

실험적 간 발암모델에서 감마선 조사 쇠고기 섭취가 쥐의 항산화 방어체계에 미치는 효과

김정희[†] · 진유리 · 강일준* · 변명우**

서울여자대학교 영양학과

*한림대학교 식품영양학과

**한국원자력연구소

Effects of γ -Irradiated Beef Feeding on Antioxidative Defense Systems in Experimental Hepatocarcinogenesis

Jung-Hee Kim[†], You-li Jin, Il-Jun Kang*, Myung-Woo Byun**

Dept. of Nutrition, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

*Division of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

**Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-345, Korea

Abstract

This study was done to investigate the effect of γ -irradiated beef feeding on antioxidant vitamin levels and defense enzyme activities in diethylnitrosamine(DEN)-initiated rats. Weaning Sprague-Dawley male rats were fed the diet containing γ -irradiated ground beef at the dose 0, 3, 5 kGy as a 20% of protein source for 8 weeks. One week after feeding, rats were intraperitoneally injected twice with a dose of DEN(50mg/kg BW). As a promoter, 0.05% phenobarbital was fed in drinking water from one week after DEN treatment until the end of experiment. At the end of 8th week, serum level of vitamin C, serum and hepatic levels of retinol and α -tocopherol were determined. In addition, activities of cytosolic glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, catalase and hepatic superoxide dismutase(SOD) were measured. By γ -irradiation, there was no significant effect on serum and hepatic levels of vitamin C and α -tocopherol except a significant decreasing effect on hepatic retinol level. There was also no significant effect on the activities of enzymes involved in antioxidative defense system, However, DEN treatment led to a significant increase in activities of glutathione reductase and glutathione S-transferase while the activity of glutathione peroxidase was decreased. The activities of hepatic SOD and catalase were not changed by DEN treatment. Overall results indicate that the consumption of low dose of γ -irradiated beef does not affect antioxidative defense system.

Key words: γ -irradiated beef, antioxidative vitamins, antioxidative enzymes, rat hepatocarcinogenesis

서론

FAO의 발표에 의하면 세계적으로 수확된 식량의 약 25~40%는 해충, 미생물, 생리적 작용 등에 의해 손실되고 있으며 식품 저장 동안의 손실을 줄이기 위한 연구 개발이 식량 수급에 대처하는 현실적인 방안이라고 하였다(1). 또한 식인성 질병에 의한 건강위협과 이에 따른 경제적 손실을 감안하고, 특히 WTO 체제하에서의 국가간의 교역을 예상한다면 보다 효과적이고 안전

한 저장·가공기술의 확보는 시급한 실정이다. 이러한 요구에 부응하여 국내의 식품산업에서 새로운 가공·저장기술로 인식되며 모두의 관심의 대상이 되고 있는 것이 바로 식품의 방사선 조사기술이다(2).

방사선 조사기술은 방사선 에너지를 식품에 쬐여 표면에 오염된 미생물을 사멸시키되 생체식품의 색깔이나 모양, 맛은 변화시키지 않는 기술이다(2). 세계적으로 40여개국이 식품의 방사선 조사와 관련된 허가 또는 금지 규정을 가지고 있다. 이들 나라 중 한 품목 또는

[†]To whom all correspondence should be addressed

여러 종류의 식품(군)에 대하여 방사선 조사를 허가한 국가는 39개국에 이르고(3,4), 선진국과 개발 도상국을 포함한 30여개국에서는 상업적으로 방사선 조사식품이 생산되고 있다(5). 이들 국가들이 허가하고 있는 식품류들은 약 115개 식품(군)으로서 대부분의 식품을 포함하고 있으나 우유/유제품은 거의 제외되고 있다. 허가 식품류 가운데 감자, 양파, 마늘 등 발아·발근억제 대상식품인 근채류 농산물의 허가국이 가장 많고 그 다음이 향신료/조미료를 포함한 건조 식품류의 허가 및 실용화가 활발하다(4,5).

국내에서는 1987년 이래 4차례에 걸쳐 10kGy 이하의 감마선 조사를 제한된 식품 내에서 허가하고 있으며, 1995년 5월까지 허용된 식품은 약 20여종이다(6). 이는 식품의 발아억제, 살충 및 숙도조절 등의 목적에 한하여 실시하고 있기 때문에 허용대상 식품의 종류와 식품별 흡수선량이 규제되고 있으며, 허용식품은 건강보조 식품원료와 기초 향신료 및 가공원료에 편중되어 있어 전반적인 식품산업의 방사선 조사에 대한 산업적 활성화에는 커다란 효과를 주지 못하고 있다.

