

AFB₁에 노출된 마우스에서 Comet Assay와 Mitogenic Assay에 의한 항산화 비타민의 효과*

박 선 자**

- Abstract -

Key concepts ; Aflatoxin B₁, antioxidant vitamin, comet assay, mitogenic assay, LDL, VLDL

The Effects of Antioxidant Vitamins Via Comet and Mitogenic Assay in Mice Exposed to AFB₁

Seon Ja Park**

The objective of this study was to examine the effects of antioxidant vitamins on the cellular oxidant damage by observing the mitogenicity in the mouse spleen and the strand breaks of DNA in mouse blood induced by AFB₁.

Intraperitoneal(i.p.) injections of vitamin C(Vc) of 10 mg/kg and vitamin E(VE) of 63.8 mg/kg were repeatedly administered to male ICR mice of 6 weeks old at intervals of 4 times every 2 days. After one hour vitamin treatments, AFB₁ of 0.4 mg/kg was injected into the AFB₁ plus vitamin treated groups in the same way.

On the other hands, into the AFB₁ only treated group, only AFB₁ was injected without vitamins in the same method as above. The results of the experiment are as follows ; as regard to comet assay, DNA strand breaks were clearly present and they formatted a typical comet

* 본 연구는 경상대학교 BK 21 연구 지원에 의한 것입니다.

** 경상대학교 농업생명과학원 연수연구원

tail in the mice blood of the AFB₁ only treated groups.

However, comet tails apparently disappeared in AFB₁ plus antioxidant vitamins treated groups since oxidant damage was controlled in an almost similar level to the control group. Mitogenicity of the spleen also showed a similar tendency as before, and these differences were more remarkably observed in the reaction against Con-A, which is a T-cell mitogen. In these data, the statistical significance was $p < 0.01$. The LDL and VLDL levels were 408.72, 504.47 mg/dl respectively in the AFB₁ only treated groups.

Compared with the AFB₁ only treated groups, those of AFB₁ plus antioxidant vitamin treated groups decreased to 272.06(VC), 305.28 mg/dl(VE), respectively. On the other hand, HDL levels were diminished to 32.60, 29.60 mg/dl in AFB₁ only treated groups, compared to 42.23, 41.14 mg/dl in the AFB₁ plus antioxidant vitamins treated groups. But, blood glucose levels were not statistically significant.

I. 서 론

Aflatoxin B₁(AFB₁)은 사람을 포함한 다양한 종(species)의 포유동물에 있어서 간암 발생에 중요한 병원성 요인으로 간주되어 왔다(Smith, Lewis and Solomons, 1994). 특히 동물에서의 아플라톡신 감염증(aflatoxicosis)은 일반적으로, 황달(jaundice), 복수(ascites), 문맥성 고혈압(portal hypertension) 및 간부전(hepatic failure)과 같은 증상들을 동반한다(Robens and Richard, 1992).

또한, 이 곰팡이 독소는 간의 병리적 변화를 야기시키기도 하며, 혈청 속의 ALT(alanine amino transferase)와 AST(aspartate amino transferase) 증가와 같은 효소적 변화로 감염상태를 확인할 수도 있다(Robens and Richard, 1992 ; Netke 등 1997).

Rheal, Hisanori and Summers(2000)는 Sprague-Dawley rat에 3mg/kg의 AFB₁을 투여 후 MRI(magnetic resonance imaging) 촬영을 시간별로 연

속 시도해 본 결과 AFB₁에 노출 후 24시간에 간 문맥(HPV ; hepatic portal vein)과 간의 우측 중간 부분에 뚜렷한 간손상이 나타났다고 보고하였다.

한편, Kelly, Eaton, Guengerich, and Coulombe (1997)는 환경적 요인으로 AFB₁을 흡입할 경우 간 손상보다는 상대적으로 낮은 수준이지만, 사람의 폐 미소체(lung microsomes)에도 침범하여 원발성 폐암(primary lung cancer)을 야기시킨다고 하였다.

일찍이 Miller, E.C., Miller, J.A.(1951, 1981)에 의하면, 화학적 발암원은 일반적으로 procarcinogen(발암전구물질)의 형태로 체내에 흡수되어 대사과정을 거쳐 proximate carcinogen(인접 발암원)으로 변형되고, 더 나아가 ultimate carcinogen(최종발암원)이 되어 암을 유발한다고 하였다.

또한, 발암물질인 aminoazo dye, polycyclic aromatic hydrocarbon과 같은 것들이 표적 조직의 단백질과 결합하고 이 결합체가 많을수록 종양의 발생이 증가한다고 발표하였고, 그 후 발암 물질과 유전정보를 간직한 핵산과의 결합체를 발견하여 이것이 화학적 발암물질의 궁극적 현상이라고 주장한 바 있다.

이와 같이 대부분의 화학적 발암물질들은 체내 대사과정 중에 생성된 중간대사산물이 DNA와 결합함으로써 발암성 전이의 시초가 된다고 하였다 (Choy, 1993).

특히 최근 연구들에 의하면 AFB₁ 투여로 인하여 형성된 AFB₁-DNA adduct가 종양(tumor) 형성에 관여한다는 보고들이 발표되고 있으며(Root, Theodore and Colin 1997), 이외에도 AFB₁이 암 발생에 용량 의존적으로 관여한다는 여러 가지의 보고들이 있다(Dashwood, et al, 1989 : Bechtel, 1989).

이러한 AFB₁의 독성 및 암발생에 대하여 쥐의 간 미소체(liver microsome)로부터 정제한 cytochrome p-450을 각각 사용하여 AFB₁의 대사를 연구하여 여러 가지 대사산물을 확인하였으며, 간 미소체의 변이원성을 측정하여 AFB₁이 산화적 경로를 거치면서 발암성 대사산물을 생성한다고 하였다.

