

흰쥐 배양 전배자 및 중뇌세포에서 Ochratoxin A의 독성

홍진태* · 박귀례 · 한순영 · 박기숙 · 김형식 · 오세동 · 박희정 · 이이다 · 장성재
식품의약품안전청 국립독성연구소
(Received April 4, 1998)

Embryotoxicity of Ochratoxin A in Cultured Rat Embryonic Midbrain Cells and Whole Embryos

Jin Tae Hong[#], Kui Lea Park, Soon Young Han, Ki Sook Park,
Hyung Sik Kim, Se Dong Oh, Hee Jung Park,
Rhee Da Lee and Seung Jae Jang

National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration,
5 Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul, 122-704, Korea

Abstract—Effects of ochratoxin A (OTA) on embryo development were studied in cultured whole embryos from 9.5 day gestation rat for 48 h. OTA (more than 0.5 µg/ml) induced microcephaly in the cultured rat whole embryos. Protein and DNA content, and DNA synthesis were significantly inhibited by OTA. We next examined whether the microcephaly seen in cultured whole embryo partially results from inhibition of differentiation of embryonic midbrain cells. Embryonic midbrain cells were extracted from 12 day gestation rat embryos, and cultured for 96 hr. OTA inhibited cell differentiation about 50% over control. We also tested whether OTA-induced embryotoxicity would be associated with oxidative damages. We measured the γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) and glutathione peroxidase (GPX) activities, and glutathione (GSH) content in both cultured whole embryos and embryonic midbrain cells. OTA decreased GSH content, whereas slightly increased γ -GT activity, but GPX activity was not significantly changed. These results show that OTA caused the microcephaly and its effect may be partially due to the inhibition of cell differentiation of embryonic midbrain cells, but the role of oxidative damages is not clear in embryotoxicity.

Keywords □ Ochratoxin A, microcephaly, midbrain cell differentiation, oxidative damages.

Ochratoxin A (OTA)는 *Aspergillus Ochraceus* 및 *Penicillium Verrucosum*에 의해 생성되는 곰팡이독으로서 실험동물에서는 신장독성, 간장독성 및 소장염¹⁻³⁾를 일으키는 것으로 알려져 있다. OTA는 또한 유전독성⁴⁾과 면역억제작용⁵⁾ 및 암⁶⁾을 일으키는 물질이기도 하다. OTA가 생식기능에 미치는 영향에 대한 연구는 흰쥐, 생쥐, 햄스터, chick embryo, hydra 등을 이용한 *in vivo* 및 *in vitro* 시험을 통해 여러 가지 생식기능 장애 및 생식기관에 대한 독성이 있다고 보고되고 있는

데, 대표적인 독성으로 수두증(hydrocephaly), 배자사망, 골격변이(skeletal variation), 골화지연(delayed ossification), 자궁내성장지연(intra-uterine growth retardation) 및 소두증(microcephaly)이 보고되고 있다.⁷⁻¹³⁾

실험동물을 이용한 OTA의 생식독성 시험결과, 임신 7~10일째 모체 흰쥐에 0.2 mg/kg의 OTA를 단회 경구투여시 다음 세대(F₁)에서 소두증과 골화지연 및 골격변이가 나타남이 보고되었으며,⁷⁾ 임신 15~17일째 모체 생쥐에 1.25 및 2.25 mg/kg의 OTA를 단회 복강투여시 다음 세대에 정향반사(surface righting), 유영(swimming) 및 pivoting과 같은 행동발달이 둔화되

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-380-1789 (팩스) 02-380-1788

며 뇌에 손상을 주어 소두증(microcephaly)을 일으킨다고 보고되었다.⁸⁾ 암컷 흰쥐에 OTA를 200, 400, 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 10, 20, 35일까지 경구투여 시킨 결과 뇌의 막결합 효소의 활성도가 부위특이적으로 달라짐이 관찰되었는데 이는 OTA의 developmental neurotoxicity와 관련이 있음을 시사한다고 보고되었다.⁹⁾ 임신 8일째 생쥐에 2 또는 3 mg/kg OTA를 경구 투여시 다음 세대의 동물에서 골격이상, 골격변이 및 성장지연이 관찰되었으며 단백질 결핍 식이의 경우 OTA에 의한 이와 같은 최기형성이 증가함이 보고되었다.¹⁰⁾ 임신 10일째 생쥐에 3 mg/kg OTA를 경구투여한 경우 다음세대의 6주령 생쥐에서 OTA에 의한 뇌 무게의 유의성있는 감소가 일어나 소두증을 일으킨다고 보고되었으며¹¹⁾ 이들 생쥐의 somatosensory 및 visual cortex의 cortical thickness가 유의성 있게 감소한 것이 소두증의 한 원인으로 밝혀졌다고 보고되었다.¹²⁾ 임신 11일째 또는 13일째 생쥐에 5 mg/kg 의 OTA를 복강주사 하였을 때 배자의 후뇌에서 핵농축세포(pyknotic cells)가 형성된다고 보고되었다.¹³⁾

