大韓獸醫學會誌(2004) 第44卷 第4號
Korean J Vet Res(2004) 44(4) : 507~513

아플라톡신을 단회 투여한 랫드의 간에서 CYP450 1A1, p53의 발현과 DNA adduct의 형성

이범준[1] · 이숙진[1] · 김태명[1] · 김대중[1] · 남상윤[1] · 현상환[1] · 강종구[1] · 홍진태[2] · 김철규[3] · 윤영원[1]*

[1]충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소
[2]충북대학교 약학대학 및 동물의학연구소
[3]국립독성연구원 독성연구부

(게재승인: 2004년 11월 20일)

CYP450 1A1 and p53 expression and DNA adduct formation in the liver of rats treated with a single dose of aflatoxins

Beom Jun Lee[1], Sook Jin Lee[1], Tae Myoung Kim[1], Dae Joong Kim[1], Sang Yoon Nam[1], Sang Hwan Hyun[1], Jong Koo Kang[1], Jin Tae Hong[2], Cheul Kyu Kim[3] and Young Won Yun[1]*

[1]College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
[2]College of Pharmacy and Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
[3]National Institute of Toxicological Research, Korea FDA, Seoul 122-704, Korea

(Accepted: November 20, 2004)

Abstract : Aflatoxins are produced mainly by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* that grow in improperly stored cereals. Aflatoxin B_1 (AFB_1) is a potent hepatocarcinogen in a variety of experimental animals including human beings. In spite of a high attention to the hepatocarcinogenecity of AFB_1, the relative toxicity of aflatoxins (AFB_2 and AFG_1) is not fully clarified. Sprague-Dawley male rats were orally administered with AFB_1, AFB_2, and AFG_1 at the dose of 250 μg/kg (additionally including a dose of 1250 μg/kg for AFB_1) body weight. Animals were then killed at 12, 24 or 48 hrs following aflatoxin exposure. Subsequently the immunohistochemical examination of p53, cytochrome p450 1A1 (CYP450 1A1), and glutathione-S-transferase placental form (GST-P) were performed. The level of the 8-OxodG in the liver was determined. Expressions of CYP450 1A1 and p53 were high in the liver of rats through 48 hrs after treatment of AFB_1 at the single dose of 250 μg/kg. This pattern was more clear as increasing doses. The treatment of AFB_2 and AFG_1 did not affect the expression of CYP450 1A1 but it caused weak expression of p53. The activity of GST were not found in the liver of rats treated with aflatoxins. The formation of 8-OxodG by AFB_1 increased in a dose-dependent manner up to 24 hrs after a single treatment of AFB_1 thereafter decreased to the level of control. The treatment of AFB_2 and AFG_1 did not affect the levels of 8-OxodG in the liver of rats with increasing time. These results in the present study indicate that AFB_1 among aflatoxins with low comparable levels is the most toxic as determined by early biomarkers such as CYP450 1A1, p53, GST-P, and 8-OxodG.

Key words : aflatoxins, CYP450 1A1, p53, Glutathione-*S*-transferase placental form (GST-P), 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OxodG)

이 논문은 2004년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

*Corresponding author: Young Won Yun
Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
[Tel: +82-43-261-2597, Fax: +82-43-267-3150, E-mail: ywyun@cbnu.ac.kr]

서 론

Aflatoxin(AF)은 옥수수, 땅콩 등의 곡물류를 잘못 저장하여 발생한 곰팡이인 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasiticus*로부터 생산되는 독소이다. 아플라톡신들은 AFB_1, B_2, G_1, G_2의 네 종류가 각기 다른 비율로 혼합되어 함께 존재하며 그 중에서 AFB1의 독성이 가장 강한 것으로 밝혀져 있다 [21].