이러한 과정에서 AFB₁으로 인한 지질과산화 반응이 유발되면 유해한 독성물질이 생성되어 여러 종류의 질병을 일으킨다(Jacob 1994).

특히 이러한 손상에 가장 민감한 반응을 일으키는 것은 DNA이므로, 이와 같은 손상을 관찰할 수 있는 여러 방법들이 집중적으로 연구되어 왔으며, 특히 comet assay(또는 single cell gel electrophoresis, SCGE)를 이용한 방법이 신속하고 민감성이 높다(정 등, 2001)고 하였다.

또한, Sekihashi et al.(2001)에 의하면 여러 가지 생체기관에서 유전 독성을 조사하는 데 comet assay는 매우 유용한 방법에 속한다고 하였다.

한편, 이러한 지질과산화 반응에 의한 손상을 감소시킬 수 있는 방법들이 연구 보고되고있으며, 특히 AFB₁으로 인한 이러한 세포손상 및 암발생 과정을 방어할 수 있는 항산화제의 적용에 대한 관심이 높아지고 있다.

이러한 항산화제 중에서 Butylated hydroxyanisole (BHA)과 tertiary butylhydroquinone(TBHQ) 같은 종류의 합성된 식품 항산화제를 첨가함으로써 식품의 지질과산화 과정을 통제하는 데 도움을 줄

수 있다.

그러나 실제로 이들 합성된 식품 항산화제의 안정성에 대한 논란이 많고, 이러한 점을 극복하기 위하여 최근에는 자연 항산화제의 사용에 관심을 갖게 되었으며 레티놀(retinol), 토코페롤(tocopherol), 식물추출물(herb extracts), 녹차(green tea)(Qin, 1997, Namiki, 1990 등)와 같은 자연 항산화제의 적용이 높아지고 있는 실정이다.

그 중에서 특히 주요 항산화제에 속하는 비타민 C와 비타민 E의 적용에 대하여 여러 가지 연구들이 최근에 보고되고 있다. 특히 comet assay를 이용한 실험에서 비타민 C는 항암제로 인한 부작용 및 유전독성을 경감시킨다(Blasiak, 2001)고 보고하였으며, 여러 가지 변이전구물질(promutagen)의 산화적 대사 과정을 저해할 수도 있으며, 산화 환원 완충계에서 유해한 유리 라디칼을 제거하여 부가체 형성을 저지시키는 것으로 알려져 있다(Sato, Niki and Shimasaki, 1990).

그리고 비타민 E 또한 대표적 지용성 비타민으로서 유리 라디칼의 손상으로부터 인체를 보호해 주며 세포막 통합성을 유지하는 항산화제로 잘 알려져 있으며(Sies, 1991), Bachowski 등(1995)은 식이 섭취를 통한 비타민 E의 적절한 보충은 산화적 스트레스에 대응하는 능력을 증가시킨다고 하였다.

이에 본 연구에서는 AFB₁ 단독 투여와 항산화 비타민(Vitamin C와 Vitamin E)의 혼합 투여 후 생체 내 DNA 나선절단, 유사분열에 미치는 영향 및 지단백과 혈당수준에 대한 항산화 비타민의 효과를 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

마우스에 투여된 곰팡이 독소는 Aflatoxin

B₁(AFB₁)이었으며, 항산화 비타민은 Vitamin C (VC)와 Vitamin E(VE)였으며, 모두 Sigma 제품을 사용하였다.

Comet assay에 사용된 시약은 DMEM(Gibco), disodium EDTA(Kokusan) Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free phosphate buffered saline(PBS)는 Life technologies 제품, DMSO(dimethyl sulfoxide), ethidium bromide, Triton X-100, Tris, sodium lauryl sarcosinate는 Sigma 제품을 사용하였고, low melting point agarose gel(LMPA), normal melting point agarose gel(NMPA)은 Life technologies 제품이었다.

그리고 Blastogenesis에 관한 실험을 위하여, Concanavalin A(Con A), lipopolysaccharide(LPS), RPMI-1640(Sigma), fetal calf serum(Gibco), methyl-³H-thymidine, liquid scintillation counter (Beckman LS-6000 TA)를 사용하였다.

또한, 지단백 측정을 위한 BLF IIkit(ASAN Co.) 및 혈당측정을 위한 Glzyme(榮研化學, Tokyo, Japan) 시약이 사용되었다.

그리고 실험에 사용한 중요 기기는 UV-Spectrophotometer(Bekmans, Co. USA), Homogenizer(Nihonseiki kaisha, AM-11, japan) Ultracentrifuge(Beckmans C14, Co. USA), Ultrasonic cell membrane disruptor(Bandelin Sonopuls HD 60), Optical electromicroscope(Olympus, Nikon, HFX-II, Japan), Zeiss PCO(Fisher imager version 1.40) 등을 사용하였다.

2. 실험대상

대한실험동물센터로부터 생후 6주, 평균체중 40g의 수컷 마우스(ICR 계통)를 구입하여 동물 사육장에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 25℃를 유지토록 하였으며, 명암주기는 자연채광으로 하고 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 6군으로 나누었으며, 모두 복강투여(i.p. injection)로 시행되었다.

제1군은 대조군으로 AFB₁의 용매로 사용된 DMSO 50 μ l와 비타민 C의 용매인 0.1M NaHCO₃ 50 μ l를 함께 투여하였으며, 제2군의 경우 DMSO 50 μ l와 비타민 E의 용매인 Corn oil 50 μ l를 함께 투여하였다. 제3군은 0.1 M NaHCO₃ 50 μ l를 투여한 다음 1 시간 후 0.4mg/kg 농도의 AFB₁ 50 μ l를 투여하였다.