배자를 이용한 *in vitro* 시험에서의 OTA에 의한 영향을 살펴보면, 임신 10일째 SD 흰쥐 배자를 45시간 배양하면서 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OTA를 노출시킨 결과 용량 의존적으로 yolksac diameter, crown-rump length, somite number와 단백질 및 DNA 함량이 감소함이 발견되었고 hypoplasia telencephalon이 관찰되었다고 보고되었다.¹⁴⁾ Chicken egg embryos에 OTA를 투여한 결과 기형발생을, 외뇌증, 소두증, 안면중양렬등이 증가함이 보고되었다.¹⁵⁾

OTA의 여러 가지 표적장기증 발달과정에 있는 뇌는 OTA에 매우 높은 감수성이 있는 것으로 알려지고 있는데 OTA에 의한 가장 흔한 최기형 및 배자 발생독성은 소두증(microcephaly)을 일으키는 것으로 실험결과 밝혀졌으나⁷⁻⁹⁾ 현재까지 OTA에 의한 소두증의 작용원인에 대한 구체적 연구는 미진한 실정이다. OTA가 뇌에 나타나는 독성은 뇌의 부위특이성이 있는 것으로 사려되는데 OTA 노출에 의해 뇌의 막(membrane)에 존재하는 특정효소의 활성도가 부위에 따라 다르다는 결과가 보고되었고,⁹⁾ 소두증이 유발된 임신 9~11일째 생쥐 뇌에서 telecephalic벽의 세포사에 의한 변화가 소두증의 한 원인이라는 연구결과가 발표되었다.¹¹⁾

따라서 본 연구에서는 *in vivo* 최기형시험의 대체법으로 다년간 본 연구실에서 확립한 whole embryo

culture법¹⁶⁾을 이용하여 *in vivo*상에서 나타난 OTA에 의한 소두증이 재현되는지 알아보고, 소두증의 원인이 embryonic midbrain cell의 분화·증식하는 과정의 변화에 의한 것인지를 알아보고자 하며, 최근 OTA의 독성발현기전으로 제기된 산화적 손상기전¹⁷⁻¹⁹⁾에 대하여도 배양 흰쥐 whole embryos와 embryonic midbrain cells을 이용하여 부분적으로 밝혀 보고자 한다.

실험방법

실험동물

식품의약품안전청에서 생산 사육한 Wister rats을 동물사육조건(온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 명암교대 12 hr)을 유지한 상태에서 사육하였으며 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

Whole embryo 배양

배자의 배양방법은 임신 9.5일 되는 날, 임신이 확인된 흰쥐를 오후 2시에 경추탈골시켜 도살한 다음, 자궁을 모체로부터 적출하였다. 무균적으로 적출한 자궁을 멸균된 Tyrode solution에서 자궁벽을 절개하여 배자가 들어있는 탈락막(decidua)을 노출시켰다. 입체현미경하에서 미세한 Watchmaker's forceps을 이용하여 탈락막을 조심스럽게 제거하여 배자를 분리시킨 후, Reichert's membrane을 제거하고 배자들을 적출하였다. 배양배지 3 ml가 담겨있는 배양병에 적출된 배자를 2~4마리씩 넣어, 전배자 배양시스템(Ikemoto Co., Rika Kogyo Japan)에서 48시간 동안 배양하였다. 배양배지는 흰쥐의 전혈로부터 얻은 immediately centrifuged(IC)혈청을 이용하였으며, 배양기내 온도는 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로, 기계의 회전장치(drum)의 회전속도는 1분당 25회전으로 유지시켰다. 혼합 제조된 가스($\text{O}_2\text{-CO}_2\text{-N}_2$)를 0.22 mm의 filter에 150 ml/min의 속도로 통과시켜 멸균된 상태로 공급했으며, 가스 교환은 처음 17시간은 5% O_2 , 5% CO_2 , 90% N_2 조성으로 이후에는 20% O_2 , 5% CO_2 , 75% N_2 조성으로 7시간을 공급하였으며 나머지 시간동안은 45% O_2 , 5% CO_2 , 55% N_2 조성으로 공급하였다. 각배자의 성장 및 분화상태는 Maele-Fabry등²⁰⁾의 배자점수 평가방법(embryo scoring system)에 의한 점수총계법을 이용하였다. OTA의 노출 농도는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 노출시켜 embryo 발달을 관찰하였고 이

중 1 및 3 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 선정하여 다른 시험을 실시하였다.

Embryonic midbrain 세포 배양

Embryonic midbrain cell 배양은 Flint 및 Orton 법²¹⁾에 따라 배양하였다. 임신 12일째 흰쥐로부터 embryos를 적출한 후 midbrain만 분리하여 1% trypsin이 섞인 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS, Gibco, Gaithersburg, MD, USA)으로 각각의 세포를 분리하였다. 세포를 다시 10% Nu serum, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 streptomycin 및 100 units/ml의 penicillin이 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium nutrient mixture F-12 Hams(DME/F12 1:1 mixture, Sigma Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 배양액에 suspension 시켰다. 세포부유액을 5×10^6 cells/ml로 맞추고 6-well tissue culture plate에 20 μl 씩 한 well당 5 drops을 분주한 후 37°C의 배양기에서 2시간 배양하여 plate상에 부착하도록 하였다. 이후 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹인 OTA가 들어있는 배양액을 2 ml씩 넣은 후 37°C에서 5% CO_2 가 유지되게 하여 4일간 배양하였다. OTA 농도는 cytotoxicity가 나타나지 않는 0.25와 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 을 이용하여 실시하였다.

