*KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.*
*Vol. 31, No. 3, pp. 831~837 (1999)*

# 마우스에서 Ochratoxin A로 유발된 산화적 독성에 대한 항산화 비타민의 완화작용

박정현 · 강성조* · 강진순** · 류재천*** · 정덕화
경상대학교 식품공학과, *경상대학교 농어촌개발연구소
**진주전문대학 가정과, ***한국과학기술연구원 독성연구팀

# Modulation Effects of Antioxidant Vitamins on Ochratoxin A-induced Oxidative Toxicity in Mice

Jung-Hyun Park, Sung-Jo Kang*, Jin-Soon Kang, Jae-Chun Ryu*** and Duck-Hwa Chung
*Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University*
**Institute of Agriculture and Fishery Development, Gyeongsang National University*
***Department of Home Economic, Chinju Technical College*
****Toxicology Laboratory, Korea Institute of Science and Technology*

**Abstract**

Ochratoxin A (OA), a naturally occurring mycotoxin, has been known to cause renal and hepatic lesion in human and animals. This study was carried out to investigate the modulation effects of antioxidant vitamins on OA-induced lipid peroxidation associated with oxidative damage. Vitamin C (10 mg/kg/day) and vitamin E (63.8 mg/kg/day) were administered by intraperitoneal (i.p.) injection to male ICR mice, and 1 hr later, OA which was dissolved in 0.1 M $NaHCO_3$, treated 4 mg/kg/day by i.p. injection. During 4 days repeated, and then measured superoxide dismutase (SOD) activity, catalase activity and malondialdehyde (MDA) formation in microsomes of liver and kidney. Additionally, the relationship between cell damage and modulation effects of antioxidant vitamins was evaluated by comet assay. Results were as followed; i) SOD, catalase activity and MDA level were significantly increased by OA treated, ii) SOD, catalase activity and MDA formation were significantly decreased by antioxidant vitamins combine treated, iii) blood cell damage associated with lipid peroxidation, induced by OA, also modulated by antioxidant vitamins. These results indicated that antioxidant vitamins might be used for prevention of renal and hepatic damage due to ochratoxicosis.

Key words: Ochratoxin A, lipid peroxidation, SOD, catalase, MDA, oxidative damage, comet assay

## 서 론

Ochratoxin A (OA)는 *Aspergillus ochraceus, Penicillium viridicatum* 등이 생산하는 2차 대사산물[1-2]로 신장독성, 간독성, 발암성[3]이 잘 알려져 있고 최근 면역독성[4], 유전독성[5], 생식독성[6], 기형독성[7] 등의 독성도 나타낸다고 보고되고 있다. 이 독소는 처음 남아프리카산 곡류 및 콩과식물에 함유되어 있는 진균독을 조사하는 과정에서 발견된 후[8], 여러 곡류 및 사료에서의 1차적 오염에 대한 보고가 주로 이루어져 위험도는 높은 반면, 사람에게의 위해도는 비교적 낮다고 인식되어 왔다. 그러나, 최근 분석방법의 발달에 따른 낮은 검출한계, 높은 민감도를 갖는 신뢰성 있는 보고들에서 우리가 일상적으로 섭취하는 커피, 맥주, 와인 등의 기호식품[9-10], 육류가공식품[11], 곡류가공식품[12] 및 우유[13]에서의 오염이 확인되고 있어 보건상 문제가 되고 있는 실정이다. 이는 일본이나 유럽에서 주로 보고되었으나, 수입개방으로 인해 우리 나라에서도 예외는 아닐 것이며, 무엇보다도 우리 나라에서 가장 대중적인 된장, 간장 등의 발효식품에서도 오염이 보고되고[14-16], 서부경남의 시설원예산물에서도 이들 독소를 생성하는 곰팡이가 발견되는 등[17] 이 곰팡이독소에

Corresponding author: Duck-Hwa Chung, Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju, Gyeongnam 660-701, Korea

대한 노출이 알려지고 위해도가 증가되고 있다. 아울러, 풍토성 신장질환이나 비뇨기계 종양을 가진 환자의 혈청 표본 중 상당한 수의 표본에서 더 많은 OA가 검출된 예가 있고[18], 유럽의 몇몇 국가와 캐나다에서 실시된 사람혈청 조사결과 OA가 저농도로 사람에게 널리 노출되어 있는 등 일상에서 빈번하게 접할 수 있다는 근거들이 있다[11]. 반면, 곰팡이독소 중독증은 한번 발증하면 약물요법이 효과가 없는 것이 특징[19]이므로 예방차원에서 이의 독성을 저하시킬 수 있는 연구가 요구된다.