육류의 방사선 조사는 미생물의 살균, 효소 불활성화 등으로 도살 직후부터 부패되기 쉬운 육류를 저장, 운송하기에 가장 적합한 방법으로 여겨져 미국 FDA에서는 1997년 냉동육을 포함한 적색육에 대하여 미생물 살균을 목적으로 냉장육의 경우 최고 4.5kGy, 냉동육의 경우 최고 7kGy를 허가하였고, 돼지고기에 대해서는 기생충(선모충) 제거를 위하여 1.0kGy 이하의 방사선 조사를 허가하였다(4,7). 이는 미국에서 수출되는 육류 제품에 대한 수입국의 까다로운 위생검사를 극복하기 위해 취해진 조치로서 앞으로 국제 무역에 있어서 방사선 조사기술의 이용이 더욱 확대되리라 추정된다. 게다가 본격적인 WTO 체제하에서의 국제무역에 있어 통과기준이 되는 국제식품규격위원회(Codex) 법안에는 모든 식품류의 방사선 조사를 승인하고 있다(8). 따라서 서구화된 식생활로 육류 소비가 날로 증가하고 있는 우리나라의 실정을 생각해 보면 방사선 조사 육류가 식탁에 오를 날은 얼마 남지 않았지만 식품조사 허가품목에도 빠져있을 뿐 아니라 그 기준도 확립되어 있지 않은 실정이다.

방사선 조사식품에 대한 소비자들의 부정적인 선입견(9)을 불식시킬 수 있는 방법은 실험상으로 그 안전성을 검증하여 그 결과를 토대로 소비자들을 교육, 홍보하는 것이다. 국내에서는 방사선을 실험 동물의 신체 일부분 혹은 전체에 직접 조사한 후 그로 인한 영향에 대한 연구나(10), 방사선 조사 식품자체의 품질 변화, 과산화물 생성 및 색소변화 등에 관한 일부 연구(11,

12)는 있으나 조사식품을 식이로 섭취시킨 후 *in vivo* 상에서 효과를 조사한 연구는 드물다.

따라서 본 실험에서는 방사선 조사 최고기의 안전성에 관한 연구의 일환으로, 화학물질로 유도한 간 발암 모델에서 방사선 조사 최고기 섭취가 항산화 비타민의 영양상태 및 항산화 관련효소의 활성도에 미치는 영향을 조사하고 아울러 방사선 조사선량에 따라 이들 항산화 방어체계에 차이가 있는지를 조사해 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험설계 및 실험식이

80~90g 정도로 이육된 3주령 Sprague-Dawley종을 이용하여 각 군간의 차이가 없도록 난피법으로 따라 방사선 조사 선량(0kGy, 3kGy, 5kGy)과 DEN 투여 여부에 따라 6군으로 나누어 실험식이를 공급하였다. 방사선 조사는 그린피아기술주식회사에서 보유하고 있는 ⁶⁰Co γ -radiation을 사용하였다.

식이 성분 조성은 AIN-76을 본 연구에 적합하도록 수정하여 사용하였다. 각 군의 실험식은 모든 영양소의 함량을 동일하게 하였으며, 단백질 대용으로 육류를 섞어 주었고 식이 지방의 함량은 쇠고기속의 지방함량과 2% 옥수수유 첨가한 것을 합하면 식이 무게의 약 7%정도 되었다. 실험설계와 실험식은 전보(13)와 같다.

시료수집

실험식이를 공급한지 9주째에 실험동물을 12시간 금식시킨 후 단두로 희생시켜 시료를 수집하였다.

혈청의 분리는 단두 후 즉시 경동맥으로부터 혈액을 받아 상온에서 응고시킨 후 3,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액인 혈청을 분리하여 분석실험에 사용하였다.

간은 단두 후 즉시 절제하여 차가운 생리식염수로 여러 번 흔들어 씻은 후 여과지에서 여분의 수분을 제거하여 중량을 측정한 후에 Masmoudi 등(14)의 방법에 따라 cytosol과 microsome을 분리한 후 액체 질소에 급속 동결시켜 -80°C에 보관하였다가 분석시 꺼내어 사용하였다.

생화학적 분석

혈청의 비타민 C

혈청 비타민 C 함량 측정은 혈청에 0.75M meta-phosphoric acid를 가하여 제단백 시킨 후 2,4-dinitrophenylhydrazine method(15)에 의하여 혈청 분리 당일

측정하였다.

혈청과 간의 tocopherol과 retinol 함량 측정

혈청과 간의 α -tocopherol과 retinol 함량은 시료를 hexane으로 추출한 후 Bieri 등(16) 및 Hatam과 Kayden (17)의 방법을 참조하여 HPLC로 분석하였다.

HPLC의 조건은 Nova-Pak C18 column(3.9×150 mm)을 사용하여 측정하였고, mobile phase는 methanol : water(95 : 5)로 1.5ml/min의 유속을 유지하였다. Retinol과 α -tocopherol의 표준용액을 HPLC에 주입하여 표준 용액의 peak area와 시료의 peak area를 비교하여 정량하고 혈청에서는 각각 μg retinol/ml serum, μg α -tocopherol/ml serum으로 간에서는 각각 μg retinol/g liver, μg α -tocopherol/g liver로 나타내었다.

항산화 관련효소 활성도 측정

간 cytosol의 glutathione peroxidase(GSH-Px)의 활성도는 Paglia와 Valentine(18) 및 Deagen 등(19)의 방법을 수정하여 기질로 H_2O_2 를 이용한 coupled enzyme assay 방법으로 측정하였다. GSH-Px는 환원형 GSH를 GSSG로 산화시키며, 이것이 다시 GSH-reductase에 의해 GSH으로 환원될 때 NADPH는 산화되는데, 이런 NADPH의 산화 정도를 340nm에서의 흡광도 감소 속도로 측정하였다. GSH-Px의 활성도는 NADPH의 분자흡광계수 $6.22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 1분 동안 mg protein당 산화되는 NADPH의 nmole 수로 표시하였다.

