflatoxin의 병태 생리적 작용에 있어서는 세포막의 불안정성 및 mitochondrial swelling을 유발한다는 보고가 있고(Doherty and Campbell, 1972, 1973), 이는 주로 간에서 대사되며 간의 탄수화물, 지방, 단백질 대사 활동을 억제한다(Horton, B. J., Horton, J. D. and Sabine, J. R. 1972)고 알려져 있다. 이외에도 아시아와 아프리카 일부의 역학적 조사에서 음식물에 포함된 aflatoxin의 양과 원발성 간암의 발병과 상당한 연관성이 있다고 보고된 바 있다(Wu, Wei, Ku, G, 1984).

이러한 Aflatoxin의 식품에서의 오염 및 aflatoxin에 오염된 음식을 많이 섭취하는 사람들에 있어서 혈액이나 소변에서의 aflatoxin 의 노

출정도를 측정하는 법에 대해서 외국에서는 많은 연구가 이미 행해졌으나, 국내에서는 아직도 활발하지 못하다. 최근 이영준(1991)은 사람의 뇨(urine)에서 aflatoxin을 검출하여 aflatoxin의 잔존량과 간병변과의 연관성을 알아보았다.

한편, aflatoxin이 간독성을 나타내는 기작에 대한 연구들 중 특히 Omar 등(1996)은 aflatoxin의 독성이 신장의 microsome에서 NADPH 의존성 lipid peroxidation이 일어나는 산화적 과정을 거치면서 독성을 일으킨다고 보고하였고, 이로 인한 지질과산화 반응이 유발되면 유해한 독성물질이 생성되어 여러 종류의 질병을 일으킨다고 한다(Jacob, 1994).

최근 aflatoxin으로 인한 세포손상 및 암발생 과정을 방어할 수 있는 항산화제의 적용에 대한 관심이 높아지고 있다. 이들 여러 항산화제 중에서 특히 비타민 C 와 비타민 E의 적용에 대하여 여러 가지 연구들이 보고되고 있다(Namika, 1990). 그 중 vitamin C는 독소를 포함한 여러 가지 promutagen의 산화적 대사 과정을 저해할 수도 있으며, 산화 환원 완충계에서 유해한 free radical을 제거하여 adduct 형성을 저지시킨다(Sato et al, 1990)고 한다. Vitamin E 또한 대표적인 지용성 비타민으로서 free radical의 손상으로 부터 인체를 보호해주는 항산화제로 잘 알려져 있다. 아울러 Smigel(1992)은 비타민 A와 비타민 C는 암발생 예방에 대한 효과 및 helper T-cell (T_H)의 활성을 향진시킨다고 하였다. Bendich등(1984)은 비타민 E가 mitogen에 대한 기니아피그의 면역 반응을 향진시킨다고 보고하였다. 그러나 이러한 항산화제들이 NADP의존성 AFB₁의 대사 및 잔류에 영향을 준다는 보고는 거의 발표되지 않고 있다.

그리고 우리 나라 사람의 식생활에서 주식이 곡식이며 또한 곡식을 재료로 만든 가공식품을 많이 섭취하고 있는 실정인데도 불구하고 적절한 곡물 보관 시설 및 유통과정이 미비한 우리의 현실에서 aflatoxin의 오염은 상당히 있을 것으로 예상되며, 이로 인한 우리 나라 사람들의 원발성

간암 발병에 aflatoxin 이 중요한 원인이 될 수 있다고 생각된다. 그러므로 본 연구에서는 실험 동물의 체내에 aflatoxin B₁을 단독 투여하거나 항산화제인 vitamin C 및 vitamin E와 혼합 투여하여 *in vivo* 상태에서 유도된 세포손상 과정에 있어서의 병리적 변화(pathogenesis)에 대하여 간 독성 유발 요인과 연관된 간기능 효소들(Liver Function Enzymes)의 변화를 알아보고, 항산화제인 vitamin C 와 vitamin E를 혼합 투여하여 간 독성에 미치는 효과를 평가하였다. 아울러 전자 현미경 실험에 의한 형태적 관찰을 통하여 이를 확인하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물에 투여된 Aflatoxin B₁(AFB₁), vitamin C(VC), vitamin E(VE)는 Sigma 제품을 사용하였다. 실험에 사용한 주요 기기는 homogenizer (Nihonseiki kaisha, AM-11, Japan), 초박절기 (Ultracut, Reich-ert-Jung, Germany), 투과전자 현미경(Hitachi H-600) 등을 사용하였다.

2. 실험대상

본 실험을 위하여 대한실험동물센터로부터 ICR 계통의 생후 6주, 평균 체중 30g의 수컷 마

우스를 구입하여 동물 사육장에서 1주일간 적응 시킨 후 사용하였다. 사육장은 25℃를 유지토록 하였으며 명암주기는 자연채광으로 하고 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 군당 8 마리씩 6군으로 나누었으며, 모두 복강투여로 2일에 한번씩, 4회 반복투여 하였다. 항산화비타민 및 이들 용매를 투여 1시간 후 AFB₁ 및 AFB₁의 용매로 사용된 DMSO를 투여하였다. 즉, 대조군인 제1군의 경우 비타민 C의 용매인 0.1M NaHCO₃ 50 μ l 투여 후 AFB₁의 용매로 사용된 DMSO 50 μ l를 투여하였고, 제2군의 경우 비타민 E의 용매인 corn oil 50 μ l 및 DMSO 50 μ l를 투여하였다. 제 3군은 0.1M NaHCO₃ 50 μ l 투여 후 0.4 mg/kg 농도의 AFB₁ 50 μ l를 투여하였으며, 또한 제4군은 corn oil 50 μ l 투여 후 0.4 mg/kg 농도의 AFB₁ 50 μ l를 투여하였다. 제5군은 수용성 항산화 비타민의 효과를 보기 위해 vitamin C를 10mg/kg의 농도로 투여하고 1시간 후 AFB₁을 투여하였다. 제6군은 지용성 항산화비타민의 효과를 비교하기 위해 vitamin E를 63.8 mg/kg의 농도로 투여하였으며 1시간 경과 후 AFB₁을 복강 내 투여하였다.