Ochratoxin A는 phenylalanyl group을 가지고 있어 phenylalnine과의 경쟁적 작용에 의한 단백질 합성저하가 독성발현의 제 1차적 원인으로 보고되었으나[7], 최근에는 간 및 신장의 mitochondria 내의 전자전달계인 p-450에서 생산되는 free-radical 및 lipid peroxidation으로 인한 세포적 손상이 독성의 원인으로 추측되고 있다[20-22]. 대사과정 중 생성되는 활성산소는 반응성이 아주 강한 파괴적인 물질로, 세포막과 접촉하거나 통과하는 과정에서 세포막 지질성분의 lipid peroxidation을 유발하고[23] 산화 반응으로 생긴 free radical은 단백질, 핵산과의 상호작용을 통해 결국 DNA손상 및 apoptosis를 유발하여 세포 내지 조직의 구조적, 기능적 손상을 야기하여 생체 독성을 일으킨다[24]. 한편, 체내에는 활성산소종 발생에 의해 유도되는 endogenous free radical scavenger인 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase 등의 효소들이 존재하여 lipid peroxidation chain reaction이 차단되어 지질과산화가 방어되므로 이들 효소의 활성과 세포 손상과의 관계는 아주 밀접하고[25], 항산화 비타민들의 존재도 영향을 미친다고 알려져 있다[26].

그러므로, 본 실험에서는 항산화 비타민이 OA의 독성완화에 미치는 영향을 알아보기 위해 OA와 일상생활에서 쉽게 접할 수 있는 항산화 비타민인 vitamin C (VC)와 vitamin E (VE)를 마우스 복강 내에 주사하여 간장과 신장에서의 체내 항산화 효소의 활성 및 지질과산화에 미치는 영향을 알아보았고, comet assay에 의한 혈구세포의 관찰로 OA에 의한 세포의 손상 및 항산화 비타민의 독성저하에 관여하는 효과를 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 시약

Ochratoxin A (OA), vitamin C (VC), vitamin E (VE), malondialdehyde (MDA, 1,1,3,3-tetramethoxy propane), superoxide dimutase (SOD, from bovine liver, bovine kidney), bovine serum albumin (BSA), thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), pyrogallol, diethylenetriaminepentaacetic acid, triton X-100, dimethylsulfoxide (DMSO), ethidium bromide, tris, sodium lauryl sarcrosinate는 Sigma 제품을 사용하였고, protein assay dye reagent는 Bio-Rad Co., disodium EDTA는 Kokusan 제품, $Ca^{++}$, $Mg^{++}$ free phosphate buffered saline (PBS), dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)은 Gibco 제품, low melting point agarose gel (LMPA)은 FMC 제품을, 그 외 sodium chloride, sodium hydroxide 등은 특급시약을 사용하였다.

### 실험동물

ICR 계통의 생후 5주, 평균무게 20 g의 수컷 마우스를 대한실험동물 센터에서 구입하여 동물 사육장에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 25°C를 유지토록 하였으며 명암주기는 자연채광으로 하고 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 4군(n=8)으로 나누어 Table 1과 같이 처리하였으며, 모두 복강투여로 1일 1회, 4일 반복투여 하였고, 대조용액(1군, 2군) 및 항산화 비타민(3군, 4군) 투여 1시간 후 OA를 투여하였다. 즉, 대조군인 제 1군(C)의 경우 용매인 0.1 M $NaHCO_3$을 100 μL씩 투여하였으며, 제 2군(OA)의 경우 OA를 아급성독성용량인 4 mg/kg의 농도로 투여하였다. 제 3군은 수용성 항산화 비타민의 효과를 보기 위해 vitamin C를 10 mg/kg의 농도로 투여하고 동시에 2군과 같이 OA를 투여하였다. 제 4군은 지용성 항산화 비타민의 효과를 비교하기 위해 vitamin E를 63.8 mg/kg의 농도로 투여한 뒤 2군과 같이 OA를 투여하였다.

### 실험샘플준비

투여 24시간 후에 ether 마취시키고 해체하여 실험을

**Table 1. Treatment of ICR mice with vitamin C and vitamin E to assess its protective effects against ochratoxin A toxidity**

| Group | Intraperitoneally injected dose[1)] | No. of animals |
|---|---|---|
| Control (C) | A+A[2)] | 8 |
| Ochratoxin A (OA) | A+B | 8 |
| Ochratoxin A+Vitamin C (OA+VC) | C[3)]+B | 8 |
| Ochratoxin A+Vitamin E (OA+VE) | D+B | 8 |

[1)]A: 100 μL of 0.1 M Sodium bicarbonate solution, vehicle control
B: 4 mg ochratoxin A/kg body weight/day
C: 10 mg vitamin C/kg body weight/day
D: 63.8 mg vitamin E/kg body weight/day
[2)]Antioxidant vitamins and vehicle solution treated by ip. injection 1 hr before ochratoxin A administration.
[3)]The dosage is equivalent to the human therapeutic dose level

실시하였다. 혈액은 심장에서 채혈하였으며, 50 mL 주사기를 사용하여 차가운 PBS (0.1 M, pH 7.4)를 복부대정맥을 통해 주입하여 혈액을 제거한 다음, 간과 신장을 적출 하여 차가운 PBS에 담가 잔여혈액을 다시 제거한 후 간 무게, 신장무게를 재고 실험에 사용하였다. 각 장기를 5배 량의 phosphate buffer (0.1 M, pH 7.3)로 균질화 시킨 후 3,000 g (top table centrifuge)로 원심분리하여 얻은 상등액을 초음파 처리하여 실험을 실행하였다.

