

항산화 비타민과 Aflatoxin B₁의 혼합 투여가 마우스 간의 지질 함량 및 지방산 조성에 미치는 영향

박선자* · 박정현 · 강말순* · 정덕화†

*진주보건대학 간호과, 경상대학교 식품공학과

The Effects of Aflatoxin B₁ Co-administrated with Antioxidant Vitamins on Lipid Contents and Fatty Acids Composition of Liver in Mice

Seon Ja Park*, Jung Hyun Park, Mal Sun Kang* and Duck Hwa Chung†

*Department of Nursing, Chinju Health College, Gyeongnam 660-757, Korea

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Gyeongnam 660-701, Korea

ABSTRACT – Lipid peroxidation is one of the main manifestations of oxidative damage and has been found play an important role in the toxicity and carcinogenesis of many carcinogens. This study was carried out to investigate the effects of aflatoxin B₁ co-administrated with antioxidant vitamins on lipid contents and fatty acids components of liver in mice. For this work, vitamin C and vitamin E, the major antioxidants, were administrated with 10 mg/kg and 63.8 mg/kg respectively, through intraperitoneal(i.p) injection to male ICR mice, and 0.4 mg/kg of the AFB₁ injected by i.p. 1hr later. The results were as follows: two fold amounts of free cholesterol, triglyceride, and total cholesterol in serum and liver of mice treated with only AFB₁ were observed, when compared to those of mice co-administrated with antioxidant vitamins. However, the levels of phospholipids in serum and liver of mice treated with only AFB₁ were decreased. Concerning to fatty acids composition of liver from AFB₁-treated mice, P/S ratio was shown more low level in cholesteryl ester, triglyceride, total cholesterol and phospholipid than those of mice co-administrated with antioxidant vitamins. In these data which provide with a reliable evidence on their antioxidant effects to aflatoxicosis.

Key words □ Aflatoxin B₁, Antioxidant vitamins, Lipid peroxidation, Fatty acids, Lipid contents.

Aflatoxin은 *Aspergillus*속 곰팡이가 생성하는 곰팡이 독소(mycotoxin)로서 독성이 강할 뿐만 아니라 aflatoxin B₁, aflatoxin B₂ 및 aflatoxin G₁등의 다양한 종류의 이성체를 포함한다. 이와같은 aflatoxin 이성체는 TLC(thin layer chromatography)에 의해서 발현하는 형광의 색에 따라서 B(blue)군, G(green)군으로 구분되며 이들을 섭취한 동물의 생체 대사물로서 소변, 유즙 등에서 발견되는 것이 M (metabolized)군으로 B₁, G₁ 및 M₁과 각각의 분자내에 수산화기가 치환된 B₂, G₂ 및 M₂가 가장 많이 알려져 있다. 이들 중 aflatoxin B₁이 가장 독성이 강하며 pH 3 이하의 산성과 pH 10 이상의 알칼리성 그리고 산화제, 환원제 및 자외선과 감마선에서 불안정하다. 그러나 열에 대하여 저항

성이 커서 280-300°C에서 분해되므로 일반 식품과 같은 가공, 처리로는 제거가 불가능하여 더욱 위생상의 문제를 크게 하고 있다. 한편, aflatoxin 생성 조건은 수분 16% 이상, 온도 25-30°C, 상대습도 80-85% 이상이다. 이러한 조건이 적당할 때 aflatoxin은 땅콩 뿐만 아니라 탄수화물이 풍부한 쌀, 보리, 밀 및 옥수수 등의 곡류가 주요한 기질이 되어 생성되는 것으로 알려져 있고, 또한 동일한 균주라 할 지라도 환경조건에 따라 aflatoxin 생성능에 차이를 보이는 것으로 되어있다.^{1,2)}

또한 aflatoxin은 종에 따라 감수성에 차이가 있지만 사람, 쥐, 무지개 송어, 기니아피그, 원숭이 등에서 원발성 간암을 유발하는 발암 인자로 알려져 있으며,^{3,4)} 특히 인체에 미치는 aflatoxin의 영향은 발암성, 돌연변이성(mutagenic)및 기형발생성(teratogenic)등이 있다. 그리고 aflatoxin은 드물

†Author to whom correspondence should be addressed.

게 급성 중독을 일으키는 것으로 보고되는데, 인도 서부 지역에서 수주 동안 하루에 2-6 mg의 aflatoxin을 섭취한 사람에게서 급성 간질환을 관찰할 수 있었다는 보고⁹⁾가 있다. 이러한 aflatoxin의 급성 작용 기전으로는 단백질 생성 저해와 면역 억제 작용이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 aflatoxin은 구조적으로 항응고제인 coumarine과 유사하여 1969년 Bababunmi와 Bassir^{6,7)}는 rat liver에서 factor II와 VII의 합성을 억제하여 prothrombin time을 연장시키는데 비타민 K를 주면 환원된다는 것을 알게 되었다. 또한 소아에서의 Reye 증후군과 Kwashiorkor 환자에서 다량의 aflatoxin이 검출되었다고 보고되어 학계의 관심을 끌었다.⁸⁾ 특히 aflatoxin은 세포막의 불안정성 및 mitochondrial swelling을 유발하며,¹⁰⁾ 주로 간에서 대사되면서 간의 탄수화물, 지방, 단백질 대사 활동을 억제한다¹¹⁾고 알려져 있다.