첫 번째 투여 후 8일째 ethyl ether 마취시키고 해체하여 실험을 실시하였다. 혈액은 심장에서 채혈하였으며, 50ml 주사기를 사용하여 차가운 PBS(0.1M, pH 7.4)를 복부 대정맥을 통해 주입하여 혈액을 제거한 다음, 간을 적출 하여 차가운 PBS(4℃)에 담가 잔여혈액을 다시 제거한 후 간

Table 1. Administration contents of the vehicle solvent, vitamin C, vitamin E and aflatoxin B₁ refer to each group

Groups	Contents	I.P. injected dose	No. of animals
G1	0.1M NaHCO ₃ + DMSO	a+e	8
G2	Corn oil + DMSO	b+e	8
G3	0.1M NaHCO ₃ + AFB ₁	a+f	8
G4	Corn oil + AFB ₁	b+f	8
G5	vitamin C + AFB ₁	c+f	8
G6	vitamin E + AFB ₁	d+f	8

a ; 50 μ l of 0.1M NaHCO₃, b ; 50 μ l of Corn oil, c ; 10mg/kg of vitamin C, 50 μ l, d ; 63.6 mg/kg of vitamin E, 50 μ l, e ; 50 μ l of DMSO, f ; 0.4 mg/kg of AFB₁, 50 μ l

무게를 재고 실험에 사용하였다.

3. 실험방법

1) 체중 및 간의 무게 측정

실내온도 25℃의 자연채광에서 물과 식이를 자유롭게 섭취하도록 하였으며 매일 일정한 시간에 마우스의 체중을 측정하여 통계 처리하였다. 또한 해체시 간을 적출하여 4℃ PBS(0.1M, pH 7.4)에 담가 잔여 혈액을 제거한 다음 무게를 측정하였다.

2) 혈청 중의 간기능 관련 효소의 활성 측정

혈청에서의 간기능 관련 효소인 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT)측정은 Reitman-Frankel법에 준한 방법으로 GOT/GPT kit(Shinyang chemical, co., Korea)를 사용하였으며 Karmen unit로 나타내었다. Lactate dehydro-genase(LDH)는 LDH-LQ(Asan, co)를 사용하여 Wróblewski unit로 나타내었으며, alkaline phosphatase(ALK. phosphatase)는 kind-king 측정법으로 만들어진 New-K-PHOS를 측정 kit로 하여 그 활성치는 King-Armstrong(K-A)단위로 나타내었다.

3) 전자현미경적 관찰

대조군 및 AFB₁ 단독투여 군, AFB₁과 항산화 비타민을 함께 투여한 군의 간 조직을 각각 1-2 mm³의 크기로 잘라서 2.5% glutaraldehyde로 전고정한 후 1% osmium tetroxide로 후고정을 하였다. 이 때 사용하는 모든 시약은 0.2 μm filter로 여과한 0.1M 인산완충용액으로 희석하였으며, 동일한 완충용액으로 세척하였다. 시료를 알콜농도 상승 순(60%-100%)으로 탈수하고 propylene oxide로 조직을 치환시킨 다음 epon 812에 포매하였다. 포매된 조직을 60℃ oven에서 24시간 중합시킨 후 초박절기(Ultracut, Reichert-Jung)를 이용하여 초박절편(70 nm)을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 투과전자현미

경(Hitachi H-600, Japan)으로 75 kV에서 관찰하고 사진 촬영하였다.

4) 통계처리

대조군과 AFB₁ 투여 및 항산화 비타민 혼합 투여군 사이의 결과치는 평균치와 표준편차로 표기(mean ± S.D.)하고 이들에 대한 통계적 처리는 SAS(Strategic Application Software, version 6.12)program을 이용하여 one-way ANOVA 분석을 실시한 후 유의성이 있는 경우 사후 분석으로 다중 비교의 하나인 Scheffe' 검정을 실시하여 통계적 차이를 검증하였다. 각 군의 유의성은 $p<0.05$ 및 $p<0.01$ 수준에서 의의를 평가하였다.

III. 결 과

1. 체중 및 간의 무게에 미치는 영향

ICR mice에 AFB₁ 및 AFB₁과 항산화비타민을 혼합 투여한 후 AFB₁에 대한 전반적인 영향을 조사하기에 앞서 체중을 매일 일정한 시간에 측정된 결과 Table 2와 같이 AFB₁투여 후 3일째까지는 각 군별 특별한 차이가 없었으나 투여 후 4일째부터는 $p<0.01$ 의 유의수준에서 군별 현저한 차이를 보였다. 또한 마우스 해체시 간의 무게를 측정된 결과 Table 3에 제시된 바와 같이 대조군과 항산화제 혼합투여군 및 AFB₁ 단독투여군에 있어서 유의한 차이를 볼 수 있었다($p<0.01$).

3. 간 기능 효소(liver function enzyme)에 미치는 영향

AFB₁ 투여군의 혈청에서 GOT, GPT, LDH, ALK. Phosphatase의 혈청 수준이 Table 4와 같이, AFB₁ 단독 투여군에서 현저하게 증가하였다. 특히 GOT는 AFB₁ 단독투여군인 3군과 4군에서 각각 182.37 ± 5.48 , 208.47 ± 1.84 (IU/unit)였으나 항산화비타민 투여군인 5군과 6군에서는 129.70 ± 15.07 , 130.27 ± 1.29 로 유의성 있는 감소를 보였

Table 2. The body weight of mice as following elapsed time in each group

	BODY WEIGHT							
	1D	2D	3D	4D	5D	6D	7D	8D
	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD
G1	33.62±1.55 a	33.76±1.34 a	33.90±1.27 a	34.98±1.10 a	35.62±0.77a b	36.11±0.86a b	37.11±0.53a b	37.40±1.41 b
G2	34.60±1.41 a	34.77±0.69 a	34.98±0.88 a	35.38±1.24 a	36.43±0.58 a	37.40±0.36 a	37.76±0.42 a	37.52±1.90 a
G3	34.25±1.39 a	34.46±0.91 a	34.16±1.07 a	33.13±0.84a b	32.16±0.78c d	32.08±1.42c d	31.88±0.95 c	31.65±1.31 c
G4	33.58±0.94 a	33.81±0.92 a	33.28±1.01 a	32.22±2.28 b	31.26±1.37 d	30.47±1.02 d	30.24±0.58 d	29.91±1.32 c
G5	32.97±1.25 a	33.12±1.52 a	33.86±1.72 a	33.32±1.13a b	33.11±1.54 c	33.07±1.16 c	32.87±1.59 c	32.02±1.10 ac
G6	33.77±1.36 a	34.13±1.33 a	34.28±1.74 a	34.17±1.67 ab	33.90±1.19 bc	33.67±0.64 c	33.37±1.16 c	32.18±0.81 a
F	1.56	2.17	1.51	5.67**	27.07**	56.03**	77.10**	4.52**
p	0.1913	0.0746	0.2065	0.0004	0.0001	0.0001	0.0001	0.002