### SOD 효소활성측정

시료 1 mL을 23,000 g로 초고속원심분리하여 pyrogallol을 이용한 Stefan 등[27]의 방법으로 bovine liver 및 kidney superoxide dismutase (SOD)를 표준으로 해당 unit 단위에서 3분 동안 pyrogallol의 autoxidation억압 정도를 420 nm에서 분광광도계로 측정하고 그 값을 회귀방정식으로 산출하여 각 시료의 흡광치를 이 방정식에 대입하여 활성도를 구하였다.

### Catalase 효소활성측정

$KMnO_4$ 적정을 이용한 Cohen 등[28]의 방법으로 480 nm에서 그 흡광도를 측정하여 catalase 활성도를 산출하였다. Catalase 활성도는 1차등급 반응상수인 $k$로 표현될 수 있으며 그 식은 다음과 같다.

$$k=\log(S_0/St)\times 2.3/t$$

여기서 t는 반응시간(3분)이고, $S_0$는 $H_2O_2$의 초기농도, St는 $H_2O_2$의 t분 때의 농도를 의미한다.

### 지질 과산화 측정

Thiobarbituric acid를 이용한 Shah 등[29]의 방법을 응용하여 MDA 함량을 구하여 지질 과산화 정도를 측정하였다. 즉, 시료 1 mL에 17.5% TCA 1 mL, 0.6% TBA (pH 2) 1 mL을 첨가하여 100°C에서 15분간 반응시키고 실온에서 냉각한 후 70% TCA를 1 mL첨가하여 냉온 방치시킨 것을 3,000 g에서 10분간 원심분리하여 상등액 속의 MDA-TBA 결합체를 534 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 MDA 함량은 회귀방정식으로 산출한 표준 MDA(1,1,3,3-tetramethoxy propane)의 직선의 방정식에 대입하여 구하였다.

### 단백질 정량

SOD와 catalase 활성도의 분석과 MDA함량은 mg단백질에 대한 함량과 활성도로 표시하였으며, 각 시료의 단백질 정량은 Bio-Rad protein assay dye reagent를 이용하여 측정하였다.

### Comet assay

혈액 10 μL를 DMEM 1 mL에 취하고 동일 배지에 단계 희석하면서 0.1% trypan blue로 염색한 후 hemocytometer로 계측하여 $2\times10^4$/mL로 세포 수를 조절한 다음 6,000 g에서 5분 동안 원심 분리하여 얻은 pellet을 0.5% low melting point agarose gel (LMPA) 50 μL에 포매(embedding)시켜 comet assay를 위한 시료로 사용하였고, Singh 등[30-31]의 방법에 준하여 실험을 실시하였다. 즉, 40°C의 0.5% LMPA 150 μL를 fully frosted microscope slide 위에 부가하고 즉시 cover glass를 덮어 5분간 냉장 보관하여 굳혀 gel층을 만든 후 cover glass를 벗기고 건조시킨 slide 위에 $2\times10^4$ cell/50 μL LMPA로 준비된 시료를 그 위에 떨어뜨려 cover glass를 덮어 낮은 온도에서 굳히고, 마지막으로 200 μL의 LMPA를 부가하여 cell이 함유된 gel층을 중층 하였다. 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris, 1% triton X-100로 조성된 lysis buffer (pH 10)에 slide를 담가 저온·암실 조건에서 1시간동안 lysis시켜 DNA의 double strand를 풀어 주고, 다시 slide를 전기영동 buffer (300 mM NaOH, 10 mM Na2EDTA, 0.1% hydroxy qunoline)에 20분 정도 담가 unwinding 시킨 후 slide를 electrophoresis reservoir의 anode(+)쪽에 배열하고 electrophoresis buffer를 채운다음 12 V, 250 mA로 실온에서 40분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M tris buffer (pH 7.5)에 5분씩, 3번 세척하고, 2 μL/mL농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여, 형광현미경으로 516~560 nm excitation filter, 590 nm barrier filter에서 250~400배로 관찰하였다.

### 통계처리

대조군과 OA 투여 및 항산화 비타민 혼합투여군 사이의 결과치는 평균치와 표준오차로 표기(mean±S.D.)하고 이들에 대한 통계적 처리는 Student's $t$-test를 시행하여 통계적 차이를 검증하였다. 각 군의 유의성은 $p<0.05$ 및 $p<0.01$ 수준에서 의의를 평가하였다.