Cell proliferation and differentiation 측정

Cell proliferation은 [³H]-thymidine uptake²²⁾ 방법을 이용하여 실시하였다. whole embryos 및 embryonic midbrain cells 배양시작 24시간 후에 3 $\mu\text{Ci/ml}$ 의 [³H]-thymidine을 24시간 노출시킨 후 세포 증식 과정 중에 일어나는 [³H]-thymidine의 uptake를 측정하였다. Embryonic midbrain cell의 differentiation은 hematoxylin 염색방법으로 실시하였다. 분화된 각자의 cell foci를 stereomicroscope(Nikon SMZ-10, Nikon, Japan) 상에서 count 하였다.

Biochemical parameters 측정

Protein content는 Bradford method에 의하여 측정하였고 DNA content는 diphenylamine method에 의해 측정하였다. γ -Glutamyltranspeptidase(γ -GT) 활성과 glutathione 함량은 whole embryos 또는 midbrain cell homogenate에서 assay kit(Sigma Co.)를 이용하여 정량하였고 gluta-

thione peroxidase 활성은 105,000 \times g에서 60분 원심분리한 후 cytosol 내에서 Tappel의 방법²³⁾에 의해 측정하였다.

통계방법

Data는 one-way 분산분석하였고 유의성의 검정을 위한 post hoc test는 Bonferroni's 법을 실시하여 $p < 0.05$ 수준으로 표현하였다. Data가 heterogeneous variance를 나타내는 경우는 log 치로 변화시켜 통계분석하였다.

실험결과

Embryo toxicity

9.5일째 embryos에 0.1~20 $\mu\text{g/ml}$ 의 OTA를 48시간 노출시킨 결과 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서부터 embryo의 발달에 손상이 나타나기 시작하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 *in vivo* 시험결과 나타나는 전형적인 소두증이 관찰되었는데 OTA노출에 따라 head length가 용량의존적이고 통계학적으로 유의성있게 감소하였다(Fig. 1). 다른 형태학적 변화에서는 crown-rump length 및 yolk sac diameter는 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었으며

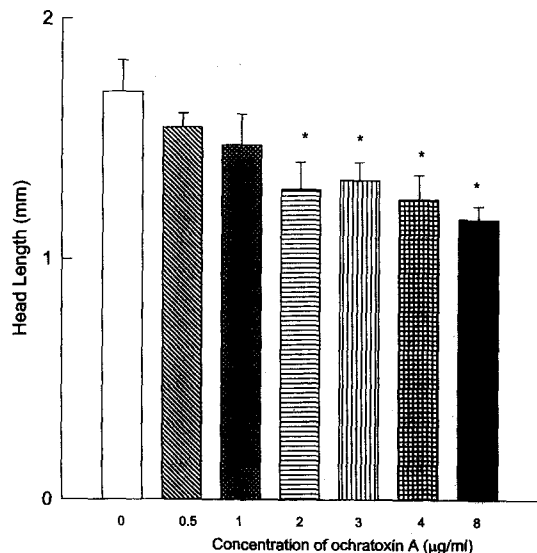


Fig. 1— Effect of OTA on head length of rat embryo in the whole embryo culture. Embryos were extracted from rats gestation 9.5 days, and cultured with different doses of OTA for 48 hr as described in the materials and methods.

Table 1—Effect of ochratoxin A on the embryo development in cultured rat whole embryos

OTA (μg/ml)	Yolk sac diameter	Crown-rump length (mm)	Total score
0	3.9±0.3	3.4±0.2	62.8±2.2
0.5	3.8±0.1	3.1±0.2	60.5±2.4
1	3.8±0.5	3.2±0.3	59.4±3.4*
2	3.5±0.8	3.0±0.4	58.1±3.1*
3	3.3±0.2	3.0±0.3	56.7±3.4*
4	3.9±0.4	3.1±0.1	57.1±2.3*

Embryo were extracted from rats gestation day 9.5, and cultured in the absence or presence of OTA for 48 hr. Values were expressed as mean standard error of twelve to fifteen rat embryos

* Significant different from control (p<0.05)

total score는 유의성있게 감소하였다(Table 1). 본 실험조건에서는 8 μg/ml 이상의 OTA는 독성이 매우 강하여 embryo의 발달을 저지하는 농도로 밝혀졌다.

OTA의 배자독성발현과 protein 및 DNA함량과의 관계를 알아보고자, whole embryo에서의 protein 및 DNA함량을 연구한 결과, 배양 whole embryo에서 OTA에 의하여 protein과 DNA의 함량은 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2A 및 3A). Protein과 DNA의 함량은 배양 embryonic midbrain 세포에서도 감소하였는데 0.5 μg/ml농도의 OTA에 의해서 protein이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2B 및 3B).