Values within the same column with same alphabets are not significantly different. (**, $p < 0.01$) among the groups by one way ANOVA with Scheffe' test. D ; Days as elapsed time. All values represent mean±S.D(Standard Deviation). Description related to groups was revealed in detail on Table 1.

Table 3. The liver weight of mice as following elapsed time in each group

	G1(n=8)	G2(n=8)	G3(n=8)	G4(n=8)	G5(n=8)	G6(n=8)	F	P
Liver (g)	1.62±0.24 a	1.55±0.14 a	1.29±0.03 b	1.23±0.04 b	1.49±0.06 a	1.51±0.07 a	13.77**	0.0001

Values within the same column with same alphabets are not significantly different. (**, $p < 0.01$) among the groups by one way ANOVA with Scheffe' test. All values represent mean±S.D(Standard Deviation). Description related to groups was revealed in detail on Table 1.

Table 4. Alteration of the liver function enzymes in mice serum.

	GOT(IU/L)	GPT(IU/L)	LDH ¹⁾	ALK. Phosphatase ²⁾
	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD
G1	75.33± 2.27 d	73.47± 2.66 c	540.19±10.60 b	2.31±0.10 b
G2	76.09± 2.94 d	76.41± 5.72 c	534.81±12.58 b	2.47±0.10 b
G3	182.37± 5.48 b	283.39± 5.41 a	796.97± 8.49 a	12.61±1.82 a
G4	208.47± 1.84 a	289.89±18.83 a	802.72± 4.84 a	13.79±2.10 a
G5	129.70±15.07 c	138.12± 8.40 b	537.76±16.18 b	3.03±0.15 b
G6	130.27± 1.29 c	141.83± 3.95 b	541.01±18.03 b	3.18±0.05 b
F	383.61**	663.92**	688.01**	135.67**
p	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

Values within the same column with same alphabets are not significantly different(n=6) (**, $p < 0.01$) among the groups by one way ANOVA with Scheffe' test. ¹⁾Wroblewski unit ²⁾K-A unit. All values represent mean±S.D(Standard Deviation). Description related to groups was revealed in detail on Table 1.

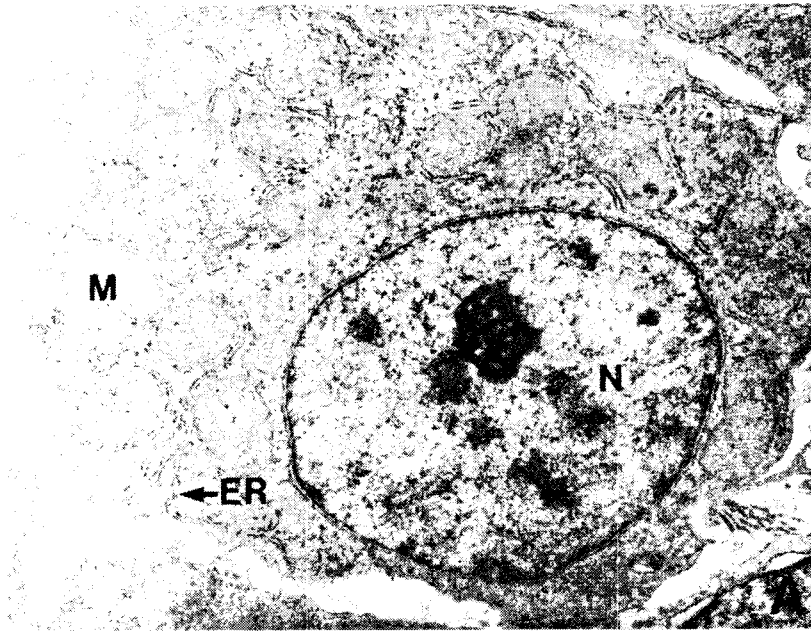
으며, GPT 또한 단독투여군인 3군과 4군에서는 각각 283.39 ± 5.41 , 289.89 ± 18.83 (IU/unit)인 반면 항산화비타민 혼합투여군인 5군과 6군에서는 각각 138.12 ± 8.40 , 141.83 ± 3.95 로 $p < 0.01$ 의 유의수준에서 통계적으로 유의성 있는 감소를 보였다. 이러한 경향은 GPT에서도 유사한 결과를 보여주었고, LDH, ALK. phosphatase의 혈청 수준에서는 항산화비타민 투여군에서는 대조군과는 유의한 차이를 나타내지 않았지만 3군, 4군과는 $p < 0.01$ 의 유의수준에서 통계적인 차이를 나타내었다.