## 결 과

### OA 투여가 체중 및 장기무게에 미치는 영향

OA를 투여한 마우스의 생화학적인 영향을 조사하기에 앞서 체중, 간 및 신장의 무게를 측정한 결과는 Table 2에서와 같이 OA 단독투여군 및 항산화 비타민 복합투여군 모두 체중의 증가가 모두 유의성있게($p<$

**Table 2. Body and organ weight of mice treated with ochratoxin A alone and compound antioxidant vitamins**

| Experimental group | Body weight (g) | | Liver weight (g) | Kidney weight (g) |
|---|---|---|---|---|
| | Before treatment | Before dissectrion | | |
| C (8)[1)] | 24.30±1.96[2)] | 29.85±2.08 | 1.87±0.35 | 0.47±0.06 |
| OA (8) | 23.48±1.51 | 23.58±1.25* | 1.40±0.16 | 0.37±0.05 |
| OA+VC (7) | 23.54±1.37 | 25.11±1.21* | 1.49±0.13 | 0.42±0.06 |
| OA+VE (8) | 21.37±1.30 | 24.28±1.48* | 1.53±0.15 | 0.44±0.03 |

[1)]A number of mice in group.
[2)]Mean±S.D. (standard deviation on the mean for number). C; 100 μL of 0.1 M sodium bicarbonate solution, vehicle control, OA; 4 mg ochratoxin A/kg body weight (b.w.)/day, OA+VC; 10 mg vitamin C/kg b.w./day and 4 mg ochratoxin A/kg b.w./day, OA+VE; 63.8 mg vitamin E/kg b.w./day and mg ochratoxin A/kg b.w./day.

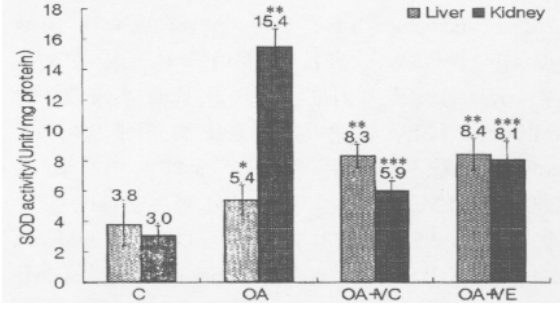


**Fig. 1. SOD activity in the mice liver and kidney treated with ochratoxin A alone and compound antioxidant vitamins.** C; 100 μL of 0.1 M sodium bicarbonate solution, vehicle control, OA; 4 mg ochratoxin A/kg body weight (b.w.)/day, OA+VC; 10 mg vitamin C/kg b.w./day and 4 mg ochratoxin A/kg b.w./day, OA+VE; 63.8 mg vitamin E/kg b.w./day and 4 mg ochratoxin A/kg b.w./day. *Significantly different from controls $p<0.05$. **Significantly different from controls $p<0.01$ ***Significantly different from only ochratoxin A-treated mice $p<0.05$.

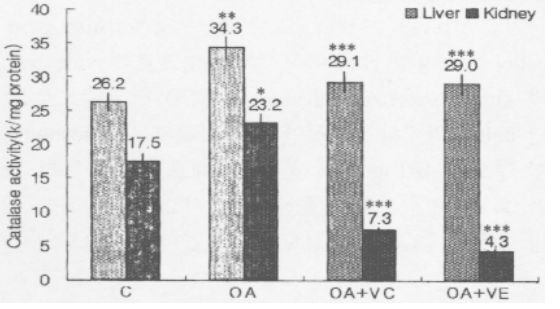


**Fig. 2. Catalase activity in the mice liver and kidney treated with OA alone and compound antioxidant vitamins.** C; 100 μL of 0.1 M sodium bicarbonate solution, vehicle control, OA; 4 mg ochratoxin A/kg body weight (b.w.)/day, OA+VC; 10 mg vitamin C/kg b.w./day and 4 mg ochratoxin A/kg b.w./day, OA+VE; 63.8 mg vitamin E/kg b.w./day and 4 mg ochratoxin A/kg b.w./day. *Significantly different from controls $p<0.05$. **Significantly different from controls $p<0.01$ ***Significantly different from only ochratoxin A-treated mice $p<0.05$.

0.05) 감소했다. 특히 OA 단독투여군은 체중의 증가를 거의 보이지 않았고, 체중에 대한 간 및 신장의 무게도 대조군에 비해 낮게 나타났다. 그 중 체중에 대한 신장의 무게는 OA 단독투여군이 가장 낮게 나타났다.

### OA 투여가 SOD 활성에 미치는 영향

Superoxide radical 생성 정도 및 항산화 비타민의 역할을 규명하기 위해 체내 생성·유도되는 SOD의 활성도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 대조군이 간 및 신장에서 각각 3.8±1.42 (unit/mg protein), 3.0±1.32를 보였고, OA의 투여군의 경우, 간에서는 5.4±1.04, 신장에서는 15.4±2.32로 신장에서 급격한 증가를 보였다. 반면 VC 투여시 각각 8.3±0.82, 5.9±1.35, VE 투여시 각각 8.4±1.68, 8.1±2.72로 간에서는 OA 단독투여에 비해 SOD 활성의 증가보인 반면, 신장에서는 항산화 비타민 투여군 모두 유의성 있게($p<0.05$) 효소활성을 억제하였다.