또한, 제4군은 Corn oil 50 μ l를 투여한 후 1시간이 경과한 다음 0.4mg/kg 농도의 AFB₁ 50 μ l를 투여하였다. 제5군은 수용성 항산화비타민의 효과를 보기 위해 Vitamin C를 10mg/kg의 농도로 투여하고 1시간 후 AFB₁을 투여하였다. 제6군은 지용성 항산화비타민의 효과를 비교하기 위해 Vitamin E를 63.8mg/kg의 농도로 투여하였으며, 역시 1시간 경과 후 AFB₁을 복강내 투여하였다. 이상과 동일한 방법으로 2일에 한 번씩 4회 반복 투여하였다.

투여 시작일로부터 8일째 ethyl ether로 마취시키고 해체하여 실험을 실시하였다. 혈액은 심장에서 채혈하였으며, 채혈 즉시 10 μ l를 DMEM 1ml에 희석하여 세포 수를 측정하였으며, 나머지 혈액은 혈청 분리하여 -70℃에 보관하였다.

50ml 주사기를 사용하여 차가운 PBS(0.1 M, pH 7.4)를 복부 대정맥을 통해 주입하여 혈액을 제거한 다음, 비장을 적출하여 차가운 PBS에 담가 잔여혈액을 다시 제거한 다음 RPMI-1640 배지로 세척 후 방법에 준하는 순서에 의해 실험하였다.

3. 실험방법

1) Comet assay

(1) Single cell gel electrophoresis 시료준비

AFB₁의 산화적 독성에 의한 DNA의 손상 정도 및 항산화 비타민의 영향을 살펴보기 위해 Single Cell Gel Electrophoresis(SCGE, Comet assay)를

실시하였다.

채혈시 혈액 10 μ l를 DMEM 1ml에 취하고 동일 배지에 단계 희석하면서 0.1% trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 계측하여 2 \times 10⁴/ml로 세포 수를 조절한 후 10,000rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 얻은 pellet을 0.5% NMPA 50 μ l에 부유시켜 comet assay를 위한 시료로 사용하였다. Fig. 4의 실험 과정에 준하였다.

(2) Slide 준비 및

Single cell gel electrophoresis

Singh, Stephens and Schneider(1994)의 방법에 준하여 실험을 실시하였다. 즉, 40 $^{\circ}$ C의 0.5% LMPA 150 μ l를 fully frosted microscope slide 위에 부가하고 즉시 cover glass를 덮어 5분간 냉장 보관하여 gel층을 굳힌 후 cover glass를 벗기고 건조시킨 slide 위에 2 \times 10⁴cell/ml/50 μ l NMPA로 준비된 시료를 그 위에 떨어뜨려 cover glass를 덮어 저온에서 굳히고, 마지막으로 200 μ l의 LMPA를 부가하여 cell이 함유된 gel층을 증충하였다.

2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100로 조성된 lysis buffer(pH 10)에 slide를 담가 저온, 암실 조건에서 1시간 동안 lysis시켜 DNA의 double strand를 풀어 주고, 다시 slide를 전기영동 buffer(300mM NaOH, 10mM Na₂EDTA, 0.1% hydroxy quinoline)에 20분 정도 담가 unwinding 시킨 후 slide를 electrophoresis reservoir의 anode(+) 쪽에 배열하고 electrophoresis buffer를 채운 다음 12 V, 250 mA로 실온에서 40분간 전기영동을 실시하였다.

전기영동이 끝난 후 0.4M Tris buffer(pH 7.5)에 5분씩 3번 세척하고, 2 μ g/ml 농도의 ethidium bromide로 염색하여 형광현미경으로 516~560nm excitation filter, 590 nm barrier filter에서 slide를 250~400배로 관찰하고 Zeiss PCO, Fisher imager version 1.40을 이용하여 사진 촬영하였다.

2) 비장세포의 blastogenesis에 관한 실험

Aflatoxin B₁의 mouse에 대한 면역독성을 시험하기 위하여 Czerkinsky, Nilsson and Nygren (1983)의 방법에 따라서 AFB₁을 투여한 마우스의 비장을 유리시켜 Concanavalin A(Con A) 및 lipopolysaccharide(LPS) 등의 자극에 대한 반응을 위한 실험을 하였다.

RPMI-1640(Sigma) 배지로 비장 조직을 2회 세척한 다음 10% fetal calf serum이 첨가된 RPMI-1640배지를 넣고 세포를 분리하였다. 원심 분리 후 침전된 세포를 Tris-buffered 0.83% ammonium chloride 처리를 한 다음 1,500rpm에서 5분간 원심 침전을 2회 시행 후 0.3% trypan blue로 생체 염색(vital staining)하여 5 \times 10⁵ cell/ml 수준으로 조정하였다.

분리된 세포부유액을 Falcon 3047 culture plate에 1ml씩 분주한 다음 Con A 4 μ g, LPS 2 μ g을 각 plate에 첨가하여 5% CO₂ 배양기에서 72시간 동안 정지한 후 세포를 수거하기 7시간 전에 1 μ Ci의 methyl-³H-thymidine을 넣고, 6시간 더 경과 후 세포를 막여과(0.45 μ m)하였다.

scintillation vial에 넣어 0.5N HCl 1ml을 넣은 후 1ml의 ethylacetate로 막용해를 시도한 다음 10ml의 scintillation 용액을 넣고, liquid scintillation counter로 β -counting하였다.

3) 혈청 속의 지단백(lipoprotein) 구성

혈청 속 지단백의 입자의 크기와 밀도에 따른 고비중지단백(HDL), 저비중지단백(LDL) 및 초저비중지단백(VLDL)을 측정하기 위하여 BLF II kit를 이용하였다.

4) 혈당 수준에 미치는 영향

Glzyme을 이용한 포도당 산화효소 방법으로 측정하였다.