AFB_1은 hepatitis B virus와 함께 동물 모델 뿐 아니라 특정 오염지역의 사람에게도 간암을 유발한다고 알려졌다 [10, 15]. AFB_1은 체내에서 흡수되어, 간의 cytochrome p450(CYP450) 효소에 의해 AFB_1-8,9-*exo*-epoxide로 대사된다 [8, 19]. 이 epoxide는 DNA 의 base인 guanine의 N7 위치에 결합하여 주요한 DNA adduct인 8,9-dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB_1(AFB_1-N7-guanine)을 형성한다 [5, 6, 12]. AFB_1-N7-guanine은 불안정한 형태이므로 두 가지의 더욱 더 안정된 다른 형태로 변화한다. 즉, purine 기가 떨어져 나가서 apurinic site를 형성하거나 AFB_1-N7-guanine 구조에서 imidazole ring이 열리면서 AFB_1-formamidopyrimidine(AFB_1-FAPY)을 형성한다 [2]. 이러한 DNA adduct들이 여러 가지 유전자에 mutation을 유발하여 정상적인 세포를 암세포로 변화시키는 유전독성을 발휘한다.

또한 아플라톡신의 대사과정에서 유리되어 나오는 free radical 들은 간암과정에 중요한 역할을 하는데, DNA를 공격하여 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine(8-OxodG)을 생성한다 [20]. 암발생 및 독성발현과 8-OxodG의 생성과의 관련성은 많은 연구자들에 의해 발암물질들에 의한 암발생 예측에 하나의 biomarker로 사용하여 왔다 [11, 14, 17]. 이러한 adduct가 만약 DNA 수복 기전에 의해 제거되지 않는다면, AFB_1으로 유도된 간암에 있어서 자주 target이 되는 인체 p53 gene에서 점돌연변이가 일어나게 되어 p53 단백질의 아미노산 배열에 변화를 주게 된다. 즉 p53 gene의 codon 249의 세번째 염기에 특이적으로 G→T transversion이 일어나 p53 protein에서 ser이 arg으로 대체되므로서 간암(hepatocellular carcinoma) 발생에 영향을 준다. 또한 *ras* oncogene의 codon 12, 13, 61의 mutation이 간암발생과 밀접한 관련성이 있음이 보고되고 있다 [3, 7, 16].

아플라톡신의 무독화 현상을 알아보면 대표적 아플라톡신인 AFB_1의 가수분해는 일차적으로 cytochrome p450 family에 의하여 AFB_1-aflatoxin 8,9-hydrodiol이 되고 이는 sulfate 또는 glucuronic acid와 효소중합체를 형성하여 수용성 sulfate 혹은 glucuronide esters로 되어 요나 담즙으로 분비됨으로써 무독화 된다 [9]. 이 과정에서 중요한 역할을 하는 대표적인 무독화 효소는 glutathione S-transferase(GST)이다. 따라서 이 효소의 활성저하는 아플라톡신의 독성 및 발암 과정을 촉진하는 것으로 알려졌다 [4, 18].

간암 발생률이 높은 원인중의 하나가 아플라톡신오염과 밀접하게 관련되어 있다는 많은 보고와 함께 이들 아플라톡신들이 종류별로 함께 검출된다는 그 동안의 연구결과를 기초로 해서 볼 때 아플라톡신의 종류별 각각의 독성 현상 및 독성차이와 암 유발 가능성에 대한 인체 위해성 평가 자료가 필요하다. 따라서 본 실험에서는 3종류의 아플라톡신(AFB_1, B_2, G_1)을 단회 노출시킨 후 생체지표들을 이용하여 시간경과(12, 24, 48 hr)에 따른 AF 세 종류간의 상대적 독성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 투여

SD계 5주령 수컷 SPF 랫드(Samtako Co.)를 주문하여 일주일간 순화기간을 둔 후 실험을 시작하였다. 실험동물은 격리용 랫드 사육상(Threeshine Co.)에서 사육하였고 실험동물용 사료(Samyangoilfeed Co.)를 자유로이 급여하였다. 실험군은 총 5개군으로 대조군, AFB_1 250 μg/kg 및 AFB_1 1250 μg/kg, AFB_2 250 μg/kg, AFG_1 250 μg/kg(Wako Chemical Co. Ltd, Tokyo, Japan)이며 1회 경구투여 하였다. 각 group당 동물 수는 9-12마리(전체 48마리)이며, 아플라톡신은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해시킨 후 증류수에 현탁액을 조제하여 투여하였다. 투여 후 각각 12, 24, 48시간에 각 군에서 3마리 동물을 부검하였다. 대조군은 별도의 격리된 실험실에서 증류수를 경구 투여하였다.