4. 전자현미경(TEM)에 의한 형태적 관찰

AFB₁의 간세포내 축적에 의한 미세구조 변화를 관찰하기 위해 전자현미경적 실험을 수행한 결과 대조군의 경우 Fig. 1A에서와 같이 핵, 핵막이 정상적인 모양을 하고 있으며, 미토콘드리아에서도 규칙적인 크리스테(cristae)가 관찰되었다. 또한 미토콘드리아 주변의 소포체도 전형적인 평형구조를 나타내고 있다. Fig. 1B는 AFB₁ 단독 투여 군으로 핵과 핵막이 팽창되어 있으며 소포체가 긴 막대 모양에서 원형으로 변형되어 나타났고 미토콘드리아는 크리스테(cristae)가 분열되어 속이 빈 형태를 보여주고 있으며, 지방 과립들이 나타나고 있다. 한편 vitamin C 혼합 투여군(Fig. 1C)에서는 핵이 약간 팽창된 모양을 하고 있으나 핵막의 모양이 거의 정상으로 되었으며 소포체와 미토콘드리아도 거의 정상 모양을 회복하고 있다. 그리고, vitamin E 혼합 투여군(Fig. 1D)도 vitamin C 혼합 투여군과 유사한 결과를

나타내고 있으나 핵막이 부분적으로는 비정상이며 미토콘드리아의 내부 크리스테가 아직은 불분명한 모습을 보였다. 소포체도 원형에서 막대기 모양으로 회복되었으나 완전히 정상적인 모양과는 차이가 있었다. 따라서 항산화비타민 투여군은 AFB₁ 단독 투여군에 비하여 전체적으로 회복된 상태를 보여주고 있으나 대조군에 비해서는 어느 정도 독성의 영향을 받은 것으로 나타났다. 그리고 Fig. 2는 AFB₁ 축적에 의한 간세포 내 미토콘드리아의 변형을 관찰하기 위해 고배율로 확대한 사진(26,000×)이다.

Fig. 2A는 크리스테 형태가 분명한 정상적인 미토콘드리아를 보여 주고있으며 소포체 역시 원래의 정상적 모양을 유지하고 있으며, Fig. 2B는 AFB₁ 단독 투여군으로 크리스테의 형태가 파괴되어 속이 빈 미토콘드리아 모양을 하고 있고, 정상 보다 팽윤된 모양을 보이고 있다. Fig. 2C는 vitamin C 혼합 투여군으로 미토콘드리아의 내부가 다소 회복되었으나 아직도 크리스테가 불분명하게 나타났다. 그러나 미토콘드리아의 크기는 정상으로 회복되어 있었다. 소포체의 모양 역시 완전 회복 상태는 아니지만 원형으로 변형된 형태가 가끔씩 관찰된다. 또한 Fig. 3A에서는 AFB₁을 단독 투여한 군의 간에서의 동양혈관(sinusoid) 주변에 나타난 섬유화(fibrosis) 현상을 확대한 것으로 많은 콜라겐 섬유 다발들이 모여서 이미 섬유화 현상이 상당히 진행되었음을 나타내고 있다. 또한 Fig. 3B에서는 혈관 주변의 많은 이물질들이 탐식되어 있는 대식세포(macrophage)를 보여주고 있다.



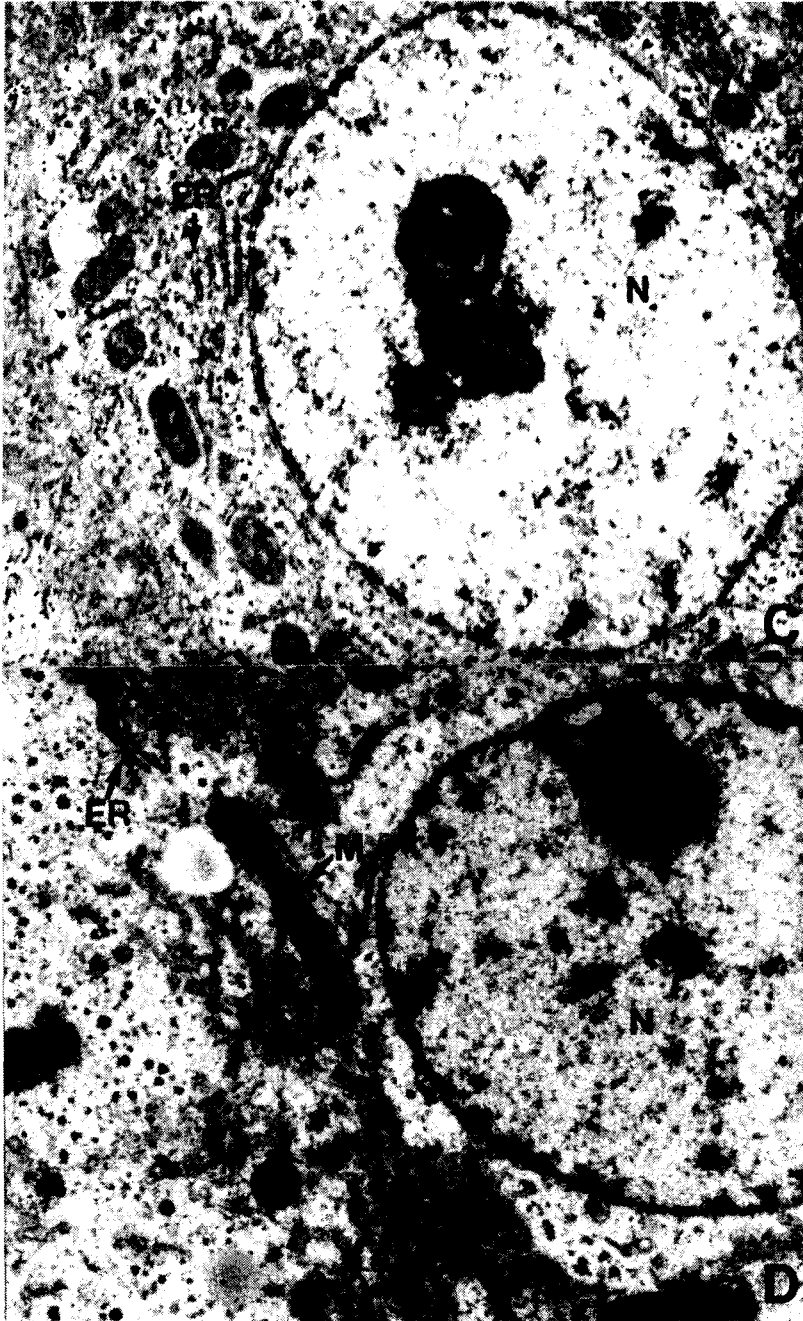


Fig. 1. Electron micrograph of ultrastructural feature of the 6-week mouse liver. A, control group ; B, aflatoxin administrated group ; C and D, aflatoxin co-administrated with vitamin C(C) and E(D) group. 16,000x
M, mitochondria ; N, nucleus ; ER(arrows), rough endoplasmic reticulum ; LD, lipid droplet.

