

항산화비타민이 Aflatoxin B₁ 투여 마우스의 간세포에서 Aflatoxin B₁-DNA Adduct 형성에 미치는 영향

박선자 · 강성조 · 박정현 · 오상석¹ · 정덕화*

경상대학교 응용생명과학부

¹이화여자대학교 식품영양학과

The Effect of Antioxidant Vitamins on Aflatoxin B₁-DNA Adduct the Formation in Aflatoxin B₁ Administered Mice Liver

Seon-Ja Park, Sung-Jo Kang, Jung-Hyun Park, Sang-Suk Oh¹ and Duck-Hwa Chung*

Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University

¹Department of Food and Nutrition, Ewha Womans University

The objective of this study was to examine the effects of antioxidant vitamins on the formation of AFB₁-DNA adduct and AFB₁-inducing cellular oxidative damage. Intraperitoneal(i.p.)injections of 10 mg/kg vitamin C(VC) and 63.8 mg/kg vitamin E(VE) were repeatedly administrated 4 times with 2 days interval to 6 week old male ICR mice. After one hour of vitamin treatments, 0.4 mg/kg AFB₁ was injected in AFB₁ plus vitamin treated groups by same way. On the other hands, AFB₁ treated group was only injected with AFB₁ by the same method described above without vitamins. According to quantitative analysis of the AFB₁ in mice serum by indirect competitive ELISA, 12.28 and 18.78 ng/mL were detected in AFB₁-treated groups, but 7.60 and 4.85 ng/mL in AFB₁ plus VC and VE treated groups, respectively. 23.78, 25.48 ng/mL of AFB₁-DNA adduct were detected in mice liver of AFB₁ treated groups, while 5.26, 7.81 ng/mL in AFB₁ plus VC and VE treated groups, respectively. Consequently, the differences in the concentrations of AFB₁ related materials between vitamin treated and non-treated groups were significant. Immunohistochemistry revealed brownish infiltration of AFB₁ around central vein and sinusoid in AFB₁-treated group. This manifestation was distinctly reduced in AFB₁ plus VC and VE treated groups.

Key words: aflatoxin B₁, antioxidant vitamin, ELISA, aflatoxin B₁-DNA adduct, immunohisto chemical detection

서 론

Aflatoxin B₁(AFB₁)은 사람을 포함한 다양한 종(species)의 포유동물에 있어서 간암 발생에 중요한 병원성 요인으로 간주되어왔다⁽¹⁾. 특히 동물에서의 아플라톡신 중독증(aflatoxicosis)은 일반적으로 간에서의 병리적 변화와 혈청속의 ALT(alanine amino transferase)와 AST(aspartate amino transferase) 증가와 같은 효소적 변화로 확인될 수 있다^(2,3). Rhee⁽⁴⁾은 Sprague-Dawley rat에 3 mg/kg의 AFB₁을 투여 후 MRI(magnetic resonance imaging) 촬영을 시간별로 연속 시도해본 결과 AFB₁에 노출 후 24시간에 간문맥(HPV; hepatic portal vein)과 간

의 우측 중간 부분에 뚜렷한 간 손상이 나타났다고 보고하였다.

대부분의 화학적 발암물질들은 체내대사과정 중에 생성된 중간대사산물이 DNA와 결합함으로써 발암성 전이의 시초가 된다고 하였다⁽⁵⁾. 특히 최근 연구들에 의하면 AFB₁투여로 인하여 형성된 AFB₁-DNA 부가체(adduct)가 종양(tumor)형성에 관여한다는 보고들이 발표되고 있으며 1997년 Root⁽⁶⁾는 AFB₁을 고농도로 반복 투여시 AFB₁-DNA 부가체가 형성되어 GGT(γ -glutamyl transpeptidase) 양성 암 신생물 전구단계(positive preneoplastic foci)를 진전시키며 이것이 종양으로 발전되는 증거가 된다고 보고하였다. 이외에도 AFB₁이 암 발생에 용량 의존적으로 관여한다는 여러 가지의 보고들이 있으며, 송어⁽⁷⁾에서나 쥐와 송어⁽⁸⁾에 관한 연구에서도 AFB₁-DNA 부가체 수준과 암 발생과의 용량 의존적 경향에 대한 보고들이 있었다. 이러한 AFB₁의 독성 및 암발생에 대하여 쥐의 간 미소체(liver microsome)로부터 정제된 시트크롬 p-450을 각각 사용하여 AFB₁의 대사를 연구하여 여러 가지 대사산물을 확인하였으며 간 미소체 존재 하에서 Ames test로 이

*Corresponding author : Duck-Hwa Chung, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea
Tel: 82-55-751-5480
Fax: 82-55-753-4630
E-mail: dhchung@nongae.gsnu.ac.kr