Glutathione reductase는 Carlberg와 Mannervik의 방법(20)을 이용하여 cytosol에서 GSSG와 NADPH를 기질로 하여 GSH로 환원될 때 NADPH가 산화되는 정도를 340nm에서 흡광도의 감소 속도로 측정하였다.

Glutathione S-transferase(GST) 활성도는 Habig 등(21)의 방법으로 cytosol에서 측정하였다. Cytosol GST 활성도는 GSH와 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene(CDNB)를 기질로 사용하여 340nm에서 흡광도의 증가 속도를 측정하여 분당 생성되는 conjugated CDNB의 양으로 측정하였고, 활성도 계산은 이 물질의 분자흡광계수 $9.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 이용하였다.

Catalase는 Abei의 방법(22)에 따라 효소의 기질인 H_2O_2 의 감소 속도를 spectrophotometer를 이용하여 240 nm에서 측정하였다. Catalase의 활성도는 과산화수소의 분자흡광계수 $43.6\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 이용하여 계산하였고 mg protein당 1분 동안 결합되는 reduced H_2O_2 의 μ mole 수로 표시하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 활성은 Markunmd와 Marklund(23) 및 Sheri의 방법(24)을 수정하여 pyrogallol의 autoxidation을 SOD가 억제하는 정도를 통하여 측정하였다. Total SOD 활성도를 측정하기 위하여

간조직 1g을 냉각시킨 후 0.25M sucrose buffer로 균질액을 만든 다음 0°C 14,000rpm에서 1시간 원심 분리하였다. 그 상층액을 50mM Tris-cacodylic acid buffer로 5배 희석하였다. 그 중 40 μ l를 취해 Tris buffer 6ml, pyrogallol 40 μ l를 가한 후 혼합하여 420nm에서 흡광도의 증가 속도를 측정하였다. Enzyme 1 unit는 pyrogallol autoxidation을 50% 방해하는데 필요한 효소의 양으로 산출하였다.

위의 Tris-cacodylic acid buffer에 1mM potassium cyanide(KCN)를 1 : 1비율로 첨가하여 위와 동일한 방법으로 Mn-SOD 활성을 측정하였다. Cu, Zn-SOD활성은 total SOD 활성에서 Mn-SOD 활성을 감산하여 산출하였다.

단백질 함량 측정

Cytosol의 단백질 함량은 Lowry 방법(25)으로 측정하였다. 이때 표준 물질로는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하여 계산하였다.

통계 처리

방사선 조사 정도와 발암물질 투여에 따른 효과와 이들간의 상호작용을 보기 위하여 실험결과를 2-way analysis of variance(ANOVA)로 분석하여 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 유의성을 검증하였다. 모든 실험 결과의 통계 처리는 Statistical Analysis System(SAS) program package를 이용하였고, 실험분석 결과는 평균과 표준 편차로 표시하였다.

결과 및 고찰

실험동물의 체중, 간 무게

8주간 동물을 사육한 후 최종 체중은 방사선 조사정도나 발암물질 투여에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 1). 이 결과는 대부분의 선행 연구에서도 방사선 조사 식이를 먹인 군이 대조군과의 체중 차이가 없었던 것(26)이나, 방사선 조사군이 비조사군에 비해 성장률이 약간 느리기는 하지만 결국 두 군이 같은 체중에 도달하게 됐다는 보고(27)와 일치하였다.

간 무게는 방사선 조사에 따른 차이는 없었고, 발암물질을 투여한 경우에 유의적으로 증가하였다. 따라서 체중에 대한 간 무게의 비율(간 무게/체중)도 발암물질을 투여한 군에서 유의적으로 증가하였다. 이는 발암물질을 투여한 다른 연구들에서도 유사한 결과를 보여 주었다(28). 특히 간의 상태를 육안으로 살펴보았을 때

Table 1. Effect of γ -irradiated beef feeding on body weight and liver weight of rat treated with DEN

Group ¹⁾	Body weight(g)	Liver weight(g)	Liver wt./Body wt. ratio(%)
C	331.7±17.2 ^{2)NS3)}	8.3±0.9 ⁴⁾	2.5±0.2 ^b
C-DEN	324.8±33.3	11.5±1.6 ^a	3.6±0.4 ^a
3I	320.8±23.2	8.0±0.5 ^b	2.5±0.2 ^b
3I-DEN	323.5±37.8	12.1±1.1 ^a	3.8±0.4 ^a
5I	326.4±25.4	8.3±1.0 ^b	2.6±0.3 ^b
5I-DEN	327.6±13.9	11.8±0.8 ^a	3.6±0.2 ^a

¹⁾C=No irradiation, 3I=3KGray irradiation, 5I=5KGray irradiation

²⁾Values are mean±SD.

³⁾NS=not significant

⁴⁾Means with difference superscripts within a column are significantly different at p<0.05.

발암물질 투여군에서 간이 매우 비대해 있고 섬유질화 되어 있었다.