CYP450, p53, GST에 대한 면역조직화학적 검사

면역조직화학적 분석을 위해 부검한 실험동물의 간조직을 Methacan 고정액(Methanol:Chloroform:Acetic acid = 6:3:1)에 고정하여 조직처리 후 파라핀으로 포매하였다. 파라핀 포매조직을 3-4 μm의 두께로 잘라 조직절편을 만들고, Avidin-biotin peroxidase complex(ABC, Vectastain ABC Elite kit, Vectastatain, USA)법을 이용하여 다음과 같이 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 파라핀 조직을 탈파라핀한 후, 함수과정을 거치고, peroxidase를 없애기 위해 methanol에 용해된 1% H_2O_2에 처리한 후 정상 말혈청(normal horse serum)으로 blocking 하고 0.3% bovine serum albumin(BSA)이 첨가된 phosphate buffered saline(PBS)로 희석된 CYP450 1A1 항체(Santa cruz, USA), p53 항체(Cell signaling Technology Inc., England) 및 GST 항체(MBL, Nagoya, Japan)를 처리하였다. PBS로 3회 정도 세척한 후, block serum

solution으로 희석한 2차 항체(CYP450 1A1, p53: Biotinylated Anti-mouse IgG: GST: Biotinylated Anti-rabbit IgG)와 반응시켰다. 이어서 Avidin-Biotin complex를 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하여 DAB(3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.2M Tris-HCl buffer, pH 7.6)로 발색하였다. 증류수로 세척하고 메이어 hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다. 총 간세포의 수는 현미경 100배의 시야에서 약 500개 정도였으며 염색된 세포가 x200의 확대된 시야에서 계산되었고 <5 = –, 5-15 = +, 16-25 = ++, >25 = +++로 나타내었다.

8-OxodG ELISA 분석

(1) 간조직으로부터 DNA 추출

냉동 간조직으로부터 DNA 분리는 DNAzol reagent (GibcoBRL, USA)를 이용하였다. 간의 일부분을 20 mM Tris-buffer 2 m*l*을 넣고 균질화 시킨 후 3,000 g(10 min, 4°C)로 원심분리하였다. 간 현탁액 2 m*l*에 3 m*l* DNAzol reagent를 넣고 1 m*l* syringe를 이용하여 균질화한 후, 15,000 g(10 min, 4°C)로 원심분리 하였다. 원심분리한 후 상등액을 걷어내서 새로운 튜브에 넣고 100% cold ethanol을 동량 넣어 DNA를 침전시켰다. -20°C에서 10-15분간 방치한 후 10,000 g(15 min, 4°C)로 원심분리하고, 펠렛만 남기고 건조시킨 후, 100% ethanol 1 m*l*로 헹궈낸 후 건조시켰다. 추출된 DNA를 Tris-HCl(pH 7.0)에 녹이고, 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 순수한 DNA의 추출여부를 확인하기 위해서 absorbance ratio ($A260/A_{280}$)가 1.6-1.9의 범위에 드는지 확인한 후 digestion하였다. 10 mM Tris-HCl(pH 7.0) 200 μ*l* 당 DNA solution 100 μg이 되도록 농도를 맞추었다. 95°C에서 3분간 변성시킨 후, 25 μ*l* DNase(100U)와 0.5 M $MgCl_2$ 4 μ*l*를 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 1 μ*l* Nuclease P1(5U)과 100 μM $ZnCl_2$ 2 μ*l*를 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 1 μ*l* Alkaline phosphatase(3U)를 넣고 다시 37°C에서 1시간 반응시켰다.

(2) 8-OxodG의 정량분석법

8-OxodG(또는 8-OHdG)의 측정은 8-OxodG ELISA Kit(Japan Institute for the Control of Aging, Nikken Foods Co., Japan)를 이용하였다. 표준 8-OxodG 용액(2000, 400, 80, 16, 3.2, 0.64 ng/m*l*)과 준비된 시료 50 μ*l* 씩을 각기 다른 well에 넣고 제1항체용액도 50 μ*l* 씩 넣은 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응종료 후 각 well의 반응액을 버리고, 200 μ*l*의 세정액을 넣어 닦아내었다. 계속해서 각 well에 제2항체용액 100 μ*l* 씩 분주한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 종료 후 well의 용액을 버리고, 200 μ*l*의 세정액을 넣어 닦아낸 후, 기질용액 100 μ*l*를 반응 well에 분주하고 상온에서 30분간 반응시킨 후, 반응정지액 100 μ*l*를 가해 반응을 정지시켰다. 표준액의 각 농도의 흡광도의 수치를 대수적으로 그린 후, 작성한 표준곡선을 이용하여 각 시료의 8-OxodG의 흡광도를 읽고 농도를 계산하였다.

