

방사선 조사 사료를 섭취한 Mouse의 혈장, 간, 소장 점막의 과산화지질과 림프구 DNA의 산화적 손상*

장현희¹⁾ · 강명희²⁾ · 양재승³⁾ · 이선영^{1)§}

충남대학교 생활과학대학 식품영양학과,¹⁾ 한남대학교 이과대학 식품영양학과,²⁾ 한국원자력연구소 식품검지실³⁾

Plasma, Tissue Thiobarbituric Acid Reactive Substance and Lymphocyte Oxidative DNA Damage in Mouse Fed Gamma Irradiated Diet*

Jang, Hyun-Hee¹⁾ · Kang, Myung-Hee²⁾ · Yang, Jae-Seung³⁾ · Ly, Sun-Yung^{1)§}

Department of Food & Nutrition,¹⁾ Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Department of Food and Nutrition,²⁾ Han Nam University, Daejeon 306-791, Korea

Detection laboratory Irradiated Foods,³⁾ Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea

ABSTRACT

Food irradiation has been steadily increasing in many countries in line with increasing international trade and concerns about naturally occurring harmful contaminants in food. Although irradiation provides an excellent safeguard for the consumer by destroying almost 100% of harmful bacteria, it is necessary to ensure the safety of irradiated foods. This study was performed to investigate the effect of an irradiated diet on lipid peroxidation in the plasma, liver, small intestinal mucosa, and lymphocyte DNA damage in mice. Eight-week old ICR mice were assigned to two groups to receive either non-irradiated or irradiated (10 kGy) diets containing 20.38% fish powder and 6.06% sesame seeds for 4 weeks. The resulting changes in the degrees of lipid peroxidation were evaluated based on the level of plasma and liver thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), transmission electron micrograph of jejunal mucosa, and free radical-induced oxidative DNA damage in lymphocytes, as measured by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis). The peroxide values of the gamma irradiated diet were measured every week, and the sample for comet assay was taken at the end of the four week experimental period. There was no significant difference in food efficiency ratio between the two groups. The peroxide values of the diet were immediately increased to 35.5% after gamma irradiation and kept on increasing during storage. After 4 weeks, no differences in tissue or plasma TBARS value were observed between the two groups, but epithelial cells of jejunum showed osmiophilic laminated membranous structures, considered as myelin figures. The oxidative DNA damage expressed as tail moment (TM) increased 30% in the blood lymphocytes of the mice fed the irradiated diet. In conclusion, the comet assay sensitively detected differences in lymphocyte DNA damage after feeding with the irradiated diet for 4 weeks. However, in order to ensure the safety of irradiated foods, it would be more useful to conduct a long-term feeding regimen using an irradiated diet and examine the level of lipid peroxidation and the state of oxidative stress in a greater range of organs. (*Korean J Nutrition* 36(3) : 255~261, 2003)

KEY WORDS : gamma irradiation, thiobarbituric acid reactive substance, oxidative DNA damage, alkaline comet assay, cell damage.

서론

식품의 방사선 조사는 주로 식품의 보존기간을 높여 식

량난을 해결하기 위하여 식품학자들에 의하여 처리기술이 발전되고 적용범위를 넓혀왔다. 그러나 식품은 방사선 에너지를 흡수하여 free radical을 다량 생성하게 되고,¹⁾ 특히 산소 존재하에서는 peroxide의 생성이 빠르게 생성된다. Peroxide는 식품의 불포화 지방산과 반응하여 자동산화 과정에 의하여 지질과산화물을 일으키므로 관능적인 품질 면에서 뿐 아니라 식품의 항산화 영양소 함량에도 영향을 주게된다. Adamiker에 의하면 방사선조사 된 사료는 부분

접수일 : 2003년 3월 13일

채택일 : 2003년 4월 13일

*This research was supported by grant No. R05-2001-000-00695-0 from the Basic Research Program of the Korea Science & Engineering Foundation.

§To whom correspondence should be addressed.

적인 수용성 비타민류의 파괴를 수반하며 지질의 변성으로 지질함량이 감소한다고 하였다.²⁾ 또 자유 라디칼을 다량 생성하는 식품의 방사선조사는 생체막의 지질과산화의 생성에 의한 세포파괴를 초래하여 악성종양을 유발시킬 수도 있다고 보고되었다.³⁾

1983년 FAO에서는 방사선 조사식품들에 대한 Codex 표준 규격 채택시 안전성에 대해 검토하여 평균 조사량 10 kGy까지는 독성학적으로 안전하다고 하였다. 안전성 검토는 이 당시까지 보고된 많은 연구자료를 토대로 이루어졌으나 *in vivo* 연구 결과가 많지 않았고 시험방법 또한 극히 제한되어있었다. 이후로 과학기술이 발전함에 따라 유전독성학적, 영양학적 안전성의 시험 방법도 진일보하였으므로 1980년대 이전에 실시되었던 유전독성학적, 영양학적 안전성에 대한 검토 결과는 재고할 필요가 있게 되었다.

