

Effects of vitamin C on the formation of aflatoxin B₁-DNA adduct in rat livers treated with radiation and aflatoxin B₁

Soyoung Kim¹, Hansoo Kim², Jin-Soon Kang^{1*}

¹Department of Food and Nutrition, International University of Korea, Gyeongnam 660-759, Korea

²Department of Food Science and Technology, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

Vitamin C가 방사선과 Aflatoxin B₁을 처리한 흰쥐의 간세포에서 Aflatoxin B₁-DNA Adduct 형성에 미치는 영향

김소영¹ · 김한수² · 강진순^{1*}

¹한국국제대학교 식품영양학과, ²부산대학교 식품공학과

Abstract

The objective of this study was to examine the effects of vitamin C on the formation of aflatoxin B₁ (AFB₁)-DNA adduct and AFB₁-inducing cellular oxidative damage in rat livers treated with radiation and AFB₁. Six-week-old male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: the control group, the AFB₁-treated group, the group treated with AFB₁ and vitamin C, the group treated with X-ray and AFB₁, and the group treated with X-ray and AFB₁ with vitamin C. On the first day of the experiment, only one dose of X-rays was exposed to the entire liver at 1,500 cGy. Next, vitamin C was injected at 10 mg/kg body weight via intraperitoneal injection, followed an hour later by the administration of 0.4 mg/kg of AFB₁ via intraperitoneal injection. These treatments were administered every three days for 15 days. On the 16th day, the animals were sacrificed. The AFB₁ contents of the rat sera were determined via indirect competitive ELISA. In the quantitative analysis of AFB₁ in the rat sera via ELISA, 5.17±0.34 ng/mL of AFB₁ was detected in the AFB₁-treated groups, but the amount decreased more significantly to 3.23±0.76 ng/mL in the groups treated with AFB₁ and vitamin C (p<0.01) than in the AFB₁-treated groups. The effect of vitamin C on AFB₁-DNA adduct formation was determined via ELISA. The values of AFB₁-DNA adduct formation were 9.38±0.41 ng/ml in the AFB₁-treated groups, but the amount decreased more significantly to 5.28±0.32 ng/mL in the groups treated with AFB₁ and vitamin C (p<0.01) than in the AFB₁-treated groups. Immunohistochemistry revealed that the accumulation of the AFB₁ was not observed in the normal liver tissue (G1). The AFB₁-positive materials were observed in the central vein and the portal vein of the liver tissue from the AFB₁ (G2) treatment or the X-ray and AFB₁ (G4) co-treatment, but the AFB₁-positive materials were observed weakly in the group treated with vitamin C (G3 and G5). These results indicate that vitamin C had ameliorating effects on the AFB₁ accumulation of liver tissue.

Key words : vitamin C, aflatoxin B₁, aflatoxin B₁-DNA adduct, ELISA, Immunohistochemistry

서론

Aflatoxin B₁(AFB₁)은 사람을 포함한 다양한 종(species)의 포유동물에 있어서 간암 발생에 중요한 병원성 요인으로 간주되어왔다(1). Rhee 등(2)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 간의 우측 중간 부분에 뚜렷한 간 손상이 나타났다고 보고하였다. 대부분의 화학적 발암물질들은 체내대사과정 중에 생성된 중간대사물질이 DNA와 결합함으로써 발암성 전이의 시초가 된다고 하였다(3). 특히 최근 연구들에 의하여 AFB₁투여로 인하여 형성된 AFB₁-DNA 부가체(adduct)가 종양(tumor)형

*Corresponding author. E-mail : jskang-8075@hanmail.net
Phone : 82-55-751-8314, Fax : 82-55-751-8329

성에 관여한다는 연구들이 발표되고 있으며 Root(4)는 AFB₁을 고농도로 반복 투여 시 AFB₁-DNA 부가체가 형성되어 GGT(γ -glutamyl transpeptidase) 양성 암 신생물 전구 단계(positive preneoplastic foci)를 진전시키며 이것이 종양으로 발전되는 증거가 된다고 발표하였다. 이외에도 AFB₁-DNA 부가체 수준과 암 발생과의 용량 의존적 경향에 대한 연구(5,6)들이 있었다. 이러한 AFB₁의 독성 및 암발생에 대하여 쥐의 간 미소체(liver microsome)로부터 정제한 시트크롬 p-450을 각각 사용하여 AFB₁ 대사를 연구하여 여러 가지 대사산물을 확인하였으며 간미소체 존재 하에서 Ames test로 이들 중간산물의 변이원성을 측정하여 AFB₁이 산화적 경로를 거치면서 발암성 대사산물을 생성 여러 종류의 질병을 일으킨다는 보고도 있다(7). 간암을 치료하는 방사선 요법은 수술, 항암약물요법과 더불어 환자의 생존율을 증가시키는데 크게 기여하고 있는 치료방법으로 현재 임상에서 널리 이용되고 있다. 그러나 세포에 방사선을 조사하였을 때 방사선과 세포내의 물분자가 반응하여 이온 라디칼을 생성하고 생성된 이온 라디칼이 또 다른 물 분자와 반응하여 반응성이 높은 활성산소와 과산화라디칼(O·OH)을 생성하게 된다(8). 이러한 과도한 산화 반응물은 혈장 내 vitamin C, E, coenzyme Q 10, β -carotene 등의 항산화 비타민을 소모시키고 지질의 과산화와 DNA 손상을 유도하여 노화 및 암을 비롯한 여러 질병의 발병 및 진행에 매우 큰 영향을 주며(9) 또한 이것은 aflatoxin에 의해서 생성된 과산화물과 동일한 조직 손상을 일으킨다. 그러므로 AFB₁과 방사선 조사로 인한 독성 유발 기전이 oxygen free radical에 의한 산화적 손상이 원인이라는 관점에서 볼 때 항산화제 투여로 인한 산화 억제작용을 기대할 수 있음에 따라 최근 이러한 독소중독으로 인한 세포손상 및 암 발생 과정을 방어할 수 있는 항산화제의 적용에 대한 관심이 높아지고 있다. 그중 vitamin C는 수용성 항산화제로서 독소를 포함한 여러 가지 promutagen의 산화적 대사 과정을 저해할 수도 있으며, 산화 환원 완충계에서 유해한 free radical을 제거하여 adduct형성을 저지시키는(10) 한편, 지용성 항산화제인 α -tocopherol 내지 ¹O₂ quencher인 β -carotene 등의 재생을 돕고, quencher dismutase에 대한 보호 기능 등 강력한 항산화 효력을 나타내는 것으로 알려져 있다(11,12). 또한 Vitamin C는 prostagladin과 cytokine의 생성 조절 등의 면역능력과 관계하며 비타민 C가 부족하면 세균에 감염당하기 쉬우며, 세포매개성 면역능력이 손상된다고 한다(13). 또한 Salmonella typhimurium에서 AFB₁로 인한 돌연변이를 억제 시키며(14). Benedict 등(15)은 3-methyl-cholanthrene에 의해 시작된 C3H10T $\frac{1}{2}$ Cell의 형태학적 변형을 vitamin C가 억제한다는 것을 처음으로 발표하였고, Yasukawa 등(16)은 vitamin C가 X선을 조사한 세포에서 종양발생을 억제한다는 것을 보고하기도 하였다. 따라서 곡류를 주식으로 하는 우리나라 사람들의 경우 AFB₁에