통계학적 분석

본 실험에서 얻은 자료를 통계학적으로 분석하였다. 측정치에 대한 통계학적 분석은 통계처리 컴퓨터프로그램인 Sigma stat를 이용하여 분석하였다. 대조군에 대한 유의성은 $p<0.05$에서 Bonferroni t-test를 실시하였다.

결과 및 고찰

CYP450, p53, GST에 대한 면역조직화학적 검사

아플라톡신을 1회 투여한 후 CYP450 1A1, p53 및

Table 1. Time-course immunohistochemical responses of CYP450 1A1 in rat liver following a single dose of aflatoxins

Group \ Time(hr)		0	12	24	48
Control		-	-	-	-
AFB1	250 μg/kg	-	+++	+++	++
	1250 μg/kg	-	+++	+++	+++
AFB2	250 μg/kg	-	-	-	-
AFG1	250 μg/kg	-	-	-	-

Positively stained cells were counted at the view of magnification by x100 (about total 500 cells).
- : Positivity per section was less than five cells.
+ : Positivity per section was five to fifteen cells.
++ : Positivity per section was sixteen to twenty five cells.
+++ : Positivity per section was more than twenty five cells.

Table 2. Time-course immunohistochemical responses of p53 in rat liver following a single dose of aflatoxins

Group \ Time(hr)		0	12	24	48
Control		-	-	-	-
AFB1	250 μg/kg	-	+++	+++	++
	1250 μg/kg	-	+++	+++	+++
AFB2	250 μg/kg	-	+	+	+
AFG1	250 μg/kg	-	+	+	+

Positively stained cells were counted at the view of magnification by x100 (about total 500 cells).
- : Positivity per section was less than five cells.
+ : Positivity per section was five to fifteen cells.
++ : Positivity per section was sixteen to twenty five cells.
+++ : Positivity per section was more than twenty five cells.