들 중간산물의 변이원성을 측정하여 AFB₁이 산화적 경로를 거치면서 발암성 대사산물을 생성한다고 하였다. 이러한 과정에서 AFB₁으로 인한 지질과산화 반응이 유발되면 유해한 독성물질이 생성되어 여러 종류의 질병을 일으킨다⁹⁾. 따라서, AFB₁으로 인한 이러한 세포손상 및 암발생과정을 방어할 수 있는 항산화제의 적용에 대한 관심이 높아지고 있다. 1990년 Namiki¹⁰⁾의 보고에 의하면 butylated hydroxyanisole (BHA)과 tertiary butylhydroquinone(TBHQ) 같은 합성된 식품 항산화제를 첨가함으로써 식품의 지질과산화 과정을 통제하는데 도움을 줄 수 있다고 하였다. 그러나 실제로 이들 합성된 식품 항산화제의 안정성에 대한 논란이 많으며 이러한 점을 극복하기 위하여 최근에는 자연 항산화제의 사용에 관심을 갖게 되었으며 레티놀(retinol), 토코페롤(tocopherol), 식물추출물(herb extracts)과 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 비타민 C는 독소를 포함한 여러 가지 변이전구물질(promutagen)의 산화적 대사 과정을 저해할 수도 있으며 산화 환원 완충계에서 유해한 유리 라디칼을 제거하여 부가체 형성을 저지시키는 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 그리고 비타민 E 또한 대표적 지용성 비타민으로서 유리 라디칼의 손상으로부터 인체를 보호해주며 세포막 통합성을 유지하는 항산화제로 잘 알려져 있으며¹²⁾, Bachowski 등¹³⁾은 식이 섭취를 통한 비타민 E의 적절한 보충은 산화적 스트레스에 대응하는 능력을 증가시킨다고 하였다. 또한 Smigel¹⁴⁾은 비타민 A와 비타민 C의 암발생 예방 효과에 대한 유사한 연구와 함께, helper T-cell(TH)의 활성을 향상시킨다는 보고를 하였다.

이에 본 연구에서는 AFB₁ 단독 투여와 항산화 비타민(vitamin C와 vitamin E)의 혼합 투여가 마우스의 아플라톡신중독증에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 혈청중의 유리 AFB₁의 함량과 간 손상 및 대사와의 연관성을 알아보고자 AFB₁투여 후 혈청 중의 유리 AFB₁을 조사하였고, 이에 따른 마우스의 간세포에서 AFB₁-DNA 부가체의 함량을 조사하면서 아울러 간 손상에 대한 면역조직화학적 검사를 실시하였으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

재료

Aflatoxin B₁(AFB₁), 비타민 C(VC), 비타민 E(VE)등이 실험동물의 복강내에 투여되었으며 Sigma(Louis, Mo. USA)제품을 사용하였다.

그리고 AFB₁-DNA 부가체를 정량하기 위하여 사용한 시약은 chloroform(Fisher Scientific) NaCl, Tris-HCl, EDTA, SDS(Sodium Dodecyl Sulfate), phenol, isoamyl alcohol, ammonium acetate 등은 Sigma(Louis, Mo. USA)제품이었으며, Sep-Pak cartridge는 Water사(Millipore corporation. MILFORD, MASS. USA) 제품을 사용하였다. 또한 anti-mouse IgG-horseradish peroxidase, citrate buffer, bovine serum albumin(BSA), tween 20(polyoxy ethylene sorbitan mono-laurate), ABTS(2'-azimobis-(3-ethylbenzthiazoline)), phos-

phate buffered saline(PBS)등이 ELISA에 사용되었다. 이들 시약은 모두 Sigma(Louis, Mo. USA)제품을 사용하였다

그리고 실험에 사용한 기기는 UV-Spectrophotometer(Bekmans, Co. USA), Homogenizer(Nihonseiki kaisha, AM-11, japan), Ultracentrifuge(Beckmans C14, Co. USA), Brushles D.C. Motor Centrifuge(Vision VS-6000 CF), Ultrasonic cell membrane disruptor(Bandelin Sonopuls HD 60), 냉동절편기(Histostat 855, USA) ELISA washer-miniwash(Dynatech, Lab. USA), ELISA reader(Bio-Rad, Co, USA) and MPM software(Bio-Rad, version 4.0) 등이었다.

실험대상

ICR 계통의 생후 6주, 평균체중 40g의 수컷 마우스를 대 한실험동물센터로부터 구입하여 동물 사육장에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 25°C를 유지토록 하였으며 명암주기는 자연채광으로 하고 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 6군으로 나누었으며, 모두 복강투여(i.p. injection)로 시행되었다.

대조군인 제 1군의 경우 AFB₁의 용매로 사용된 DMSO 50 μ L와 비타민 C의 용매인 0.1 M NaHCO₃ 50 μ L를 함께 투여하였으며, 제 2군의 경우 DMSO 50 μ L와 비타민 E의 용매인 Corn oil 50 μ L를 함께 투여하였다. 제 3군은 0.1 M NaHCO₃ 50 μ L를 투여한 다음 1시간 후 0.4 mg/kg농도의 AFB₁ 50 μ L를 투여하였다. 또한 제 4군은 Corn oil 50 μ L를 투여한 후 1시간이 경과한 다음 0.4 mg/kg 농도의 AFB₁ 50 μ L를 투여하였다. 제 5군은 수용성 항산화비타민의 효과를 보기 위해 비타민 C를 10 mg/kg의 농도로 투여하고 1시간 후 AFB₁을 투여하였다. 제 6군은 지용성 항산화비타민의 효과를 비교하기 위해 비타민 E를 63.8 mg/kg의 농도로 투여하였으며 역시 1시간 경과 후 AFB₁을 복강내 투여하였다. 이상과 동일한 방법으로 2일에 한번씩 4회 반복 투여하였다.