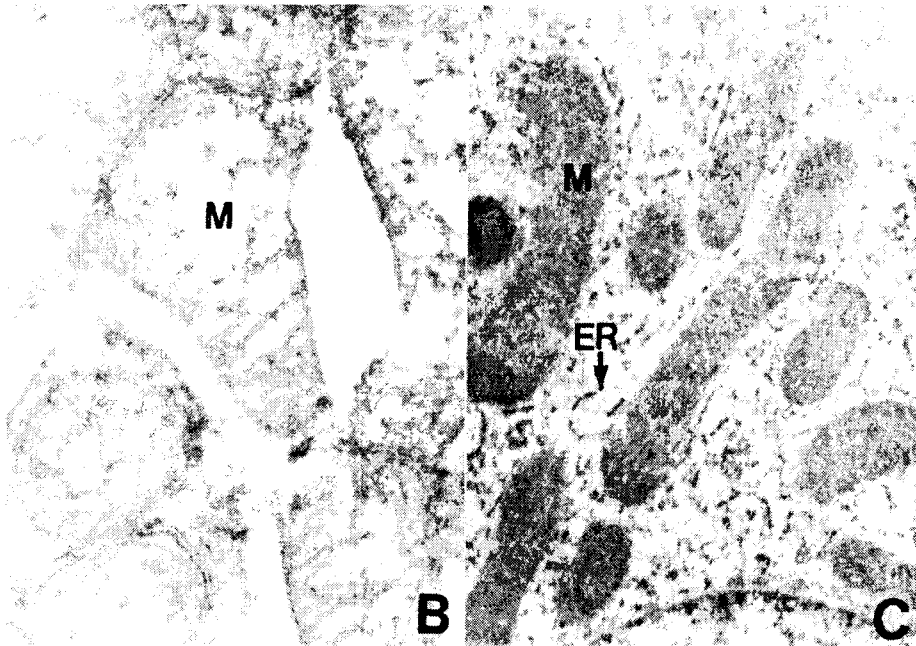


Fig. 2. Electron micrograph of ultrastructural feature of the 6-week mouse liver. A, control ; B, aflatoxin administrated group ; C, aflatoxin co-administrated with vitamin C group. 26,000x
M, mitochondria ; ER, rough endoplasmic reticulum ; LY, lysosome.

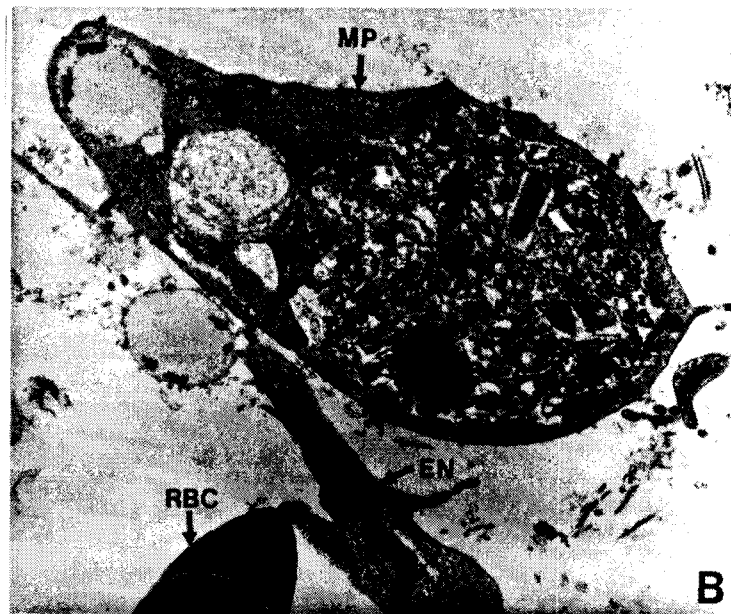


Fig. 3. Fibrosis(A) and macrophage(B) found in the 6-week mouse liver of aflatoxin administrated group. A, 26,000x ; B,16,000x
 F. collagen fiber ; MP. macrophage ; EN, endothelial cell ; RBC. red blood cell.

IV. 고 찰

대표적인 환경성 오염물질 중 하나인 AFB₁은 방치해 둔 곡류, 건과류, 또는 가축사료 등에서 흔히 발견되는 곰팡이로부터 생성되는 mycotoxin으로 가장 많고 가장 강력한 독성과 발암성을 가지고 있다. 이것은 주로 음식을 통하여 동물이나 사람에게 유입되어 강력한 간 독성 물질이 되며 돌연변이 및 간암 유발원이 되기도 한다. 실제로 원발성 간암의 발생률은 aflatoxin 섭취량이 많은 지역일수록 높은 발생 율을 보여주는 반면에 유럽 및 미주 지역 등에서는 낮은 발생 율을 보여준다(Doll, Payne, and Waterhouse, 1966). 간암의 원인으로 알려진 것은 간경화(liver cirrhosis), B형 간염(hepatitis type B), alcohol, hemochromatosis, glycogen storage disease, non-A non-B viral hepatitis, 간흡충, 흡연, aflatoxin 등이 있는데, 전세계적으로 간암 유발의 중요한 인자로 알려져 있는 것은 B형 간염이다. 따라서 우리 나라는 B형 간염의 발생 율이 높은 지역이고 간경화 및 간흡충 등 간질환이 상당히 흔한 지역일 뿐 아니라 곡물을 주식으로 하는 식생활 습관에 있어서 부실한 곡물저장 및 유통체계의 불안정성이 자주 노출되는 우리 현실로 미루어 볼 때 곰팡이의 대사 산물인 aflatoxin의 노출 위험이 크다고 할 수 있다. 따라서 이 mycotoxin이 간암 발생의 중요한 인자로 작용할 것으로 생각된다. Schoental(1970)은 화학적으로 다양한 물질인 pyrrolizodine alkaloids, alkyl nitrosamines, 7,12-dimethylbenz<a>anthracene, aflatoxin 등은 대사적 활성이 되면 암 전구 물질로 작용한다고 주장하였고 aflatoxin의 발암성 대사산물 2, 3 epoxide를 제시하였다. Aflatoxin의 독성 중 하나로 면역결핍유발이 있는데 특히 세포면역결핍을 유발시키고 B형 간염과 함께 co-carcinogen으로 작용하여 원발성 간세포 암을 유발한다는 보고가 있다(Liu, Zang, Wu, 1983). 이러한 연구를 바탕으로 하여 본 실험에서 나타난 체중 및 장기 무게에 미치는 영향에 있어서