혈청 비타민 C, retinol 및 α -tocopherol 함량

항산화 비타민의 영양상태를 조사하기 위하여 혈청에서 비타민 C, retinol과 α -tocopherol의 함량을 측정 한 결과 방사선 조사에 의한 효과는 나타나지 않았으나 발암물질 투여에 따라 유의적으로 증가하였다(Table 2).

비타민 C는 지질과산화 반응을 억제시키며 친수성 라디칼을 효과적으로 제거하는 첫 방어체계로서 작용하기 때문에, 본 실험에서는 암화과정에서 생성되는 지질과산화물과 라디칼을 제거하기 위해 발암물질 투여군에서 혈청 비타민 C가 유의적으로 증가되었다고 추측된다. 이는 에탄올을 공급함으로써 체내 산화적 스트레스를 유발한 실험에서 에탄올 급여군이 비급여군보다 혈장내 총 비타민 C 함량이 유의적으로 낮았다는 실험 결과(29)와 상반되는 결과를 보였다.

특히 수용성 비타민이 지용성 비타민보다 방사선 조

사에 덜 민감하여 비타민 C의 경우 방사선 조사시 파괴되는 정도는 열처리 과정 중에 일어날 수 있는 정도에 지나지 않는다고 하여(30), 본 연구에서 사용된 감마선 조사량으로는 쇠고기의 비타민 C 함량에 크게 차이가 없을 것으로 생각된다.

혈청의 retinol 함량과 α -tocopherol 함량도 혈청 비타민 C와 유사하게 방사선 조사에 따른 유의적인 차이는 없었으나 발암물질 투여에 의하여 유의적으로 증가하였다. 이는 발암물질을 투여한 다른 연구의 결과(31)와 유사하게 혈청 α -tocopherol 함량의 증가를 보이고 있으며 이는 발암물질 투여에 의해 산화적 스트레스가 증가함에 따라 이에 대처하기 위하여 혈청 α -tocopherol의 함량이 증가된 것으로 생각된다. 또한 혈청 α -tocopherol의 경우에는 실험군, 대조군 모두에서 비조사 쇠고기를 섭취한 군들이 조사 쇠고기를 섭취한 군보다 혈청 α -tocopherol의 함량이 높은 경향을 보였다. 이는 혈청과 조직의 비타민 E 수준이 식이요인의 영향을 받는다는 보고(32)에 따라 방사선 조사에 감수성이 큰 비타민 E가 조사에 의해 영향을 받아(30) 조사육에 있는 비타민 E 함량 감소에 따른 섭취량의 차이 때문일 가능성도 있다.

간의 retinol 및 α -tocopherol 함량

간의 retinol 함량은 발암물질의 투여와 방사선 조사에 의해서 유의성 있게 변화되었다. 즉 방사선 조사에 의해 유의적으로 감소(p<0.0433)하고 발암물질 투여에 의해서도 유의적으로 감소(p<0.0001)하고 있으나, 방사선 조사와 발암물질 투여에 의한 교호작용은 보이지 않았다.

반면에 간의 α -tocopherol 함량은 방사선 조사와 발암물질 투여에 의해 유의적인 변화를 보이지 않았다(Table 3). 발암물질 비투여군은 방사선 조사 정도에 따

Table 2. Effect of γ -irradiated beef feeding on serum ascorbic acid, retinol and α -tocopherol contents of rats treated with DEN

Group ¹⁾	Ascorbic acid (μ g ascorbic acid/L Serum)	Retinol (μ g retinol/ml Serum)	α -Tocopherol (μ g tocopherol/ml Serum)
C	12.63±1.23 ²⁾³⁾	0.29±0.10 ^{abc}	8.40±1.24 ^{bcd}
C-DEN	14.40±3.09 ^{ab}	0.34±0.08 ^{ab}	12.09±2.07 ^a
3I	11.23±3.45 ^b	0.25±0.03 ^c	7.50±1.46 ^d
3I-DEN	15.74±4.18 ^a	0.37±0.08 ^a	11.30±3.00 ^{ab}
5I	12.80±3.58 ^b	0.27±0.05 ^{bc}	7.93±2.50 ^{cd}
5I-DEN	16.62±2.03 ^a	0.37±0.04 ^a	10.88±3.43 ^{abc}

¹⁾C=No irradiation, 3I=3KGray irradiation, 5I=5KGray irradiation

²⁾Values are mean±SD.

³⁾Means with different superscripts within a column are significantly different at p<0.05. By two-way ANOVA, DEN treatment effects for ascorbic acid, retinol and tocopherol were significant at p<0.0001, p<0.0003 and p<0.002, respectively.

Table 3. Effect of γ -irradiated beef feeding on hepatic retinol and α -tocopherol contents of rats treated with DEN

Group ¹⁾	Retinol (μg retinol/g liver)	α -Tocopherol (μg tocopherol/g liver)
C	127.63 \pm 17.84 ^{2)a3)}	32.70 \pm 7.53 ^{NS4)}
C-DEN	61.88 \pm 29.96 ^c	26.57 \pm 3.68
3I	120.08 \pm 22.96 ^{ab}	28.35 \pm 9.34
3I-DEN	68.35 \pm 27.58 ^c	27.04 \pm 8.92
5I	99.32 \pm 23.36 ^b	27.24 \pm 8.67
5I-DEN	53.63 \pm 14.44 ^c	26.32 \pm 3.60

¹⁾C=No irradiation, 3I=3KGray irradiation, 5I=5KGray irradiation

²⁾Values are mean \pm SD.