Aflatoxin의 식품 오염 정도와 오염된 음식을 많이 섭취하는 사람들에 있어서 혈액이나 소변에서의 aflatoxin의 농도정도를 측정하는 법에 대해서 외국에서는 많은 연구가 이미 보고되고있다. Aflatoxin의 식품 오염에 대한 연구도 상당히 진행되어 정 등¹²⁾은 영남지방의 농산물로부터 aflatoxin 생성균을 분리한 결과 총 342건 중 1.3%의 시료에서 *Asp. flavus*로 추정되는 곰팡이를 분리하였고, 기존 aflatoxin의 분석법을 개량한 ELISA법으로 영남지방에서 수집한 쌀의 4.6%가 aflatoxin에 오염되었음을 밝히기도 하였다.¹³⁾

Rahimtura 등¹⁴⁾, Omar 등¹⁵⁾에 의하면 aflatoxin의 독성이 간이나 신장의 microsome에서 NADPH 의존성 lipid peroxidation 이 일어나는 산화적 과정을 거치면서 독성을 일으킨다고 보고하였다. 이러한 대사 과정에서는 genotoxicity, cytotoxicity가 발생하는데 특히 aerobic condition에서는 최종 전자수용체로 산소를 사용하므로 대사 과정 중 반응성이 매우 높은 superoxide anion이 생성되며,¹⁶⁾ 이는 반응성이 아주 강한 파괴적인 물질로 DNA, protein, lipid 와 같은 많은 거대 분자들과 반응하여 NADPH-dependent lipid peroxidation을 유발하므로 조직들의 손상을 일으키며,¹⁷⁾ 여러 종류의 발암 및 apoptosis와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ 이런 물질들에 대한 신체 방어 기전으로 superoxide dismutase가 생성되어 superoxide anion을 hydrogen peroxide나 산소 분자로 산화시키고,¹⁹⁾ hydrogen peroxide를 제거하는 catalase를 생성하여 산화적 손상에 대응하며, 이러한 SOD, catalase는 inducible protein 으로 산화적 손상에 반응하여 증가된다고 한다. 이와같이 aflatoxin B₁으로 인한 독성 유발 기전이 oxygen free radical에 의한 산화적 손상이 원인이라는 관점에서 볼 때 항산화제 투여로 인한 산화 억제작용을 기대할 수도 있을

것이다.²⁰⁾

따라서 본 연구도 aflatoxin B₁을 마우스의 체내에 단독으로 투여하거나 또는 항산화 비타민과 혼합 투여후 실험동물의 간지질성분과 간의 지방산 조성에 미치는 영향에 관하여 실험하여, 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

실험동물에 투여된 aflatoxin B₁(AFB₁), vitamin C(VC), vitamin E(VE)는 Sigma 제품을 사용하였다. 그리고 지방 성분 및 지방산 조성을 측정하기 위하여 사용한 시약은 hexan, isopropanol, chloroform, methanol, petroleum ether, ethyl ether, acetic acid 등으로 모두 특급시약을 사용하였다. 지방 성분 측정용 kit로 총 콜레스테롤은 Cholestezyme-V(ASAN, Co.), 중성지방은 Trizyme-V (ASAN, Co.), 인지질은 Plzyme (IATRON, Co.) Free cholesterol C-Test (ASAN, Co.)을 이용하여 측정하였다.

그리고 실험에 사용된 중요 기기는 UV-spectrophotometer (Bekmans, Co. USA), homogenizer(Nihonseiki kaisha, AM-11, Japan), brushles D.C. Motor Centrifuge(Vision VS-6000 CF), ultrasonic cell membrane disruptor(Bandelin Sonopuls HD 60), Gas chromatograph (Shimadzu GC-17A)등이었다.

실험대상

본 실험을 위하여 대한실험동물센터로부터 ICR 계통의 생후 6주, 평균무게 30.2 g의 수컷 마우스를 구입하여 동물 사육장에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 25°C를 유지토록 하였으며 명암주기는 자연채광으로 하고 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 6군(n=6)으로 나누어 Table 1과 같이 처리하였으며, 모두 복강 투여(i.p. injection)로 2일에 한번씩, 4회 반복투여 하였다. 즉, 대조군인 제 1군은 용매 대조군으로 AFB₁을 녹인 용매 DMSO 50 μ l와 vitamin C를 녹인 용매 0.1M NaHCO₃ 50 μ l를 투여하였으며, 제 2군의 경우 AFB₁을 녹인 용매 DMSO 50 μ l와 vitamin E를 녹인 용매 corn oil 50 μ l를 투여하였다. 또한 제 3군은 0.4 mg/kg 농도의 AFB₁ 50 μ l와 0.1M NaHCO₃ 50 μ l를 투여하였고, 제 4군은 0.4 mg/kg농도의 AFB₁ 50 μ l와 corn oil 50 μ l를 투여하였으며, 제 5군은 수용성 항산화비타민의 효과를 보기 위해 vitamin C를 10 mg/kg의 농도로 투여한 뒤 3, 4군과 동일한 농도의 AFB₁을 투여하였다. 제 6군은 지용성 항산화비타민의 효과를 비교하기 위해 vitamin E를 63.6 mg/kg의

Table 1. Administration contents of the vitamin C, vitamin E and AFB₁ refer to grouping in different groups

Groups	contents	i.p. injected	
		dose	No. of animals
G1	DMSO + 0.1M NaHCO ₃	a+b	6
G2	DMSO + Corn oil	a+c	6
G3	0.1M NaHCO ₃ +AFB ₁	b+d	6
G4	Corn oil+AFB ₁	c+d	6
G5	AFB ₁ +vitamin C	d+e	6
G6	AFB ₁ +vitamin E	d+f	6

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

농도로 투여한 뒤 3, 4군과 같은 농도의 AFB₁을 투여하였다.