특히 국제간 식품유통량의 증가로 인하여 방사선 조사 식품의 도입량이 많아지고 있지만 조사식품의 검지는 기술적으로 한계가 있어 국내에서 거의 이루어지지 못하고 있는 실정이며 농수산물 수입이 많은 근접국가의 조사시설 규모나 식품의 제조사 여부도 파악되지 못하는 상황이다. 또한 국내에서도 최근 들어 식중독균의 제거 등을 목적으로 고선량 조사에 대한 식품학적 검토가 이루어지고 있으나^{4,5)} 그에 대한 안정성 검토는 극히 제한된 범위에서만 이루어지고 있다. 그러므로 현대와 같이 인체의 건강에 많은 주의가 기울여지고 산화적인 스트레스와 영양섭취의 불균형이 문제가 되고 있는 시점에서는 방사선 조사 식품을 다른 방향에서 바라보고 그 효과를 검증해야 할 필요성을 안고 있다.

한편, 산화적인 스트레스가 가해졌을 때 그 결과를 측정하기 위한 방법으로 효소를 이용한 생체내 항산화능 측정은 지금까지 생화학자들에 의해 애용되어온 방법이다. 그러나 이 방법은 생체의 자체적인 보호체계의 발휘로 인해 지질과산화에 대한 영향을 민감하게 측정하기 어려우며 *in vivo*와 같이 많은 요소가 영향을 주는 경우 결과의 재현성이 미흡한 측면이 있다. 따라서 생체내에서 세포의 산화적 스트레스를 감지할 수 있는 좀 더 유용하고 민감한 측정방법으로 본 연구에서는 comet assay 또는 single cell gel electrophoresis (SCGE)로 불리는 측정방법을 도입하게 되었다. 이 방법은 이제까지 사용되었던 방법들보다 쉽게 유해자극에 대한 DNA손상을 정량적으로 측정할 수 있는 방법으로 Singh 등⁶⁾에 의해 보다 민감하게 DNA손상을 감지해 낼 수 있는 방법으로 발전되어 그 동안 많은 연구자들에 의해 암 유발원이나 독성물질에 대한 유전독

성실험에 다양하게 적용되어져 왔다.⁷⁾

본 연구에서는 위에 기술한 바와 같이 여러 가지 이유로 *in vivo* 실험을 통해 방사선조사 사료 섭취에 따른 산화적 스트레스를 알아보고자 하여 생체내 지질과산화물 농도를 측정하고 alkaline comet assay를 이용한 DNA손상과 소장점막의 조직학적 검사를 통하여 방사선조사 식품의 안전성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물의 사육 및 식이

체중이 31~35 g인 8주령 ICR mouse 20마리를 대한실험동물센터로부터 구입하여 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 의 항온항습 조건을 유지하고 12시간 광주기를 유지한 사육실에서 1주간 환경과 사료에 적응시켰다. 두 군의 평균 체중이 비슷하게 임의로 10마리씩 나누어 물과 사료는 무제한 급여하였으며 4주 동안 사육하였다. 실험 식이는 AIN93M diet를 기본으로 하여 참깨와 고등어분을 포함시켜 분말 사료로 제조하였다(Table 1). 참깨와 고등어는 한국인의 다소비 식품들이며 중국 등 인근 지역에서 다량 수입되는 식품으로 방사선 조사 가능성이 크며 또한 방사선 조사시 그 영향이 크게 나타날 수 있는 불포화지방산 함량이 높은 식품이므로 본 연구에 실험재료로 사용하였다. 어분은 내장을 제거한 고등어를 1 cm 두께로 통으로 잘라 5일간 냉동건조하고 이를 분말화하여 사용하였으며 참깨는 냉동건조된 것을 믹서에 가볍게 갈아 분말화하여 사용하였다. 제조한 사료의 반은 대조군 식이로 하고 다른 반은 함기포장하여 10 kGy 선량에서 방사선 조사하여 실험군 식이로 사용하였다. 체중은 1주일에 한 번씩 측정하였으며 사료 섭취량은 매일 측정하였다.