첫 번째 투여 후 8일째 에틸에테르 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 적출하여 차가운 PBS에 담가 잔여혈액을 다시 제거한 다음 간 무게를 잰 후 실험에 사용하였다. ELISA, AFB₁-DNA 부가체 및 면역조직화학적 실험을 위한 혈청 및 조직은 -70°C에 보관하며 실험을 시행하였다.

ELISA에 의한 혈중 AFB₁의 정량 방법

Kawamura¹⁵⁾의 방법을 응용하여 소량의 시료에서 혈청중 AFB₁ 함량을 분석하는 법을 확립하였다. 먼저 심장에서 채혈한 혈액을 냉장 방치하여 응고시킨 후 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 -70°C에서 보관하며 혈중 AFB₁의 잔류 농도를 측정하기 위한 실험에 사용하였다.

즉, 혈청 200 μ L에 chloroform 200 μ L를 가하고 1분 동안 강하게 교반시킨 후 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 유기용매 층을 회수하였다. 회수된 유기용매층 중에서 100 μ L를 microcentrifuge tube에 취해 질소가스로 유기용매를 날려보낸 후 10% methanol-PBS 100 μ L를 가하여 ELISA 분석

에 이용하였다.

ELISA에 의한 AFB₁의 정량적 분석은 indirect competitive ELISA법⁽¹⁶⁾을 이용하여 혈청 중 AFB₁ 함량은 검색하였다. 먼저, AFB₁-BSA conjugate를 coating buffer(carbonate buffer)에 녹여 microtiter plate에 100 μL(100 ng AFB₁/well)씩 분주한 다음 4°C에서 12시간 방치하여 well coating 시킨 후 세척용 완충액(PBS-tween)으로 4회 세척하였다. 세척 후 인산 완충용액에 녹인 1% BSA(Bovine Serum Albumin)를 가하여 12시간 방치시킨 후 세척용 완충액(PBS-tween)으로 4회 세척하여 항체의 비특이적인 반응을 방지하였다. 세척한 plate에 표준 AFB₁ 또는 분석용 시료 30 μL 및 본 실험실에서 생산하여 보관중인 것 중 역가가 높은 AFB₁ 항체(AF78)를 1:500으로 희석하여 30 μL씩 well에 주입하고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 plate를 세척용 완충액으로 3회 세척하고, 1:4000으로 희석한 2차 항체(anti-mouse IgG-HRP)를 100 μL씩 넣어 37°C에서 30분 반응 후 세척용 완충액으로 6회 세척한 다음 ABTS에 0.01% H₂O₂가 첨가된 기질 100 μL를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 발색시킨 후 ELISA reader(Bio RAD model 550)로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 MPM software(Bio RAD, version 4.0)를 이용하여 표준곡선을 작성하고 AFB₁ 함량을 계산하였다.

AFB₁-DNA 부가체(adduct) 검출 방법

간 조직 내에서 AFB₁과 함께 형성된 DNA 부가체를 검출하므로써 조직내 AFB₁의 축적 정도를 측정하기 위하여 Gross 등⁽¹⁷⁾의 DNA 분리 방법에 의한 phenol-chloroform 추출을 시행하였다. 간 조직을 해체 후 즉시 -70°C에 보관하였다가 조직 100 mg 당 1.2 mL의 digestion buffer(100 mM NaCl, 10 mM tris.Cl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1 mg/mL proteinase K)를 넣고 조직을 갈아서 50°C에서 shaking상태로 16시간 동안 경과 후 동량의 tris-saturated phenol/chloroform/isoamyl(25:24:1)을 넣고 강하게 교반하여 3,600 rpm 속도로 4°C에서 10분 동안 원심분리 하였으며 1/10 volume의 7.5 M ammonium acetate를 첨가하는 동시에 2.5 volume의 100% cold ethanol로 DNA 침전을 유도하였다. 이렇게 수확된 DNA를 멸균유리막대로 spool out하여 70% ethanol로 세척하였으며 2시간 동안 실온에서 건조시킨 다음 200 μL의 PBS(pH 7.3)에 녹여 AFB₁-DNA adduct 검출을 위한 DNA 추출 및 ELISA실험을 위한 가수분해 시료로 사용하였다.

얻어진 AFB₁-N7-Gua-DNA adduct로부터 AFB₁을 검출하기 위하여 Shen등⁽¹⁸⁾의 방법으로 가수분해하였다. 즉, 상기 방법에 의하여 분리된 DNA 100 μL에 10 M HCl 1 μL를 첨가 후 70°C에 20분 동안 정치한 다음 5 M NaOH 2 μL를 넣어 중화반응을 유도한 후, Sep-Pak cartridge를 통하여 정제시켰으며, 상기의 방법으로 ELISA실험을 수행할 때까지 -20°C에 보관하였다.