세포의 분화 및 증식

세포의 증식억제가 소두증에 영향을 주는지 알아보기 위해서 DNA 합성을 배양 whole embryos 및 embryonic midbrain cells에서 측정할 결과 OTA는 whole embryo와 embryonic midbrain cells의 DNA synthesis를 유의성있게 감소시켰다(Fig. 4A 및 B). OTA

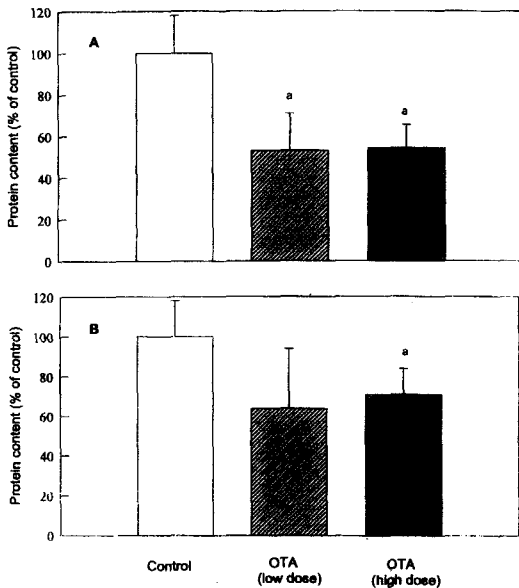


Fig. 2—Effect of OTA on protein level in the cultured rat whole embryos (A) or midbrain cells (B).

Embryos or midbrain cells were extracted from 9.5 or 12 day gestation rat, respectively, and cultured in the presence of two doses of OTA (1 or 3 μg/ml for embryos; 0.25 or 0.5 μg/ml for midbrain cells) for 48 hr (embryos) or 96 hr (midbrain cells). Protein level was determined in the cell homogenates as described in the materials and methods. Values are mean±standard error of twelve to fifteen embryos or of two experiments, with triplicates of each experiment in midbrain cell culture. Values with superscripts are significantly different.

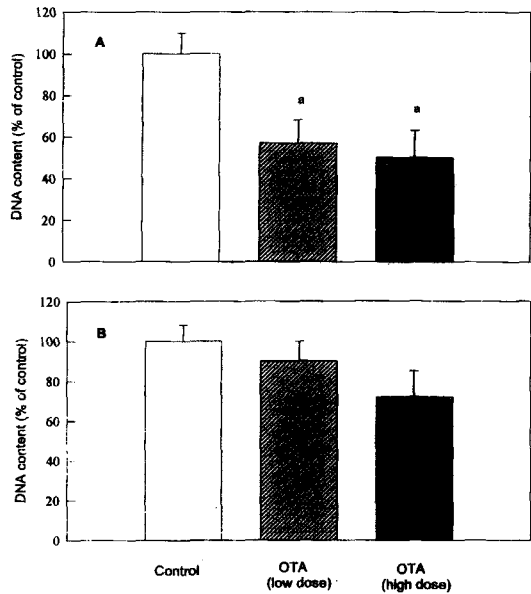


Fig. 3—Effect of OTA on DNA content in the cultured rat whole embryos (A) or midbrain cells (B).

Embryos or midbrain cells were extracted from 9.5 or 12 day gestation rat, respectively, and cultured in the presence of two doses of OTA (1 or 3 μg/ml for embryos; 0.25 or 0.5 μg/ml for midbrain cells) for 48 hr (embryos) or 96 hr (midbrain cells). Protein level was determined in the cell homogenates as described in the materials and methods. Values are mean±standard error of twelve to fifteen embryos or of two experiments, with triplicates of each experiment in midbrain cell culture. Values with superscripts are significantly different.

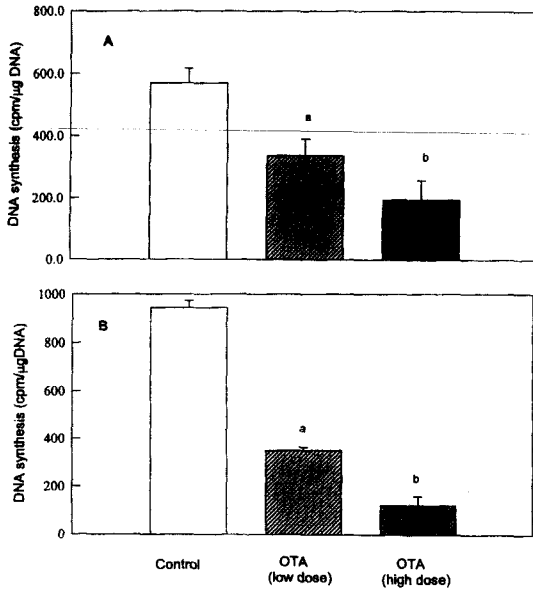


Fig. 4—Effect of OTA on DNA synthesis in the cultured whole embryos (A) or midbrain cells (B). Embryos or midbrain cells were extracted from 9.5 or 12 day gestation rat, respectively, and cultured in the presence of two doses of OTA (1 or 3 $\mu\text{g/ml}$ for embryos; 0.25 or 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for midbrain cells) for 24 hr. 3 $\mu\text{Ci/ml}$ of [^3H]-thymidine was exposed to embryos or midbrain cells. After 24hr exposure, [^3H]-thymidine uptake was measured as described in the materials and methods. Values are mean \pm standard error of twelve to fifteen embryos or of two experiments, with triplicates of each experiments in midbrain cell culture. Values with superscripts are significantly different.