### OA 투여가 catalase 활성에 미치는 영향

산화적 대사에 의해 생성되는 hydrogen peroxide의 제거를 위해 체내 생성되는 항산화 효소인 catalase 활성에 미치는 OA의 영향과 항산화 비타민의 효과를 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는바와 같이 대조군의 경우, 간과 신장에서 각각 26.2±10.2 (*k*/mg protein), 17.5±5.4의 활성을 보였고, OA 투여군의 경우 각각 34.3±8.6, 23.2±3.2로 유의적인($p<0.01$) 상승을 보인 반면, VC의 혼합 투여군은 29.1±4.7, 7.3±1.2, VE 혼합 투여군은 20±12.2, 4.3±0.4로서 항산화 비타민의 혼합 투여에 의해 유의성 있게 저하되었으며($p<0.05$) 특히, 신장에서의 catalase활성을 저하시키는 것으로 나타났다.

### OA 투여가 지질과산화에 미치는 영향

세포막의 산화에 의해 생성된 지질의 과산화물인 MDA를 thiobarbituric acid와 결합하는 성질을 이용하

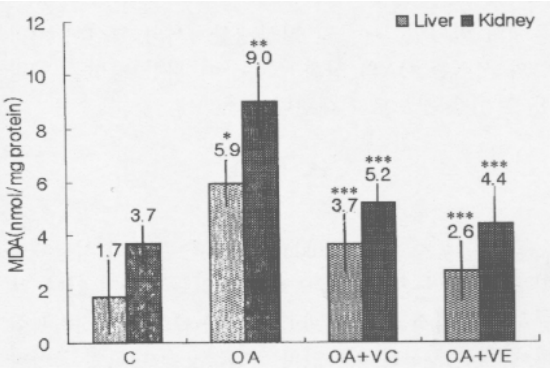


**Fig. 3. Malondialdehyde concentration in the mice liver and kidney treated with OA alone and compound antioxidant vitamins.** C; 100 μL of 0.1 M sodium bicarbonate solution, vehicle control, OA; 4 mg ochratoxin A/kg body weight (b.w.)/day, OA+VC; 10 mg vitamin C/kg b.w./day and 4 mg ochratoxin A/kg b.w./day, OA+VE; 63.8 mg vitamin E/kg b.w./day and 4 mg ochratoxin A/kg b.w./day. **Significantly different from controls $p<0.01$ ***Significantly different from only ochratoxin A-treated mice $p<0.05$.

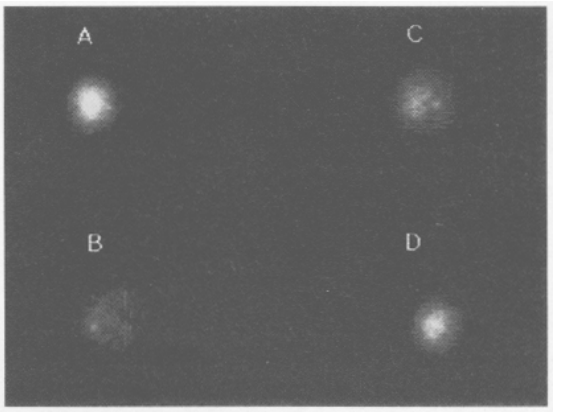


**Fig. 4. Mouse whole blood cell processed single cell gel electrophoresis for evaluation of DNA damage.** A; 100 μL of 0.1 M sodium bicarbonate solution, vehicle control, B; 4 mg ochratoxin A/kg body weight(b.w.)/day, C; 10 mg vitamin C/kg b.w./day and 4 mg ochratoxin A/kg b.w./day, D; 63.8 mg vitamin E/kg b.w./day and 4 mg ochratoxin A/kg b.w./day.

여 비색 측정한 결과 Fig. 3에서 보는바와 같이 간장과 신장에서 OA 투여군에서 그 함량이 유의적($p<0.01$)으로 증가함을 보였다. 간과 신장에서의 대조군의 함량은 각각 1.7±1.37 (nmol/mg protein), 3.7±0.68이였고, OA단독 투여 군에서는 각각 5.9±0.48 (대조치의 347%), 9.0±1.26(대조치의 243%)로 증가함을 보인 반면, VC 혼합 투여군에서는 각각 3.7±1.05, 5.2±0.7, VE 투여군은 각각 2.6±1.07, 4.4±1.27로 항산화 비타민의 혼합 투여군에서는 모두 OA 단독 투여군보다 MDA 함량이 낮게 나타났다.