5) 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. 결과

1. 식이 소비량에 미치는 영향

각 실험군에 있어서 매일 일정한 시간에 식이 소비량을 측정된 결과 Fig. 1와 같이 대조군에 있어서는 평균 50.24mg으로 꾸준한 증가를 보이고 있으나, aflatoxin B₁ 투여군은 투여 후 2일째까지는 식이 소비량이 증가하다가 3일째부터 급격히 하강함을 보여주는 반면 항산화제 투여군은 평균 46.31mg에서 완만한 증가를 보여주고 있다.

2. DNA 손상

AFB₁투여로 인한 산화적 손상으로 발생한 DNA 나선 절단(DNA strand break) 정도를 육안

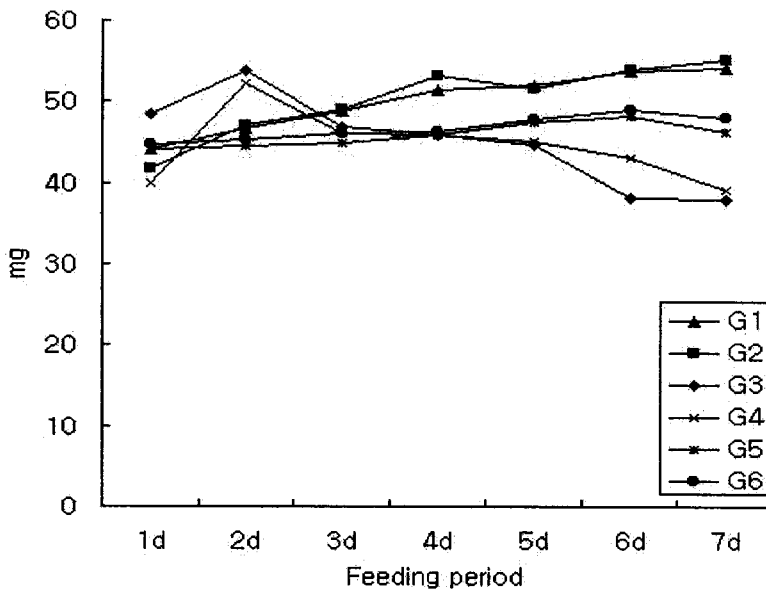
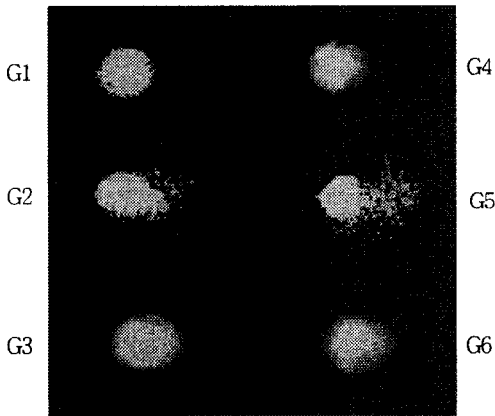


Fig. 1. The feed consumption of mice as followed time course

적으로 관찰하기 위해 Comet assay(Single Cell Gel Electrophoresis)를 실시한 결과 AFB₁ 단독 투여군에서는 DNA 나선절단(DNA strand break)이 이동되어 끌리는 현상의 손상된 세포 형태를 볼 수 있었다.

반면에, 항산화비타민의 혼합 투여군은 모두 DNA 나선 절단이 거의 생기지 않았고 AFB₁ 단독 투여군에서보다 세포 손상 정도가 뚜렷하게 감소된 것을 육안적으로 관찰할 수 있었다. 이것은 항산화 비타민 C와 E 투여군 모두에서 유사한 결과가 도출되었다(Fig. 2).



- G1, DMSO±NaHCO₃ ;
- G2, DMSO±Corn oil ;
- G3, AFB₁±NaHCO₃ ;
- G4, AFB₁±Corn oil ;
- G5, AFB₁±VTC ;
- G6, AFB₁±VTE.

Fig. 2. Evaluation of the DNA damage by single cell gel electrophoresis in whole blood cell.

3. Mitogenic assay

AFB₁의 단독 투여군과 항산화 비타민 투여군에서의 유사분열 상태를 비교 평가하기 위한 blastogenesis

실험에서 β -counting한 결과는 Table 1에서 나타난 바와 같이 T-cell mitogen 으로서의 Con A에서 AFB₁의 단독 투여군에서 유사분열이 현저하게 저하되었음을 보여주고 있다.

항산화 비타민 투여군에서는 상대적으로 면역억제 기능이 현저하게 줄어들었음을 보여주고 있다. 이와 같은 결과는 B-cell mitogen 으로서의 LPS 첨가에서도 유사한 경향을 보여주고 있으며, 각 군에 있어서의 유의한 상관관계를 나타내고 있다.

Table 1. Mitogenic effect of Con A and LPS in spleen cell

	Con A	LPS
	M±SD	M±SD
G1	16318328.33±1498.73 ^b	6411917.67±933.50 ^a
G2	18323249.67±93.26 ^b	7191263.33±525.88 ^c
G3	3854316.17±18.11 ^c	4394714.33±58.06 ^e
G4	2952630.83±12.79 ⁱ	3317222.50±39.53 ^l
G5	8886553.50±234.00 ^c	9924025.33±326.09 ^a
G6	7637035.00±259.62 ^d	8282999.83±278.28 ^b
F	99999.99**	99999.99**
P	0.0001	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).

4. 혈청 속의 지단백(lipoprotein) 구성

혈청 내 지단백의 구성 성분에 관한 실험 결과가 Table 2에서와 같이 AFB₁ 단독 투여군에서 LDL의 수치가 402.06±5.35, 415.38±12.79(mg/dl)로 나타났으며, VLDL에서는 589.75±13.35, 419.20±10.24(mg/dl)로 높게 나타났다. 반면, HDL에 있어서는 32.60±1.02, 29.60±0.93(mg/dl)로 오히려 줄어들었으며, 대조군과 항산화제 혼합 투여군에서는 큰 차이가 없었다.