노출되기 쉽고 이들 중 일부는 위, 간, 담도 암과 같은 상복부 암으로 진단되어 간을 포함하는 부위에 대해 방사선 치료를 받을 수 있는 경우를 생각하여 vitamin C가 AFB₁투여 혹은 방사선과 AFB₁을 병합처리한 흰쥐의 독소중독증에 미치는 영향을 살펴보고자 흰쥐의 혈청 중의 유리 AFB₁ 함량과 간세포의 AFB₁-DNA 부가체의 함량을 조사하였고 아울러 간 손상에 대한 면역조직학적 검사를 실시하였으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육방법

Sprague Dawley 계통의 생후 6주, 평균무게 150±20 g의 수컷 흰쥐를 대한실험동물 센터에서 구입하여 동물 사육장에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 실내온도 20±5°C, 습도 55~60%를 유지하였으며 명암주기는 자연채광으로 하고 고형사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험군의 구성 및 투여농도 및 용량

실험군은 5군(n=6)으로 나누어 Table 1과 같이 처리 하였다. X-ray 조사는 실험 기간 내 단 1회로 실험사육기간 첫 일에 조사하였고 X-ray 조사 1시간 후 vitamin C를 투여하였으며 vitamin C 투여 1시간 후 AFB₁을 투여하였다. Vitamin C와 AFB₁은 모두 복강투여(intraperitoneal injection)로 실험 사육 1일부터 1회 시작하여 3일에 한번씩, 5회 반복 투여하였으며 실험동물 사육기간은 총 15일로 하였다. 대조군인 1군의 경우에 용매인 DMSO 0.1 mL, 0.1 M NaHCO₃ 0.1 mL를 함께 투여하였다. 2군의 경우는 아급성용량인 0.4 mg/kg 농도의 0.1 mL AFB₁와 용매 0.1 M NaHCO₃ 0.1 mL 투여하였으며, 3군은 2군에 대한 항산화 비타민의 효과를 보기위해 vitamin C를 10 mg/kg의 농도로 투여하고 동시에 2군과 동량의 AFB₁을 투여하였다. 4군은 X-ray 조사 후 0.1 mL AFB₁을 투여 하였으며, 5군은 4군에 대한 항산화비타민의 효과를 보기위해 X-ray 조사 후 0.1 mL의 vitamin C와 동량의 AFB₁을 투여 하였다. 실험동물에

Table 1. Treatments of experimental animal

Groups	Content	Injection dose	No. of animals
G1	DMSO + 0.1 M NaHCO ₃	a + b	6
G2	0.1 M NaHCO ₃ + AFB ₁	b + c	6
G3	AFB ₁ + vitamin C	c + d	6
G4	AFB ₁ + X-ray	b + c	6
G5	AFB ₁ + X-ray + vitamin C	c + d	6

a : 0.1 mL of DMSO b : 0.1 mL of 0.1 M NaHCO₃
c : 0.4 mg/kg of AFB₁ (=0.1 mL) d : 10 mg/kg of vitamin. C (=0.1 mL)

투여된 AFB₁ 과 vitamin C는 Sigma 제품을 사용하였고 ELISA에 사용된 항체는 본 실험실에서 제작한 단일클론 항체(AF78 MAb)를 사용하였다.

방사선조사

방사선 조사는 Co-60 Teletherapy unit(Theratron-780, AECL, Ottawa, Canada)를 사용하여 실시하였다. 흰쥐의 복부 조사 시 움직이지 못하도록 고정 시킨 후 동 장치에서 방출되는 X선을 이용하여 6 Mv 방사선을 1.5 cm 깊이에 1,500 cGy(radiation/min.) 선량률로 1회 조사하였다.

실험동물의 처리

실험사육 최종일에는 7시간 절식시킨 후 ethyl ether를 사용하여 마취시키고 해부하여 실험을 실시하였다. 혈액은 심장에서 채혈하였으며 간장조직은 50 mL 주사기를 사용하여 차가운 phosphate buffer(PBS, 0.1 M, pH 7.4)를 문맥을 통해 주입하여 혈액을 제거한 다음 적출하여 차가운 PBS에 담가 잔여혈액을 다시 제거한 후 간 무게를 측정하였고 혈액은 -70°C에 보관하면서 실험을 실행하였다.

혈청 속의 Vitamin C 함량 측정

혈액을 심장 채혈법으로 채취한 후 혈액 약 1 mL 취하여 즉시 보존제인 dithiothreitol(10 mM/L)용액 50 µL을 첨가한 후 4°C, 3,000×g 원심조건에서 15~20분 동안 혈청을 분리하여 -80°C로 냉동 보관하여 사용하였다. Vitamin C 측정은 ferric acid ion(Fe³⁺)이 산성용액에서 525 nm에서 특징적인 흡광도를 가지는 complex를 형성하기 위해 a,a-dipyridyl과 coupled된 형태인 ferrous ion(Fe²⁺)으로 환원되는 원리를 이용한 a,a-dipyridyl method(17)에 의해 측정하였다.

혈청 조직의 AFB₁ 정량방법

혈청 전처리 방법: 혈청 중 AFB₁ 함량을 검색하기 위해서 Kawamura 등(18)의 방법을 응용하여 소량의 시료에서 분석하는 법을 확립하였다. 즉, 혈청 200 µL에 chloroform 200 µL 가하고 1분 동안 강하게 교반시킨 후 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 유기용매 층을 회수하였다. 회수된 유기용매층중에서 100 µL를 microcentrifuge tube에 취해 질소가스로 유기용매를 날려 보낸 후 10% methanol-PBS를 100 µL 가하여 ELISA 분석에 이용하였다.

항체의 특성

혈중 AFB₁의 함량을 indirect competitive ELISA법으로 조사하기에 앞서 ELISA에 사용된 항체의 특이성을 aflatoxin analogue와의 교차반응성(cross-reactivity)으로 나타내었다. 즉, Liu 등(19)의 방법으로 aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ 및 sterigmatocystin 과의 교차반응을 실험하여 항체의 항원에 대한 특이성을 검토하였는데, 각 표준물질

의 농도별로 항체에 대한 반응을 조사하고, 그 결과 나타난 optical density(OD)로 표준곡선을 작성하였다. 이때 최대 O.D값의 1/2에 해당하는 analogue의 양에 대한 aflatoxin B₁의 양에 대한 비를 퍼센트로 나타내었다.

Aflatoxin B₁의 표준 곡선 및 회수율 측정

혈청 중의 잔류 AFB₁을 ELISA법으로 정량하기 위하여 먼저 표준곡선과 회수율을 측정하였다. 표준 AFB₁을 농도 별로 반응시켜 각 well의 발색정도를 ELISA reader 405 nm에서 측정 후 MPM software를 이용하여 표준곡선을 작성하였다. 아울러 표준 AFB₁을 각각 10, 50, 100 ng/mL로 정상 혈청에 인위적으로 투여하여 얻은 흡광치를 표준곡선에 대응시켜 농도를 구하고, 혈청에서의 회수율을 구하였다.