첫 번째 투여 후 8일째 ethyl ether 마취시키고 해체하여 실험을 실시하였다. 혈액은 심장에서 채혈하였으며, 50 ml 주사기를 사용하여 차가운 PBS(0.1 M, pH 7.4)를 복부 대정맥을 통해 주입하여 혈액을 제거한 다음, 간을 적출 하여 차가운 PBS에 담가 잔여혈액을 다시 제거한 후 -70°C에 보관하면서, 지질성분 및 지방산 조성 측정을 위한 실험을 수행하였다.

실험방법

간장과 혈청에서의 지질성분 분리 및 함량 측정

간조직에서의 지질성분을 분리하고 그 함량 측정은 다음과 같이 행하였다. 즉 조직 1.0 g을 hexane : isopropanol (H : IOH = 3 : 2, v/v) 혼합액으로 지질을 추출하여 20 ml로 정용한 다음 각 측정 kit 시약의 표준용액 농도를 기준으로 추출액 (총 콜레스테롤; 400 μ l, 유리콜레스테롤; 500 μ l, 중성지질 100 μ l, 인지질 100 μ l)을 취하여 질소 건조시킨 후 실험과정에 따라 총콜레스테롤, 중성지질, 인지질의 함량을 측정하였다. 또한 혈청에서의 지질 분석은 심장 채혈 후 -70°C에 보관 중이던 용혈되지 않은 혈청 20 μ l를 총콜레스테롤 분석에 사용하였으며, 그 외 유리콜레스테롤 분석을 위하여 혈청 100 μ l, 인지질 분석을 위하여 동일한 혈청 20 μ l를 사용하여 효소법에 의한 kit에 준하는 방법으로 측정하였다. 즉, 콜레스테롤 및 유리콜레스테롤의 함량 측정은 총콜레스테롤 측정용 kit(Cholestesyme-V ASAN Co.)를 사용하였고, 유리콜레스테롤 농도는 유리콜레스테롤 측정용 kit(Free cholesterol C-Test ASAN Co.)로 측정하였다. 그리고 중성지질 및 인지질 측정을 위해서는 중성지질 측정용 kit(Triglyzyme-V ASAN Co.)와 인지질 측정용 kit(Plzyme IATRON Co.)로 각각 측정하여 산출하였다.

Table 2. Gas Chromatography conditions for the analysis of fatty acids

Items	Conditons
Instrument	ShimadzuGC-10
Column	OMEGAWAX320 30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m
Detector Type	Flame Ionosatio Detector
Column Temp.	160~250°C, 4°C/min
Injector Temp.	260°C
Detector Temp.	260°C
Carrier Gas	He. 1.5 Kg/cm ²
Split ratio	1:100

간장의 지방산 조성 분석

AFB₁이 간장의 지방산 조성에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위해, Canuto²¹⁾의 방법을 응용하여 실험실에서 확립한 방법으로 실험을 실시하였다. 즉, 간 조직 1.0 gm을 취하여 hexane : isopropanol (H : IOH = 3 : 2, v/v) 혼합액으로 추출하여 20 ml로 정용한 다음 지질추출액을 질소 건조시키고 0.5 ml의 hexane에 녹여 Kieselgel 60 G를 사용한 TLC 박층에 line a spot한 다음, 전개액(petroleum ether : ethyl ether : acetic acid = 82 : 18 : 1, v/v)으로 전개, 풍건하여 요오드 증기로서 발색시켜 인지질, 중성지질 및 콜레스테롤 에스테르의 3가지 지질 성분으로 분리하였다. 분리된 지질성분을 H : IOH 혼합액으로 재 추출 후 4% H₂SO₄로 methylesterylation 시켜 가스크로마토그래피(gas chromatograph)로 분석하였으며 기기의 분석조건은 Table 2와 같다.

통계처리

대조군과 AFB₁ 투여 및 항산화 비타민 혼합 투여군 사이의 결과치는 평균치와 표준편차로 표기(mean \pm 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.

실험 결과

간의 지질성분에 미치는 영향

AFB₁이 투여된 ICR mice 간에서의 지질성분에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3에서와 같이 총 콜레스테롤 수치는 AFB₁ 단독 투여군이 9.54 ± 1.23 , 10.00 ± 1.17 (mg/

Table 3. Lipid components of the liver in each groups

	(Unit : mg/g)			
	Total cholesterol	Free cholesterol	Phospholipid	Triglyceride
	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD
G1	3.48±1.39 ^b	4.32±1.57 ^b	20.02±7.11 ^b	5.70±5.65 ^d
G2	3.54±1.01 ^b	4.09±1.41 ^b	19.00±8.42 ^b	7.07±5.67 ^{cd}
G3	9.54±1.23 ^a	10.71±1.57 ^a	45.58±7.03 ^a	34.40±6.34 ^a
G4	10.00±1.17 ^a	11.47±1.91 ^a	47.72±6.63 ^a	28.16±7.10 ^{ab}
G5	4.63±0.58 ^b	6.65±1.56 ^b	13.08±7.93 ^b	17.62±2.57 ^{bc}
G6	4.51±0.23 ^b	6.76±1.12 ^b	14.37±4.82 ^b	18.35±3.09 ^b
F	51.28 ^{**}	24.54 ^{**}	29.61 ^{**}	26.99 ^{**}
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. All values represent mean±S.D(Standard Deviation). Description related to groups was revealed in detail on Table 1.