Table 1. Composition of experimental diet (% of diet)

Ingredient	%
Cornstarch	49.30
Casein	5.15
Sucrose	9.55
Sesame seed	6.06
Mackerel	20.38
Fiber (α -cellulose)	4.78
Mineral mix (AIN-93G-MX)	3.34
Vitamin mix (AIN-93G-VX)	0.96
L-cystine	0.29
Cholin-bitartrate	0.24
Tert-butylhydroquinone	0.0014

C: F: P ratio = 58.8: 6.06: 25.5

2. 실험동물 희생 및 시료채취

사육이 끝난 mouse는 16시간 절식 후 에테르로 가볍게 마취하여 심장에서 채혈하고 개복하여 간을 취하였다. 취한 간은 0°C 생리적 식염수에 한 번 10 mM phosphate buffer (pH 7.4)에서 한 번 세척하여 혈액을 제거하고 phosphate buffer에서 조직 균질기로 마쇄하여 조직 균질액을 얻었다. 소장은 장막 외부의 지방을 제거하고 전장을 취하여 0°C 생리적 식염수와 phosphate buffer에서 2회 세척하고 조직검사용 시료를 채취한 후 나머지는 길기로 갈라 수분을 제거하고 점막을 취하여 phosphate buffer에서 균질화하였다. 모든 작업은 냉장온도에서 시행하여 시료의 온도가 상승하는 것을 방지하였다. 조직균질 시료는 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하여 최종 조직균질액으로 사용하였다. 혈액은 채혈한 후 4°C에서 한 시간 방치 후 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 취하여 분석에 사용하였다.

3. 사료의 과산화물가 (Peroxide value, POV) 측정

비조사 사료와 방사선 조사된 사료의 POV값은 Lea법⁹⁾에 따라 측정하였다. 방사선 조사하기 직전과 조사 직후에 POV값을 측정하였고, 저장 기간별 사료의 POV값은 방사선 조사된 사료를 진공밀봉 포장 후 냉동보관하면서 조사 후 1주일, 2주일 3주일, 4주일에 각각 측정하였다.

4. 조직과 혈청에서의 과산화지질 분석

각각의 조직에서 Yagi의 방법⁹⁾을 수정보완한 이¹⁰⁾의 방법인 TBA법에 의하여 측정하였다.

1) 간조직 균질액에서 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 측정

간 조직에서 TBARS 측정은 Ohkawa¹¹⁾와 이¹⁰⁾의 방법을 참고하여 측정하였다. 즉, 간 조직액을 1/12N H₂SO₄와 10% phosphotungstic acid로 2회 단백질 침전시키고 얻어진 침전물을 균질화한 후 1% TBA용액 1 ml, acetic acid, FeCl₃를 넣고 15분간 TBA반응을 일으켰다. 반응 후 바로 얼음물에서 냉각시켜 상층액에서 533 nm의 흡광도를 읽었으며 blank는 증류수로, 표준물질로는 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane용액을 사용하였다. TBARS의 최종 결과는 일부의 간조직 균질액을 취해 Bradford의 방법¹²⁾에 따라 단백질 함량을 측정하여 조직 단백질 단위중량에 대한 TBARS의 농도로 산출하였다.

2) 소장조직 균질액에서 TBARS 측정

장 점막세포는 본연의 지질과산화가 잘 일어나지 않아¹³⁾ TEA값이 매우 낮으므로 미리 1시간 동안 37°C, 공기 중

에서 배양하여 산화를 유도한 후에 배양이 끝난 소장점막 균질액 200 μ l를 사용하여 간 조직액과 동일한 방법으로 TBARS를 측정하였다.

3) 혈청에서의 TBARS 측정

혈청에서의 TBARS 측정은 간 조직에서의 측정법과 동일하였으며 혈청 50 μ l에 대하여 실시하였고 TBA 반응시간은 30분이었다.

5. DNA 손상정도 분석

Singh의 방법⁶⁾을 기초로 하여 alkaline comet assay를 다음과 같이 실시하였다.