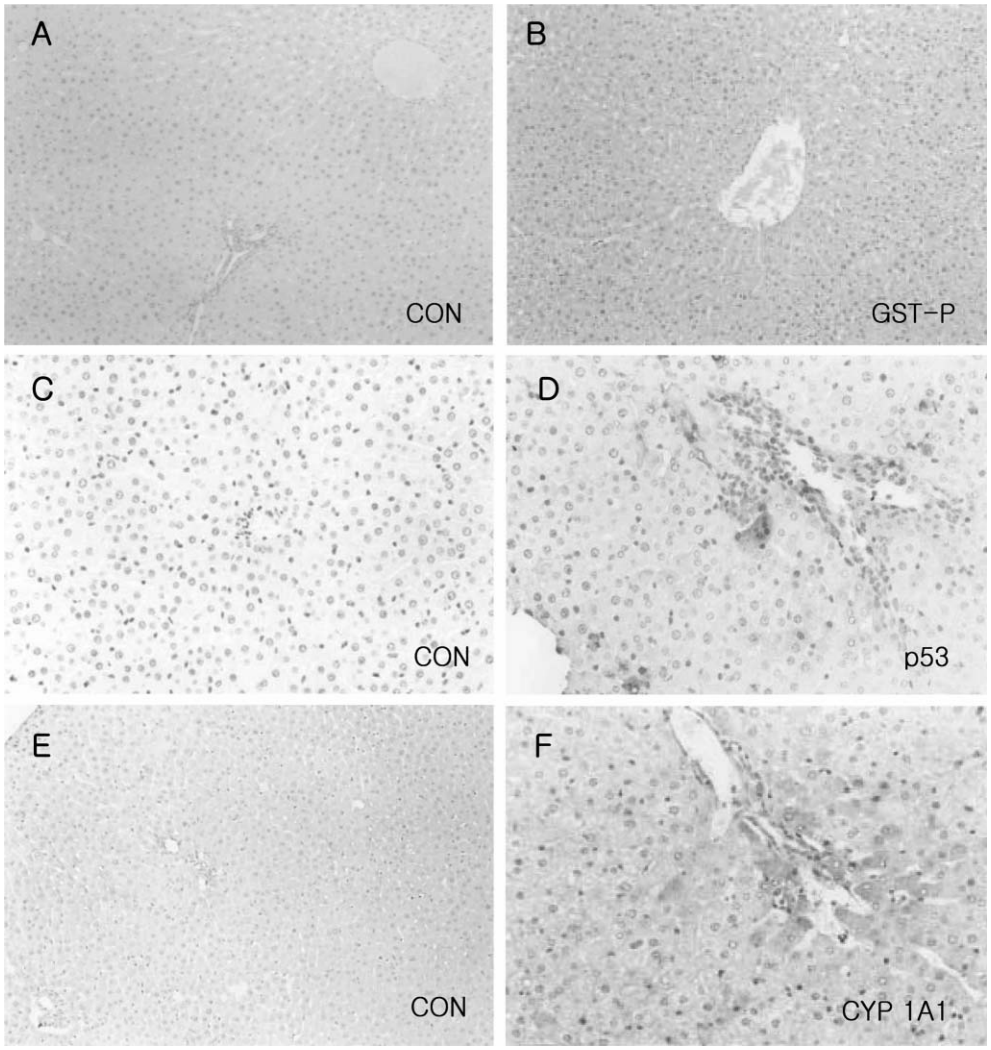

Fig. 1. Immunohistochemistry on (A) GST-P (x100), (C) p53 (x200) and (E) CYP450 1A1 (x100) for the control and (B) GST-P (x100), (D) p53 (x200) and (F) CYP450 1A1 (x200) in the liver of rats at 48 hrs after a single treatment of aflatoxin B1. Many positive hepatocytes by CYP450 1A1 and p53 in aflatoxins are detected in the portal area of the liver, while no positive hepatocytes by GST are seen.

GST에 대한 면역조직화학적 염색결과는 Table 1과 2, 그리고 Fig. 1에 나타냈다. AFB_1(250 μg and 1250 μg/kg) 투여군에서 CYP450 1A1 효소의 활성이 투여 후 12시간에서 48시간까지 지속적으로 높게 나타났으며 AFB1 저농도(250 μg/kg) 투여군에서는 48시간 후 다소 감소하는 경향을 나타냈다(Table 1 and Fig. 1). 다른 아플라톡신들 즉 AFB2와 AFG1은 시간의 경과에 관계없이 CYP450 1A1의 단백질 발현을 보이지 않았다(Table 1). 아플라톡신은 CYP450의 작용을 받아 AFB_1-8,9-*exo*-epoxide로 대사되어야 독작용을 일으키므로, 이 효소의 작용이 높다는 의미는 곧 아플라톡신의 독성이 크다는 의미이다. 그러므로 이 결과를 통해서도 AFB_1의 독성이 다른 AFB2와 AFG1의 독성보다 더 강한 것을 알 수 있다. AFB_1에 의한 DNA adduct형성에 관한 연구에 의하면, 600 μg/kg을 1회 복강내 투여했을 때 투여 후 2시간에 AFB_1-N7-guanine adduct양이 최대로 증가했다가 그 후 급격히 감소했다고 하였다 [5]. 그러나 본 실험에서는 경구투여 방법을 이용했으므로 AF이 흡수되는 데에 걸리는 시간이 더 길었을 것으로 사료된다. 비록 12시간 이전에 측정한 결과가 없어서 CYP450이 활성화되는