ELISA에 의한 AFB₁의 정량

혈청 중 AFB₁ 함량은 indirect competitive ELISA법(20)을 이용하여 검색하였다. 먼저, AFB₁-BSA(Bovine Serum Albumin) conjugate를 coating buffer(carbonate buffer, pH 9.6)에 녹여 microtiter plate에 100 µL(100 ng AFB₁ /well)씩 분주한 다음 4°C에서 overnight하여 well coating 시킨 후 세척용 완충액(PBS-tween)으로 4회 세척하였다. 세척 후 항체의 비 특이적인 반응을 방지하기 위해 인산 완충용액에 녹인 1% BSA를 가하여 overnight 시킨 후 세척용 완충액(PBS-tween)으로 4회 세척하였다. 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 µL well에 주입하고 37°C에서 1 시간 반응시켰다. 반응이 끝난 plate를 세척용 완충액으로 3회 세척하고, 희석한 2차 항체(anti-mouse IgG-HRP, 1: 4,000)를 100 µL 넣어 37°C에서 30 분 반응 후 세척용 완충액으로 6회 세척하였다. 여기에 기질로 ABTS 100 µL와 30% H₂O₂를 첨가하여 37°C에서 30분 발색시킨 후 ELISA reader(Bio RAD model 550, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 MPM software (Bio RAD, version 4.0)를 이용하여 표준곡선을 작성하고 AFB₁ 함량을 계산하였다.

간세포 조직의 AFB₁-DNA adduct 검출방법

간 조직 내에서 AFB₁과 함께 형성된 DNA adduct를 검출 함으로써 조직 내 AFB₁의 축적 정도를 측정하기 위하여 Gross 등(21)의 분리방법에 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 16시간 동안 shaking 하였다. 여기에 동량의 tris-saturated phenol: chloroform: isoamyl(25:24:1)을 넣고 강하게 교반하여 3,600 rpm 속도로 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상정액

에 1/10 volume의 7.5 M ammonium acetate를 첨가하는 동시에 2.5배의 100% cold ethanol로 DNA 침전을 유도하였다. DNA를 멸균막대기로 spool out하여 70% ethanol로 세척하였으며 2시간 동안 실온에서 건조시킨 다음 200 μ L PBS(pH 7.3)에 녹여 AFB₁-DNA adduct 검출을 위한 DNA 추출 및 ELISA 실험을 위한 가수분해 시료로 사용하였다. 얻어진 AFB₁-N7-Gua-DNA 부가체로부터 AFB₁을 검출하기 위하여 Shen 등(22)의 방법으로 가수분해하였다. 즉 상기 방법에 의하여 분리된 DNA 100 μ L 에 10 M HCl 1 μ L 첨가 후 70°C에 20분 동안 정치한 다음 5M NaOH, 2 μ L 넣어 중화반응을 유도한 후, Sep-Pak cartridge를 통하여 정제 시켰으며 상기의 방법으로 ELISA 실험을 수행할 때까지 -20°C 에 보관하였다.

조직 중 AFB₁ 의 관찰을 위한 면역조직화학적 방법

간 조직 내에서 AFB₁이 축적된 양상을 관찰하기 위하여 Miller 등(23)의 방법에 의하여 AFB₁에 대한 항체를 이용하여 면역조직학적 실험을 시행하였다. AFB₁이 투여된 간조직을 외과적으로 절제 후 즉시 4% neutral buffered paraformaldehyde(NBP, pH 7.2) 하루 동안 고정하였다. 고정된 간은 흐르는 물에 2 시간 동안 수세한 다음 70% alcohol에서부터 100% alcohol까지 각각 1시간씩 단계적으로 반응하여 탈수화 하였다. Xylene에서 1시간씩 3회의 투명화를 거쳐 vacuum oven에서 3시간 동안 파라핀 침투를 시켰다. 파라핀으로 조직을 포매한 후 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었다. 절편된 조직은 gelatin으로 덮어씌운 슬라이드에 올린 후 42°C 온열기 위에서 30분 동안 말려서 파라핀을 녹인 다음 xylene에 5분간 3번 반응시켜 파라핀을 완전히 제거시킨 후 alcohol series를 거쳐 수화시켰다. 연속 절편된 간조직을 일정한 간격으로 일반 염색하여 조직의 이상 유무를 확인한 후에 인접절편에 면역조직화학염색을 시행하였다. 0.1 M PBS로 5분간 3번 세척한 후 0.3% H₂O₂를 30분간 처리하고, normal goat serum을 조직에 충분히 점적하여 30분 동안 반응시켰다. Serum을 깨끗이 닦아낸 후, 1 : 200으로 희석한 1차 항체(aflatoxin monoclonal antibody)를 점적하여 4°C에서 밤새 반응시켰다. 0.1 M PBS에 5분 동안 3번을 세척한 후, 2차 항체(biotinylated goat anti-mouse IgG)를 부착시켜 실온에서 1시간 동안 반응시키고, 또 같은 방법으로 세척한 후, ABC 용액(Avidin - Biotinylated horseradish peroxidase macromolecular Complex Kit, Vector Lab, CA, USA)에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 위와 같은 방법으로 세척 후, 0.025% DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, D-5637, C₁₂H₁₄N₄ · 4HCl, FW 360.1, Sigma), 0.07% NiCl₂ · 6H₂O, 0.003% H₂O₂를 섞어 발색 반응을 보았다. 먼저 이 시약은 DAB를 0.1 M의 PBS와 섞어서 충분히 녹이고, NiCl₂ · 6H₂O를 넣어 섞은 후 3 MM paper로 filtration하고 사용 직전에 H₂O₂를 넣었다. 발색 시간은 각 항체들의 조직 특이

성에 따라 서로 다르게 처리하였다. 발색 정도는 틸름이 발색 과정의 조직들을 현미경상에서 관찰하였다. 발색 후 다시 위와 같은 방법으로 세척한 후, alcohol series에서 각 2분씩 탈수화 하였으며 xylene으로 투명화를 거쳐 영구 포매하고 광학현미경(Olympus BX5, Tokyo, Japan) 상에서 관찰하였다. 면역조직화학염색의 정도(stainability)는 두 명의 관찰자가 각각 관찰하여 그 결과를 음성반응(-)로, 약한 염색성은(+)로, 중간 정도의 염색성은(++), 강한 염색성은(+++)로 표시하였다.