g)으로 대조군의 3.48±1.39, 3.54±1.01에 비해 유의적(p<0.01)으로 높은반면 항산화 비타민의 투여군은 대조치와 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다. 유리 콜레스테롤과 인지질에 있어서도 총 콜레스테롤과 동일한 경향의 유의성을 나타내었으며, 중성지방은 AFB₁ 투여군에서 34.40±6.34, 28.16±7.10(mg/g)으로 대조군의 5.70±5.65, 7.07±5.67(mg/g)에 비해 증가하는 경향을 보였으며 vitamin C 혼합 투여의 경우 17.62±2.57(mg/g), vitamin E 혼합 투여군의 경우는 17.62±2.57(mg/g)으로 항산화비타민의 투여는 대조군과는 차이가 있지만 aflatoxin 단독 투여군에 비하면 그 증가폭이 크지 않았다. 이들 각 군에 있어서의 유의확률이 p=0.0001로 유의 수준 p<0.01 보다 작기 때문에 각 군별 평균의 차이에 대한 유의성을 재확인할 수 있었다.

혈청의 지질 성분에 미치는 영향

AFB₁이 투여된 ICR mice 혈청에서의 지질성분에 미치는

영향을 조사한 결과는 Table 4에서와 같이 총 콜레스테롤 수치는 AFB₁ 단독 투여군이 308.86±14.15, 395.78±20.49(mg/g)으로 대조군의 130.46±5.67, 128.79±5.54에 비해 유의적(p<0.01)으로 높은 반면, 항산화비타민 혼합 투여군 중 특히 vitamin E 투여군은 대조치와 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다. 이와 같은 경향은 중성지방과 유리 콜레스테롤에 있어서도 동일한 경향의 유의성을 나타내었으며, 인지질은 AFB₁ 투여군에서 142.79±6.43, 132.52±4.27으로 대조군의 248.38±22.27, 251.10±23.62에 비해 오히려 감소하였다. vitamin C 혼합 투여의 경우 219.85±7.95, vitamin E 혼합 투여군의 경우는 229.40±8.79으로 항산화비타민의 투여는 aflatoxin 단독 투여군과 비교하여 증가된 수치를 나타내었으나, 대조군과는 차이를 보이지 않았다. 이들 각 군에 있어서의 유의확률이 p=0.0001로 유의 수준 p<0.01 보다 작기 때문에 각 군별 평균의 차이에 대한 유의성을 재확인할 수 있었다.

간장 총지질의 지방산 조성에 미치는 영향

전 실험에서 AFB₁이 지질의 구성 성분에 영향을 준 것을 기초로 하여 간장에서 추출한 지질 성분을 총 콜레스테롤, 인지질, 중성지질, 콜레스테롤 에스테르로 분획하여 총 지질 및 각 성분의 지방산 조성에 대한 구성비(peak area%)를 살펴 보았다. Table 5에서와 같이 간장 총 콜레스테롤의 지방산 조성의 경우 AFB₁ 투여군은 다가불포화 지방산(poly unsaturated fatty acid; PUFA) 및 단가불포화 지방산(monounsaturated fatty acid; MUFA)의 감소를 보인 반면 포화지방산(saturated fatty acid; SFA)의 비율이 증가하는 경향을 보였다. 즉, 대조군의 경우 총 콜레스테롤의 지방산 구성비가 PUFA : MUFA : SFA = 47.7 : 18.1 : 29.6 과 52.8 : 12.1 : 30.4의 비율 보였으며 AFB₁ 투여군에서는 구성비가 26.3 : 33.4 : 35.2와 26.8 : 25.3 : 41.8로 SFA의 증가를 보인 반면 항산화 비타민의 투여군에서는

Table 4. Lipid components of the serum in each groups

	Free cholesterol(mg/g)	Phospholipid(mg/g)	Triglyceride(mg/g)	Total cholesterol(mg/g)
	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD
G1	46.05±6.38 ^d	248.38±22.27 ^{ab}	141.15±130.46 ^c	130.46±5.67 ^d
G2	46.93±15.03 ^d	251.10±23.62 ^a	153.24±4.05 ^c	128.79±5.54 ^d
G3	160.57±8.00 ^b	142.79±6.43 ^c	420.71±38.09 ^a	308.86±14.15 ^b
G4	182.16±4.27 ^a	132.52±4.27 ^c	495.15±4.75 ^a	395.78±20.49 ^a
G5	76.12±3.87 ^c	219.85±7.95 ^b	234.36±84.71 ^b	205.30±11.04 ^c
G6	57.32±5.21 ^d	229.40±8.79 ^{ab}	155.71±11.6 ^{bc}	136.27±17.11 ^d
F	338.12 ^{**}	80.00 ^{**}	96.31 ^{**}	408.48 ^{**}
p	0.0001	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. Description related to groups was revealed in detail on Table 1.