시점이 투여 후 12시간 이내라고 밖에 추정할 수 없지만 48시간 이후로도 같은 정도로 유지되는 것으로 보아 1회 투여에 의한 독성이 48시간 이후까지 지속될 것이라고 예상할 수 있다. 그리고 AFB_2와 AFG_1 저농도(250 μg/kg) 투여군에서는 CYP450에 대한 면역조직화학적 염색이 음성으로 나타났으나 고농도 투여군의 결과가 포함되지 않은 것이므로 AFB_2와 AFG_1 투여군에서 CYP450 효소의 활성이 전혀 없다고 말할 수는 없다. 추후 추가적 실험에서 용량별 반응을 비교하여 확인해 보아야 할 것이다. AFB_1 저농도, 고농도 투여군에서의 p53에 대한 면역조직화학적 염색 결과는 CYP 450의 결과와 같이, 48시간 후까지 활성화되는 양상을 보였다(Table 2). 그리고 AFB_2와 AFG_1 투여군에서는 약한 양성으로 나타났다(Table 2). p53은 mutation되어 기능이 저하되지 않는 한, 비정상적인 세포성장을 억제하기 위한 고유의 작용이 활성화될 것으로 예상되며, 이 결과도 그러한 예상을 뒷받침 해 준다. 면역조직화학적 검사로는 단지 p53이 AFB_1에 의해 현저하게 활성화되었다는 것만을 알 수 있을 뿐, 그 활성화 정도를 양적으로 확인할 수는 없었다(Fig. 1). 한편, 모든 종류의 아플라톡신 투여군에서 GST-P가 양성으로 염색된 부분이 관찰되지 않았다(Fig. 1). Allameh 등은 AFB_1-glutathione conjugation에 관한 연구에서, AFB_1을 1회 400 μg/kg 용량으로 복강내로 투여하고 GST activation을 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)를 통한 발색법으로 측정한 결과, 투여 후 6시간일 때 가장 활성도가 높았고 그 후 감소하는 양상을 보였다고 보고하였다 [1]. 이 용량은 본 실험의 고용량과 유사하지만, 투여방법 및 효소활성도 측정의 방법이 서로 다르기 때문에 같은 결과를 보이지 않았다. 본 실험은 경구투여 방법을 이용했으므로 AF가 흡수되어 무독화되기까지는 더 많은 시간이 필요할 것으로 사료된다. 결론적으로 p53, CYP450 1A1의 면역조직화학적 검사결과 모두 AFB_1 투여군에서 높게 측정되었으며 이는 AFB_1의 독성이 가장 강하다는 사실을 다시 증명해 주는 것이었다. AF가 경구로 섭취되면 12시간 이내에 CYP450 효소가 활성화되어 독성을 지닌 물질로 대사되어 간의 DNA에 adduct를 형성하고 뒤이어 이러한 DNA 변화를 바로잡기 위해 p53이 활성화된 것으로 사료된다. 48시간 후까지도 이러한 활성화가 지속되는 것으로 보아 AF 1회 투여 후 정상으로 회복되는 시간은 48시간 이후로 추정되며, 그 후 GST도 활성화될 것으로 예상된다.

8-OxodG (DNA adduct)의 변화

간에서의 8-OxodG의 분석결과는 Fig. 2에 나타내었다. 아플라톡신 B1의 단회 투여군에서 간의 8-OxodG의 생성, 즉 간의 DNA adduct 형성에 있어서 대조군과 비교하여 12 및 24시간 후에 농도에 따른 유의성 있는 증가를 보였으나 48시간 후에는 다시 대조군의 수준으로 환원되었다(Fig. 2). 따라서 이러한 결과는 아플라톡신의 투여 후 신속하게 간에서 DNA adduct를 형성하고 약 48시간 이내에서 정상수준으로 DNA가 수복이 되는 것으로 사료된다. AFB_2 및 AFG_1의 경우에는 시간에 따른 8-OxodG의 생성에 특별한 변화를 발견할 수 없었다(Fig. 2). 이런 결과로부터 AFB_1, AFB_2 및 AFG_1의 아플라톡신 중 AFB_1 투여가 가장 많은 DNA adduct 형성을 보였으며 따라서 랫드에서 간 발암유발과 가장 밀접한 관련성이 있는 것으로 사료된다 [11].

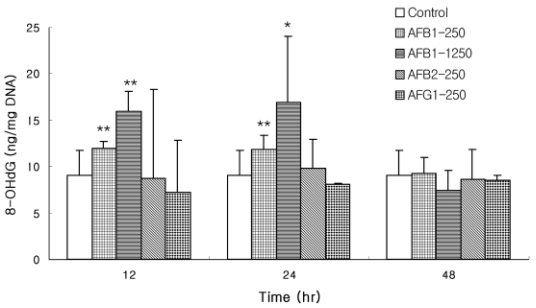

Fig. 2. Time-course changes of 8-OxodG levels in rat liver treated with a single dose of aflatoxins. *,**Significantly different from control at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively.