통계처리

분석 결과의 통계처리는 실험군당 평균치와 표준편차로 표기(mean±S.D.)하고 이들에 대한 통계처리는 SAS (version 6.12 SAS Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 one-way ANOVA분석을 실시한 후 유의성이 있는 경우 사후 분석으로 다중비교의 하나인 Duncan (24)의 다중 범위 검증을 실시하여 통계적 차이를 검증하였다. 각 군의 유의성은 p<0.01수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

간조직의 무게, 식이섭취량, 체중증가량, 식이효율

간조직의 무게, 식이섭취량, 체중증가량, 식이효율을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 간장의 무게는 대조군을 포함한 전군에서 군별 유의적인 차이는 없었다. 체중증가량은 식이섭취량에 따라 비교적 증감하는 경향이였다. AFB₁투여군(2,3군)보다는 방사선 조사군(4,5군)의 식이 섭취량과 체중 감소가 더 뚜렷하였으며(p<0.01) 특히 방사선과 AFB₁ 함께 처리한 4군에서 식이 섭취량과 체중이 가장 적은 것으로 보아 시험동물 처리 시 과도한 스트레스가 그 원인으로 작용했을 것으로 생각된다. Park(25)는 CCl₄로 간독성을 유발시켜 1주일동안 사육한 흰쥐의 간장의 무게는 정상 쥐가 4.0±0.4 liver/body weight(%)인데 비하여 시험 군에서

Table 2. Liver weight, food intake, body weight gain and FER of the rats fed the diet for 15 days

Groups ¹⁾	Liver weight (g)	Food intake (g)	Body weight gain (g)	FER ²⁾ (%)
G1	11.17±1.45 ^{NS3)}	285.51±19.10 ^{3d)}	49.97±12.55 ^{a)}	0.18
G2	11.93±1.62	272.72±27.53 ^{b)}	60.91±10.76 ^{a)}	0.22
G3	11.26±0.92	260.48±10.35 ^{b)}	55.20±8.09 ^{b)}	0.21
G4	12.09±0.92	204.47±28.14 ^{b)}	12.40±4.65 ^{b)}	0.06
G5	11.83±0.76	216.76±23.92 ^{b)}	27.54±8.03 ^{b)}	0.12

¹⁾Treatments of animals are shown in detail on Table 1.

²⁾FER= [body weight increased during experimental period(g)/total food intake during experimental period (g)]×100.

³⁾NS: not significant at p<0.01.

⁴⁾Values with different superscripts within the same column are significantly different at p<0.01.

는 4.5±0.3 liver/body weight(%) 증가하였다고 보고하였다. 또한 Bannasch 등(26)은 간세포 암 초기에 간조직의 국소적 변형에 따라 탄수화물 변화가 일어나 과량의 glycogen과 지질의 축적으로 인해 일시적으로 간 무게가 증가한다고 하였다. 본 연구는 유의적인 차이를 볼 수 없었는데 이것은 방사선조사 혹은 AFB₁투여로 인해 간세포의 증식 및 비대화가 일어났으나 그 정도는 미미하며 vitamin C가 간세포 증식과 비대화를 억제시키는 것에 영향을 미칠 것이라고 생각된다.

혈청의 비타민 C의 함량

15일 동안 사육한 후 혈청의 vitamin C 농도를 측정 한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 각 처리군이 유의적으로 낮았으며(p<0.01) 대조군을 제외한 전군에서의 유의적인 차이는 없었으나 vitamin C를 투여하지 않은 2군보다 vitamin C를 투여한 3, 5군에서 더 vitamin C 농도가 낮은 경향이였다. 이는 방사선조사와 AFB₁투여 시 vitamin C의 흡수를 감소시키거나 대사 전환을 증대시킨 것으로 생각된다. 한편 대조군을 제외한 전군에서의 유의적인 차이는 없었으나 vitamin C를 투여하지 않은 2군보다 vitamin C를 투여한 3, 5군에서 더 vitamin C 농도가 낮게 나타났다. 이러한 현상은 방사선조사와 AFB₁ 투여의 치명적인 산화 stress로 수용액 상에서 free radical이 형성되면서 이에 대응해 vitamin C가 가장 먼저 방어 작용에 사용되어(27) 일시적으로 소모량이 많아졌을 것으로 여겨진다. 그러나 본 실험과는 달리 정상 흰쥐에게 이틀에 한번씩 2주간 100 mg/100 g체중 수준으로 과량으로 복강 내 투여한 Im 과 Lee(28)의 연구와 흰쥐에게 300 mg/100 g 체중 수준으로 과량의 vitamin C를 4주간 경구 투여한 Lee 등(29)의 연구에서는 대조군에 비해 혈장의 vitamin C 수준이 유의적으로 현저히 높았다고 보고한 것으로 보아 투여된 vitamin C 농도, 기간 및 동물 처리 방법 등에 따라 그 영향을 받는 것으로 생각 된다.

Table 3. Vitamin C concentration of the serum in each group (mg/dL)

	Vitamin C
G1 ¹⁾	0.067±0.01 ^{a2)}
G2	0.011±0.00 ^b
G3	0.008±0.01 ^b
G4	0.014±0.01 ^b
G5	0.008±0.02 ^b
p	0.000

¹⁾Treatments of animals are shown in detail on Table 1
²⁾Values with different superscripts within the same column are significantly different at p<0.01.

혈청 중 AFB₁의 정량

사용항체의 특성

Liu 등(19)의 방법을 참고로 교차반응을 실험하여 항체의 항원에 대한 특이성을 검토한 결과, Table 4에서와 같이 AFB₁의 교차반응성이 100%로 나타났으며, G₁, G₂에 대한 교차반응성이 각각 23%, 16%로 나타났지만 그 외 aflatoxin B₂, M₁, M₂, sterigmatocystin과는 반응성이 거의 없는 것으로 나타났다.

Table 4. Cross activity of AFB₁ 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⁾Represents means of three duplicate trials.
²⁾Defined as a ratio of the amounts of aflatoxin B₁ required to give 50% inhibition of maximal binding to the amount of test compound able to do the same (expresses as a percentage).

Aflatoxin B₁의 표준 곡선 및 회수율 측정

면역분석법에 의한 혈청 AFB₁의 농도를 측정하기 위하여 0.5 ng/mL에서 500 ng/mL의 농도범위에서 이 반복으로 표준곡선을 작성한바 Fig. 1과 같은 표준곡선을 얻을 수 있었다. 표준 AFB₁의 농도가 높아짐에 따라 OD값의 수치가 상대적으로 낮아지는 경향으로 나타나는 전형적인 면역 분석법에서의 표준곡선을 보였다. 아울러 표준 AFB₁를 10, 50, 100 ng/mL 량으로 정상 혈청에 spike하여 얻은 흡광치를 표준곡선에 대응시켜 농도를 구하고, 혈청에서의 회수율을 구한 결과 Table 5에서와 같이 76%-91%로 나타났다. 이는

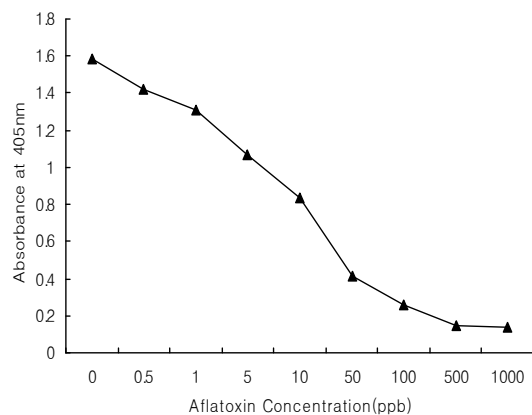


Fig. 1. Indirect competitive ELISA standard curve for Aflatoxin B₁

Table 5. Recovery rate of the AFB₁ in serum after spiking of AFB₁

Concentration (ppb) ¹⁾	Absorbance (405 nm)	Detected concentration (ppb)	Recovery rate (%)
10	0.418±0.036	7.629	76
50	0.256±0.052	44.212	84
100	0.138±0.054	91.094	91

¹⁾The standard curve originated in 0.5-500 ng/mL concentration of AFB₁ standard and represent means duplicate trials.