AFB₁을 투여한 군과 항 산화 비타민을 혼합 투여한 군에서의 체중 및 장기 무게에 미치는 영향을 조사하였다. 24시간 주기로 매일 같은 시간에 체중을 측정된 실험 결과에서 나타난 바와 같이 AFB₁ 단독 투여 군에서 4일째부터 유의성 있게 체중이 감소하였다. Ibeh(1998)의 실험에서 AFB₁을 14일간 투여한 군에서 AFB₁ 단독투여군의 체중이 $p < 0.05$ 수준의 유의성있는 감소를 나타내었으며 항산화 비타민 혼합 투여 군에서는 AFB₁ 단독투여군에 비해 체중 감소에서 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다는 보고가 있었다. 그러나 본 실험에서는 항산화 비타민 혼합 투여 군에서도 체중 감소가 적게 나타났으므로 항산화 비타민의 효과를 한번 더 확인할 수 있었다 ($p < 0.01$). 한편, Vitamin C 혼합 투여 군과 vitamin E 혼합 투여 군간에는 큰 차이가 없었다. 8일째 mouse 해체시 간의 무게를 측정된 결과에 의하면 간의 무게는 항 산화 비타민 투여 군은 대조 군과 거의 차이가 없을 정도로 간의 무게가 감소되지 않았으나 AFB₁ 단독 투여 군에서는 통계적 유의성있게 감소 경향이 나타났다. 반면 신장의 무게에 있어서는 큰 변화가 없었다(자료 미제출). 이러한 결과는 AFB₁이 특히 hepatic damage를 유발한다는 종래의 여러 학설들을 뒷받침하는 가설이 될 수 있으며 또한 체중 및 장기의 무게는 식이 소비량과의 상관성을 가지며 대조 군에서 시간이 경과함에 따라 식이 소비량이 차츰 증가(자료 미제출)하는 반면 AFB₁ 단독 투여 군에서는 2일째까지는 증가하였으나 3일째부터 급격한 감소 경향을 나타내고 있으며 이는 AFB₁의 투여 일 수가 증가 될수록 점차 감소하였다. 항 산화 비타민 투여 군에서는 대조 군에서처럼 식이 소비량이 증가 하기는 하였으나 그 증가 정도가 완만하였다.

또한 혈청에서 간기능 상태를 나타내는 일차적 지표인 GOT, GPT, LDH, alkaline phosphatase를 측정된 결과 이러한 모든 liver function enzyme에 있어서 AFB₁ 단독 투여 군에서 그 수치가 유의하게 증가하였으며 항산화비타민 혼합투여군에

있어서는 그 증가 정도가 상당히 억제되었다 ($p < 0.01$). 특히 LDH에서는 거의 대조 군과 동일한 수준의 수치를 나타내었으므로 간조직 손상에 대한 항산화 효과는 vitamin C와 E 모두 유사하게 나타났다. 이것은 Shen, Han-Ming, Chen-Yang Shi, Hin-Peng Lee, and Choon-Nam Ong(1994)의 연구에서 AFB₁을 투여 후 시간 경과에 따라 혈청 중 GOT, GPT 수준을 측정해 본 결과 두 효소 모두 2일 제부터 유의하게 증가하였으며 5일째부터는 극히 저 농도를 유지한다고 하였다. 본 실험에서는 마지막 AFB₁ 투여 후 다음날 실험 동물을 해체하였으므로 어느 정도 혈중 농도가 상승되었을 때라고 생각한다. AFB₁ 단독 투여 군에서 간 기능에 관여하는 대부분의 효소가 유의적으로 증가하였다는 것은 심각한 간손상(liver cell damage)를 의미하며 이것은 또한 항산화 비타민 혼합 투여 군에서 그 증가 정도가 억제되었으므로 항산화적 효과(antioxidant effect)가 충분히 나타난 것으로 여기며 여기에 첨가하여, 사람에게 있어서 hepatocellular carcinoma (HCC)를 유도하는 oval cell proliferation의 marker로서 혈청 수준에서의 alphafetoprotein(AFP)의 상승을 연구(Sell, Xu, Huff, Kabena, Harvery and Dunsford, 1998)하였으므로 AFP에 대한 추가 검증이 필요하다고 생각된다.

한편 간세포 내 AFB₁의 축적 상태를 관찰하기 위한 전자 현미경적 실험에서 AFB₁ 투여군의 간세포에서 전자현미경으로 관찰된 핵막의 팽윤현상은 AFB₁에 의해 야기된 핵막의 불안전성에 기인한다고 생각되는데, 이러한 현상은 AFB₁이 세포내 리소좀의 효소를 방출시켜서 세포막이 불안전하게 된다고 보고한 바 있다(Prokrovsky, Kravchenko and Tutelyan, 1972). 또한 1973년 Doherty와 Campbell은 AFB₁ 투여군에서 관찰한 미토콘드리아의 팽윤 현상은 미토콘드리아의 크리스테에 존재하는 시토크롬 b, c, c₁ 사이의 전자전달반응의 저해 때문인 것으로 보고되었고, 한편으로는 DNP-inducible ATPase 활성이 저해되어 미토콘드리아가 팽윤한다는 보고도 있다.

본 실험에서 나타난 전자현미경적 결과로서는 미토콘드리아의 외형적인 변형만 관찰될 뿐 원인 규명은 또 다른 생화학적 실험이 요구될 것으로 생각한다. Theron(1965)에 의하면 AFB₁은 조면소포체에서 일찍이 리보솜을 탈락시키며, Pong과 Wogan(1970)은 조면소포체의 변형과 함께 리보솜이 파괴된다고 보고한 바 있다. Ibeh(1992)는 AFB₁에 오염된 쥐의 간세포에서 RNA 중합효소의 활성이 억제된다고 보고한 바 있는데 아마도 ribosomal RNA 생성도 같이 저해되어 조면소포체 형성과 유지에 유해한 영향을 주는 것으로 생각된다. 비타민 C나 E 혼합투여군에 있어서 핵막 핵막 등이 정상에 가깝게 회복된 현상은 이들 비타민의 항산화력에 의해 세포막 표면에 형성된 틈(nick)이나 팽창 상태가 가역적이고 반복적인 결합이 유도되어 핵막 핵막이 거의 정상 상태로 회복된 것으로 보여진다. 이와 같은 회복된 결과들은 Ibeh(1998) 등의 결과와 일치하는데, 쥐 정소에 alpha-tocopherol을 AFB₁과 혼합 투여한 경우에 정소 조직에서 AFB₁의 독성이 억제되었다고 보고한 바 있다.