8-OxodG는 그 자체만으로도 유전독성이 있으며 자체의 base pairing(G≡C)이 되지 않아 misparing되기도 하지만 인접 base에도 영향을 주어 gene 발현이 되지 않거나 비정상적인 발현이 되도록 유도되어 종양으로의 진행을 촉진하는 DNA adduct로서 발암 조기 예측인자로 이용될 수 있음이 시사되어 왔다 [14, 17]. 본 실험에서 AFB_1 투여군에서만 조기에 DNA adduct 형성이 용량 의존적으로 나타나 8-OxodG가 AFB_1의 간암 예측인자로 사용 할 수 있음을 보여주고 있다. 단회투여 실험에서는 용량의존적인 변화를 나타내었으므로 추후 AFB_2와 AFG_1에 대한 추가적인 용량을 설정하여 확인할 필요가 있다고 생각한다. 이상에서와 같이 본 실험의 평가로는 AFB_1을 제외한 다른 종류들이 주목할만한 독성을 나타내지 않았다. 또한 그들 간의 독성의 차이를 확인할 수 없었으므로 더욱 민감한 다른 지표의 이용이 요구된다.

결 론

아플라톡신은 곡물류를 잘못 저장하여 발생한 곰팡이인 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasiticus*로부터 생

산되는 독소로서 아플라톡신 B_1(AFB_1)은 인체를 포함한 다양한 실험동물에 있어서 강력한 간 발암물질이다. 그 동안 간암발생에 대한 높은 관심에도 불구하고 여러 종류의 아플라톡신(AFB_2, AFG_1 및 AFG_2)에 대한 상대적인 독성은 아직 완전히 밝혀져 있지 않다. 본 실험에서는 아플라톡신 종류간의 상대적 독성 및 생체 지표들(p53, CYP450, GST)간의 관련성을 알아보고자 했다. 수컷 Sprague-Dawley 랫드에 아플라톡신 B_1, B_2, 및 G_1를 각각 250 μg/kg(AFB_1의 경우 1250 μg/kg 포함) 체중의 용량으로 투여한 후 12, 24, 48시간에 부검하여 CYP450 1A1, p53 및 GST 항체에 대한 면역조직화학적 검사 및 DNA adduct인 8-OxodG의 생성을 측정하였다. 그 결과 AFB_1 단회 투여에 의해 CYP450 1A1 및 p53의 활성이 투여 48시간 후까지 높게 지속되었다. 그리고 이런 경향은 용량을 증가시킬수록 더욱더 뚜렷하게 나타났다. 그러나 AFB_2 및 AFG_1 투여군의 CYP450 1A1 및 p53의 활성은 시간의 경과에도 매우 미약하였으며 그 양상도 일정하지 않아 독성의 차이를 확인할 수 없었다. 또한 모든 아플라톡신 투여군에서 GST의 활성은 나타나지 않았다. 8-OxodG의 DNA adduct 형성은 AFB_1에서 초기 24시간까지 용량 의존적으로 높게 나타났으나 AFB_2 및 AFG_1의 경우는 대조군과 차이가 없었다. 이러 결과는 초기 생체지표로서 CYP450 1A1, p53 및 GST의 활성이 아플라톡신 간독성의 예측인자로서의 활용성이 적으며 그 밖에도 여러 아플라톡신 종류간의 독성차이의 규명에는 더욱 민감한 다른 지표의 이용이 요구된다는 것을 의미한다.