혈청 중에 존재하는 특정성분이 ELISA에 영향을 미친 것으로 생각되나 AFB₁ 정량에 크게 문제가 없을 것으로 판단되었다.

ELISA에 의한 혈청 중 유리 AFB₁ 함량

이상의 기초 실험을 토대로 혈청 중의 AFB₁ 함량을 ELISA로 측정된 결과는 Table 6과 같다. 즉, AFB₁ 단독 투여한 2군에서는 5.17±0.34 ng/mL이었으며 2군에 vitamin C를 함께 투여한 3군에서는 3.23±0.76 ng/mL로 나타나 2군에 비해 유의적으로 약 38% 감소한 양상을 나타내었다. 한편 X선 조사와 AFB₁ 병합 처리한 4군은 5.62±0.44 ng/mL이었으며 4군에 vitamin C를 투여한 5군에서는 4.84±0.36 ng/mL로서 4군에 비해 다소 감소하였으나 유의적인 차이는 없었다. 이와 유사한 연구로는 Park 등(30)의 AFB₁을 투여한 후 vitamin E를 투여한 마우스 혈청 중의 AFB₁ 잔류량을 ELISA 측정법으로 조사한 결과 항산화제인 vitamin E를 투여함으로써 혈청 중 AFB₁의 함량이 감소하였다고 보고한 바 있다. AFB₁은 설치류와 사람세포를 대상으로 하는 여러 실험 모델 체계에서 변이 유발원으로 알려져 염색체 이상, 미세핵과 자매염색체의 변화, 비정상적 DNA 합성, 염색체 가닥 분해를 일으켜 간암 발생의 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려져 왔다(31). Vitamin C는 독소를 포

Table 6. Concentration of AFB₁ in serum and AFB₁-DNA adduct in liver

Groups ¹⁾	AFB ₁ (ng/mL)	AFB ₁ -DNA adduct (ng/mL)
G2	5.17±0.34 ^{b2)}	9.38±0.41 ^{ab}
G3	3.23±0.76 ^a	5.28±0.32 ^a
G4	5.62±0.45 ^b	10.16±0.54 ^{ab}
G5	4.84±0.36 ^b	8.21±0.31 ^{ab}
F	701.33 ^{**}	5.44 ^{**}
p	0.001	0.001

¹⁾Treatments of animals are shown in detail on Table 1.

²⁾Values with different superscripts within the same column are significantly different (ng/mL) among the groups by one way ANOVA. Each sample repeated three times.

함한 이러한 돌연변이 전구물질(promutagen)의 산화적 대사 과정을 저해할 수도 있으며 산화 환원 완충계에서 유해한 자유기(free radical)를 제거하여 부산물(adduct) 형성을 저지시키는 것(32)으로 알려져 있다. 또한 in vitro에서 활성 산소를 포함하는 자유라디칼의 수용성 quencher로써 지질 과산화연쇄반응을 차단시키는 한편, 지용성 항산화제인 α -tocopherol 내지 ¹O₂ quencher인 β -carotene 등의 재생을 돕고, quencher dismutase에 대한 보호기능 등 강력한 항산화 효력을 나타내며(33,34) 이러한 항산화제로서 작용할 뿐만 아니라 peroxidant로도 작용한다고 Adlard 등(35)은 발표하였다. 이와 같이 본 실험에서도 vitamin C가 항산화제로서 작용하여 이러한 돌연변이 전구물질(promutagen)의 산화적 대사 과정을 저해하며 산화 환원 완충계에서 유해한 자유기(free radical)를 제거하여 혈청 중의 AFB₁의 감소에 그 영향을 미치는 것으로 생각된다.

간세포에서의 AFB₁-DNA adduct의 함량

AFB₁이 투여된 간세포에서 형성된 AFB₁-DNA adduct를 분석하기 위한 실험에서 Table 6과 같은 결과를 얻게 되었다. AFB₁ 단독 투여한 2군에서는 9.38±0.41 ng/ml이었으며 2군에 vitamin C를 함께 투여한 3군에서는 5.28±0.32 ng/mL로 나타나 2군에 비해 유의적으로(p<0.001) 44% 정도의 현저한 감소를 볼 수 있었다. 한편 X선 조사와 AFB₁ 병합 처리한 4군은 10.16±0.54 ng/mL이었으며 4군에 vitamin C를 투여한 5군에서는 8.21±0.31 ng/mL로서 4군에 비해 다소 감소하였으나 유의적인 차이는 없었다. AFB₁-DNA adduct는 AFB₁의 발암성과 밀접한 연관성을 가지고 있다는 지속적인 연구들이 시행되고 있다. Stark(36)는 AFB₁이 대사과정에서 8,9-epoxide를 형성하며 이것은 DNA의 nucleophilic site와 쉽게 binding 하여 DNA부가체를 만든다고 하였으며 또한 Essigmann(37)는 AFB₁은 DNA에서 guanine residue를 공격하여 전체 adduct의 90%이상을 차지하는 중요 adduct인 8,9-dihydro-9-hydroxy-(N7-guanyl) AFB₁를 만들게 된다고 하였다. 이렇게 형성된 AFB₁-DNA adduct는 target cell의 DNA에서 promutagenic sites를 형성시켜 malignant tumor의 critical initiation step으로 작용하여 간암을 유발하는 것으로 알려져 있다(23). 이러한 기전으로 발생한 간조직의 AFB₁-DNA adduct는 대부분이 2,3-dihydro-2-N7-formyl-2',5',6'-triamino-4'-oxo-N5-pyrimidyl-3-hydroxy AFB₁(AFB₁-FAPy)으로 전환되어 간 조직에서 정량된다. 한편 Root(4)는 AFB₁을 고농도로 반복 투여 시 AFB₁-DNA 부가체가 형성되어 GGT 양성 암 신생물 전구단계(positive preneoplastic foci)를 진전시킨다는 AFB₁-DNA부가체 수준과 암 발생과의 용량 의존적 경향에 대하여 보고한 바 있다. 본 실험에서 얻어진 AFB₁-DNA 부가체의 함량은 AFB₁ 단독 투여군에서는 그 함량이 높게 나타났으나 여기에 vitamin C를 함께 투여한 군에서는 현저히 감소하였다