Table 5. GC analysis on fatty acid compositions of the liver lipid by TLC fraction

		peak area (%)					
Fatty acids	G1	G2	G3	G4	G5	G6	
Chole-sterol-ester							
saturates	32.5331	32.89791	74.99086	71.50546	56.62645	55.82942	
monoenes	6.818871	6.734205	2.385446	8.432598	1.403843	2.411188	
n-3	17.47287	19.09595	4.374063	4.214713	9.174207	8.553507	
n-6	1.838252	1.738242	2.28052	1.877561	1.258478	1.259074	
polyenes	41.33691	39.53369	15.96911	13.96967	31.53702	31.94682	
P ¹⁾ /S ²⁾	1.270611	1.201708	0.212947	0.195365	0.556931	0.572222	
n-3P/n-6P	9.505157	10.98579	1.918011	2.244781	7.289922	6.793492	
Trigly-sterol-ceride							
saturates	48.26044	50.80393	68.99938	64.1564	45.26449	41.10184	
monoenes	13.54047	5.15728	12.19612	20.05998	34.12579	37.84264	
n-3	6.54503	7.049351	1.312811	1.253006	4.112624	4.197066	
n-6	0.833233	0.990486	0.894268	0.88394	0.619932	0.611811	
polyenes	30.82083	35.99895	16.59742	13.64667	15.87717	16.24665	
P/S	0.638635	0.708586	0.240545	0.212709	0.350764	0.395278	
n-3P/n-6P	7.854982	7.117062	1.468029	1.417525	6.633997	6.860064	
Total							
saturates	29.58139	30.39455	35.21598	41.81306	29.1821	33.34638	
chole-sterol-sterol							
monoenes	18.14831	12.13281	33.39255	25.27361	28.62962	17.86742	
n-3	3.807477	3.910894	3.554354	3.99011	5.217359	5.319617	
n-6	0.727348	0.807406	1.555009	2.11518	1.514094	1.586831	
polyenes	47.73547	52.75433	26.28211	26.80804	35.45683	41.87975	
P/S	1.613699	1.735651	0.746312	0.64114	1.21502	1.255901	
n-3P/n-6P	5.234739	4.843778	2.285745	1.886416	3.445862	3.352353	
saturates	77.71976	76.44024	84.48849	82.97159	83.09894	81.13251	
monoenes	3.065561	6.594769	5.228861	6.493594	2.523856	3.601314	
Phos-pho-lipid							
n-3	3.165593	3.372194	2.48073	2.094741	2.888469	4.011292	
n-6	0.819882	0.789953	1.283139	1.140053	1.104357	1.009891	
polyenes	15.22921	12.80284	6.518782	7.300022	10.38437	10.24499	
P/S	0.24723	0.221938	0.121705	0.126969	0.173013	0.188163	
n-3P/n-6P	3.861037	4.268852	1.933328	1.837407	2.615522	3.972005	

¹⁾ P; polyunsaturated fatty acid, ²⁾ S; saturated fatty acid.

Description related to groups was revealed in detail on Table 1.

PUFA는 감소되었으나 MUFA는 더 증가함을 보였다. 또한 vitamin E 혼합 투여군에서는 vitamin C 혼합 투여군과 비교하여 PUFA가 더 증가하였으며 MUFA는 더 감소된 결과를 나타내었다.

간장 중성지질의 지방산 조성에 미치는 영향

또한 간에서 추출된 중성지질에서의 지방산 분석 결과는 Table 5에서 나타난 바와 같이 AFB₁의 투여군의 경우 대조군에 비해 PUFA는 감소를 보였으나 SFA의 비율은 증가하는 경향을 보였다. 즉, 중성지질 지방산의 구성비(peak area %)가 대조군에서의 PUFA : MUFA : SFA = 30.8 : 13.5 : 48.3 과 36.0 : 5.2 : 50.8에서 AFB₁ 투여군에서는 16.6 : 12.2 : 69와 13.6 : 20.1 : 64.2로 SFA가 약간 증가를 보인 반면 PUFA는 감소 경향을 나타내었다. 그러나 항 산화비

타민의 투여군은 SFA의 경우는 대조군 보다 감소되었고 PUFA는 AFB₁ 단독 투여군과 비슷한 수준이나 MUFA는 대조군 및 AFB₁ 단독 투여군 보다 오히려 증가함을 보였다.

간장 인지질의 지방산 조성에 미치는 영향

간장의 인지질을 TLC로 분석을 얻어 지방산 조성을 측정 한 결과 Table 5와 같이 나타났다. 즉, AFB₁의 투여에 의해 MUFA는 대조군과 비교하여 큰 차이가 없었으나 PUFA는 감소를 보인 반면 SFA의 비율이 다소 증가하였다. 즉, 지방산의 구성비(peak area %)가 대조군의 경우 PUFA : MUFA : SFA=15.2 : 3.1 : 77.7과 12.8 : 6.6 : 76.4에 비하여, AFB₁ 투여군은 6.5 : 5.2 : 84.5와 7.3 : 6.5 : 83으로 SFA가 크게 증가를 보인 반면 항 산화비타민의 투여군은 모두

MUFA는 대조군과 비슷한 수준을 보였다. 그러나 SFA는 AFB₁ 단독 투여군과 유사한 경향을 나타내었으며 PUFA는 대조군 보다는 감소하였지만 AFB₁ 단독 투여군 보다는 오히려 증가하였다. 그러나 세포막 구성 요소인 인지질의 지방산 조성에서 SFA의 조성이 유의성있게 증가함은 세포막의 손상에 의해 불포화지방산의 산화가 일어남을 알 수 있었다.