### OA에 의한 세포손상

Free radical에 의해 가장 손상을 받기 쉽고, 전신에 대한 산화적 손상을 대표할 수 있는 혈구세포를 comet assay (single cell gel electrophoresis)를 실시하여 OA가 단일 세포의 DNA 수준에서 손상을 주는 정도와 항산화 비타민에 의한 독성저하에 효과를 육안적으로 관찰하였다. 그 결과 Fig. 4에서 보는바와 같이 OA 단독 투여군에서는 DNA손상으로 인한 DNA break들이 이동되어 끌리는 형상(comet form)으로 나타나는 손상된 세포의 형태를 볼 수 있었고, 항산화 비타민의 혼합투여군은 모두 DNA break들이 거의 생기지 않았고 OA단독 투여군에서 보다 세포손상정도를 저하시키는 것을 관찰 할 수 있었다. 특히 VE 투여군의 경우는 모든 결과에서와 비슷하게 세포 손상억제에 대해 더 양호한 결과를 보였다.

## 고 찰

본 실험의 결과는 항산화 비타민을 사람의 치료용량으로 투여하였을 때 OA에 의한 세포적 손상을 경감시키는 것으로 나타났다. OA의 독성발현 기작에 대해서는 아직 정립되지 않았지만, OA의 구조에 phenylalanine기가 포함된 것에 기인한 단백질 합성저하[7]와 aflatoxin의 독성과 유사하게 간이나 신장의 microsome에서 NADPH의존성 lipid peroxidation이 일어나는 산화적 과정을 거치면서 세포손상을 일으킨다[32-33]는 등의 가설이 있으며, 기작에 관한 연구가 계속 진행이 되고 있다. Hoehler 등[21]은 OA가 free radical을 생성하여 genotoxic and cytotoxic effect를 갖는다고 하였는데, 본 실험의 결과에서도 OA 단독투여군의 경우 내인성 자유기 제거효소인 SOD, catalase 활성이 모두 유의성 있게($p<0.01$) 증가하였고, 동시에 MDA 함량도 유의성있게($p<0.01$) 증가함은 OA의 대사과정에서 free radical의 생성이 많아져서 세포막의 지질과산화가 촉진되었음을 알 수 있다. 이 등[34]은 SOD는 지질과산화 반응에 의해 활성이 증가되는 효소이며, 지질과산화가 촉진되는 경우에만 SOD 및 catalase 활성이 증대됨을 관찰 할 수 있다고 한다. 신장에서의 SOD 활성의 급격한 증가(대조군의 510%)는 신장에서의 superoxide radical의 생성이 많고, 이에 의한 지질의 과산화가 촉진되어 손상이 증가 될 수 있고 특히, OA의 독성 중 신독성이 가장 강한 직접적인 근거가 될 수 있다고 사료된다.

SOD와 catalase는 glutathione peroxidase와 함께 대표적인 지질과산화에 대한 방어 효소들로서, 모두 적혈구의 세포막과 간세포의 미토콘드리아 수질과 세포질에 공존하며 superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$)에 의한 지질과산화를 막는 synergistic set 구실을 한다. 즉, SOD에 의해 $O_2^{\cdot-}$가 dismutation되어 $H_2O_2$가 생성되면 catalase가 $H_2O_2$를 제거시킨다. 항산화 비타민은 그 자체가 superoxide radical 소거제이므로 SOD에 대해 보조기능을 나타낸다[34]. 또한 Fe(II)생성을 통한 VC의 산화촉진 작용을 SOD가 억제하기도 하며, VC 및 VE는 효소적 NADPH 의존성 지질과산화에도 영향을 줄 수 있으므로 항산화 비타민의 공급수준은 $O_2^{\cdot-}$의 생성속도와 SOD 및 catalase의 활성에도 영향을 미칠 수 있다[34].

본 실험 결과에서는 OA의 단독투여에 의해 증가된 SOD 및 catalase의 활성이 항산화 비타민의 공급에 의해 다시 유의성($p<0.05$) 있게 감소함을 보였다. 특히 신장에는 OA 단독투여군에 비해 260% 이상 감소함을 보여 항산화 비타민의 투여가 superoxide의 생성억제에 효과가 있음을 시사하였다. 이는 이 등[34]의 보고에서 항산화 비타민은 그 자체가 superoxide radical 소거제이므로 SOD에 대해 보조기능을 나타내고, 동시에 superoxide의 생성 및 이의 연쇄반응을 차단하는 것으로 사료된다. 이는 superoxide dismutase의 연쇄반응에 의해 생성되는 $H_2O_2$의 제거 작용을 하는 catalase의 활성도 유의성 있는 감소를 보였기 때문이다. 이로 인해 지질과산화의 감소(MDA 함량의 유의성 있는 감소) 및 세포의 손상이 저하되는 것으로 보인다. 그러나, 간장에서의 SOD 활성은 OA의 단독투여군보다 다소 증가하였지만, 유의성은 없었다. 본 실험의 결과에서는 특히 VE가 VC보다 지질과산화 억제(MDA 형성억제) 및 세포 손상에 대한 방어 정도가 더 우수하게 나왔는데, 이는 VE가 세포막의 인지질의 내층에 존재하면서 친수성 잔기와 비슷한 페놀성 기능을 가지고 phytyl side-chain과 구조적 연관성을 가지는 특성이 있으므로[26], 세포막 내의 불포화지방산의 과산화를 방지하여 세포막의 손상에 대한 방어 작용이 더 뛰어나다고 사료된다. 그리고, VC도 활성산소를 포함하는 활성산소종의 수용성 quencher로써 항산화제로 작용하여 산화적 대사에 의한 친전자성 대사산물(electrophilic metabolite)의 생성을 억제하고, 친핵성 성향(nucleophilic property)에 의해 electrophilic radical의 활성을 방해하는 역할을 하여 수용성 과산화 라디칼을 제거하고, 환원된 vitamin E를 재생시키는 역할을 가지므로[35] OA에 의한 산화적 독성을 저하시키는 것으로 보인다.