1979년 Ryan등에 의한 보고에 의하면 미국에서 Reye 증후군을 가진 환자의 혈청에서 TLC방법으로 31.3 ng/ml 이라는 높은 측정치가 나왔다고 보고한 바 있고 Hendrickse(1982)에 의하면 수단 어린이에 있어서 Kwashiorkor 와 aflatoxin 사이에 상당한 연관 관계가 있다고 발표하였다. 최근 네델란드의 Hayes, van Nieuwenhuiz and Ratgeber(1984)은 기름 공장 직공들에 있어서 호흡기도를 통한 aflatoxin의 노출에 의해서 aflatoxin에 노출되지 않은 사람보다 발암율이 훨씬 더 높아진다는 것을 보고한 바 있다. 또 다른 흥미로운 보고는 중국에서 발표된 것으로 "duck hepatitis virus"의 잦은 감염이 있는 집오리에 있어서 aflatoxin이 오염된 사료를 먹인 오리에 있어서만 원발성 간세포 암이 발생하고 그렇지 않은 경우는 전혀 발생하지 않았다고 하는데(Sun, and Chu, 1984), 이는 간세포 암의 유발인자로 가장 널리 인정받는 B형 간염과 aflatoxin

의 상호관계에 대한 유추에 더 많은 의미를 주는 것이다.

이외에도 aflatoxin의 급성 작용을 보면 단백질 생성을 저해하며 면역을 억제하는 성질을 가지고 있다. 몇 가지 보고에 의하면 가금류에서 aflatoxin을 주었을 때 *Pasteurella*, *Salmonella*, *Candida* 등에 대한 저항력이 현저히 떨어진다는 보고가 있다(Hamilton and Harris, 1971). 그리고 가금류에서 aflatoxin reticuloendothelial system의 기능에 손상을 주어 순환계에서 colloidal carbon을 제거하지 못한다는 사실을 발표했었다(Michael, Thaxton and Hamilton, 1973). aflatoxin은 구조적으로 항응고제인 coumarine과 구조적으로 유사한데 Bababunmi와 Bassir(1969), Bassir, O. 와 Bababunmi, E. A(1969)는 rat liver에서 factor II와 VII의 합성을 억제하여 prothrombin time을 연장시키는데 비타민 k를 주면 환원된다는 것을 알게 되었다.

따라서 본 실험에서는 효소적, 세포 형태적 접근 방법을 시도하여 aflatoxin B₁의 hepatotoxicosis에 영향을 주는 여러 가지 요소와 이에 대한 항산화 비타민(vitamin C 와 vitamin E)의 방어 효과를 규명하였으며 향후 더욱 다양한 항산화 비타민의 적용으로 생활 환경에서 노출되기 쉬운 간손상을 방어하는데 도움이 될 것으로 사료하는 바이다.

V. 결론

AFB₁을 투여한 마우스의 간기능 효소와 간독성에 미치는 항산화 비타민의 영향을 알아보기 위하여 male ICR mice에 대조용매 및 항산화 비타민 C와 비타민 E를 복강내 주사를 통하여 각각 10mg/kg, 63.8mg/kg 씩 투여하였으며 1시간 후 0.4mg/kg의 AFB₁을 동일한 방법으로 투여하였다. 같은 방법으로 2일 간격으로 7일째 날까지 투여되었고, 8일째 해체하여 실험한 결과는 다음과 같았다.

1. 체중의 변화에 있어서 AFB₁ 단독 투여 군에서 투여 4일째부터 현저하게 감소되었으며($p < 0.01$), 항산화비타민 혼합 투여 군에서는 체중 감소정도가 완화되었다. 간 무게는 AFB₁ 단독 투여 군에서 유의성 있는 감소를 보였으며($p < 0.01$), 항산화 비타민 혼합 투여군에서는 대조군과 거의 차이가 없을 정도로 그 독성이 저해되어 나타났다.

2. 간기능효소(Liver function enzym)의 측정 결과 혈청내 GOT(=AST), GPT(=ALT), LDH, ALK. phosphatase 수준이 AFB₁ 단독 투여 군에서 눈에 띄게 증가($p < 0.01$)하였으며 항산화비타민 혼합 투여군에서는 대조군과 통계적으로 차이가 없을 정도로 독성이 완화되었다. 특히 LDH의 혈청 수준에 있어서는 AFB₁과 항산화 비타민 혼합 투여군에서의 경우 거의 대조군과 유사하였다.

3. 전자현미경적 관찰에서 AFB₁의 복강내 주사를 통하여 야기된 암 발생적 병리적 변화에서 세포소기관의 퇴행을 포함한 간에서의 미토콘드리아, 소포체, 핵과 핵막 등의 형태를 관찰한 결과 비타민 C와 E를 혼합 투여한 군에서 세포 변형정도가 상당히 억제되었다.