간장 콜레스테롤 에스테르의 지방산 조성에 미치는 영향

간장의 콜레스테롤 에스테르를 TLC로 분획을 얻은 다음 GC로 지방산 조성을 측정된 결과는 Table 5에서와 같이 AFB₁의 단독 투여군은 대조군에 비해 MUFA의 감소를 보이고 SFA의 비율이 증가하는 경향을 보였다. 즉, 지방산 구성비(peak area %)가 대조군에서 PUFA : MUFA : SFA = 41.3 : 6.8 : 32.5와 39.5 : 6.7 : 32.6을 보였으며 AFB₁ 단독 투여군은 16 : 2.4 : 75와 14 : 8.4 : 71.5로 SFA가 크게 증가하였고 항산화 비타민의 투여군은 모두 MUFA가 대조군 및 AFB₁ 단독 투여군 보다 감소 하였으며 SFA는 대조군 보다 감소하였고 PUFA는 AFB₁ 단독 투여군 보다 증가를 보였다.

고 찰

대표적인 환경성 오염물질 중 하나인 aflatoxin B₁은 주로 음식을 통하여 동물이나 사람에게 유입되어 강력한 간독성 물질이 되며 돌연변이 및 간암 유발원이 되기도 한다. 실제로 원발성 간암의 발생률은 aflatoxin 섭취량이 많은 지역일수록 높은 발생률을 보여주는 반면에 유럽 및 미주 지역 등에서는 낮은 발생률을 보여준다.²²⁾ 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, 전 세계적으로 간암 유발의 중요한 인자로 알려져 있는 것은 B형 간염이다. 따라서 우리 나라는 B형 간염의 발생률이 높은 지역이고 간경화 및 간흡충등 간질환이 상당히 흔한 지역일 뿐 아니라 곡물을 주식으로 하는 식생활 습관에 있어서 부실한 곡물저장 및 유통체계의 불완전성이 자주 노출되는 우리 현실로 미루어 볼 때 곰팡이의 대사 산물인 aflatoxin의 노출 위험이 크다고 할 수 있다. 따라서 이 toxin이 간암 발생의 중요한 인자로 작용할 것으로 생각된다. Table 5에 나타난 실험 결과에 의하면 aflatoxin B₁ 단독 투여군에 있어서 cholesteryl ester 지방산에 있어서 n-3계 지방산이 현저히 감소하였고 n-6계 지방산은 오히려 증가하였다. 이것은 특히 n-6계 지방산 중 linoleic

acid가 암의 발생을 촉진시키는 주요 인자로 생각된다는 Chan²³⁾의 보고와 관점을 같이하며 P/S ratio 또한 감소됨을 나타내었다. 이렇게 saturated fatty acid가 증가되는 것은 Donaldson²⁴⁾의 보고에 의하면 지질 대사에 있어서 aflatoxin의 영향은 닭의 사료 1 gm 당 aflatoxin 2.5 µg씩 주었을 때 fatty acid synthetase와 fatty acid elongation activity를 억제하며 hepatic fatty acid synthesis의 장애를 초래한다고 하였다. 그러나 항산화 비타민을 혼합 투여한 군에서는 P/S ratio가 대조군 보다는 감소되었지만 aflatoxin B₁ 단독 투여군과 비교하면 상당히 높아졌다는 것을 알 수 있으며 특히 phospholipid에 있어서는 항산화제로 vitamin E를 혼합 투여한 군에서의 n-3P/n-6P의 수준이 거의 대조군과 가깝게 나타났다. 이것은 1989년 Cameron²⁵⁾의 연구에 의하면 n-6계 지방산이 많은 식이를 쥐에게 투여했을 때 prostaglandin 중 면역반응 억제에 관여하는 prostaglandin E₂(PGE₂)의 생성을 증가시켜서 암의 생성을 돕고 n-3계 지방산은 PGE₂의 생성을 억제하여 암의 생성을 막는다는 결과와 유사하다. 그러나 n-6 PUFA(polyunsaturated fatty acids)에 비해 n-3 PUFA는 과량 섭취할 경우 cis형의 불안정한 이중결합과 지방산 자체의 높은 불포화도로 인해 peroxide와 free radical등의 지질과산화물을 더욱 많이 생성하므로서 세포의 손상을 초래한다고 하였다.²⁶⁾ n-6계와 n-3계 지방산의 불균형이 혈전증, 관절염, 천식 등 다양한 질병유발과 관련됨이 알려지면서 개별 지방산의 섭취와 개별 지방산의 혈청 농도등의 질적인 측면에서의 지방산 균형의 중요성이 강조되고 있다. 당뇨병에서는 n-6계와 n-3계 지방산의 product/precursor 비율이 감소되어 LCPUFA(long chain polyunsaturated fatty acids)로의 전환에 이상이 초래되며 특히 desaturation과정이 영향을 받는 것으로 보고되기도 하였다.²⁷⁾ 한편 혈청과 간 조직에서 지질 구성 성분의 분석에 있어서 혈청 속에서는 free cholesterol, triglyceride, total cholesterol이 aflatoxin B₁ 단독 투여군에서 유의하게(p<0.01) 증가하였지만 phospholipid에서는 오히려 감소하였다. 이것은 간세포를 비롯한 생체 내 세포가 free radicals에 의한 지질과산화에 대해 방어 기전을 가지고 있으므로 이러한 지질과산화 현상은 세포막의 주요 구성 성분인 인지질을 구성하는 불포화 지방산이 활성 산소와 결합함으로써 시작된다. 지질과산화 반응으로 인하여 세포막을 구성하는 인지질은 알코올, 케톤 및 알데하이드 등으로 분해되어 세포막의 정상적인 작용을 상실하게 된다. 이들 분해 산물은 효소의 활성을 억제하며, 세포 괴사 및 미세 혈관 병변 등의 원인으로 알려져 있으므로 본 실험에서도 toxin의 영향으로 인한 인지질의 함량이 감소하였다고 생각된다. Horton²⁸⁾에 의하면 정상적으로, 음식물의 섭취