그러므로, OA에 의한 2차 오염우려가 있는 식육 동물에의 비타민 투여 및 일상생활에서의 항산화 비타민의 섭취는 OA의 산화적 손상에 의한 병변을 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

곰팡이 독소인 ochratoxin A (OA)는 동물과 사람에게 간 및 신장의 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 산화적 손상과 관련이 있는 OA-유발 지질과산화에 대한 항산화 비타민의 완화작용에 대하여 조사하였다. 수컷 ICR 마우스에 비타민 C (10 mg/kg)와 비타민 E (63.8 mg/kg)를 복강 투여하고, 한 시간 후에 0.1 M $NaHCO_3$에 녹인 OA를 4 mg/kg/day의 용량이 되게 복강 투여하였다. 4일간 반복투여 한 후 간과 신장의 microsome 내의 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase 활성과 malondialdehyde (MDA) 생성을 측정하였다. 아울러 comet assay에 의해 세포의 손상과 항산화 비타민의 완화 작용에 대한 관련성을 알아보았다. 결과들은 간과 신장에서 모두 i) OA투여에 의해 SOD, catalase 활성 및 MDA 수치가 유의성($p<0.05$) 있게 증가하였고, ii) 항산화 비타민 혼합 투여에 의해 OA에 의한 SOD, catalase 활성 및 MDA 형성이 유의성 있게 저하되었으며, iii) OA-유발 지질과산화와 관련이 있는 혈구세포의 손상도 항산화 비타민에 의해 완화되었다. 이러한 결과들은 항산화 비타민이 OA중독에 의한 간과 신장의 손상의 예방에 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 문 헌

1. Haggblom, P.: Production of ochratoxin A in barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* ; Effect on fungal growth time, temperature and innoculum size. *Appl. Environ. Mocrobiol.*, **43**, 1205-1207 (1995)
2. Chu, F.S.: Studies on ochratoxins. *Crit. Rev. Toxicol.*, **2**, 499-524 (1974)
3. International agency for research on cancer (*IARC*) monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans overall evaluations of carcinogenicity at updating of IARC monographs. Volumes 1 to 42 Lyon : IARC, (1987)
4. Sharma, R.P.: Immunotoxicity of mycotoxins. *J. Dairy Sci.*, **76**, 892-897 (1991)
5. Creppy, E.E., Kane, A., Dirheimer, G., Latarge-Frayssinet, C., Mousset, S. and Frayssinet, C.: Genotoxicity of ochratoxin A in mice; DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicol. Lett.*, **28**, 29-35 (1985)
6. Hong, J.T., Park, K.L., Han, S.Y., Park, K.S., Kim, H.S., Oh, S.D., Park, H.J., Choi, Y.I., Kook, S.S., Lee, R.D. and Jang, S.J.: Safety evaluation of natural toxin; Reproductive