이 일으키는 소두증이 midbrain의 분화억제에 의한 결과인지를 알아보기 위해서 세포독성이 나타나지 않는 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 과 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 OTA를 embryonic midbrain cells에 노출시킨 결과 embryonic midbrain의 cell differentiation이 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 억제되지 않았으나, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ OTA에 의해서 4일간 배양한 경우 50%가 감소하였다(Fig. 5).

황산화 enzymes 활성화 와 glutathione 농도

OTA에 의해 생성되는 oxidative damage에 대한 영향을 배양 whole embryos 및 embryonic midbrain cells를 이용하여 실시하였다. OTA에 의한 glutathione의 농도는 whole embryos에서는 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 증가하였으나 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 유의성있게 감소

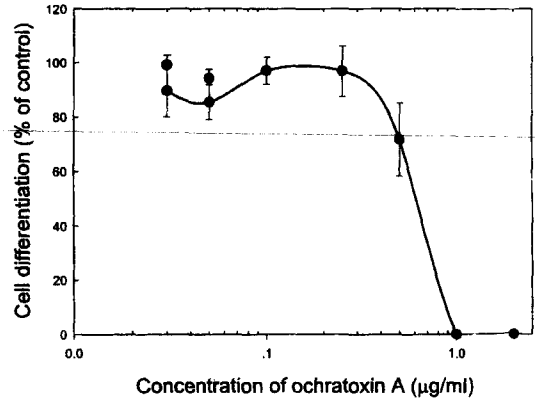


Fig. 5—Effect of OTA on embryonic midbrain cell differentiation.

Embryonic midbrain cells were extracted from embryos of 12 day gestation rat and cultured in the presence of two doses (0.25 or 0.5 $\mu\text{g/ml}$) of OTA for 96 hr. Cell differentiation was determined as described in the materials and methods. Values are mean \pm standard error of two experiments, with triplicates of each experiment.

하였다. Midbrain cells에서는 0.25 및 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 유의성있게 감소하였다 (Fig. 6). $\gamma\text{-GT}$ activity는 whole embryos 및 midbrain cells에서 증가하였으나 유의성은 없었으며 (Fig. 7), glutathione peroxidase 활성은 큰 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 8).

고 찰

본 실험에서는 OTA의 배자독성 및 그 원인 기전을 whole embryo와 embryonic midbrain 세포배양법을 이용하여 실시하였다. OTA는 전배자배양에서 microcephaly를 일으키는 embryotoxicity하고 midbrain cells의 증식과 분화를 억제하였다. 낮은 농도의 OTA는 전배자에서 glutathione 농도를 증가시켰으나 높은 농도에서는 감소시켰고, OTA는 $\gamma\text{-GT}$ 의 활성을 전배자 및 증체세포 배양에서 증가시켰으나 glutathione peroxidase 활성도는 큰 변화가 없었다.

본 실험에서 OTA에 의해 embryo에서 소두증이 관찰되었는데 이 결과는 여러 연구자들⁷⁻⁹⁾이 *in vivo*에서 관찰한 OTA에 의한 소두증의 결과와 일치한다. Maele-Fabry¹⁷⁾는 생쥐 embryo 배양하여 morphology변화를 토대로 최기형성 물질을 스크리닝하는 시험법으로 *in vivo* 시험의 대체법으로 유용하다고 보고

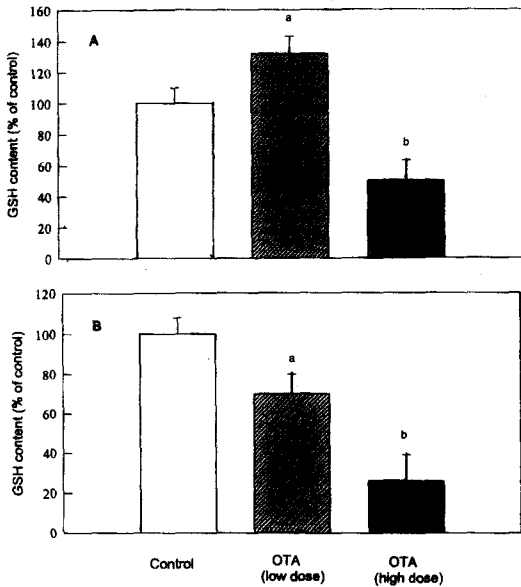


Fig. 6—Effect of OTA on the glutathione level in the cultured rat whole embryos (A) or midbrain cells (B). Embryos or midbrain cells were extracted from 9.5 or 12 day gestation rat, respectively, and cultured in the presence of two doses (1 or 3 $\mu\text{g/ml}$ for embryos; 0.25 or 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for midbrain cells) of OTA for 48 hr (embryos) or 96 hr (midbrain cells). Glutathione level was determined as described in the materials and methods. Values are mean \pm standard error of twelve to fifteen embryos or of two experiments, with triplicates of each experiment in midbrain cell culture. Values with superscripts are significantly different.