참고문헌

1. **Allameh, A., Farahani, M. and Zarghi, A.** Kinetic studies of aflatoxin B1-glutathione conjugate formation in liver and kidney of adult and weanling rats. Mech. Ageing Dev. 2000, **115**, 73-83.
2. **Busby, W. F., Jr. and Wogan, G. N.** Chemical Carcinogens (Searle, C. ed) pp. 945-1136, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 1984.
3. **Chao, H. K., Tsai, T. F., Lin, C. S. and Su, T. S.** Evidence that Mutational Activation of the *ras* genes may not be involved in Aflatoxin B1-induced Human Hepatocarcinogenesis, Based on Sequence Analysis of the *ras* and *p53* genes. Mol. Carcinog. 1999, **26**, 69-73.
4. **Chen, S. Y., Chen, C. J., Tsai, W. Y., Ahsan, H., Liu, T. Y., Lin, J. T. and Santella, R. M.** Associations of plasma aflatoxin B1-albumin adduct level with plasma selenium level and genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M_1 and T_1. Nutr. Cancer. 2000, **38**, 179-185.
5. **Croy, R. G. and Wogan, G. N.** Temporal patterns of covalent DNA adducts in rat liver after single and multiple doses of aflatoxin B1. Cancer Res. 1981, **41**, 197-203.
6. **Croy, R. G., Essigmann, J. M., Reinhoil, V. N. and Wogan, G. N.** Identification of the principal aflatoxin B1-DNA adduct formed *in vivo* in rat liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978, **75**, 1745-1749.
7. **Donnelly, P. J. and Massey, T. E.** Ki-ras Activation in Lung Cells Isolated from AC3F1 (A/J×C3H/HeJ) Mice After Treatment With Aflatoxin B1. Mol. Carcinog. 1999, **26**, 62-67.
8. **Gallagher, E. P., Kunze, K. L., Stapleton, P. L. and Eaton, D. L.** The kinetics of Aflatoxin B1 oxidation by human cDNA-expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1996, **141**, 595-606.
9. **Guengerich, F. P., Johnson, W. W., Ueng, Y. F., Yamazaki, H. and Shimada, T.** Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. Environ. Health Perspect. 1996, **104**, 557-562.
10. **Hall, A. J. and Wild, C. P.** Epidemiology of aflatoxin related disease. *In* The Toxicology of Aflatoxins. Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance. p. 233, Academic Press, New York, 1994.
11. **Kasai, H.** Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydorxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. Mutat. Res. 1997, **387**, 147-163.
12. **Lin, J. K., Miller, J. A. and Miller, E. C.** 2,3-Dihydro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy-aflatoxin B1, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B1-DNA or-ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsome-mediated reactions in rat liver *in vivo*. Cancer Res. 1977, **37**, 4430-4438.
13. **McMahon, G., Hanson, L., Lee, J. J. and Wogan, G. N.** Identification of an activated c-Ki-ras oncogene in rat liver tumors induced by aflatoxin B1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986, **83**, 9418-9422.
14. **Otteneder, M. and Lutz, W. K.** Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts. Mutat. Res. 1999, **424**, 237-247.

15. **Peers, F., Bosch, X., Kaldor J., Linsell, A. and Pluijmen, M.** Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland, Int. J. Cancer. 1987, **39**, 545-553.
16. **Riley, J., Mandel, H. G., Sinha, S., Judah, D. J. and Neal, G. E.** *In vitro* activation of the human Ha-ras proto-oncogene by aflatoxin B1. Carcinogenesis. 1997, **18**, 905-910.
17. **Shen, H. M., Ong, C. N., Lee, B. L. and Shi, C. Y.** Aflatoxin B_1-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. Carcinogenesis. 1995, **16**, 419-422.
18. **Tiemersma, E. W., Omer, R. E., Bunschoten, A., van't Veer, P., Kok, F. J., Idris, M. O., Kadaru, A. M., Fedail, S. S. and Kampman, E.** Role of genetic polymorphism of glutathione-S-transferase T1 and microsomal epoxide hydrolase in aflatoxin-associated hepatocellular carcinoma. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2001, **10**, 785-791.
19. **Ueng, Y. F., Shimada, T., Yamazaki, H. and Guengerich, F. P.** Oxidation of aflatoxin B1 by bacterial recombinant human cytochrome P450 enzymes. Chem. Res. Toxicol. 1995, **8**, 218-225.
20. **Wild, C. P. and Turner, P. C.** The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. Mutagenesis. 2002, **17**, 471-481.
21. **Wogan, G. N. and Newberne, P. M.** Dose-Response Characteristics of Aflatoxin B1 Carcinogenesis in the rat. Cancer Res. 1969, **27**, 2370-2376.