³⁾Means with different superscripts within a column are significantly different at $p < 0.05$. By two-way ANOVA, Both DEN treatment and irradiation effects for hepatic retinol were significant at $p < 0.0433$ and $p < 0.0001$, respectively.

⁴⁾NS=not significant

라 함량이 감소하는 듯 하였으나 유의적인 차이는 없었고, 발암물질 투여에 따라서도 감소의 경향을 보였으나 역시 유의적인 차이는 없었다. 간의 retinol과 α -tocopherol 함량은 C(No irradiation + 발암물질 비투여)군이 가장 높았고 5I-DEN(5kGy irradiation + DEN)군이 가장 낮았다.

본 실험에서 발암물질 투여에 의해 혈청의 retinol, α -tocopherol 함량은 증가한 반면 간의 retinol은 유의적으로 감소하였고, α -tocopherol 함량은 감소 경향을 보였다. 이러한 결과는 발암물질을 투여한 Yoon(31)의 연구 결과와 유사한 경향을 보이는데, 이는 발암물질 투여시 각 조직에서 비타민 A, E의 요구가 증가됨에 따라 간에서 혈액으로의 이동이 많아져 간에서의 함량이 감소된 것으로 생각된다.

간의 glutathione 의존 항산화 효소 활성화도

간 cytosol의 GSH-Px의 활성화도는 발암물질 비투여

군에 비해 투여군에서 유의적으로 감소($p < 0.0008$)하였고, 방사선 조사 정도에 따라 약간 낮아지는 경향을 보였으나 유의적이지는 않았다(Table 4).

GSH-Px는 세포막을 보호하고 microsome에서 생성된 H_2O_2 등의 과산화물 해독기능에 catalase보다 더 효과적으로 작용하며 자체에 selenium을 함유하고 있다. 본 실험의 결과는 화학적 발암원으로 유도한 마우스의 간암 세포에서 그 활성도가 감소했으며(33) 또한 DEN 투여 후 phenobarbital(PB)로 간암을 유도한 실험에서 발암물질 투여군이 대조군에 비해 GSH-Px의 활성도가 유의적으로 낮았다는 보고(34) 등과 유사한 결과를 보여 주었다.

간 cytosol의 GSH-Rd의 활성화도는 발암물질 투여에 따라 유의적으로 증가($p < 0.030$)하였고 발암물질 비투여군들에서는 방사선 조사 정도에 따라 GSH-Rd의 활성화도가 감소하는 경향을, 발암물질 투여군에서는 증가하는 경향을 보이고 있어 발암물질 투여에 따른 민감한 활성화도의 변화를 보였다.

GSH-Rd는 직접 과산화물 제거에 관계하는 것이 아니라, GSH-Px에 의해 생성된 산화형 glutathione(GS-SG)을 환원형 glutathione(GSH)으로 전환하는 역할을 하며 세포 내에 glutathione 수준을 유지하는데 중요한 역할을 한다(35).

본 실험에서 발암물질 투여에 의해 GSH-Rd 활성화도가 증가된 결과는 간의 암화 촉진과정 동안 간에서 GSH-Rd의 활성화도가 증가했다고 보고한 다른 여러 연구들(33,35)과 일치하는 결과이다. 하지만 본 실험과는 달리 Lankin 등(36)은 발암물질을 투여했을 때 GSH-Px와 함께 GSH-Rd의 활성화도가 감소하였다고 보고하고 있어 이 부분에 대한 더 많은 실험이 요구된다.

간 cytosol의 GST 활성화도는 발암물질의 투여에 의해 유의적으로 증가($p < 0.001$)하였고, 방사선 조사에 의

Table 4. Effect of γ -irradiated beef feeding on cytosolic glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rats treated with DEN

Group ¹⁾	GSH-Px	GSH-Rd	GST
	(nmole NADPH oxidized /mg protein/min)	(nmole NADPH oxidized /mg protein/min)	(nmole CDNB conjugated /mg protein/min)
C	88.58 \pm 11.78 ^{2)a3)}	26.27 \pm 12.70 ^{ab}	438.54 \pm 123.26 ^b
C-DEN	69.93 \pm 22.55 ^{bc}	25.71 \pm 9.33 ^{ab}	1122.09 \pm 232.65 ^a
3I	79.01 \pm 23.47 ^{ab}	21.15 \pm 10.05 ^{ab}	427.03 \pm 174.30 ^b
3I-DEN	58.80 \pm 5.42 ^c	29.22 \pm 8.28 ^{ab}	1214.88 \pm 186.78 ^a
5I	77.77 \pm 14.37 ^{ab}	18.46 \pm 9.27 ^{ab}	452.62 \pm 90.66 ^b
5I-DEN	66.46 \pm 8.37 ^{bc}	34.66 \pm 19.99 ^a	1141.00 \pm 215.86 ^a

¹⁾C=No irradiation, 3I=3KGray irradiation, 5I=5KGray irradiation

²⁾Values are mean \pm SD.