조직 중 AFB₁의 관찰

간 조직내에서 AFB₁이 축적된 양상을 관찰하기 위하여 Miller 등⁽¹⁹⁾의 방법에 의하여 AFB₁에 대한 항체를 이용하여 면역조직화학적 실험을 시행하였다. AFB₁이 투여된 간조직을 외과적으로 절제 후 즉시 4% neutral paraformaldehyde

(pH 7.2)에 고정 후 30% sucrose 용액에 서서히 가라앉힌 후 급속동결제(O.C.T. compound)로 동결시켜 -20°C 이하에서 냉동절편기(Histostat 855, USA)로 10 μm의 절편을 만들었다. 선정된 조직 절편을 함수과정을 거쳐서 0.02 M PBS로 세척한 다음 비특이성 반응을 감소시킨 후 100 μL를 절편 위에 점적하여 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, 다시 PBS로 15분씩 3회 세척한 다음 1:200으로 희석한 1차 항체 aflatoxin monoclonal antibody(AF78)를 4°C에서 18시간동안 반응시켰다. 0.5% periodic acid에 3분간 처리후 1:200으로 희석된 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG를 부착시켜 실온에서 1시간 동안 반응 후 1:100으로 희석된 3차 항체인 avidinbiotin peroxidase complex를 첨가 후 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 methyl green으로 대조 염색하여 검경하였다.

통계처리

대조군과 AFB₁ 투여 및 항산화 비타민 혼합 투여군 사이의 결과치는 평균치와 표준편차(mean±S.D.)로 표기하고 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 그 의의를 평가하였다.

결 과

ELISA에 의한 Aflatoxin B₁의 정량

사용항체의 특성: Liu등⁽²⁰⁾의 방법을 참고로 교차반응을 실험하여 항체의 항원에 대한 특이성을 검토하였는데, Table 1에서와 같이 AFB₁의 교차 반응성이 100%로 나타났으며, G₁, G₂에 대한 교차 반응성이 각각 23%, 16%로 나타났지만 그 외 aflatoxin B₂, M₁, M₂, sterigmatocystin과는 반응성이 거의 없는 것으로 나타났다.

Aflatoxin B₁의 회수율 측정: 면역분석법에 의한 혈청 AFB₁의 농도를 측정하기 위하여 0.001 ng/mL에서 10 ng/mL의 농도 범위에서 이 반복으로 표준 곡선을 작성한 결과, 검출한계는 0.001 ng/mL로 측정되었으며 이때 표준곡선을 Bio-Rad

Table 1. Cross reactivity of aflatoxin B₁ and analogues by indirect competitive ELISA¹⁾

Analogues	Cross reactivity(%) ²⁾
Aflatoxin B ₁	100
Aflatoxin B ₂	-
Aflatoxin G ₁	23
Aflatoxin G ₂	16
Aflatoxin M ₁	-
Aflatoxin M ₂	-
Sterigmatocystin	-

¹⁾Represent means of triplicate trials

²⁾Defined as a ratio of the amounts of AFB₁ required to give 50% inhibition of maximal binding to the amount of test compound able to do the same(expresses as a percentage)

Table 2. Recovery rate of the AFB₁ in serum sample after spiking of aflatoxin B₁(ng/mL)

Concentration (ppb) ¹⁾	Absorbance (405 nm)	Standard deviation	Detected concentration (ppb)	Recovery rate (%)
10	0.429	± 0.066	7.533	70
50	0.266	± 0.042	43.472	86
100	0.199	± 0.014	94.013	94

¹⁾The standard curve originated in 0.001~10 ng/mL concentration of AFB₁ standard and represent means duplicate trials. Maximal absorbance(A), slope(B), IC₅₀(C) and minimal absorbance(D) are values from the four-parameter curve fit given by the equation $y=(A-D)/[1+(x/C)^B]+D=(2.301-0.018317)/(1+(Conc./0.105)^{0.4899})+0.01837$, Correlation Coefficient=0.994

Table 3. Concentration of AFB₁ in the AFB₁-treated mice sera and co-administrated with antioxidant vitamin treated mice sera by ELISA¹⁾

Group	Concentration (ppb)
G3	12.28 ± 0.26 ^a
G4	18.78 ± 0.58 ^a
G5	7.60 ± 0.39 ^b
G6	4.85 ± 0.27 ^b
F	695.90 ^{**}
p	0.0001

¹⁾The standard curve originated in 0.001~10 ng/mL concentration of AFB₁ standard; Maximal absorbance(A), slope(B), IC₅₀(C) and minimal absorbance(D) are values from the four-parameter curve fit given by the equation $y=(A-D)/[1+(x/C)^B]+D=(2.301-0.018317)/(1+(Conc./0.105)^{0.4899})+0.01837$, Correlation Coefficient=0.994. Each sample repeated three times. The data were shown by Mean ± S.D. (Standard deviation on the mean n=6)

Values within the same column with same alphabets are not significantly different(ng/mL)(**, p<0.01) among the groups by one way ANOVA with Scheffe' test

사에서 제공한 소프트웨어 프로그램인 MPM microplate manager(Ver. 4.0)으로 분석하였을 때 다음과 같은 방정식을 얻을 수 있었다.

$Y^{1)} = (A-D)/[1+(x/C)^B]+D = (2.301-0.018317)/(1+(Conc./0.105)^{0.4899})+0.01837$, ¹⁾Maximal absorbance(A), slope(B), IC₅₀(C) and minimal absorbance(D) are values from the four-parameter curve fit given by equation. Correlation Coefficient = 0.994 아울러 표준 AFB₁를 각각 10, 50, 100 ng/mL로 정상 혈청에 spike하여 얻은 흡광치를 표준곡선 및 방정식에 대응시켜 농도를 구하고, 혈청에서의 회수율을 구한 결과 Table 2에서와 같이 70%~94%로 나타났다. 이는 혈청 중에 존재하는 특정성분이 ELISA에 영향을 미친 것으로 생각되나 전 연구(not published)에서 HPLC에 의한 AFB₁의 함량(R² = 0.997)을 고려하면 본 실험에서의 AFB₁ 정량에는 크게 문제가 없는 것으로 판단되었다.