(p<0.001). 이러한 결과는 Shen 등(38)의 흰쥐에 항산화제의 일종인 selenite 8 ppm을 마시는 물에 혼합 투여하였을 때 용량 의존적으로 AFB₁-DNA binding이 억제되었다는 보고와 유사하였다. Schoenta(39)은 화학적으로 다양한 물질인 pyrrolizidine alkaloids, alkyl nitrosamines, 7,12-dimethylbenzanthracene, aflatoxin 등은 대사적 활성이 되면 암 전구물질로 작용한다고 주장하였고 aflatoxin 발암성 대사 산물로 2,3 epoxide를 제시하였다. 또한 돌연변이 형성 시 지질과산화에 의해 유도된 active oxygens, active free radical, carbonyl compound 등이 mutagenic initiation 과 promotion 단계에 관여하며 이때 효과적인 항산화제가 돌연변이를 억제한다는 Mitsuo의 보고(40)도 있다. 이러한 보고에 따라 본 결과에서 vitamin C가 흰쥐의 간세포에서 AFB₁-DNA 부가체의 생성을 억제한 것은 vitamin C가 AFB₁의 산화적 대사 과정인 산화 환원 완충계에서 유해한 자유기를 제거하여 AFB₁ 부가체 형성을 저지시키는 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 또한 항산화제 효소와의 synergist 역할로서 조직내의 AFB₁ epoxide를 포함체로 형성하여 신속하게 배설하거나 돌연변이 생성단계인 initiation과 promotion에서 AFB₁ 생성을 억제하여 AFB₁-DNA adduct를 감소시키는 것으로 생각된다. 한편 X선 조사와 AFB₁ 병합 처리한 4군과 4군에 vitamin C를 투여한 5군과는 유의적인 차이를 볼 수 없었으나 다소 감소하였다. 이는 방사선과 AFB₁ 병합 처리함으로 심한 조직 손상이 야기된 것으로 생각되며 이로 인해 vitamin C의 필요성이 더 증가된 것으로 생각된다. 또한 Vitamin C의 용량에 따른 항산화 효과의 증가에 대한 논란이 있으므로(41) vitamin C의 용량별 항산화 효과에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다. 또한 vitamin C의 투여에 따른 방사선 조사 시각에 따라 세포보호효과가 다르며(42) 방사선 조사 방법에 있어서 본 연구에서는 1회의 고용량의 방사선을 조사하였으나 실제 임상에서는 분할 조사를 시행하게 되므로 분할 방사선 조사 시에 vitamin C의 항산화 효과가 어떻게 나타나는지에 대한 비교연구도 필요하리라 생각된다.

면역화학적 관찰을 통한 AFB₁의 축적양상

간 조직 내에서 AFB₁이 축적된 양상을 관찰하기 위하여 AFB₁에 대한 항체를 사용하여 면역조직학적 실험을 시행하였다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 정상 간조직(G1)에서는 전체적으로 AFB₁의 축적이 거의 일어나지 않는 반면 AFB₁ 투여군인 2군에서는 AFB₁의 축적이 중심정맥과 문맥 주변에서 관찰되었다. 면역조직화학염색의 정도(stainability)를 나타낸 Table 7의 결과를 보면 AFB₁의 양성반응은 대조군인 1군에서는 볼 수 없었으며 AFB₁ 투여군인 2군에서는 주로 중심정맥 주변으로 양성반응이 관찰되었으며 문맥 주변에서도 약한 양성반응을 관찰할 수 있었다. 2군에 vitamin C를 혼합 투여한 3군에서는 2군에 비해 중심정맥 주위에서

Table 7. Effect of vitamin C on Immunohistochemical staining¹⁾ in rats liver

Group	No.	dilution	area	1	2	3	4
1	1:100	CV	-	-	-	-	
		PA	-	-	-	-	
	1:200	CV	-	-	-	-	
		PA	-	-	-	-	
2	1:100	CV	++	+	++	++	
		PA	+	-	-	+	
	1:200	CV	++	++	++	++	
		PA	-	+	-	+	
3	1:100	CV	-	++	++	+	
		PA	-	-	-	-	
	1:200	CV	+	+	+	++	
		PA	-	-	-	-	
4	1:100	CV	++	++	++	+	
		PA	-	-	-	-	
	1:200	CV	++	++	++	+	
		PA	-	-	-	-	
5	1:100	CV	++	+	+	+	
		PA	+	-	-	-	
	1:200	CV	+	+	+	+	
		PA	-	-	-	-	

¹⁾Immunohistochemical staining of AFB₁ observed by two observers were represented at (-), (+), (++) , (+++). (-): negative reaction, (+): weak stainability, (++) : medium stainability, (+++): strong stainability, CV: central vein, PV: portal vein. G1: control group (no treated group), G2: AFB₁ -treated group, G3: the group treated with AFB₁ and vitamin C, G4: the group treated with X-ray and AFB₁, G5: the group treated with X-ray and AFB₁ with vitamin C.

양성반응이 감소하였으며 문맥주변에서는 양성반응이 관찰되지 않았다. 방사선과 AFB₁ 병합처리한 제4군에서는 중심정맥 주변에서 AFB₁ 단독 처리한 2군과 비슷한 정도의 양성반응을 관찰할 수 있었으나 문맥주변에서는 양성반응을 거의 찾아 볼 수 없었다. 4군에 vitamin C를 혼합 투여한 5군에서는 중심정맥 주변에서 양성반응을 관찰할 수 있어 vitamin C 투여에도 불구하고 섬유화의 감소나 문맥 형태의 정상화를 볼 수 없었으나 AFB₁의 양성반응은 제4군에 비해 약간 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다. 이것은 Rhee 등(2)의 연구에서 AFB₁에 노출 후 24시간이 경과하는 동안 심한 혈관울혈, 수포형성, 세포퇴화가 나타났으며 이러한 현상은 24시간 만에 모든 간엽에서 나타났다는 보고와 유사한 경향이었으며 Liu 등(43)은 AFB₁을 섭취한 실험동물의 부검 시 지방간, 간 섬유화, 복수, 장의 부종, 담도증식, 간암들이 나타나고 외견상 음식 섭취 감소에 의한 체중 감소가 나타났으며 결국 실험동물의 사망까지도 유발된다고 보고한 바 있다. 또한 AFB₁을 흰쥐에 투여 후 간세포 미세구조를

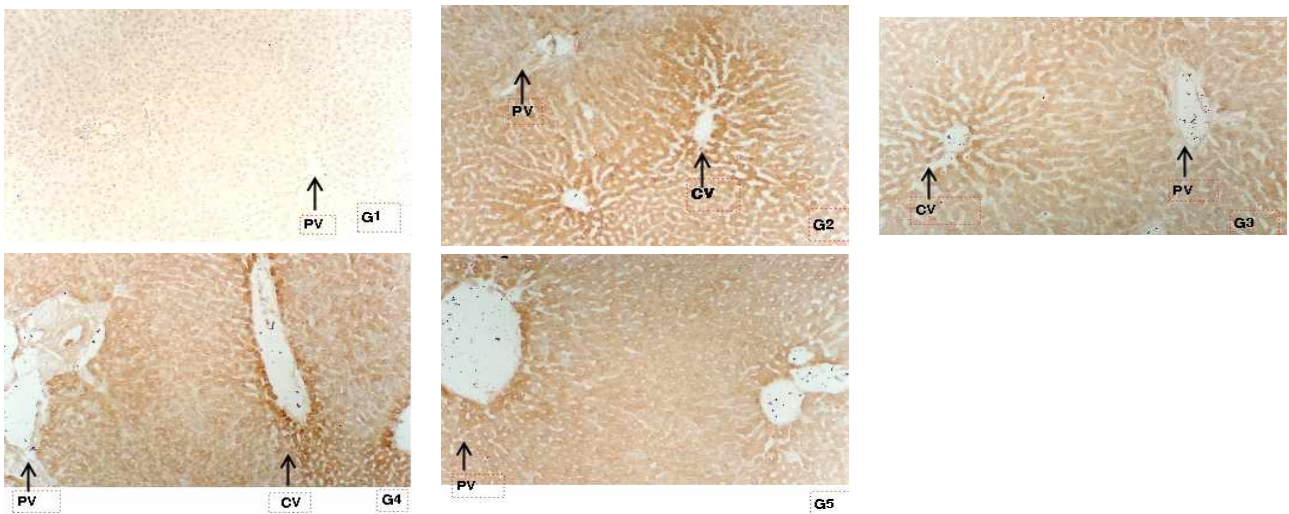


Fig. 2. Immunohistochemical localization of AFB₁ in the rats liver for 15 days (200X).