³⁾Means with different superscripts within a column are significantly different at $p < 0.05$. By two-way ANOVA, DEN treatment effects for GSH-PX, GSH-Rd and GST were significant at $p < 0.0008$, $p < 0.030$ and $p < 0.0001$, respectively.

한 변화는 보이지 않았다. 이는 GST-Px의 활성도와는 정반대의 양상이고, GSH-Rd의 활성도와는 유사한 양상을 보여 Carlberg 등(35)이 보고한 발암물질로 간암을 유도했을 때 cytosol의 GST가 크게 증가한다는 것과 일치하였다.

GST는 간에 존재하며 외부물질이 체내에서 대사되는 과정에서 생성되는 친전자성 물질을 glutathione의 sulfhydryl(-SH)기와 결합시켜 glutathione-S-conjugated를 형성하여 더 배설되기 쉬운 물질로 만들어 해독과정에 기여하는 효소이다. 발암물질 투여시 활성도가 증가한 GST는 활성화된 발암물질을 glutathione과 결합시켜 배설을 용이하게 함으로써 간암 발생을 변화시키는 중요한 역할을 하는 것으로 보인다(37). 이 GST는 발암물질 해독과 더불어 막의 지질과산화물을 제거하는데도 효과적으로 작용했을 것으로 사료된다.

간의 catalase 및 superoxide dismutase 활성도

Catalase는 지질과산화에 대한 방어기작으로, 지질의 산화를 유발시키는 스트레스 시에 유도되어 지질과산화물 개시시키는 활성 산소를 제거하는 역할을 한다(22).

간 cytosol의 catalase 활성도는 방사선 조사에 의한

차이는 보이지 않았고, 발암물질 투여군이 비투여군보다 약간 낮은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다 (Table 5). 이는 쥐의 간을 에탄올로 손상시킨 후 catalase 활성도를 측정된 결과 실험군과 대조군 간의 유의적인 차이가 없었다는 연구결과(38)와 유사하였다.

Mn-SOD, Cu,Zn-SOD의 활성도는 방사선 조사와 발암물질 투여에 있어서 유의적인 차이를 보이지 않았으나, Cu,Zn-SOD 활성도는 발암물질 투여에 대해서 유의성은 없으나 증가하는 경향을 보였다(Table 6).

Mn-SOD 활성과 Cu,Zn-SOD 활성을 모두 감안한 Total SOD 활성은 역시 방사선 조사와 발암물질 투여에 있어서 유의적인 차이는 없었지만 비투여군에 비해 발암물질 투여에 따라 증가되는 경향을 보였다.

대부분의 간암 세포에서 O₂ 생성과 함께 SOD 활성이 감소되며 Mn-SOD는 거의 소실된다(39)고 하였고, 간 질환상태에서도 Cu,Zn-SOD 활성이 감소되어 활성 산소에 의한 free radical 손상을 더 쉽게 받을 것이라고 하였으나(40) 본 실험 결과와는 일치하지 않았다. 또 Choi 등(37)의 연구에 의하면 AAF를 처리한 군에서 Cu,Zn-SOD 활성이 유의적으로 낮아졌고 Total SOD 활성도 역시 낮아졌다는 보고가 있었으나, 이는 본 실험과 상반되는 결과였다. Zidenberg-Cherr 등(41)의 연구에서는 간 MDA의 증가에 따라 SOD의 활성이 증가되었다고 하지만, 본 연구에서는 간 MDA가 높은 발암물질 투여군에서 SOD 활성도가 증가하는 경향만 보일 뿐 유의적인 차이는 없었다.

요 약

본 연구는 방사선 조사 우육의 안전성 평가의 일환으로 실험적 간 발암모델에서 방사선 조사 쇠고기의 섭취가 동물의 항산화 비타민들의 영양상태와 항산화 방어 효소계 활성도 변화에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 체중은 방사선 조사 정도

Table 5. Effect of γ -irradiated beef feeding on cytosolic catalase activities in rats treated with DEN

Group ¹⁾	Catalase (μ mole H ₂ O ₂ reduced/mg protein/min)
C	235.54 \pm 170.94 ^{2)NS3)}
C-DEN	199.65 \pm 211.97
3I	219.02 \pm 108.43
3I-DEN	229.56 \pm 140.57
5I	200.51 \pm 56.35
5I-DEN	195.70 \pm 74.39

¹⁾C=No irradiation, 3I=3KGray irradiation, 5I=5KGray irradiation

²⁾Values are mean \pm SD.

³⁾NS=not significant

Table 6. Effect of γ -irradiated beef feeding on hepatic superoxide dismutase activities in rats treated with DEN

Group ¹⁾	Total SOD (unit/mg protein/min)	Mn-SOD (unit/mg protein/min)	Cu,Zn-SOD (unit/mg protein/min)
C	52.06 \pm 8.16 ^{2)NS3)}	18.56 \pm 11.15 ^{NS}	33.50 \pm 6.85 ^{NS}
C-DEN	58.38 \pm 8.01	21.65 \pm 9.25	36.73 \pm 10.68
3I	50.37 \pm 21.49	20.00 \pm 10.93	30.37 \pm 17.13
3I-DEN	52.34 \pm 6.62	19.13 \pm 9.64	33.20 \pm 5.92
5I	53.39 \pm 11.43	20.49 \pm 7.15	32.90 \pm 16.64
5I-DEN	56.01 \pm 8.03	20.06 \pm 8.28	35.95 \pm 6.50

¹⁾C=No irradiation, 3I=3KGray irradiation, 5I=5KGray irradiation

²⁾Values are mean \pm SD.