Table 2. Lipoproteins of the serum in each group

	LDL(mg/dl)	VLDL(mg/dl)	HDL(mg/dl)
	M±SD	M±SD	M±SD
G1	197.10± 4.12 ^c	197.03± 5.19 ^e	48.20±2.48 ^a
G2	199.91± 4.04 ^c	211.07± 8.71 ^e	48.02±1.15 ^a
G3	402.06± 5.35 ^a	589.75±13.35 ^a	32.60±1.02 ^c
G4	415.38±12.79 ^a	419.20±10.24 ^b	29.60±0.93 ^d
G5	334.65±34.05 ^b	337.11±36.84 ^c	42.23±1.18 ^b
G6	209.48±10.21 ^c	273.46±13.45 ^d	41.14±0.87 ^d
F	258.24**	411.91**	186.38**
p	0.0001	0.0001	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).

5. 혈당수준의 변화

AFB₁ 단독 투여군과 항산화 비타민 투여군에서의 혈당 수준의 변화를 관찰하는 실험에서 실제로 Table 3, Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 AFB₁ 단독 투여군에서 199.24±115.15, 211.05±10.91(mg/dl)로 증가된 수치를 나타내고 있지만 Table 3의 통계 자료에서는 유의성을 나타내지 않았다.

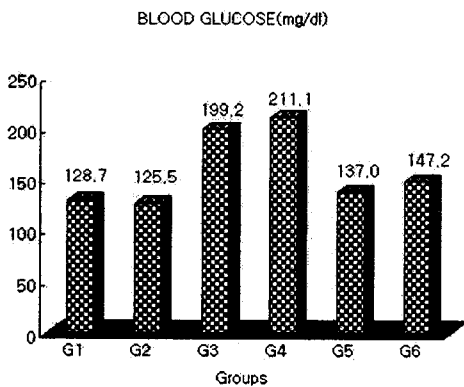


Fig. 3. Evaluation of the glucose level in mice sera

Table 3. Evaluation of the glucose levels in mice sera

	BLOOD GLUCOSE(mg/dl)
	M±SD
G1	128.68± 67.42a
G2	125.47± 27.61a
G3	199.24±115.15a
G4	211.05± 10.91a
G5	137.04± 41.00a
G6	147.21± 29.89a
F	2.37
p	0.0634

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).

IV. 고찰

Aflatoxin B₁(AFB₁)으로 인한 아플라톡신 중독증(aflatoxicosis)은 사람에게서 매우 중요한 위해 인자로 작용하고 급성 혹은 아급성 중독시 주요 표적 장기는 간(liver)이며, AFB₁에 오염된 음식을

섭취 혹은 소비할 가능성이 높은 민족일수록 간암 발생의 위험이 더 높을 수 있다는 것을 의미한다 (Burfenig, 1973).

또한, AFB₁은 설치류와 사람 세포를 대상으로 하는 여러 실험 모델 체계에서 변이 유발원으로 알려졌다으며, 또한 염색체 이상, 미세핵과 자매염색체의 변화, 비정상적 DNA 합성, 염색체 가닥 분해와 부가체 형성(AFB₁-N7-guanine)을 일으키는 것으로 보고(Wang and Groopman, 1999)하였다.

따라서, 곡물을 주식으로 하는 우리나라의 식생활 습관과 수입개방으로 인한 식품 원료의 다양성 등으로 이와 같은 AFB₁의 전신적 위해작용에 빈번하게 노출될 가능성이 증가하고 있는 실정므로 이 곰팡이 독소에 대한 보다 철저한 조사가 필요하다

이러한 연구를 바탕으로 본 실험에서는 식이소비량에 대한 기초조사를 하였으며, 그 결과 식이소비량에 있어서는 대조군에서 시간이 경과함에 따라 식이 소비량이 차츰 증가하는 반면 AFB₁ 단독 투여군에서는 2일째까지는 증가하였으나 3일째부터 급격한 감소 경향을 나타내고 있으며, 이는 AFB₁의 투여일 수가 증가될수록 점차 감소하였다.

항산화 비타민 투여군에서는 대조군에서처럼 식이 소비량이 증가하기는 하였으나 그 증가 정도가 완만하였다. 단독 투여군에서는 2일째까지는 증가하였으나 3일째부터 급격한 감소 경향을 나타내고 있으며, 이는 AFB₁의 투여일 수가 증가될수록 점차 감소하였다.

Ibeh(1998)의 실험에서는 AFB₁을 14일간 투여한 군에서 AFB₁ 단독 투여군의 체중이 p<0,05 수준의 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 항산화 비타민 투여군에서는 체중 감소에서 유의성을 나타내지 않았다.

그러나 전보(박선자, 박정현, 박종선, 서 및 정, 2000)에 의하면, AFB₁을 투여한 군과 항산화 비타민을 투여한 군에서의 체중 및 장기 무게에 미치는 영향에 대한 조사에서 AFB₁ 단독 투여군에서

4일째부터 유의성 있게 체중이 감소하였고, 항산화 비타민 투여군에서는 체중 감소가 완만하게 나타났다

또한, 간과 신장의 무게를 측정한 결과에 의하면 간의 무게는 항산화 비타민 투여군은 대조군과 거의 차이가 없을 정도로 간의 무게가 감소되지 않았으나 AFB₁ 단독 투여군에서는 p<0.01의 통계적 유의성을 나타낼 정도의 감소가 나타났다.

이러한 결과는 AFB₁이 특히 간손상(hepatic damage)을 유발한다는 종래의 여러 학설들을 뒷받침하는 가설이 될 수 있으며, 또한 체중 및 장기의 무게는 식이 소비량과의 상관성을 가지며 아플라톡신 중독증에 영향을 주는 것이라는 것을 시사한다.