로 생성되는 cholesterol은 간에서 합성이 억제되는데 aflatoxin은 이러한 cholesterol 합성의 중요한 feedback 조절 기전을 상실하게 한다고 주장하였고, 이러한 대사 장애는 간암의 특징적인 대사 병변이라고 Siperstein²⁹⁾은 보고하였다.

지방간의 경우 간세포 내에 중성지방의 함량이 증가하는 현상으로 adipose tissue로부터 저장지방의 이동증가, 대사변동으로 인한 중성지방의 합성증가, 간세포로부터의 지질단백의 방출저하 등에 의해 유발되는 것으로 보고되고있다.³⁰⁾

한편 1989년 Steinberg D등³¹⁾에 의하면 순환기계 질환을 야기시키는 원인으로 알려진 LDL이 금속이온 또는 macrophage등에 의하여 산화되면 cholesteryl ester가 증가하여 유해산소 및 과산화물이 생성되어 동맥경화(arteriosclerosis)등을 유발한다고 보고하였다. 동맥경화의 첫 단계는 과산화지질과 cholesterol 이 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 동맥경

화가 일어나게 된다고 설명하고있다. 최근에 와서 이 거품세포의 생성원인은 연구자들에 의해 밝혀졌는데 지방층 중산화 LDL이 이 모든 과정의 중요한 인자로 작용하며 이 과정에서 항산화제인 alpha-tocopherol, beta-carotene, flavonoids를 첨가하면 LDL의 산화가 억제된다고 보고³²⁾하였다. 또한 aflatoxin B₁ 단독 투여군에서 혈청내 중성지방(triglyceride)의 농도가 420.71±38.09, 495.15±4.75 수준으로 나타난 결과에 따르면 160 mg/dl 이상의 고농도 중성지방(triglyceride)은 동맥경화를 유발하는 다른 지단백과 연관성을 가지며 또한 고비중지단백(High Density Lipoprotein)콜레스테롤의 농도를 감소시킨다는 Chapman, M. J³³⁾의 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

결과적으로 본 연구에서 실험적으로 aflatoxicosis를 유도하여 그것에 대한 항산화 비타민의 효과를 조사한 결과 이들에 의한 항산화력이 뚜렷하게 확인되므로서 aflatoxin에 의해 유발된 중독증의 치료나 예방을 위한 기초자료로 활용될 것으로 생각하는 바이다.

국문요약

Aflatoxin은 자연속에 존재하며 높은 독성을 가진 곰팡이 독소이다. 이들 곰팡이 독소는 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasiticus*로부터 생성되는 대사산물로서 식품에서 다양한 오염 경로를 가지고 발생한다. 특히 Aflatoxin B₁(AFB₁)은 사람에게 있어서 간독성 및 간암을 유발하는 잠재력을 가진 곰팡이 독소이며, 지질과산화 반응은 aflatoxin B₁에 의한 세포 산화적 손상시 발생하는 주요 현상중의 하나이다. 따라서 본 연구의 목적은 aflatoxin B₁과 항산화 비타민 혼합 투여 후 유도된 간과 혈청의 지질 구성 성분 및 지방산 조성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수행되었다. 특히 비타민 C와 비타민 E는 중요한 항산화제에 속하는 것으로 이들을 복강내 주사(i.p, intraperitoneal injection)를 통하여 각각 10 mg/kg, 63.8 mg/kg씩 male ICR mice에 투여하였으며 1시간후 0.4 mg/kg의 AFB₁을 동일한 방법으로 투여하였다. AFB₁에 의하여 유도된 지질구성 성분의 변화에 있어서 AFB₁ 단독 투여군과 항산화 비타민 혼합 투여군을 비교하였을 때 혈청에서의 유리콜레스테롤, 중성지질, 총 콜레스테롤등은 AFB₁ 단독 투여군에서 2배 이상 증가되었다. 간에서의 지방산 조성에서도 AFB₁ 단독 투여군에서 항산화비타민 혼합투여군보다 콜레스테롤 에스테르, 중성지질, 총콜레스테롤 및 인지질의 P/S ratio가 감소하였다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 AFB₁에 의한 세포손상이 항산화 비타민에의해 감소되는 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

참고 문헌

1. Smith, J. E. and Moss, M. O.: Mycotoxins, formation, analysis and signification. John Wiley & Sons, Chichester. 3-103 (1985).
2. WHO.: Mycotoxins, environmental health criteria, 11. World health organization, Geneva (1979).
3. Barnes, J. M.: Aflatoxin as a health hazard. *J. Appl. Bacteriol.* 33, 285-298 (1970).
4. Patterson, D. S. P.: Metabolism as a factor in determining toxic action of aflatoxins in different animal species. *Food Cosmet. Toxicol.* 11, 287-294 (1973).
5. Krishnamarchari, K. A. V. R., Bhat, R. V., Nagajaran, V. and Tilak, T. B. G. : Hepatitis due to aflatoxicosis. *Lancett.* 1061-1063 (1975).
6. Bababunmi, E. A. and Bassir, O.: The effect of aflatoxin on blood clotting in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 37, 497-500 (1969).
7. Bassir, O. and Bababunmi, E. A.: Inhibition of blood clotting factors by aflatoxin. *W. Afr. J. Biol. Appl.*