toxicity of ochratoxin A (in Korean). *The Annual Report of KFDA*, **1**, 389-397 (1997)
7. Mayura, K., Parker, R., Berndt, W.O. and Philips, T.D.: Ochratoxin A-induced teratogenesis in rats; partial protection by phenylalanine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 1186-1188 (1984)
8. Applegate, K.L. and Chipley, J.R.: Ochratoxins. *Adv. Appl. Microbiol.*, **16**, 97-109 (1973)
9. Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, J. and Schlatter, C.: The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Fd. Chem. Toxic.*, **33**(5), 34-355 (1995)
10. Tsubochi, H., Terada, H., Yamamoto, K., Hisada, K. and Sakabe, Y.: Ochratoxin A found in commercial roast coffee. *J. Agricul. Food Chem.*, **36**, 540-542 (1988)
11. Migralia, M., Brera, C., Cornlei, S. and De Dominicis, R.: Ochratoxin A in Italy : Status of knowledge and perspectives, in human ochratoxicosis and its pathologies. (Creppy, E.E., Castenaro, M. and Dirheimer, G. Eds.) Hogn Libbey Eurotext. *INSERM.*, **231**, 129-139 (1993)
12. WHO: Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO technical report committee on food additives. *WHO Technical Report Series*, **806**, 29-31 (1991)
13. Kupier-Goodman, T.: Risk Assessment to humans of mycotoxins in animal-derived Food Products. Vet. *Hum. Toxicol.*, **33**(4), 325-331 (1991)
14. Kang, S.K., Lee, S.S., Shin, H.K. and Kim, J.B.: Measurement of ochratoxin A and isolation of the fungi producing ochratoxin A from, Korean traditional fermented soybean foodstuffs (in Korean). *Kor. J. Mucol.*, **19**(2), 148-155 (1991)
15. Kim, C.J., Park, K.R., Kim, J.B. and Shin, H.K.: Analysis of ochratoxin A from *deonjang, kanjang, gochujang* collected from houses and traditional markets (in Korean). *J. Fd Hyg. Safety*, **9**(4), 221-228 (1994)
16. Kang, S.S., Shin, H.K., Kim, J.B., Kim, C.H. and Lee S. S.: Characteristics of the ochratoxin A producing fungi in traditionally fermented Korean soybean foodstuffs (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**(5), 572-577 (1991)
17. Kang, S.J., Park B.J., Lee, J.O., Kang, J.S. and Chung, D.H.: Screening of ochratoxin A producing fungi from greenhouse horticulture (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**(6), 1415-1419 (1998)
18. Petkova, B.T. and Castegnaro, M.: Ochratoxin A contamination of cereals in an area of high incidence of Balkan endemic nephrophathy in Bulgaria. *Food Addit. Contam.*, **2**, 267-270 (1985)
19. Lee, Y.W. and Kim J.G.: Management of food hygiene; Mycotoxicosis (in Korean). Korea National Open University Academic press, Seoul Korea, p. 110-127 (1997)
20. Kadlubar, F.F. and Hammons, G.J.: The role of cytochrome P-450 in the metabolism of chemical carcinogens, Guengerich F.P. (Ed), Mammalian Cytochromes P-450. Boca. Raton, CRC Press, Vol. 2. p. 81-130 (1987)
21. Hoehler D., Marquardt R.R., Mclntosh A.R. and Hatch G.M.: Induction of free radicals in hepatocytes, mitochondrza and microsomes of rats by ochratoxin A and its analogs. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1357**(2), 225-233 (1997)
22. Hasinoff B.B., Rahimtula A.D. and Omar R.F.: NADPH-cytoehrome-P-450 reductase promoted hydroxyl radical production by the iron (III)-ochratoxin A complex. *Biochim.-Biophys. Acta.*, **1036**(1), 78-81 (1990)
23. Horton, A.A. and Fairhurst, S.: Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRC. Crit. Rev. Toxicol.*, **18**, 27-79 (1987)
24. Reynolds, E.S. and Moslen, M.T.: Free-radical damage in liver. In Free Radicals in Biology. Pryer, W.A. (Ed), Academic Press, New York, Vol. 5, p. 49-94. (1980)
25. McCord, J.M. and Fridovich, I.: The utility of superoxide dismutase in studying free radical reaction. *J. Biol. Chem.*, **245**, 1374-1377 (1970)
26. Judith, L.B. and Anthony, T.D.: The relationship between α-tocopherol and phospholipid fatty acids in rat liver subcellular membrane fractions. *Biochim.-Biophys. Acta.*, **962**, 81-90 (1988)
27. Stefan. M. and Gudrun M.: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469-474 (1974)
28. Cohen, G., Dembiec, D. and Marcus, J.: Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal. Bio. Chem.*, **34**, 30-38 (1970)
29. Shah, S.V., Cruz, F.C. and Baricos, W.H.: NADPH-induced chemiluminescence and lipid peroxidation on kidney microsomers. *Kideny International*, **23**, 691-698 (1983)
30. Singh N.P., Stephens R.E. and Schneider E.L.: Modifications of alkaline microgel eletrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int. J. Radiat. Biol.*, **66**(1), 23-28 (1994)
31. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E. L.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, **175**, 184-191 (1988)
32. Omar, R.F., Gelborn, H.V. and Rahimtula, A.D.: Effect of cytochrome P-450 induction on the metabolism and toxicity of ochratoxin A. *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 207-216 (1996)
33. Rahimtula A.D., Bereziat J.C., Bussacchini G.V. and Bartsch H.: Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, **37**(23), 4469-4477 (1988)
34. Lee, J.W., Lee, K.Y., Mo, S.M., Lee, J.H., Lee, D.Y., Park, S.N. and Lee B.K.: Effects of L-ascorbic acid on the plasma 2-thiobarbituric acid(TBA) value, prostaglandin biosynthesis, photochemolysis, superoxide dismutase(SOD) and catalase activities in guinea pig. *Korean Biochem. J.*, **20**(4), 378-388 (1987)
35. Bose, S. and Sinha S.P.: Modulation of ochratoxin-produced genotoxicity in mice by vitamin C. *Fd Chem. Toxic.*, **32**(6), 533-537 (1994)

(1998년 12월 14일 접수)