한바 있다. Flint와 Orton²¹⁾은 embryo midbrain cell culture method에 의해서 90%이상의 teratogenic predictability가 있음을 보고하고, Tsuchiya 등²⁴⁾은 whole embryo culture를 이용하여 ethylenethiourea에 의한 *in vivo*에서의 hydrocephaly를 *in vitro* culture system에서도 관찰할 수 있음을 보고하였다. 따라서 본 실험결과와 이들의 보고를 통해 볼 때, whole embryo culture 방법은 *in vivo* 시험의 대체법으로 유용한 방법으로 사려된다. 배양 whole embryos에서 OTA는 DNA과 protein의 양을 유의성있게 감소시켰는데 이들의 보고와 일치하며, 여러 최기형성물질의 작용기전이 macromolecule의 합성을 저해시킨다는 다른 보고와도 일치한다.²¹⁾ 본 실험에서도 whole embryo에 OTA를 노출시킨 결과 DNA 합성이 30%이상 감소되었다. 또한 rhombencephalic-spinal cord junction에서 head part만을 적출하여 이 부분

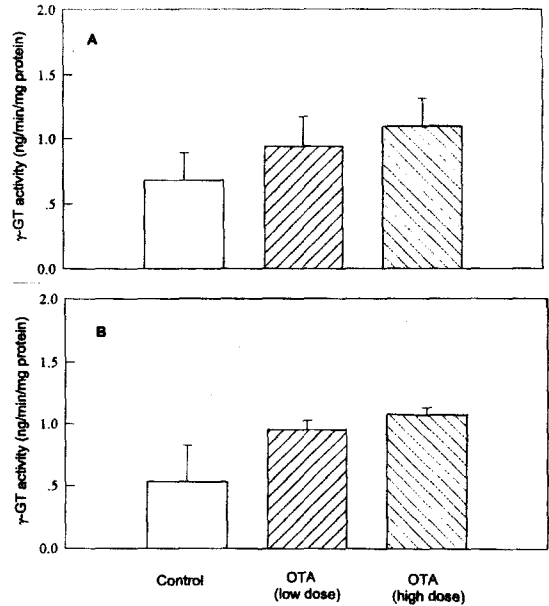


Fig. 7—Effect of OTA on γ -Glutamyltranspeptidase in the cultured rat whole embryos (A) or midbrain cells (B).

Embryos or midbrain cells were extracted from 9.5 or 12 day gestation, respectively, and cultured in the presence of two doses (1 or 3 $\mu\text{g/ml}$ for embryos; 0.25 or 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for midbrain cells) of OTA for 48 hr(embryos) or 96 hr (midbrain cells). γ -Glutamyl transferase activity was determined as described in the materials and methods. Values are mean \pm standard error of twelve to fifteen embryos or of two experiments, with triplicates of each experiment in midbrain cell culture.

의 DNA 합성정도를 연구한 결과, whole embryo 전체 및 midbrain cell에서의 DNA 합성억제와도 일치하는 것을 알았다. 따라서 소두증의 한 원인은 세포의 증식의 억제에 의한 것임을 예측할 수 있었다(data not shown).

또한 본 실험에서는 배양중뇌세포를 이용하여 OTA가 중뇌세포가 neuron으로 분화를 억제함으로써 소두증(microcephaly)을 유발하는지를 연구하였는데, 그 결과 0.5 $\mu\text{g/ml}$ OTA에서 중뇌세포의 분화가 억제됨을 관찰하였다. 따라서 gestation(days 9-12)과정에서 화학물질에 대해 예민하게 반응을 나타내는 midbrain cell의 neuron으로 분화되는 과정의 억제가 소두증의 한 원인으로 작용할 가능성이 있다고 사려된다. 실제로 *in vivo* 상태에서 OTA에 의해 telencephalic

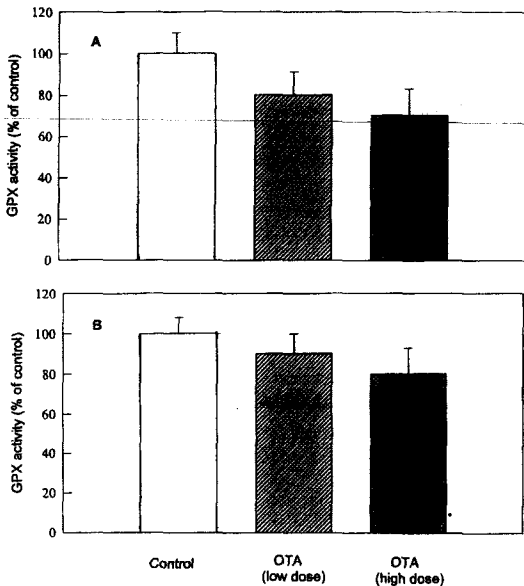


Fig. 8 — Effect of OTA on the glutathione peroxidase activity in the cultured rat whole embryos (A) or midbrain cells (B).