한편, 모든 생물체의 세포조직 속에 있는 DNA는 유해 독소나 방사선 등에 의해 가장 민감하게 손상되는 표지물로서, DNA 나선의 절단(strand break)이 일어난다(Deeble, Jabir, Parsons, Smith and Wheatley, 1990).

이러한 DNA의 변화를 측정하는 방법의 하나가 single cell gel electrophoresis에 의한 comet assay이며, 본 실험에서 나타난 바와 같이 aflatoxin B₁ 단독 투여군에서 대조군과 비교하여 DNA 나선 절단이 많이 형성되어 전형적인 comet 형태를 나타내고, 항산화 비타민 혼합 투여군에서는 대조군보다는 약간의 DNA 나선 절단이 나타나 있으나 거의 대조군에 가까운 형태를 유지하고 있다.

이러한 유해 독소에 의한 DNA 나선 절단에 대한 김, 양 및 이(1999)의 연구에 의하면 방사선 조사에 따른 comet assay에서 방사선에 조사된 시료에서 조사선량이 증가됨에 따라 DNA 손상 정도가 증가되었다는 보고에서처럼 AFB₁에 의한 결과도 이와 유사하였다.

AFB₁은 또한 강력한 mitogen(유사분열 유발인자)이며 mutagen(변이유발소)로 작용하는데(Busby, Wogan, 1985 ; Hayes, 1981), Table 1과 같은 spleen cell에서의 mitogenic assay에서 각 군당 개체변이

가 크긴 하지만 aflatoxin B₁ 단독 투여군에서 현저하게 유사분열이 억제되어 나타났다.

그리고 이것은 T-cell mitogen인 Con-A에 대한 비장세포의 반응과 B-cell mitogen인 LPS에 대한 비장 세포의 반응이 모두 유의한 성적을 나타내었고, 항산화 비타민 혼합 투여군에서 그 정도가 다소 증가하였으며, 이러한 결과는 강, 박 및 정(1998)의 보고에서 비장세포의 mitogenic response가 시간이 경과함에 따라, toxin의 양에 따라 감소하였다는 결과와 일치하였다(Hayes, 1981; Geissler and Faustman, 1988).

이러한 결과와 유사하게, hamster, 닭, rat와 올챙이에서 배아독성(embryotoxicity)과 유전적 기형성(teratogenicity)을 나타내며, AFB₁이 오염된 땅콩을 먹은 젖소에서 유산이 되고 죽게 된다는 보고도 있었다.

결국 1994년 Ibeh의 보고서처럼 AFB₁은 유사분열성(mitogenicity)에 심각한 영향을 미치는 것으로 다시 한 번 확인하게 되었으며, 이것은 결국 불임(infertility)까지 유발하게 된다고 하였다.

한편, 항산화제와 지단백의 영향에 관한 Steinberg, Parthasarathy, Carew and Witztum(1989)의 연구에서 순환기계 질환을 야기시키는 원인으로 알려진 LDL이 금속이온, macrophage 등에 의하여 산화되면 cholesteryl ester가 증가하여 유해산소, 자유기 및 과산화물이 생성되어 동맥경화(arteriosclerosis) 등을 유발한다고 보고하였다.

Esterbauer, Puhl, Dieber-Rotheneder, Waeg and Rabl(1991)은 동맥경화의 첫단계는 과산화지질과 cholesterol이 macrophage 및 동맥의 내피세포에 축적되어 거대 거품세포(foam cell)가 형성되며 이 과정에서 이들 일부 세포는 사멸되고, 이 거대한 거품세포가 점차 많아지면서 지방층(fatty streak)이 동맥 주위에 쌓여 동맥경화가 일어나게 된다고 보고하였다.

최근에 와서 이 거품세포의 생성원인은 연구자들에 의해 밝혀졌는데, 지방층 중 산화 LDL이 이 모든

과정의 중요한 인자로 작용하며 이 과정에서 항산화제인 alpha-tocopherol, beta-carotene, flavonoids를 첨가하면 LDL의 산화가 억제된다는 보고에서와 같이 본 실험에서도 aflatoxin B₁ 단독 투여군에서 LDL, VLDL의 증가가 나타났으며, HDL은 오히려 감소하였다.

또한, 전보(박선자, 박정현, 강 및 정, 2000)의 내용 중 AFB₁ 단독 투여군에서의 혈청내 중성지방(triglyceride) 농도가 420.71±38.09, 495.15±4.75로 보고된 것과 본 논문 Table 2의 HDL 32.60±1.02, 29.60±0.93(mg/dl) 수준에서 나타난 결과를 종합하면 160mg/dl 이상의 고농도 중성지방(triglyceride)은 동맥경화를 유발하는 다른 지단백과 연관성을 가지며, 또한 고비중 지단백(HDL) 콜레스테롤의 농도를 감소시킨다는 Chapman and Bruckert (1996)의 보고와 일치한다.

AFB₁의 간 대사 활동에 대한 영향은 단백질 대사에 있어서 John과 Miller(1969)는 쥐의 간에서 albumin, fibrinogen, α1-acid glycoprotein 합성을 억제한다고 하였고, 탄수화물 대사에 있어서 AFB₁은 간에서의 glycogen 저장 능력을 떨어뜨린다.

또한, UDP glucose-glycogen transglycosylase 활성을 떨어뜨리고 glucose-6-phosphatase activity도 억제하며 HMP 또는 pentose phosphate shunt를 활성화시킨다고도 한다(Steinberg, Parthasarathy, Carew, Khoo and Witztum, 1989).

따라서, 본 실험에서의 혈당 수준은 AFB₁ 단독 투여군에서 통계적 유의성은 없으나 증가되어 나타난 것이, 반복되는 독소 투여로 인하여 간에 저장되어야 할 glucose가 모두 혈액 속으로 유출되어 일시적이거나 혈당 수준을 높이는 데 영향을 준 것으로 유추할 수 있다.