이상의 결과들에서 볼 때 마우스의 간에서 AFB₁에 의하여 유발된 독성은 항산화 비타민을 혼합 투여하므로서 독성 정도가 통계적으로 유의성 있게 억제되었다. 이는 생체 내에서의 AFB₁의 독성 발현이 간에서의 대사 중 산화적 작용으로 인한 근거를 제시하고, 아울러 항산화 비타민은 곰팡이 독소인 AFB₁에 의한 세포손상을 방어하는데 효과적이라고 생각되며 향후 인체에 영향을 주는 여러 가지 환경 독소에 대한 보다 다양한 항산화 비타민들과 관련된 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 이영준(1991). 韓國人의 尿中 Aflatoxin B₁ 測

定. 경상대학교 석사학위 논문

2. Bababunmi, E. A. and Bassir, O(1972). Effects of Aflatoxin B₁ on the swelling and adenosin triphosphate activities of mitochondria isolated from different tissues of the rat. FEMS Lett., 26, 102-104
3. Bababunmi, E. A. and Bassir, O(1969). The effect of aflatoxin on blood clotting in the rat. Br. J. Pharmacol., 37, 497-500
4. Bassir, O. and Bababunmi, E. A(1969). Inhibition of blood clotting factors by aflatoxin. W. Afr. J. Biol. Appl. Chem., 12, 28-32
5. Bendich A, D'Apolite P, Gabriel E. and Machlin LJ(1984). Interaction of dietary vitamin C and vitamin E on guinea pig immune responses to mitogens. J. Nutr., 144, 1588-1593
6. Doherty, W. P. and Campbell, T. C(1972). Inhibition of rat-liver mitochondria electron-transport flow by aflatoxin B. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 3, 601-602
7. Doherty, W. P. and Campbell, T. C(1973). Aflatoxin inhibition of rat-liver mitochondria. Chem. Biol. Interact., 7, 63-67
8. Doll, R., Payne, P., Waterhouse, J(1966). Cancer incidence in five continents international union against cancer and springer-verlag, heidelberg. Hepatitis due to aflatoxicosis. Lanceti., 1061-1063
9. Hamilton, P. B. and Harris, J. R(1971). Interaction of aflatoxicosis with candida albicans infection and other stress in chickens. Poult. Sci., 50, 906-912
10. Hayes, R. B., van Nieuwenhuiz, J. P., Ratgever, J. W(1984). Aflatoxin exposure in the industrial setting: an epidemiological study of mortality. Food. Chem. Toxic., 22, 39-43
11. Hendrickse, R. G., Coulter, J. B. S., Lamplugh, S. M(1982). Aflatoxin and Kwashiorkor : a study of Sudanese children. Brit. J. Med., 285, 843-846
12. Horton, B. J., Horton, J. D. and Sabine, J. R(1972). Metabolic controls in precancerous liver. Eur. J. Cancer., 8, 437-443
13. Ibeh, I. N(1992). The response of the reproductive system to dietary exposure to aflatoxin. Ph. D. Thesis, University of Benin Nigeria.
14. Ibeh, I. N and Saxena. D. K(1998). Effect of alpha-tocopherol supplementation on the impact of Aflatoxin B₁ on the testes of rats. Exp Toxic Pathol., 50, 221-224
15. Ibeh, I. N, Uraih N, Ogonor JI(1994). Dietary exposure to aflatoxin and human male infertility in Benin City, Nigeria. Inter J Fert Manpaus Stud., 39, 208-214
16. Jacob RA(1994). Nutrition, health and antioxidants. INFORM., 5, 1271-1275
17. Krishnamarchari, K. A. V. R., Bhat, R. V., Nagajaran, V. and Tilak, T. B. G(1975). Hepatitis due to aflatoxicosis. Lanceti., 1061-1063
18. Liu, Y. K., Zang, K. Z., Wu, Y. D(1983). Treatment of advanced primary hepatocellular carcinoma by I131-anti-AFP. Lancet., 531
19. Michael, G. Y., Thaxton, P. and Hamilton, P. B(1973). Impairment of reticuloendothelial system of chickens during aflatoxicosis. Poult. Sci., 52, 1206-1207
20. Namiki M. Antioxidants/antimutagens in foods. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr(1990)., 29, 273-300
21. Omar, R. F., Gelborn, H. V. and Rahimtula, A. D(1996). Effect of Cytochrome P450

- Induction on the Metabolism and Toxicity of Ochratoxin A. Biochemical Pharmacology, 51, 207-216
22. Patterson, D. S. P(1973). Metabolism as a factor in determining toxic action of aflatoxins in different animal species. Food Cosmet. Toxicol., 11, 287-294
 23. Pong, R. S. and Wogan, G. N(1970). Time course and dose-response characteristics of Aflatoxin B₁. Effects on rat liver RNA polymerase and ultrastructure. Cancer Res., 30, 294-304
 24. Prokrovsky, A. A., Kravchenco, L. V. and Tutelyan, V. A(1972). Effect of aflatoxin on rat liver lysosomes. Toxicol., 10, 25-30
 25. Ryan, N. J., Morgan, G. R., Hayes, A. W., Unger, P. D. and Siraj, M. Y(1979). Aflatoxin B₁ : its role in the etiology of Reye's Syndrome. Pediatrics., 64, 71-75
 26. Sato K, Niki E. and Shimasaki H. Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C(1990). Archives of Biochemistry and Biophysics., 279, 402-405
 27. Schoental, R(1970). Hepatotoxic activity of retrosine, senkirkine and hydroxysenkirkine in newborn rats, and the role of epoxides in carcinogenesis by pyrrolizidine alkaloids and aflatoxins. Nature(London)., 227, 401-402
 28. Sell S., Xu K. L., Huff W. E., Kabena L. F., Harvery R. B., Dunsford H. A(1998). Aflatoxin exposure produces serum alphafetoprotein elevation and marked oval cell proliferation in young male Pekin ducklings. Pathology., 30, 34-39
 29. Shen, Han-Ming , Chen-Yang Shi, Hin-Peng Lee, and Choon-Nam Ong(1994). Aflatoxin B₁-induced lipid peroxidation in rat liver. Toxicology and applied pharmacology., 127, 145-150
 30. Smigel K. Vitamin E moves on stage in cancer prevention studies(1992). J. Natl. Cancer Inst., 84, 996-997
 31. Sun, T. and Chu, Y(1984). Carcinogenesis and prevention strategy of liver cancer in prevalence areas. J. Cell. Physiol. Suppl., 3, 39-44
 32. Theoron, J. J., Liebenberg, N. and Jourbert, H. J. B. 1965. Histochemistry and electronmicroscopy of acute liver lesions induced by Aflatoxin B₁ in duckkilings. Nature(London)., 206, 908-909
 33. Wu, S., Wei, Y., Ku, G(1984). Study on urinary excretion of AFM₁ in Beijing and Zidong people. Chinese Journal of Oncology., 6, 163-167