Embryos or midbrain cells were extracted from 9.5 or 12 day gestation rat, respectively, and cultured in the presence of two doses (1 or 3 $\mu\text{g/ml}$ for embryos; 0.25 or 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for midbrain cells) of OTA for 48 hr (embryos) or 96 hr (midbrain cells). Glutathione peroxidase activity was determined as described in the materials and methods. Values are mean \pm standard error of twelve to fifteen embryos or of two experiments, with triplicates of each experiment in midbrain cell culture.

brain에서 수상돌기성장이 억제됨이 관찰되었다.¹¹⁾ Miki 등은 OTA가 부위특이적으로 신경독성을 나타낸다고 보고하였으며 흰쥐 뇌의 막결합효소의 활성도가 뇌부위에 따라 다르게 나타남이 보고되었다.¹²⁾ 따라서 OTA의 노출에 의한 배자발달 과정에서의 소두증같은 배자독성은 gestation 과정에 따라 specific하게 나타남을 시사하는데 midbrain cell이 neuron으로 분화되는 시기(gestation 9-12 days)에 OTA 노출은 분화 및 증식을 억제하여 소두증을 유발하는 한 원인으로 작용할 수 있다고 생각된다. Tsuchiya 등은 midbrain cell culture에서 ethylthiourea에 의한 hydrocephaly의 원인은 midbrain cells이 neuron으로의 분화가 억제되기 때문이라고 보고하였다.²⁴⁾ 본 연구에서는 또한 세포분화를 억제하는 OTA 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 DNA 합성도 억제되었다. 또한 세포분화에는 영향을 주지 않고

cytotoxicity가 나타나지 않는 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 의 OTA 농도에서는 세포증식은 유의성있게 감소되었다. 따라서 미분화된 중뇌(midbrain) 세포자체의 증식도 억제되는 것으로 판단된다.

OTA의 독성작용기전으로 oxidative damage에 의한 독성유발 가설이 제기되고 있다. 특히 OTA에 의한 신장독성과 oxidative damage와의 상관성은 많은 연구에서 제시되었는데, Dr. Creppy 등은 *in vivo*와 monkey kidney cells 인 vero cells를 이용하여 OTA의 지질 과산화에 의한 신장독성과 여러 가지 항산화효소가 신장독성을 억제하는 효과가 있다고 보고하였다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 본 실험에서는 배양whole embryos와 embryonic midbrain cells에서 OTA 처리에 의해 antioxidant인 glutathione의 농도변화를 측정하였다. Glutathione은 일차적인 oxidative stress에 의한 damage를 방어하는 polypeptide이며 또한 배자형성과정의 cell division에 중요한 역할을 하는 microtubular 형성에 영향을 미치는 factor로 알려졌다²⁵⁾ 때문에 glutathione의 농도 변화가 antioxidant로서의 작용과 cell의 분화 및 증식에 어떤 영향을 미치는지의 두 가지 목적 때문에 glutathione의 농도변화를 관찰하였다. 그 결과 OTA는 전 배자 배양 및 중뇌세포배양 모두에서 glutathione의 농도를 감소시켰다. 그러나 glutathione 농도조절과 밀접한 연관이 있으면서 다른 antioxidant enzymes(catalase 및 superoxide dismutase)보다 cell내에서 낮은 농도의 oxidant 상태에서 반응을 보이는 glutathione peroxidase(상대적으로 낮은 Km value를 갖음)는 크게 변하지 않았으며 γ -GT 활성도 변화도 유의성 있는 차이를 나타내지 않은 것으로 미루어 embryotoxicity 과정에서 OTA에 의한 glutathione 농도변화 및 antioxidative enzymes 활성도변화의 역할에 대하여는 더 진전된 연구가 필요하다고 사려된다. 다만 glutathione의 농도변화와 세포분화 및 증식에 미치는 영향을 고려할 때 OTA에 의한 glutathione의 농도감소는 OTA에 의한 cell differentiation에 부분적으로 작용했을 가능성도 있다고 판단되어 이 부분에 대하여서도 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사려된다.

본 연구결과를 정리하면 OTA는 cultured whole embryos의 embryo 발달과정에서 소두증을 일으키며 그 부분적 작용기전은 midbrain cell의 세포증식 및 분화의 억제에 의한 것으로 사려된다. 또한 다른 장기독성 현상(신장독성등)에서 나타난 oxidative damages에

의한 OTA독성현상이 whole embryo에서 일어나는지에 대하여는 더 연구가 필요하다고 사려되며 OTA에 대해 생성되는 것으로 알려진 reactive oxygen species가 세포분화 및 증식에 변화를 주어 소두증같은 기형발생과정에 어떤 작용을 하는지에 대한 연구가 필요하다고 사려된다. 현재 이와 같은 연구의 일환으로 OTA가 배양 embryonic midbrain cells내의 TNF- α 의 농도 변화와 apoptosis에 미치는 역할, 그리고 apoptosis와 관련된 BCL-2 및 P⁵³ protein의 midbrain cell differentiation과정에서의 역할에 대한 연구를 진행 중에 있다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청의 안전성연구사업 연구비(1997)에 의하여 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.