³⁾NS=not significant

와 조사 유무 및 발암물질 투여에 따라 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 간 무게는 방사선 조사에 따른 차이는 없었으며 발암물질 투여에 따라서는 유의적으로 증가하였다. 체중에 대한 간 무게의 비율 역시 발암물질 투여에 따라서 유의적으로 증가하였다. 혈청에서의 비타민 C 함량은 방사선 조사에 대한 차이는 보이지 않았으나 발암물질 투여군에서 유의적으로 감소하였다. 혈청과 간의 α -tocopherol 함량은 발암물질 투여에 의하여 혈청에서는 유의적으로 증가하였으나 간에서는 감소의 경향을 보였고, 방사선 조사 유무에 따라 비조사군보다 조사군이 약간 감소의 경향을 보였다. 혈청과 간의 retinol 함량은 발암물질 투여에 따라 혈청에서는 유의적으로 증가하였고 간에서는 현저하게 감소하였다. 또 간의 retinol 함량은 방사선 조사 정도에 따라 조사량이 많을수록 유의적으로 감소하였으나 방사선 조사와 발암물질에 대한 교호작용은 없었다. 간 cytosol의 glutathione peroxidase 활성도는 방사선 조사에 대한 차이는 보이지 않았으나 발암물질 투여에 따라 유의적으로 감소하였다. 간 cytosol의 glutathione-S transferase 활성도는 발암물질 투여에 따라 현저히 증가하였고, glutathione reductase 활성도 역시 유의적으로 증가하였다. 두가지 효소 모두 방사선 조사에는 변화를 보이지 않았다. 간 cytosol의 superoxide dismutase와 catalase 활성도는 모두 방사선 조사와 발암물질 투여에 따른 차이를 보이지 않았다. 이상의 실험 결과를 요약해 보면 방사선 조사 유무와 조사량의 차이가 단지 간의 retinol 함량에만 영향을 주어 방사선 조사량이 많을수록 간의 retinol 함량이 감소하였으나, 다른 항산화 비타민이나 항산화 관련 효소계 활성도에는 별 영향을 주지 못하였다. 따라서 본 연구에서 쇠고기 조사에 사용된 5kGy까지는 동물 체내에서 큰 영향을 주지 않아 안전한 선량으로 사료되나, 앞으로 보다 많은 영양소에 대한 연구와 확대된 선량에서 조사했을 때의 영향에 대한 심도있는 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 과학기술처 원자력연구개발과제의 연구비로 수행되었으며 그 지원에 감사드립니다.

문헌

1. FDA : Irradiation in the production, processing and handling of food.-Food and Drug Administration. *Fed. Reg.*, **51**, 13376-13399(1986)
2. Byun, M. W. : Application and aspect of irradiation technology in food industry. *Food Sci and Industry*, **30**, 89-100(1997)
3. Derr, D. D. : International regulatory status and harmonization of food irradiation. *J. Food Protect.*, **56**, 882-886(1993)
4. IAEA : *Clearance of item by country*. Intl Atomic Energy Agency, Vienna, Austria(1997)
5. ICGFI : Summary report on eleventh meeting of the international consultative group on food irradiation. Denpasar, Bali, Indonesia, 2-4 November(1994)
6. 보건복지부 : 방사선 조사기준 및 규격개정. 보건복지부 고시 제1995-34(1995. 5. 19)
7. 변명우, 김경표 : 방사선 조사식품에대한 미국의 최근동향. *식품산업과 영양*, **3**, 30-33(1998)
8. FAO/WHO : Codex General Standard for Irradiated Foods. Codex Alimentarius Commission, Rome, Italy (1984)
9. Bruhn, C. : Consumer attitudes and market response to irradiated food. *J Food Protect*, **58**, 175-181(1995)
10. Kim, N. K. : The early changes of exocrine pancreas and the induction of acute pancreatitis after irradiation in rats. Thesis for Medical Sciences, Yonsei University(1987)
11. Kwak, H. J., Kang, I. J., Kim, H. K., Chang, H. G. and Park, S. A. : Changes of physicochemical properties of gamma irradiated porks during storage. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**, 1267-1272(1998)
12. Yook, H. S., Lee, J. W., Lee, K. H., Kim, S. and Byun, M. W. : Effects of gamma irradiation on pigments of beef. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**, 1184-1188(1998)
13. Kim, J. H., Kim, M. J., Kang, I. J. and Byun, M. W. : Effects of γ -irradiated beef feeding on preneoplastic hepatic lesion, cytochrome P450 system and microsome glucose 6-phosphatase activity in rat hepatocarcinogenesis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 638-645(1999)
14. Masmoudi, A., Labourdette, G., Mersel, M., Huang, F. L., Huang, K. P., Vincendon, G. and Malviya, A. N. : Protein kinase C located in rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.*, **264**, 1172-1179(1989)
15. Pesce, A. J. and Kaplan, L. A. : Methods in clinical chemistry. The CV Mosby-Company, St. Louis Washington D.C. Toronto. Part 10, Chapter 75, 574-581 (1987)
16. Bieri, J. G., Tolliver, T. J. and Catignani, G. L. : Simultaneous determination of α -tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 2143-2149(1979)
17. Hatam, L. J. and Kayden, H. J. : A high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood. *J. Lipid Res.*, **20**, 639-645(1979)
18. Paglia, D. E. and Valentine, W. N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158-169(1967)
19. Deagen, J. T., Butler, J. A., Beilstein, M. A. and Wharver, P. D. : Effects of dietary selenite, selenocysteine and selenomethionine on selenocysteine lyase and glutathione peroxidase activities and on selenium