CV: central vein, PV: portal vein. G1: control group (no treated group), G2: AFB₁-treated group, G3: the group treated with AFB₁ and vitamin C, G4: the group treated with X-ray and AFB₁, G5: the group treated with X-ray and AFB₁ with vitamin C.

관찰하면 AFB₁ 투여 2시간 후에는 간문맥 삼분지와 중심정맥을 중심으로 AFB₁의 침전이 일어난 것을 관찰할 수 있으며 주로 간조직 세포의 세포질과 핵에 고루 분포하는 현상을 볼 수 있었다고 보고(44)한 바와 같이 본 실험에서도 정상 간조직(G1)에서는 전체적으로 AFB₁의 축적이 거의 일어나지 않는 반면 AFB₁ 투여군(G2)에서는 주로 AFB₁의 축적이 중심정맥 주변에서 일어났으며 문맥주변 뿐만 아니라 혈관 가까이에 있는 간세포에서도 축적되는 양상을 나타내었다. 그러나 vitamin C 혼합 투여군(G3)에서는 중심정맥과 혈관 주변의 갈색 침전이 현저하게 줄어든 양상을 나타내었다. 이것은 조직 내에 축적된 AFB₁이 vitamin C 투여로 인하여 심한 세포독성 상태에서 회복되고 있는 것을 나타낸다. 이러한 관점에서 볼 때 세포에 대한 vitamin C의 항산화제의 해독작용 및 보호작용을 기대할 수 있으며, Goeger 등(45)에 의하면 무지개 송어에서 항산화제인 butylated hydroxyanisole(BHA)과 β -naphthoflavone(BNF)이 AFB₁의 대사에 미치는 영향으로 간세포 DNA 부가체형성과 암 발생과정에 대한 연구를 하였는데, 이 연구 결과에 의하면, BHA는 DNA 부가체형성과 암 발생과정에 영향을 미치지 않으나 BNF는 DNA 부가체형성을 감소시켰으며, 암 발생과정을 억제한 것으로 나타났다. 이러한 연구에서 나타난 바와 같이 항산화제의 종류에 의하여 효과 발생에 다양한 차이가 있는 것으로 간주된다. 한편 방사선과 AFB₁ 병합처리한 제4군에서는 중심정맥 주변에서 AFB₁ 단독처리한 2군과 비슷한 정도의 양성반응을 관찰할 수 있었으나 문맥주면에서는 양성반응을 거의 찾아 볼 수 없었던 것은 간암을 치료하는 방사선요법의 효과가 있을 것으로 생각되며 4군에 vitamin C를 혼합 투여한 5군에서는 중심정맥 주변에서 양성반응을 관찰할 수 있었으나 제4군에 비해 약간 감소하는 경향이였다. 이것은 vitamin C가 X선을 조사

종양발생을 억제한다는 Yasukawa 등(16)의 보고와 유사한 결과이었으나 본 실험에서 vitamin C 투여에도 불구하고 섬유화의 감소나 문맥 형태의 정상화는 미미한 것으로 나타나 앞으로 vitamin C의 용량별 항산화 효과에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다. 결과적으로 본 실험에서 vitamin C는 전체적인 생체 대사과정에서 지질과산화 작용을 포함한 세포독성 및 간암발생과정에서 유효한 억제 작용을 나타내었다.

요 약

본 연구는 흰쥐에게 AFB₁을 투여하거나 방사선과 AFB₁을 병합처리함으로 유발된 흰쥐의 간세포에서의 AFB₁-DNA 부가체의 형성과 세포의 산화적 손상에 대한 vitamin C의 효과를 조사하기 위하여 수행되었다. X-ray 조사는 실험기간 내 단 1회로 실험사육기간 1일에 조사 하였고 X-ray 조사 후 vitamin C를 투여하였으며 vitamin C 투여 1시간 후 AFB₁을 투여하였다. Vitamin C와 AFB₁은 모두 복강투여로 실험 사육 첫일부터 1회 시작하여 3일에 한번씩, 5회 반복 투였으며 실험동물 사육기간은 총 15일로 하였다. ELISA에 의한 흰쥐의 혈청 내 AFB₁ 잔여 농도는 AFB₁ 단독 투여군에서 5.17 ± 0.34 ng/mL이었으나 여기에 vitamin C 혼합 투여군에서는 3.23 ± 0.76 ng/ml가 검출되었다. 간세포의 AFB₁-DNA adduct 농도는 AFB₁ 단독 투여군에서는 9.38 ± 0.41 ng/mL이었으며 2군에 vitamin C를 함께 투여한 3군에서는 5.28 ± 0.32 ng/ml로 나타나 2군에 비해 유의적으로($p < 0.001$) 44% 감소한 양상을 나타내었다. 한편 X선 조사와 AFB₁ 병합처리한 4군에 비해 4군에 vitamin C를 투여한 5군에서 혈청 내 AFB₁ 함량과 간세포의 AFB₁-DNA adduct

함량이 다소 감소하였으나 유의적인 차이는 없었다. 또한 면역조직화학적 관찰에서 AFB₁ 단독 투여군에서는 중심정맥과 혈관주변에서 AFB₁ 축적이 관찰되었는데 이러한 현상은 vitamin C를 혼합 투여함으로써 중심정맥과 혈관 주변의 갈색 침전이 현저하게 감소한 것으로 나타났다. 그러나 X선 조사와 AFB₁ 병합 처리한 군에서는 그 정도가 약했다.