그러나 장시간 AFB₁에 노출되었을 때는 혈당 수준에 있어서 비정상적 증가 혹은 감소 경향을 나타낼 것으로 예상된다.

결과적으로, 본 연구에 적용된 항산화비타민 C와 E는 전체적인 생체 대사과정에서, AFB₁에 의

해 나타난 DNA 나선절단 및 유사분열억제 상태를 저해시키는 데 뚜렷한 작용을 하였으며, 이러한 효과는 지단백과 혈당수준에도 유효한 영향을 미친다고 확인되었다.

V. 결론

본 연구는 aflatoxin B₁(AFB₁)에 의하여 유발된 마우스의 혈액에서의 DNA 나선 절단과 비장에서 유사분열성을 관찰함으로써 이들 세포의 산화적 손상에 대한 항산화 비타민의 효과를 조사하기 위하여 수행되었다.

먼저, 비타민 C와 비타민 E를 6주령 수컷 ICR 마우스에 10mg/kg, 63.8mg/kg의 농도로 복강내에 각각 주사(i.p ; intraperitoneal injection)하였고, AFB₁과 비타민 혼합 투여군은 비타민을 주사한 후 1시간이 경과한 다음 0.4mg/kg의 AFB₁을 투여하였다.

투여 횟수는 2일 간격으로 동일한 방법에 의해 4회 반복 투여하였다. 반면, AFB₁ 단독 투여군은 위와 같은 방법으로 비타민 없이 AFB₁만 투여하였다. 이상의 실험 결과는 아래와 같다.

1) 대조군에서의 식이 소비량은 꾸준한 증가를 보였으며, AFB₁ 단독 투여군은 3일째부터 급격히 하강하였다. 그러나 항산화 비타민 혼합 투여군에서는 완만한 증가를 나타내었다.

2) Comet assay에 의하면, 혈액내 DNA 가닥은 AFB₁ 단독 투여군에서 뚜렷하게 분해되어 전형적

인 comet tail을 형성하였으며, 항산화제 혼합 투여군에서는 거의 대조군과 비슷한 수준으로 산화적 손상이 억제되어 comet tail이 사라졌다.

3) 또한 비장에서의 유사분열상태도 전과 유사한 경향을 나타내었으며, 이러한 차이는 T- cell 유사분열 촉진물질인 Con-A에 대한 반응에서 더욱 뚜렷하였다. 이에 대한 통계적 유의성은 p<0.01이었다.

4) 지단백 수준에서는 AFB₁ 단독 투여군에서 평균 LDL은 408.72mg/dl 였으며, VLDL은 평균 504.47mg/dl로 항산화 비타민 혼합 투여군의 LDL 272.06mg/dl와 VLDL, 305.28mg/dl보다 증가하였으며, HDL은 32.60, 29.60mg/dl로 항산화비타민 혼합투여군의 42.23, 41.14mg/dl과 비교하여 오히려 감소하였다.

5) 혈당 수준에서는 통계적 유의성이 없었다.

이상의 결과에서, 대표적 환경성 오염물질의 하나인 AFB₁의 강력한 독성으로 인한 DNA 수준과 세포수준을 포함한 여러 가지 인체독성을 감소시킬 수 있는 항산화비타민 C와 E의 효과를 확인하였으며, 이후 더욱 다양한 항산화비타민의 적용이 필요하리라고 사료되는 바이다.

또한, 이러한 실험 방법은 항암제 및 기타 독성 약물을 다루는 간호사들의 인체에 미치는 영향을 관찰하기 위한 연구나 항암제 투여환자에 있어서 이로 인한 독성 완화물질에 관한 집중적 관심과 노력에 도움이 되리라고 생각된다.

References

1. 강성조, 박선자, 정덕화(1998). T-2 toxin이 마우스 비장세포의 blastogenesis에 미치는 영향. 경상대학교 부속 농어촌개발연구소보, 제17호
2. 김충기, 양재승, 이해정(1999). DNA 'comet assay'를 이용한 곡류의 방사선 조사여부 확인. Korean J. Food Sci. Technol. 31, 906-911