- levels in rat tissues. *J. Nutr.*, **117**, 91-98(1987)
20. Carlberg, I. and Mannervik, B. : Glutathione reductase. In "*Methods in Enzymol*" Academic press, Vol. 113, pp.484-490(1985)
 21. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferases : The first enzymatic steps in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139(1974)
 22. Abei, H. : Catalase *in vitro*. In "*Methods in Enzymology*" Academic press, Vol. 105, pp.121-126(1984)
 23. Markunmd, S. and Marklund, G. : Involvement of superoxide anion radical in the autoxidation of pyrallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469-474(1974)
 24. Sheri, Z. C., Keen, C. L. and Hurley, L. S. : Superoxide dismutase activity and lipidperoxidation in the rat-Developmental correlations affected by manganese deficiency. *J. Nutr.*, **113**, 2498-2504(1983)
 25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. T. : Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275(1951)
 26. Blood, F. R. and Darby, W. J. : Feeding of irradiated beef to rats. *Tox. Appl. Pharm.*, **8**, 235-240(1966)
 27. Richardson, L. R., Ritchey, S. J. and Rigdon, R. H. : Along-term feeding study of irradiated foods using rats as experimental animals. *Federation Proc.*, **19**, 1023-1027(1960)
 28. Kim, J. H., Yoon, H. J. and Jang, J. J. : Effects of sardine oil feeding and vitamin E supplement on the preneoplastic hepatic lesion and cholesterol metabolism in hepatocarcinogenesis of rats. *Korean J. Food Nutr.*, **1**, 214-219(1996)
 29. Seo, J. S., Yang, K. M. and Choi, M. J. : Effect of dietary vitamin A on the status of antioxidants in ethanol-treated rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 848-858(1995)
 30. Polister, B. H. and Mead, J. F. : Effect of certain vitamins and antioxidants on irradiation-induced autoxidation of methyl linoleate. *J. Agr. Food Chem.*, **2**, 199-202(1954)
 31. Yoon, H. J. : Effects of sardine oil feeding and vitamin E supplementation on histopathological and biochemical changes in experimental hepatocarcinogenesis. Thesis for Ph. D. in Seoul Women's university(1994)
 32. Scott, M. L. : Advances in our understanding of vitamin E. *Fed. Proc.*, **39**, 2736-2739(1980)
 33. Stout, D. L. and Becker, F. F. : Xenobiotic metabolizing enzymes in genetically and chemically initiated mouse liver tumors. *Cancer Res.*, **46**, 2693-2696(1986)
 34. Park, K. A. : Effect of different fats and proteins on the hepatic lipid peroxidation and membrane stability in PB-induced hepatocarcinogenesis. Thesis for M.S. in Seoul National University(1993)
 35. Carlberg, I., Depierre, J. W. and Mannervik, B. : Effect of inducers of drug metabolizing enzymes on glutathione reductase and glutathione peroxidase in rat liver. *Biochem. Biophys. Acta*, **667**, 140-145(1981)
 36. Lankin, V. Z., Polyakov, V. M., Askhangel, S. V. and Gurevich, S. M. : Metabolism of lipid peroxide during chemical carcinogenesis. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **87**, 270-273(1979)
 37. Choi, H. M., Kim, J. W. and Kim, S. H. : Suppressive effects of vitamin E on the induction of placental glutathione S-transferase(GST-P) positive foci and antioxidant enzyme activity in rat hepatocarcinogenesis. *Korean J. Nutr.*, **30**, 803-812(1997)
 38. Park, P. S., Lee, B. R. and Lee, M. Y. : Effects of onion juice on ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**, 750-756(1994)
 39. Oberley, L. W. and Buettner, G. R. : Role of superoxide dismutase in cancer: A review. *Cancer Res.*, **39**, 1141-1149(1979)
 40. Togashi, H., Shinzawa, H., Wakobayoshi, H., Nakamura, T., Yamada, N., Takahashi, T. and Ishikawa, M. : Activities of free oxygen radical scavenger enzymes in human liver. *J. Hepatol.*, **11**, 200-205(1990)
 41. Zidenberg-Cherr, S., Keen, C. L., Lonnerdal, B. and Hurley, L. S. Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in rat-developmental correlations affected by manganese deficiency. *J. Nutr.*, **113**, 2498-2504(1983)

(1999년 2월 6일 접수)