임파구는 신선한 전혈 70 μ l을 1 ml의 PBS에 섞은 후 Histopaque 1077 (Sigma)를 100 μ l 이용하여 분리해내었다. 분리해 낸 임파구는 75 μ l의 0.7% low melting agarose gel (LMA)과 섞은 후, 0.5% normal melting agarose (NMA)로 코팅 처리된 slide 위로 임파구의 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 slide sandwich를 만들고 4°C 냉장고에 두어 gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μ l를 slide 위에 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 gel이 굳을 때까지 냉장 보관하였다. 차가운 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris)와 1% Triton X-100, 10% DMSO 혼합액에 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 DNA의 이중나선 구조를 풀어주었다. Lysis가 끝난 slide를 전기영동 탱크에 배열하고 실험직전에 제조하여 냉장 보관하였던 전기영동 buffer (300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA, pH)¹³⁾를 채워 40분 동안 unwinding시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/ 300 \pm 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4M Tris 완충용액 (pH 7.4)에 10분씩 3회 세척하고 slide를 건조시켰다. Ethidium bromide로 핵을 형광 염색하고 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경 (Leica, Germany) 상에서 관찰하였다. 세포 핵 image는 Komet 4.0 image analyzing system (Kinetic Imaging, UK)을 이용하여 분석하였다. 임파구의 DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리 (tail length, TL) 또는 tail length에 tail내 함유된 DNA비율을 곱해준 tail moment (TM) 값을 측정하여 나타내었으며 각 시료당 2개의 slide를 만들어 각각 50개씩 총 100개의 임파구에서 DNA 손상정도를 측정하였다.

6. 소장 조직검사

흰쥐의 희생직후 절취한 소장조직을 1 mm³ 크기로 세절

한 후 3% glutaraldehyde (in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) 용액과 2% osmic tetroxide (OsO_4) 용액에 각각 고정시킨 후 고정된 소장조직은 50~100% ethyl alcohol로 농도순으로 탈수하고 propylene oxide로 치환한 뒤 propylene oxide와 epon 혼합액에 침투시켰다. 그 후 epon 혼합액으로 포매 (Embedding) 하고 35°C, 45°C, 60°C의 항온조에서 각각 24시간씩 방치시켜 중합을 완료하였다. 포매된 소장조직은 초박절편기 (Ultramicrotome, LKB)를 이용하여 1 μ m의 준초박절편 (Semi-thin section)을 만들어 1% toluidine blue로 염색하여 광학 현미경으로 검경 부위를 결정하였다. 결정된 시료는 다시 60~90 nm 두께로 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자 염색한 후 전자 현미경 (Hitachi H-600)으로 관찰하였다.¹⁴⁾

7. 자료 처리 및 분석

실험결과는 백분율과 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 두 그룹간 평균치의 차이에 대한 유의성은 PC-SPSS (version 10.0 for windows)의 Student's t-test를 이용하여 유의 수준 5%이내에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 식이 섭취량, 체중 증가량, 식이 섭취효율

대조군과 실험군간 식이 섭취량과 체중 증가량, 식이 섭취효율은 Table 2와 같다. 방사선 조사한 사료는 개봉 후에 산패취가 있었으나 사료효율은 대조군 6.97, 실험군 6.42로 유의적인 차이를 보이지 않았으며 체중 증가량, 식이 섭취량 역시 방사선조사 사료 섭취 여부에 따라 큰 영향을 받지 않았음을 알 수 있었다. 현재까지 보고된 흰쥐에 대한 방사선 조사사료의 섭취 효율에 대한 연구들에서는 대체로 정상적인 성장율의 유지 또는 상승을 보인다고 하였다.^{15,16)} 또한 쥐 사료의 단백질 품질에 미치는 방사선 조사의 효과에 대한 Ley¹⁷⁾의 연구 보고에 의하면 70 kGy 이상의 범위로 조사되어도 단백질의 소화율과 생물가에 변화가 없었으며 동물의 성장률 또한 양호하였다고 하여 식품

Table 2. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio (N = 10)

	Control	Irradiation
Body wt gain (g/day)	9.54 \pm 3.1 ¹⁾	8.36 \pm 3.87
Food intake (g/day)	136.1 \pm 13.7	128.3 \pm 21.3
FER ²⁾	6.97 \pm 2.15	6.42 \pm 2.32

1) Mean \pm S.D

2) Food efficiency ratio = weight gain (g)/food intake (g)

의 방사선 조사는 소화 및 생체 이용율에 크게 영향을 주지 않는 것으로 보고되고 있으며 본 연구의 결과는 선 연구에서와 같은 결과를 보여 주었다.