문헌

- 1) Brown, M. H., Szczech, G. M. and Purmails, B. P. : Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **37**, 331 (1976).
- 2) Hayes, A. W., Hood, R. D. and Lee, H. L. : Teratogenic effect of ochratoxin A in mice. *Teratology.* **9**, 93 (1974).
- 3) Szczech, G. M., Carlton, W. W. and Tuite, J. : Ochratoxicosis in beagle dogs. *Part II, Pathol. Vet Path.* **10**, 219 (1973).
- 4) Hennig, A., Fink-Gremmels, J. and Leistner, L. : Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. *International Agency for Research on Cancer.* 255 (1991).
- 5) Szczech, G. M., Carlton, W. W., Tuite, J. and Caldwell, R. : Ochratoxicosis in swine. *Vet. Pathol.* **10**, 347 (1973).
- 6) Bendele, A. M., Carlton, W. W., Krogh, P. and Lillehoj, E. B. : Ochratoxin A carcinogenesis in the(C57BL/6J×C3H) F₁ mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* **75**, 733 (1985).
- 7) Brown, M. H., Szczech, G. M. and Purmails, B. P. : Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **37**, 331 (1976).
- 8) Poppe, S. M., Stuckhardt, J. L., and Szczech, G. M. : Postnatal behavioral effects of ochratoxin A in offspring of treated mice. *Teratology.* **27**, 293 (1983).
- 9) Grubisic, T. Z., Santini, A., Cepelak, I., Barisic, K., Juretic, D., and Pepeljnjak, S. : Influence of ochratoxin A treatment on the activity of membrane bound enzymes in rat brain regions. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **377**, 121 (1996).
- 10) Singh, J., Hood, R. D. : Maternal protein deprivation enhances the teratogenicity of ochratoxin A in mice. *Teratology.* **32**, 381 (1985).
- 11) Szczech, G. M. : Brain necrosis in mouse fetuses transplacentally exposed to the mycotoxin ochratoxin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **57**, 127 (1981).
- 12) Miki, T., Fukui, Y., Uemura, N., Takeuchi, Y. : Regional difference in the neurotoxicity of ochratoxin A on the developing cerebral cortex in mice. *Develop. Brain Res.* **82**, 259 (1994).
- 13) Fukui, Y., Hoshino, K., Kameyama, Y., Yasui, T., Toda, C., and Nagano, H. : Placental transfer of ochratoxin A and its cytotoxic effect on the mouse embryonic brain. *Food Chem. Toxicol.* **25**, 17 (1987).
- 14) Mayura, K., Edwards, J. F., Maull, E. A., Phillips, T. D. : The effects of ochratoxin A on postimplantation rat embryos in culture. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **18**, 411 (1986).
- 15) Wei, X., Sulik, K. K. : Ochratoxin A (OA) in chicken embryos : pathogenesis and mechanisms of malformation. *Teratology.* **47**, 385 (1993).
- 16) New, D. A. T. : Whole embryo culture and the study of mammalian embryo during organogenesis. *Biol. Rev.* **53**, 81 (1978).
- 17) Baudrimont, I., Betbeder, A. M., Gharbi, A., Pfohl-Leszkowicz, A., Dirheimer, G. and Creppy, E. E. : Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin A in rats. *Teratology.* **89**, 101 (1994).
- 18) Baudrimont, I., Ahouandjivo, R. and Creppy, E. E. : Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture by several

- agents. *Chem. Biol. Interact.* **104**, 29 (1997).
- 19) Baudrimont, I., Murn, M., Betbeder, A. M., Guilcher, J. and Creppy, E. E. : Effect of piroxicam on the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats. *Toxicology*. **95**, 147 (1995).
- 20) Maele-Fabry, G. V., Delhaise, F. and Picard, J. J. : Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos. *Teratology in vitro*. **4**, 149 (1990).
- 21) Flint, O. P. and Orton, T. C. : An in vitro assay for teratogens with culture of rat embryo mid-brain and limb bud cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **76**, 383 (1984).
- 22) Srinivan, S., Chow, C. K. and Glauert, H. P. : Effect of the peroxisome proliferator ciprofibrate on hepatic DNA synthesis and hepatic composition following partial hepatectomy in rats. *Toxicology*. **62**, 321 (1990).
- 23) Tappel, A. L. : Glutathione peroxidase and hydroperoxidase. In: *Methods in Enzymology* (Fleischer, S. and Packer, L.) pp. 52, 506-513 Academic press. N. Y. (1974).
- 24) Tsuchiya, T., Takahashi, A., Asada, S., Takakubo, F., Yamashita, N. O. and Eto, K. : Comparative studies of embryotoxic action of ethylenethiourea in rat whole embryo and embryonic cell culture. *Teratology*. **43**, 319 (1991).
- 25) Poot, M., Teubert, H., Rabinovitch, P. S. and Kavanagh, T. J. : De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J. Cell Physiol.* **163**, 555 (1995).