ELISA에 의한 혈청 중 유리 Aflatoxin B₁의 함량: 혈청 중 유리 AFB₁를 측정하기 위한 ELISA 실험에서 AFB₁ 단독 투여군인 3군, 4군에서는 각각 12.28 ± 0.26, 18.78 ± 0.58(ng/mL)을 보였으나, 항산화비타민 혼합투여군인 5군과 6군에서는 7.60 ± 0.39, 4.85 ± 0.27(ng/mL)로 감소하여 유의확률

Table 4. Quantitative analysis of the AFB₁-DNA adduct in mice liver

Group	Concentration of AFB ₁ -DNA adduct ¹⁾ (ppb) M ± SD
G1	1.08 ± 0.05 ^b
G2	1.12 ± 0.03 ^b
G3	23.78 ± 0.01 ^c
G4	25.48 ± 16.94 ^c
G5	5.26 ± 0.04 ^{ab}
G6	7.81 ± 0.01 ^{ab}
F	6.16 ^{**}
p	0.0039

¹⁾The standard curve originated in 0.001~10 ng/mL concentration of AFB₁ standard; Maximal absorbance(A), slope(B), IC₅₀(C) and minimal absorbance(D) are values from the four-parameter curve fit given by the equation $y=(A-D)/[1+(x/C)^B]+D=(2.301-0.018317)/(1+(Conc./0.105)^{0.4899})+0.01837$, Correlation Coefficient=0.994. Each sample repeated three times. The results were shown as Mean ± S.D. (Standard deviation on the mean for n=6). 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

p<0.0001에서 유의수준 p<0.01에서 통계적으로 유의성을 보였다(Table 3).

간조직에서의 AFB₁-DNA 부가체(adduct)의 함량

AFB₁이 투여된 간세포에서 형성된 AFB₁-DNA 부가체를 분석하기 위한 실험에서 Table 4와 같은 결과를 얻게 되었다. 항산화 비타민 투여군에서는 대조군 1.08 ± 0.05, 1.12 ± 0.03 ng/mL과 비교하여 5.26 ± 0.04, 7.81 ± 0.01 ng/mL로 다소 증가된 양상을 나타내었으나 AFB₁ 단독 투여군에서 나타난 23.78 ± 0.01, 25.48 ± 16.94(ng/mL) 보다는 현저히 감소되었음을 알 수 있다.

면역화학적 관찰을 통한 AFB₁의 축적 양상

간 조직 내에서 AFB₁이 축적된 양상을 관찰하기 위하여 AFB₁에 대한 단클론 항체(AF78)를 이용하여 면역조직화학적 실험을 시행하였다. Fig. 1A에서 나타난 바와 같이 정상 간 조직에서는 전체적으로 AFB₁의 축적이 거의 일어나지 않는 반면 Fig. 1B와 같이 AFB₁ 투여군에서는 주로 AFB₁의 축적이 혈관 주변에서 관찰되는데 쿠퍼세포(kupffer cell)와 유동 세포 주변의 내피세포뿐만 아니라 혈관 가까이 있는 간세포(hepatocyte)에서도 축적되는 양상을 나타내었다. 한편 항산화 비타민 혼합 투여군에서는 중심 정맥과 혈관 주변의 갈색 침전이 현저하게 줄어든 양상을 나타내고있다(Fig. 1C). 이것은 단일 용량의 AFB₁을 투여하였을 때 AFB₁의 양과 부가체 사이에는 유의한 용량 의존적 연관성을 나타낸다⁶⁾는 보고와 같이 항산화제 투여로 인하여 혈중 AFB₁의 감소와 함께 AFB₁-DNA binding이 감소¹⁸⁾한 것임을 시사한다.

고 찰

AFB₁은 설치류와 사람세포를 대상으로 하는 여러 실험 모

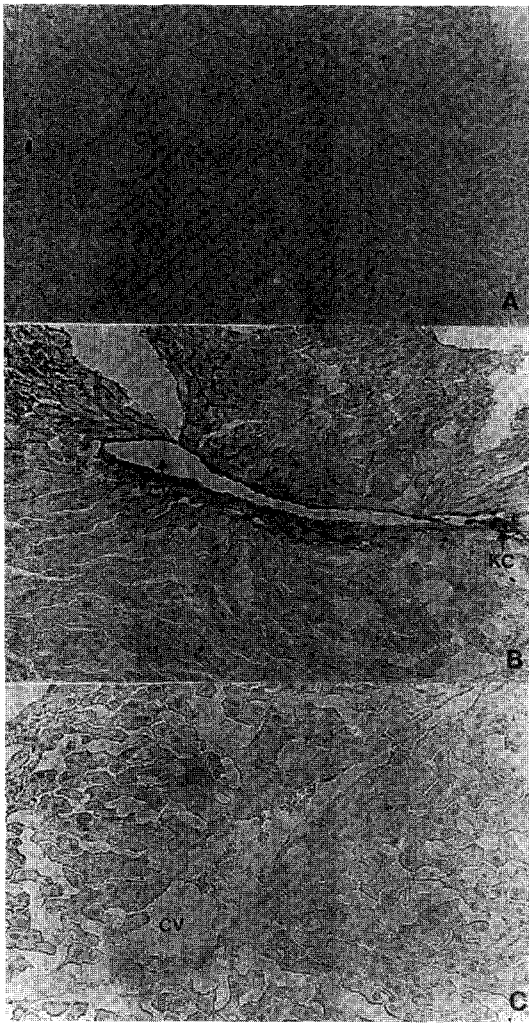


Fig. 1. Immunohistochemical localization of AFB₁ in the 6-week old mice liver.