2. 사료의 과산화물가 (Peroxide value, POV)

Table 3에는 조사 전과 조사 직후, 조사 후 저장기간에 따른 POV값의 함량과 함량비를 나타내었다. 방사선 조사 직후 조사사료의 POV값은 대조군 사료의 POV값 49 meq/kg diet에 비하여 66.4 meq/kg diet로 35.5% 증가하였다. 대조군 사료의 POV값은 저장 1주일 째 52 meq/kg diet에서 저장 4주일 째 85 meq/kg diet로 소폭 증가하는 것으로 나타났으나 실험군 사료의 POV값은 방사선 조사 후부터 3주일까지 큰 폭으로 상승하여 3주 째 POV값이 대조군의 190.7%까지 증가하였으며 저장 4주 째에는 상승 추세가 둔화되어 소폭 감소한 것으로 나타났다. 이와 같이 방사선 조사를 하지 않은 사료의 과산화물가에 비해 조사된 사료의 과산화물가는 저장기간 동안 매우 높게 나타났고 3~4주간 지속적으로 증가하는 것으로 나타나 불포화 지방산의 함량이 높은 식품의 방사선 조사는 지질과산화물 형성에 크게 기여한다는 것을 알 수 있었다.

Wills¹⁸⁾는 100~2000 krad 내의 gamma-rays 또는 electrons의 조사선량이 전분, 카제인 또는 다른 단백질들과 라드, 옥수수유, 청어 기름을 함유한 합성 식이의 지질과산화물 형성에 미치는 영향에 대한 연구에서 방사선 조사 후 라드와 전분 또는 옥수수유와 전분 합성 식이는 지질과산화물 형성이 매우 낮았으나, C20 : 4, C20 : 5, C22 : 6과 같은 고 불포화 지방산을 많이 함유한 청어 기름과 전분 합성 식이는 지질과산화물의 형성이 크게 증가함을 보고하였다. 또한 방사선 조사 후 2~3일 동안 합성 식이내에 생성되는 과산화물은 조사선량에 의존적이며, 지질과산화물의 생성은 시료의 저장 온도가 높을수록 많이 증가한다고 하였다. 모든 방사선 조사된 시료들은 과산화물 농도가 최대치에 도달하고, 이후에는 hydroperoxides와 aldehyde 분해 산

Table 3. Variation of peroxide values of control and irradiated diets during storage period

Storage period (week)	Peroxide value ¹⁾ (meq/kg diet)		
	Control	Irradiated	Ratio (%) (Irradiated/control)
0	49	66.4	135.5
1	52	162	311.5
2	68	196	288.2
3	76	221	290.7
4	85	215	252.9

1) Each value is the average of triplicate determinations

물의 농도가 상대적으로 낮은 값으로 떨어진다고 하였다. 그리고 합성 사료의 POV값은 지방이 단독으로 있을 때 보다 전분과 같은 분산매개체 내에 있을 경우 더 높다고 하였다. 본 실험식이 역시 불포화지방산을 많이 함유한 등푸른 생선의 분말과 참깨 분말이 들어간 합성사료로서 방사선 조사 후 진공밀봉 포장하여 산소를 제거하고 냉동저장 하였음에도 저장기간에 따라 POV값이 큰 폭으로 증가하는 것으로 보아 방사선 조사에 의해 생성된 free radical은 식품의 성분에 따라 상당한 산화적 변화의 요인이 될 수 있음을 알 수 있었다.

3. 혈청 및 조직에서의 과산화지질 측정

혈청과 간, 소장에서 TBARS 농도를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 혈청에서는 대조군의 TBARS 농도가 44.66 nmole/ml, 실험군에서는 51.07 nmole/ml로 실험군의 TBARS 농도가 높은 경향을 보였으나 두 군간에 유의적인 차이는 볼 수 없었다. 간 조직에서는 대조군의 TBARS 농도가 2.02 nmole/mg protein, 실험군에서는 2.10 nmole/mg protein으로 차이가 없는 것으로 나타났으며, 소장점막 균질액에서는 대조군의 TBARS 농도가 0.404 nmole/mg protein, 실험군의 TBARS 농도가 0.372 nmole/mg protein으로 두 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

조 등¹³⁾은 방사선 조사된 사료 섭취시 생체막의 지질과 산화물 생성에 의한 세포손상의 영향을 규명하기 위해 시판 고형 사료를 10 kGy로 방사선 조사한 후 7주간 흰쥐에게 섭취시킨 후 혈청 과산화물가와 조직 lipofuscin pigment의 변화를 조사하였다. 그 결과 방사선 조사가 사료의 멸균에 의한 안정성을 개선시켜서 심장지질 lipofuscin pigment는 대조군에 비해 평균 87.1% 감소하고 혈청의 TBARS 농도는 대조군에 비해 평균 91.7% 감소하였다고 한다.