- Chem.* **12**, 28-32 (1969).
8. Hendrickse, R. G., Coulter, J. B. S., Lamplugh, S. M., et al.: Aflatoxin and Kwashiorkor: a study of Sudanese children. *Brit. J. Med.* **285**, 843-846 (1982).
 9. Ryan, N. J., Morgan, G. R., Hayes, A. W., Unger, P. D. and Siraj, M. Y.: Aflatoxin B₁, its role in the etiology of Reye's Syndrome. *Pediatrics.* **64**, 71-75 (1979).
 10. Bababunmi, E. A. and Bassir, O.: 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 (1972).
 11. Brown, J. M. M. and Abrams. L.: Biochemical studies on aflatoxicosis. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* **32**, 119-146 (1965).
 12. 정덕화, 강호조, 김성영, Pestka, J. J.: 영남지방 농산물에 대한 위생학적 연구. (제1보) Aflatoxin 생성균의 분리. 한국식품위생학회지. **4**, 165 (1989).
 13. 정덕화.: Aflatoxin에 대한 최신 분석법과 규제동향. 한국식품위생학회지. **5**, 131 (1990).
 14. Rahimtula A. D., Bereziat J. C., Bussacchini G. V. and Bartsch H.: Lipid peroxidation as. a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochem. Pharmacol.* Dec 1 : 1 : **37**, 4469-4477 (1988).
 15. Omar, R. F., Gelborn, H. V. and Rahimtula, A. D.: Effect of Cytochrome P450 Induction on the Metabolism and Toxicity of Ochratoxin A. *Biochemical Pharmacology* **51**, 207-216(1996).
 16. Reynolds, E. S. and Moslen, M. T.: Free-radical damage in liver. In Free Radicals in Biology. (W. A. Pryer ed) *Academic Press, New York*, **4**, 49-94 (1980).
 17. Horton, B. J., Horton, J. D. and Sabine, J. R.: Metabolic controls in precancerous liver. *Eur. J. Cancer* **8**, 437-443 (1972).
 18. Seegers, J. C., B hmer, L. H., Kruger, M. C., Lottering, M. -L. and Kock, M. De.: A Comparative Study of Ochratoxin A-Induced Apoptosis in Hamster Kidney and Hela Cells. *Toxicology and applied Pharmacology*, **129**, 1-11 (1994).
 19. Gregory, E. M. and Fridovich, I.: Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* **114**, 1193-1197.
 20. Judith, L. B. and Anthony, T. D.: The relationship between α -tocopherol and phospholipid fatty acids in rat liver subcellular membrane fractions. *Biochemical et Biophysica Acta*, **962**, 81-90 (1988).
 21. Canuto, R. A., Biocca, M. E., Muzio, G. and Dianzani, M. U.: Fatty acid composition of phospholipid in mitochondria and microsomes during diethylnitrosamine carcinogenesis in rat liver. *Cell Biochem. Funct.* **7**, 11-19 (1989).
 22. Doll, R., Payne, P., Waterhouse, J.: Cancer incidence in five continents international union against cancer and springer-verlag, heidelberg (1966).
 23. Chan, P. C., Ferguson, K. A., Dao, T. L.: Effects of different dietary fats on mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* **43**, 1079-1083 (1983).
 24. Donaldson, W. E., Tung, H. T. and Hamilton, P. B.: Depression of fatty acid synthesis in chick liver by aflatoxin. *Comp. Biochem. Physiol.* **4**, 843-847 (1972).
 25. Cameron E, Bland J, and Marcuson R.: Divergent effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on mammary tumor development in C₃H/Heston mice treated with DMBA. *Nutr Res* **9**, 383-393 (1989).
 26. Hu ML, Frankel EN, Leiboritz BE, Tappel ALL.: Effect of dietary lipids and vitamin E on in vitro lipid peroxidation in rat liver and kidney homogenates. *J. Nutr* **119**, 1574-1582 (1989).
 27. Weisburger, J. H.: Cause, relevant mechanism and prevention of large bowel cancer. *Seminars in Oncology.* **18**(4), 316-336 (1991).
 28. Horton, A. A. and Fairhurst, S.: Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRC. Crit. Rev. Toxicol.* **18**, 27-79(1987).
 29. Siperstein, M. D.: Regulation of cholesterol biosynthesis in normal and malignant tissues. *Curr. Top. Cell. Regul.* **2**, 65-100 (1970).
 30. Abrams, M.A. and Cooper, C.: Quantitative analysis of metabolism of hepatic triglyceride in ethanol-treated rats. *J. Biochem.*, **156**, 33-46 (1976)
 31. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. E., Khoo J. C. and Witztum J. L.: Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* **320**, 915-924 (1989).
 32. Esterbauer H., Puhl H., Dieber-Rotheneder M., Waeg G. and Rabl H.: Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Ann. Med.* **23**, 573-581 (1991).
 33. Chapman, M. J and Bruckert, E.: The atherogenic role of triglycerides and small, dense, low density lipoproteins. *Artherosclerosis.* **124**, 21-29 (1996).