References

- Patterson DSP (1973) Metabolism as a factor in determining toxic action of aflatoxins in different animal species. *Food Cosmet Toxicol*, 11, 287-294
- Rheal AT, Hisanori Hashimoto, Summers PM (2000) Non-invasive in vivo magnetic resonance imaging assessment of acute aflatoxin B₁ hepatotoxicity in rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1475, 314-320
- Choy WN (1993) 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
- Root M, Theodore Lange, Campbell TC (1997) Dissimilarity in aflatoxin dose-response relationships between DNA adduct formation and development of preneoplastic foci in rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 106, 213-227
- Dashwood RH, Arbogast DN, Fong AT, Pereira C, Hendricks JD, Bailet GS (1989) Quantitative interrelationships between aflatoxin B₁ carcinogen dose, indole 3-carbinol anticarcinogen dose. Target organ DNA adduction and final tumor response. *Carcinogenesis*, 10, 175-181
- Bechtel DH (1989) Molecular dosimetry of hepatic aflatoxin B₁-DNA adducts; linear correlation with hepatic cancer risk. *Regul Toxicol Pharmacol*, 10, 74-81
- Jacob RA (1994) Nutrition, health and antioxidants. *Inform*, 5, 1271-1275
- Ward JF (1994) DNA damage as the cause of ionizing radiation-induced gene activation. *Radiat Res*, 138, 85-8
- Diplock AT (1994). Antioxidants and disease prevention. *Mol Aspects Med*, 15, 293-376
- Sato K, Niki E, Shimasaki H (1990) Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *Arch Biochem Biophys*, 279, 402-405
- Halliwell B, Foyer CH (1976) Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical. *Biochem J*, 155, 697-700
- Varma SD, Srivastava VK, Richatds RD (1982) Photoperoxidation in lens and cataract formation: preventive role of superoxide dismutase, catalase and vitamin C. *Ophthalmic Res*, 14, 167 - 175
- Anderson R, Smit MJ, Joone GK (1990) Vitamin C and cellular tmmine functions. *Ann NY Acad Sci*, 587, 34-48
- Raina V, Gurtoo HL (1985) Effects of vitamin A, C and E on aflatoxin B₁-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA-98 and TA-100. *Teratog Carcinog Mutagen*, 5, 29-40
- Benedict WF, Wheatley WL, Jones PA (1980) Inhibition of chemically induced morphological transformation and reversion of the transformed phenotype by ascorbic acid in C3/H10T1/2 Cells. *Cancer Res*, 40, 2796-2801
- Yasukawa M, Terasima T, Seki M (1989) Radiation-induced neoplastic transformation of C3H10T $\frac{1}{2}$ Cells is suppressed by ascorbic acid. *Radiation Res*, 120, 456-467
- Margolis SA, Zeigler RG, Helzisouer HJ (1991) Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurement in human serum and plasma. *Am J Clin Nutr*, 54, 1315-1320
- Kawamura O, Maki S, Sato S, Ueno Y (1993) Ochratoxin A in livestock and human sera in Japan quantified by sensitive ELISA. In *human Ochrotoxicosis and its Pathologies* John Libbey Eurotext Inserm, 231, 159-166
- Liu MT, Ram BP, Hart LP, Pestka JJ (1985) Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone. *Appl Environ Microbiol*, 50, 332-336
- Kim DS (1994) Studies on the contamination in cereals and toxicity of ochratoxin A in mouse. Ph D Thesis. Gyung-sang National University. Jinju, Korea.
- Gross-Bellard M, Oudet P, Chambon P (1973) Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *Europ J Biochem*, 36, 32 - 38
- Shen HM, Shi CY, Lee HP, Ong CN (1994) Aflatoxin B₁-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol App Pharm*, 127, 145-150
- Miller SG, Leclere RF, Seo SJ, Malone C (1990) Synthesis and transport of storage proteins by tests in *Heliothis virescens*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 14, 151-170
- Duncan DB (1993) Multiple range test for correlated and heteroscedastic mean. *Biometrics*, 13, 164-176
- Park SA (1993) Studies of *Sedum kamtschaticum fisch* on lipid peroxidation and hepatotoxicity. MS thesis, Sukmyung University, Seoul, Korea.
- Bannasch P, Mayer D, Hackre HJ (1980) Hepatocellular

- glycogenolysis and hepatocarcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 605, 217-245
27. Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD, Calafiore AM, Costanini F, Riario-sforza G, Imbastaro T, Neri M, Cuccurullo F (1995) Vitamin E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis*, 112, 91-99
 28. Im HS, Lee JW (1992) L-ascorbic acid administration on red blood cell hemolysis and tissue lipid peroxide levels in rats. *Korean J Gerontol*, 2, 153-15
 29. Lin CY, Smith S, Abraham S (1976) Lipid metabolism. *J lipid Res*, 17, 647
 30. Park SJ, Kim HK, Chung DH (2002) The effects of antioxidant vitamins on residual aflatoxin B₁ in mice Serum. *J Korea Public Health Association*, 28, 81-88
 31. Pelkonene O, Raunio H (1997) Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ Health Perspect*, 105, 767-774
 32. Sato K, Niki E, Shimasaki H (1990) Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *J Biochem Biophysics*, 279, 402-405
 33. Halliwell B, Foyer CH (1976) Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical. *Biochem J*, 155, 697-701
 34. Varma S D, Srivastava VK, Richatds RD (1982) Influence of age on the temperature of the anterior segment of the eye. *Ophthal Res*, 14, 153-159
 35. Adlard BPF, DE SOUZA SW, MOON S (1974) Ascorbic acid in fetal human brain. *Biochem Soc Transactions*, 2, 278-282
 36. Stark AA (1986) Molecular aspects of aflatoxin B₁ mutagenesis and carcinogenesis, In *Mycotoxins and Phycotoxins*. Steyn PS, Vieggaar R. (Eds.), Elsevier Science, Amsterdam, p 435-445
 37. Essigmann JM, Croy RG, Bennet RA, Wogan GN (1982) Metabolic activation of aflatoxin B₁: pattern of DNA adduct formation, removal and excretion in relation to carcinogenesis. *Drug Metab Rev*, 13, 581-602
 38. Shen M, Chen YS, Lee HP, Ong CN (1994) Aflatoxin B₁-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol Applied Pharmacol*, 127, 145-150
 39. Schoental R (1970) Hepatotoxic activity of retrosine, senkirkine and hydroxysenkirkine in newborn rats, and the role of epoxides in carcinogenesis by pyrrolizidine alkaloids and aflatoxin. *Nature(London)*, 227, 401-402
 40. Mitsuo N (1990) Antioxidant/antimutagens in food. A Review, *Food Sci Nutri*, 29, 273-300
 41. Choi Jh, Yu BP (1989) The effect of food restriction on kidney membrane structure of aging rats. *AGE*, 12, 133-136
 42. Konopacka M, Rzeszowska-wolny J (2001) Antioxidant vitamin C, D and β -carotene reduce DNA damage before as well as after γ -ray irradiation of human lymphocytes in vitro. *Mutat Res-Genet Toxicol E M*, 494, 1-7
 43. Liu Y, Zang K, Wu YD (1983) Treatment of advanced primary hepatocellular carcinoma by I¹³¹-anti-AFP. *Lancet*, 1, 531-532
 44. Choi SK(1991) Determination of aflatoxin B₁-DNA adduct and immunohistochemical analysis in mouse by the antibody to aflatoxin B₁. Ph D Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea.
 45. Goeger DE, Shelton DW, Hendricks JD, Pereira C, Bailey GS (1988) Comparative effect of dietary butylated hydroxyanisole and beta-naphthoflavone on aflatoxin B₁ metabolism. *Carcinogenesis*, 9, 1793-1800

(접수 2014년 2월 14일 수정 2014년 5월 1일 채택 2014년 5월 21일)