본 실험 식이는 지질 함량이 많은 어분과 oleic acid (18 : 1)와 linoleic acid (18 : 2)등 불포화지방산이 많은 참깨를 함유한 합성사료이므로 시판 고형사료 보다는 지질 과산화물 형성이 더 많았을 것으로 생각된다. 그러나 소장점막은 과산화지질에 대한 내성이 비교적 크며, 사료가

위 장관을 지나 소장에 이르기까지는 희석, 분해, 결합 등의 많은 변화를 거쳐야 하므로 소장에까지 도달하여 장 점막에 영향을 줄 수 있는 과산화물의 잔류 농도는 크지 않을 수 있다. 이러한 경우 위장 점막에 대한 검토가 필요하다고 할 수 있다. 혈청 및 조직내 MDA 한 가지 항목 측정으로 산화적 스트레스의 영향을 논하기는 어려우며 기존의 산화적 스트레스 측정 방법인 SOD, catalase, glutathione peroxidase 등의 효소 활성 측정법은 실험여건에 따른 다양한 요인에 의해 실험 결과의 재현성이 떨어지며, interpretation에 다분히 큰 문제를 안고 있으므로 이 외의 좀더 확실한 측정 방법이 요구된다. DNA Comet assay는 생체의 유해물질 노출정도를 평가하는 민감한 방법으로 많이 이용되어 왔으므로 본 연구에서는 방사선 조사 사료에 노출된 mouse의 임파구에서 DNA 손상정도를 측정하였고 역시 산화적 스트레스에 의한 소장 조직의 변화를 관찰하기 위해 조직검사를 실시하였다.

4. 소장조직 검사

방사선 조사된 사료를 4주 동안 먹인 후 투과전자 현미경을 이용하여 소장점막을 관찰한 결과 대조군에서 볼 수 없었던 myelin figure (MF)가 관찰되었다 (Fig. 2). Myelin figure는 지질층과 물층이 결합된 것이 한 단위를 이루고 두께는 거의 6 nm정도이며 모양이 신경 myelin sheath와 비슷하여 myelin figure라 불리며 세포의 apoptosis 발생시 초기 단계에서 관찰되는 가역적인 변화로 알려져

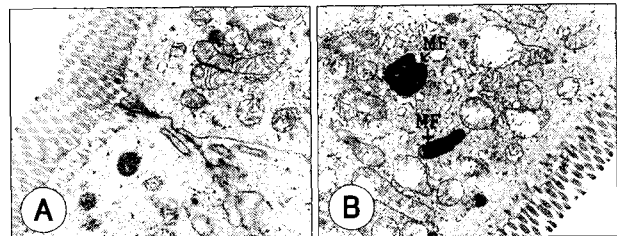


Fig. 2. Transmission electron microscopy of jejunal mucosa: Jejunal mucosa from the control (A) and mice fed irradiated diet (B). Note that the epithelial cells of jejunum showed osmiophilic laminated membranous structures, considering as myelin figures (MF).

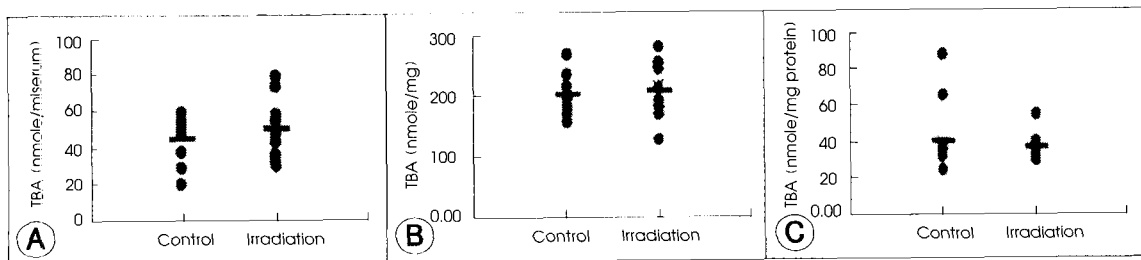


Fig. 1. TBARS in serum (A), liver (B) and intestine (C) of mouse fed control or irradiated diet for 4 weeks. Bars (-) are mean values.