A, control group; B, AFB₁ treated group without vitamins; C, AFB₁ plus vitamin C treated group. 200X CV, central vein, KC, kupffer cell.

델 체계에서 변이 유발원으로 알려졌으며, 또한 염색체 이상, 미세핵과 자매염색체의 변화, 비정상적 DNA 합성, 염색체 가닥 분해와 부가체 형성(AFB₁-N7-guanine)을 일으키며, 이것은 DNA의 핵친화성 부위(nucleophilic site)와 쉽게 결합하여 DNA 부가체를 만들어, 간암 발생의 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려져 왔다^(21,22,23). 효소면역분석법(ELISA)으로 AFB₁의 정량한 결과에 의하면 indirect competitive ELISA법을 통하여 0.001 ng/mL까지 혈청 중 AFB₁의 잔류 농도를 측정할 수 있었으며, 이것은 인체혈청에서 혈청에 대한 전정제(purification)를 하지 않고 유사한 방법으로 측정하였을 때 0.5 ng/mL까지 검출되었다⁽²⁴⁾는 보고에서 보다 민감도가 높았으며 혈청을 메탄올로 전정제할 경우 민감도가 더 증가될 있다고 하였다. 그리고 혈청과 메탄올을 1:1 비율로 섞어서 전처리할 경우 비 특이적 방해물질로 작용하는 혈청 단백질이 제거되어⁽²⁴⁾ 혈청내 AFB₁의 회수율을 현재의 70%-94% 수준보다 높일 수 있을 것으로 생각된다. 생체 시료에서 AFB₁를 검출하기 위한 여러 연구들이 수행되고 있으며^(25,26), ELISA법

에 의한 아플라톡신의 분석은 특히 소량의 시료를 취급할 경우에 더욱 유용한 방법으로 인정되고 있다. 따라서, 본 연구에서 간조직의 AFB₁-DNA 부가체를 indirect competitive ELISA를 이용하여 정량하기 위하여 먼저 간조직에서 DNA를 추출한 후 1% agarose gel electrophoresis를 통하여 육안적으로 DNA를 관찰하였으며 spectrophotometer에 의하여 측정된 DNA의 평균 O.D는 1.2396(260 nm), 0.6504(280 nm)이었으며 ratio는 1.906(260/280 nm)으로 순도가 높았다. 수확된 DNA가 가수분해 과정을 거치면, AFB₁-N7-Gua-DNA 부가체의 90% 이상이 2,3-dihydro-2-N7-formyl-2',5',6'-triamino-4'-oxo-N5-pyrimidyl-3-hydroxy AFB₁(AFB₁-FAPy)으로 전환되는 것으로 알려져 있다⁽⁶⁾. 이 추출물을 C₁₈ Sep-Pak cartridge로 정제한 후 얻어진 aflatoxin B₁-DNA 부가체의 함량은 Table 4에서와 같이 AFB₁ 단독 투여군에서의 함량이 유의하게 높게 나타났으며, 항산화 비타민 혼합 투여군에서는 독소의 함량이 감소하였고 p<0.01의 통계적 유의성을 나타내었다. 이러한 결과는 항산화제의 일종인 selenite 8 ppm을 마시는 물에 혼합 투여하였을 때 용량 의존적으로 AFB₁-DNA binding이 억제되었다는 보고⁽¹⁸⁾와 유사하였다.

동물에 있어 아플라톡신 중독증은 간의 병리적 변화와 혈청속 ALT(alanine amino transferase), AST(aspartate amino transferase)의 증가로 나타날 수 있다^(2,3)고 하였으며, AFB₁으로 인한 ALT, AST의 혈청 수준 증가에 관하여는 본 연구실의 전보⁽²⁷⁾에서도 발표한 바 있다. 따라서 AFB₁을 섭취한 실험 동물의 부검을 했을 때 지방간, 간 섬유화, 복수, 장의 부종, 담도 증식, 간암 등이 나타나고 외견상 음식 섭취 감소에 의한 체중 감소가 나타나고 결국 실험동물의 사망까지도 유발된다⁽²⁰⁾고 보고하였다. 본 실험의 전 단계에서도 AFB₁ 단독 투여군에서 현저한 체중감소가 나타났으며 해부시 간의 심한 괴사상태와 진행된 간 경변상태를 관찰할 수 있었다(data not shown). 이것은 Real 등⁽⁴⁾의 연구에서도 AFB₁에 노출 후 24시간이 경과하는 동안 심한 혈관 울혈, 수포형성, 세포퇴화가 나타났으며 이러한 현상은 24시간만에 모든 간엽에서 나타났다고 보고하였다.