3. 박선자, 박정현, 강말순, 정덕화(2000). 항산화 비타민과 Aflatoxin B₁의 혼합투여가 마우스간의 지질 함량 및 지방산 조성에 미치는 영향. 한국식품위생안전성학회지, 15(1), 5-12
4. 박선자, 박정현, 박종선, 서숙재, 정덕화(2000). Aflatoxin B₁ 투여 마우스의 간기능 효소 및 간손상에 미치는 항산화비타민의 효과. 대한기초간호자연과학회, 2(1), 49-63
5. 정석규, 박종흠, 지승택, 박금주, 김해홍, 현창기, 신현길(2000). Comet assay를 이용한 방사선 조사육의 판별. Korean J. Food Sci. Technol., 32(4), 747-754
6. Bachowski, S., Baker, T.K., Stevenson, D.E., Walborg, E.F., Jr. and Klaunig, J.E.(1995). The potential role of oxidative stress in nongenotoxic hepatocarcinogenesis in the mouse liver. Prog. Clin. Biol. Res., 391, 385-396
7. Bechtel, D.H.(1989). Molecular dosimetry of hepatic aflatoxin B₁-DNA adducts ; Linear correalation with hepatic cancer risk. Regul Toxicol Pharmacol, 10(1), 74-81
8. Blasiak J., Kowalik J.(2001). Protective action of vitamin C against DNA damage by selenium-cisplatin conjugate. Acta Biochim Pol, 48(1), 233-240
9. Busby, W. F. and Wogan, G. N.(1985). In Chemical Carcinogens, edited by C. E. Searles, American Chemical Society, Washington, D. C. 945.
10. Burfening, P.J.(1973). Ergotism. J Am Vet Med Assoc. 163(11) : 1288-90.
11. Chapman, M. J and Bruckert, E.(1996). The atherogenic role of triglycerides and small, dense, low density lipoproteins. Artherosclerosis, 124, 21-29
12. Choy, W.N.(1993). A review of the dose-response induction of DNA adducts by aflatoxin B₁ and its implication to quantitative cancer-risk assessment. Mutat. Res., 296, 181-198
13. Czerkinsky, C., Nilsson, L.A. and Nygren, H.(1983). A solid phase enzyme-linked immunosorbent assay for enumeration of specific antibody secreting cells. J. of Immunol. Methods, 65, 109-121
14. Dashwood, R.H., Arbogast, D.N., Fong, A.T., Pereira, C., Hendricks, J.D. and Bailey, G.S.(1989). Quantitative inter-relationships between aflatoxin B₁ carcinogen dose, indole 3-carbinol anti-carcinogen dose. target organ DNA adduction and final tumorresponse. Carcinogenesis, 10, 175-181
15. Deeble, D. J., Jabir, A. W., Parsons, B. J., Smith, C. J. and Wheatley, P.(1990). Changes in DNA as a possible means of detecting irradiated food. 57-59. In Food Irradiation and the Chemistry. Johnston, D. E. and Stevenson, M. H.(eds). The Royal Society of Chemistry, London, UK
16. Esterbauer H., Puhl H., Dieber-Rotheneder M., Waeg G. and Rabl H.(1991). Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. Ann. Med., 23, 573-581
17. Geissler, F. and Faustman, E. M.(1988). Developmental toxicity of Aflatoxin B₁ in the rodent embryo in vitro : Contribution of exogenous biotransformation systems to toxicity. Teratology, 37, 101-111
18. Hayes, A. W.(1981). Mycotoxin Teratogenicity and Mutagenicity. Boca Raton LA : CRC Press.
19. Ibeh, I. N, Uraih N, Ogonor J.I.(1994). Dietary exposure to aflatoxin and human male infertility in Benin City, Nigeria. Inter J Fert Manpaus Stud, 39, 208-214
20. 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
21. Jacob, R.A.(1994). Nutrition, health and antioxidants. Inform, 5, 1271-1275

22. John, D. W. and Miller, L. L.(1969). Effect of Aflatoxin B1 on net synthesis of albumin, fibrinogen and α 1-acidglycoprotein by the isolated perfused rat liver. Biochem. Pharmacol, 18, 1135-1146
23. Kelly, J.D., Eaton, D.L., Guengerich, F.P., Coulombe, R.A.Jr.(1997). Aflatoxin B1 activation in human lung. Toxicol Appl Pharmacol, 144(1), 88-95
24. Miller, E.C.(1951). Studies on the formation of protein-bound derivatives of 3,4-benzopyrene in the epidermal fraction of mouse skin. Cancer Research, 12, 547
25. Miller, E.C., Miller, J.A.(1981). Searches for ultimate chemical carcinogens and their reaction with cellular macromolecules. Cancer, 47, 2327-2345
26. Namiki, M.(1990). Antioxidants/antimutagens in foods. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr, 29, 273-300
27. Netke, S.P., Roomi, M.W., Tsao, C., Niedzwiecki, A.(1997). Ascorbic Acid Protects Guinea Pigs from Acute Aflatoxin Toxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol, 143, 429-435
28. Qin, G., Gopalan-Kriczky, P., Su, J., Ning, Y., Lotlikar, P.D.(1997). Inhibition of aflatoxin B1-induced initiation of hepatocarcinogenesis in the rat by green tea. Cancer Lett, 112(2), 149-154
29. Ray, A. C., Abbitt, B., cotter, S. R., Murphy, M. J., Reagor, J. C., Robinson, R.M., West, I. E. and Whitford, H. W. 1986. Bovine abortion and death associated with consumption of aflatoxin-contaminated peanuts. J. Am. Vet. Med. Assoc., 188, 1187-1188
30. Rheal, A.T., Hisanori Hashimoto, Summers, P.M.(2000). Non-invasive in vivo magnetic resonance imaging assessment of acute aflatoxin B1 hepatotoxicity in rats. Biochima et Biophysica Acta, 1475, 314-320
31. Robens, J.F., Richard, J.L.(1992). Aflatoxins in animal and human health. Rev. Environ. Contam. Toxicol, 127, 69-94
32. Root, M., Theodore Lange, T. Colin Campbell.(1997). Dissimilarity in aflatoxin dose-response relationships between DNA adduct formation and development of preneoplastic foci in rat liver. Chemico-Biological Interactions, 106, 213-227
33. Sato, K., Niki, E. and Shimasaki, H.(1990). Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. Archives of Biochemistry and Biophysics, 279, 402-405
34. Sekihashi K., Sasaki T., Yamamoto A., Kawamura K., Ikka T., Sasaki Y.F.(2001). A comparison of intraperitoneal and oral gavage administration in comet assay in mouse eight organs. Mutat Res, 27(493), 39-54
35. Sies, H.(1991). Oxidative stress : Introduction. In Oxidative Stress : Oxidants and Antioxidants. San Diego, CA : Academic Press, 15-22
36. Singh N. P., Stephens R. E. and Schneider E. L.(1994). Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. Int. J. Radiat. Biol, 66(1), 23-28
37. Smith, J.E., Lewis, C.W., Anderson, J.G., Solomons, G.L.(1994). Mycotoxins in human nutrition and health. In : Report EUR 16048 EN, European Commission, Directorate-General XII, Brussels, Belgium
38. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. E., Khoo J. C. and Witztum J. L.(1989). Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. N. Engl. J. Med. 320, 915-924
39. Wang J.S., Groopman J.D.(1999). DNA damage by mycotoxins. Mutat Res, 424(1-2), 167-181