있다. 그러므로 세포손상의 요인을 제거하면 다시 세포의 기능을 회복할 수 있지만 지속될 경우 세포의 apoptosis를 초래하게 된다.¹³⁹⁾ 이와 같이 소장조직 검사로 방사선 조사된 합성 사료를 섭취한 흰쥐의 소장점막이 산화적 스트레스에 의해 세포손상이 진행되고 있음을 확인하였다. 그러므로 본 연구의 결과에서와 같이 다량의 과산화지질이 함유된 식이를 지속적으로 섭취할 경우 장 점막 세포의 안전을 보장받기는 어려운 것으로 보인다. 이는 산화적인 스트레스 유발 물질에 대한 생체의 방어기전이 충분한 보호 효과를 나타내지 못하여 항상성이 깨지면서 일어나는 결과라 할 수 있다. 생체의 방어기전이 상대적으로 약화되어 산화적인 손상이 진행되는 기전을 파악하기 위해서는 항산화 효소계의 활성화와 장관 면역능에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다.

5. 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상정도

Table 4는 방사선 조사된 사료를 섭취한 mouse의 임파구에서 현미경으로 DNA fragmentation의 양상을 관찰한 후 mouse 한 마리 당 100개의 세포를 무작위로 선택하여 검사한 결과이다. 방사선 조사된 사료를 섭취한 군이 비조사 사료를 섭취한 군 보다 tail-DNA%와 tail length, 그리고 tail moment값이 유의적으로 증가하였다. 즉 tail-DNA%는 대조군이 20.8 ± 2.35 이고 실험군이 24.11 ± 2.65 로 대조군에 비해 실험군이 15.9% 증가하였다. Tail length는 대조군이 $58.85 \pm 6.33 \mu\text{m}$, 실험군이 $66.43 \pm 4.87 \mu\text{m}$ 로 대조군에 비해 12.9% 증가하였으며 tail moment값은 대조군이 13.06 ± 2.63 , 실험군이 17.08 ± 3.06 으로 대조군에 비해 실험군이 30.7% 증가하였다. free radical에 의해 유발되는 DNA의 손상은 화학적 발암과정에 있어서 결정적인 단계로 생각되어지므로²⁰⁾ 암의 위험성을 높여준다고 볼 수 있다.

방사선 조사한 사료내에 과산화물의 생성량이 유의적으로 많았음에도 불구하고 혈청이나 간조직의 TBARS 농도는 큰 차이를 보이지 못한 반면, DNA 손상을 측정하는 방법은 비교적 간편하고 민감한 검지 방법으로 본 연구의 결과에서 나타난 바와 같이 방사선 조사에 의한 조직의 산화

적 스트레스와 유전 독성학적인 위해성을 검지하는데 적합한 방법으로 사료되었다.²¹⁾ 따라서 이러한 측정기술의 도입은 그 동안 방사선 조사 식품의 위해성에 대해 발표되어 온 여러 연구 결과들을 보완, 수정할 수 있는 새로운 결과를 도출할 수 있는 계기가 될 것이다. 본 연구의 결과로 미루어 보아 방사선 조사로 인하여 free radical을 다량 함유하게 되는 식품을 지속적으로 섭취하게 되면 인체의 산화체계에 무리를 가져올 것으로 사료된다. 따라서 이러한 식품들이 수입되어 들어 올 경우는 방사선 조사여부 뿐 아니라 조사선량, 제조사 가능성에 대한 정확한 정보를 함께 입수하여 소비자에게 전달하고 특히 조사 후의 유통기간동안 저장방법을 연구하여 영양소의 파괴와 과산화물의 생성을 최소화할 수 있는 방안을 마련해야 할 것이다. 또한 더 많은 조사 가능성이 있는 식품들에 대해 방사선 조사 식품 섭취의 영향에 대해 다양한 관점에서의 연구가 필요하다고 사료된다.

요약 및 결론

본 연구는 방사선 조사 식품의 섭취시 영양학적 안전성 검토를 위해 방사선 조사된 사료를 섭취한 mouse의 혈청 및 조직에서 지질과산화 정도를 측정하고 DNA 손상 정도 및 소장점막 조직을 검사하여 방사선 조사된 사료가 mouse의 산화적 스트레스에 미치는 영향에 대해 검토하였으며 결과는 다음과 같다.