아울러, 본 연구에서 간 조직내에서 AFB₁이 축적된 양상을 관찰하기 위하여 AFB₁에 대한 항체를 이용하여 면역조직화학적 실험을 시행하였다. Fig. 1A에서 나타난 바와 같이 정상 간 조직에서는 전체적으로 AFB₁의 축적이 거의 일어나지 않는 반면 Fig. 1B와 같이 AFB₁ 투여군에서는 주로 AFB₁의 축적이 혈관 주변에서 관찰되는데 쿠퍼세포(kupffer cell)와 유동세포 주변의 내피세포뿐만 아니라 혈관 가까이에 있는 간세포(hepatocyte)에서도 축적되는 양상을 나타내었다. 한편 비타민 C 혼합 투여군에서는 중심 정맥과 혈관 주변의 갈색 침전이 현저하게 줄어든 양상을 나타내고있다.(Fig. 1C) 흰쥐의 경우 아플라톡신을 투여 후 간세포 미세구조를 관찰하면 아플라톡신 투여 2시간 후에는 간문계 삼분지와 중심정맥을 중심으로 아플라톡신의 침전이 일어난 것을 관찰할 수 있으며 주로 간조직 세포의 세포질과 핵에 고루 분포하는 현상을 볼 수 있었다⁽²⁸⁾고 보고하였다. 이러한 관점에서 볼 때 세포에 대한 항산화제의 해독작용 및 보호작용을 기대할 수 있으며, 본 실험의 결과에서 AFB₁과 비타민 C의 혼합 투여군에서 중심 정맥과 혈관 주변의 갈색 침전이 현저

하게 줄어든 현상이 나타난 것은 조직내에 축적된 AFB₁이 항산화제 투여로 인하여 심한 세포독성 상태에서 회복되고 있는 것을 나타낸다. 이러한 현상은 비타민 E 투여군에서도 동일한 결과를 나타내었다(data not shown). 또한 AFB₁에 의한 독성은 지질과산화 반응과 산화적 DNA 손상을 통해 나타나는 것으로 생각되고 있다^(18,29)는 최근 보고에서도 항산화제의 중요성이 강조되고 있다. Goeger등⁽³⁰⁾에 의하면 무지개송어에서 항산화제인 butylated hydroxyindole(BHA)과 β -naphthoflavone(BNF)이 AFB₁의 대사에 미치는 영향으로, 간 세포 DNA 부가체형성과 암 발생과정에 대한 연구를 하였는데, 이 연구 결과에 의하면, BHA는 DNA부가체 형성과 암 발생과정에 영향을 미치지 않으나 BNF는 DNA 부가체 형성을 감소시켰으며, 암 발생과정을 억제한 것으로 나타났다. 이러한 연구에서 나타난 바와 같이 항산화제의 종류에 의하여 효과 발생에 다양한 차이가 있는 것으로 간주된다. 결과적으로 본 연구에 적용된 항산화비타민 C와 E는 전체적인 생체 대사과정에서 지질과산화 작용을 포함한 세포독성 및 간암발생과정에서 유효한 억제 작용을 나타내었다.

요 약

본 연구는 aflatoxin B₁(AFB₁)에 의하여 유발된 마우스 간 세포에서의 AFB₁-DNA 부가체 형성과 세포의 산화적 손상에 대한 항산화 비타민의 효과를 조사하기 위하여 수행되었다. 먼저, 비타민 C와 비타민 E를 6 주령 수컷 ICR 마우스에 10 mg/kg, 63.8 mg/kg의 농도로 복강내에 각각 주사(i.p.; intraperitoneal injection) 하였고, AFB₁과 비타민 혼합 투여군은 비타민을 주사한 후 1시간이 경과한 다음 0.4 mg/kg의 AFB₁을 투여하였다. 투여 횟수는 2일 간격으로 동일한 방법에 의해 4회 반복 투여하였다. 반면, AFB₁ 단독 투여군은 위와 같은 방법으로 비타민 없이 AFB₁만 투여하였다. ELISA에 의한 마우스 혈청내 AFB₁의 잔여 농도는 AFB₁ 단독 투여군에서 12.28, 18.78 ng/mL이 검출되었다. 그러나 항산화비타민 C 혼합 투여군에서는 7.60 ng/mL, 항산화비타민 E 혼합 투여군에서는 4.85 ng/mL이 각각 검출되었다. 마우스의 간에서 분석된 AFB₁-DNA 부가체 농도에 의하면, AFB₁ 단독 투여군에서는 23.78, 25.48 ng/mL이었으며, 항산화비타민 C 혼합 투여된 군에서는 5.26 ng/mL, 항산화비타민 E 혼합 투여군에서 7.81 ng/mL로 각각 조사되었다. 이들 결과에 대한 통계적 유의성은 $p < 0.01$ 이었다. 또한 면역조직화학적 관찰에서 AFB₁ 단독 투여군에서는 중심정맥과 동양혈관 주변에 갈색의 침전이 두드러지게 나타났으며 이러한 현상은 항산화비타민 혼합 투여군에서 유의하게 감소한 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 교육부에서 시행한 두뇌한국 21 지원 프로그램에 의하여 연구비 지원을 받았으므로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Smith, J.E., Lewis, C.W., Anderson, J.G., Solomons, G.L. Myc-