식이 섭취량, 체중 증가량, 식이 섭취효율에서 두 군간에 유의적인 차이가 없었다. 실험 사료의 POV값은 조사 전에 비해 조사 직후 35.5% 증가하였으며 3주 후에는 190.7%까지 증가하였으며 그 이후 감소하기 시작하였다. 방사선 조사된 사료를 4주 동안 섭취한 대조군과 실험군의 혈청 및 조직에서 TBARS 농도는 두 군간에 유의적인 차이가 없었으나 혈청에서는 실험군의 TBARS 농도가 대조군의 TBARS 농도 보다 높은 경향을 보였다. 투과 전자현미경을 이용한 소장점막 조직검사 결과 세포손상의 초기 단계에 발견되는 myelin figure가 관찰되었다. 흰쥐의 DNA 손상 정도를 측정된 결과 실험군이 대조군에 비해 tail-DNA%와 tail length가 유의적으로 증가하였고 tail moment값은 30% 증가하였다. 결론적으로 comet assay는 방사선 조사 사료를 섭취한 생쥐의 산화적 스트레스를 민감하게 감지할 수 있는 방법으로 사료되며 방사선 조사 식품의 안전성 여부를 입증하기 위해서는 장기간의 조사식품 섭취 실험과 혈청 외 조직에서의 유해성 검토가 이루어져야 할 것으로 보인다.

Table 4. Comparison of DNA damage level between control and irradiation group (N = 10)

	Control	Irradiation
Tail-DNA (%)	$20.80 \pm 2.35^{1)}$	$24.11 \pm 2.65^{**2)}$
Tail Length (μm)	58.82 ± 6.33	$66.43 \pm 4.87^{**}$
Tail Moment	13.06 ± 2.63	$17.08 \pm 3.06^{**}$

1) Mean \pm S.E

2) **: Significantly different from control group at $p < 0.01$

Literature cited

- 1) Lee CH. Acceptance and Trading on Irradiated Foods. *Korea University Press*, 1998
- 2) Adamiker, DA. Composition of various methods for treating feed stuffs for laboratory animals. *Food Irradiation Information* 5: 19-42, 1975
- 3) Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* 32: 1870-1874, 1972
- 4) Jeon TW, Park JH, Shin MG, Kim KH, Byun MW. Effects of Gamma-Irradiation on Biological Activities and Color Changes of Extracts of Schizandrae fructus. *J Korean Soc. Food Sci Nutr* 32(1) : 137-142, 2003
- 5) Byun MW, Kim DH, Yook HS, Cha BS, Kim JO. Changes in Microbiological and General Qualities in Gamma Irradiated Doenjang. *Food Sci Biotechnol* 10(1) : 7-11, 2001
- 6) Singh PN, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191, 1988
- 7) Wojewodzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, Collins AR, Szumiel I. Application of the comet assay for DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. I. Strand breakage. *Mutat Res* 416(1-2) : 21-35, 1998
- 8) Ju HK. Food analysis, Hakmoonsa, 1995
- 9) Yagi K, Nishigaki I, Ohama H. Measurement of serum TBA value. *Vitamins (Jpn)* 37: 105-112, 1968
- 10) Lee JW. Development and application of a new 2-thiobarbituric acid assay detecting serum lipid peroxide value. Ph. D. Dissertation, Graduate School of Seoul National University, 1985
- 11) Ohkawa H, Ohish N, Yagi K. Assay for lipid preoxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358, 1979
- 12) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- 13) Packer L, Deamer DW, Health RL. Regulation and deterioration of structure in membranes. *Adv Gerontol Res* 2: 77-120, 1967
- 14) Pathology laboratory of school of medicine, Kyungbook national university, Pathology, Komoonsa, 1989
- 15) Cho JH, Shin KS. Changes of Lipofuchsin Pigments and Lipid Peroxide Values in Rats Fed Irradiated Diets. *Kor J Vet Publ Hlth* 16(3) : 245-247, 1992
- 16) Park JI, Kim SH, Han SS, Roh JK. Influence of Autoclaved and Irradiated Diets on the Breeding Experiments in Rats. *Kor J Lab Ani Sci* 4(1) : 33-40, 1988
- 17) Ley FJ, Bleby J, Coates ME, Paterson JS. Sterilization laboratory animal diets using gamma radiation. *Lab Anim* 3: 221-254, 1969
- 18) Wills ED. Studies of lipid peroxide formation in irradiated synthetic diets and the effects of storage after irradiation. *International Journal of Radiation Biology and Related studies in Physics, Chemistry and Medicine* 37(4) : 383-401, 1980
- 19) Ihara T, Yamamoto T, Sugamata M. The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Arch*, pp.443-447, 1998
- 20) Iversen OH. Theories of Carcinogenesis. Hemisphere Publishing Washington, 1988
- 21) Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Taniguchi K, Tsuda S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res Aug* 26:519(1-2) : 103-119, 2002