- otoxins in human nutrition and health. In: Report EUR 16048 EN, European Commission, Directorate-General XII, Brussels, Belgium (1994)
- Robens, J.F., Richard, J.L. Aflatoxins in animal and human health. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 127: 69-94 (1992)
- Netke, S.P., Roomi, M.W., Tsao, C., Niedzwiecki, A. Ascorbic Acid Protects Guinea Pigs from Acute Aflatoxin Toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143: 429-435 (1997)
- Rheal, A.T., Hisanori Hashimoto, Summers, P.M. Non-invasive in vivo magnetic resonance imaging assessment of acute aflatoxin B₁ hepatotoxicity in rats. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1475: 314-320 (2000)
- Choy, W.N. 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 (1993)
- Root, M., Theodore Lange, T. Colin Campbell. Dissimilarity in aflatoxin dose-response relationships between DNA adduct formation and development of preneoplastic foci in rat liver. *Chemico-Biological interactions.* 106: 213-227 (1997)
- Dashwood, R.H., Arbogast, D.N., Fong, A.T., Pereira, C., Hendricks, J.D. and Bailey, G.S. Quantitative inter-relationships between aflatoxin B₁ carcinogen dose, indole 3-carbinol anti-carcinogen dose, target organ DNA adduction and final tumor response. *Carcinogenesis.* 10: 175-181 (1989)
- Bechtel, D.H. Molecular dosimetry of hepatic aflatoxin B₁-DNA adducts; linear correlation with hepatic cancer risk. *Regul Toxicol Pharmacol.* 10(1): 74-81 (1989)
- Jacob, R.A. Nutrition, health and antioxidants. *INFORM.* 5: 1271-1275 (1994)
- Namiki, M. Antioxidants/antimutagens in foods. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29: 273-300 (1990)
- Sato, K., Niki, E. and Shimasaki, H. Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 279: 402-405 (1990)
- Sies, H.(1991). Oxidative stress: Introduction. In *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants.* Academic Press, San Diego, CA. 15-22.
- Bachowski, S., Baker, T.K., Stevenson, D.E., Walborg, E.F., Jr. and Klaunig, J.E. The potential role of oxidative stress in non-genotoxic hepatocarcinogenesis in the mouse liver. *Prog. Clin. Biol. Res.* 391: 385-396 (1995)
- Smigel, K. Vitamin E moves on stage in cancer prevention studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 996-997 (1992)
- Kawamura, O., Maki, S., Sato, S. and Ueno, Y. Ochratoxin A in livestock and human sera in japan quantified by sensitive ELISA. In *human Ochratoxicosis and its Pathologies*(Creppy, E. E., Castegnaro, M. and Dirheimer, G. Eds.). John Libby Eurotext INSERM. 231: 159-165 (1993)
- Lee D.S. Studies on the contamination in cereals and toxicity of ochratoxin A in mouse, Ph. D. Thesis, Gyeongsang National University (1991)
- Gross Bellard M. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.*, (1973)
- Shen, H.M., Chen, Y.S., Lee, H.P. and Ong, C.N. Aflatoxin B₁-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicology and applied pharmacology.* 127: 145-150 (1994)
- Miller, S.G., Leclerc, R.F., Seo, S.J. and Malone, C. Synthesis and transport of storage proteins by tests in *Heliothis virescens*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 14: 151-170 (1990)
- Liu, Y.K., Zang, K.Z. and Wu, Y.D. Treatment of advanced primary hepatocellular carcinoma by I¹³¹-anti-AFP. *Lancet.*, 531 (1983)
- Wang, J.S., Groopman, J.D. DNA damage by mycotoxins. *Mutat. Res.* 424: 167-181 (1999)
- Pelkonene, O., Raunio, H. Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ. Health Perspect.* 105(S4): 767-774 (1997)

23. Stark, A.A. Molecular aspects of Aflatoxin B₁ mutagenesis and carcinogenesis. In: Mycotoxins and Phycotoxins., Editors: P.S. Steyn and R. Vlegaar. Elsevier, Amsterdam. 435-445 (1986)
24. Andrew, P.W., Denning, D.W. and Michael, R.A. An ELISA method for the rapid and simple determination of aflatoxin in human serum. Food Additives and Contaminants. 5(4): 609-619 (1988)
25. Lee Y.J. Determination of aflatoxin B₁ in Korean urine. M.S. Thesis, Gyeongsang National University (1991)
26. Jung E.C., Ha W.S., Park S.T., Choi S.K., Hong S.C., Han H.S. and Chung D.H. A study on the analysis of aflatoxin B₁ in human sera by ELISA. The Korean Journal of Surgery, 42(4): 419-428 (1992)
27. Park S.J., Park J.H., Park J.S., Seo S.J. and Chung D.H. The Effect of antioxidant vitamins on liver function enzymes and hepatic damage of aflatoxin B₁ treated mice. The Journal of Korean Biological Nursing Science. 2(1): 49-63 (2000)
28. Choi S.K. Determination of aflatoxin B₁-DNA adduct and immunohistochemical analysis in mouse by the antibody to aflatoxin B₁. Ph D. Thesis, Seoul National University (1991)
29. Souza, M.F., Tome, A.R., Rao, V.S. Inhibition by the Bioflavonoid Ternation of Aflatoxin B₁-induced Lipid peroxidation in Rat liver., J. Pharm. Pharmacol. 51: 125-129 (1999)
30. Goeger, D.E., Shelton, D.W., Hendricks, J.D., Pereira, C. and Bailey, G.S. Comparative effect of dietary butylated hydroxyanisole and beta-naphthoflavone on aflatoxin B₁ metabolism. Carcinogenesis. 9(10): 1793-1800 (1988)

(2001년 9월 19일 접수)