



랫드의 간에서 다양한 농도의 아플라톡신 투여에 의한 DNA Adduct의 형성과 Ras의 발현양상

김태명 · 허진주 · 리란 · 김대중 · 남상윤 · 윤영원 · 이범준
충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소

DNA Adduct Formation and Expression of Ras Gene in the Liver of Rats Treated with Aflatoxins at Various Levels

Tae Myoung Kim, Jin Joo Hue, Lan Li, Dae Joong Kim, Sang Yoon Nam,
Young Won Yun and Beom Jun Lee

College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine, Cheongju 361-763, Korea

Received December 12, 2005; Accepted December 21, 2005

ABSTRACT. Aflatoxins are produced by *Aspergillus flavus*, *parasiticus* that grows in improperly stored cereals. Aflatoxin B₁ (AFB₁) is a potent hepatocarcinogen in a variety of experimental animals including human beings. In spite of a high attention to the hepatocarcinogenicity of aflatoxins, the relative toxicity of other types (AFB₂, AFG₁ and AFG₂) of the toxins is not fully clarified. Sprague-Dawley male rats were orally administered with AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ at the dose of 250, 1250, and 2500 µg/kg body weight. Animals were then killed at 12, 24 or 48 hrs following aflatoxin administration. Subsequently the relative weight of liver was measured and histopathological examination on the liver was performed. Level of 8-OxodG and expression of *ras* gene in the liver was determined. The relative liver weights at high doses of AFB₁ and AFG₁ was significantly low. The treatment of AFB₁ at the high dose of 2500 µg/kg showed vacuolar degeneration and centrilobular hepatic necrosis with inflammatory cells. The pathological changes by AFB₂, AFG₁ and AFG₂ were not clearly found. The formation of 8-OxodG by AFB₁ increased in a dose-dependent manner up to 24 hrs after a single treatment of AFB₁ thereafter decreased to the level of the control. The treatments of AFB₂, AFG₁ and AFG₂ showed an inconsistent pattern in the formation of 8-OxodG in the liver of rats with increasing time. The expression of *ras* oncogene in the liver by AFB₁ at the dose of 1250 µg/kg was increased twice compared to the control. The treatments of AFB₂, AFG₁ and AFG₂ at all doses decreased the expression of *ras* in the liver. These results in the present study indicate that AFB₁ among aflatoxins with low comparable levels is the most toxic as determined by early biomarkers such as 8-OxodG formation and *ras* expression. However, the levels of 8-OxodG and *ras* as biomarkers were not useful to predict the relative hepatocarcinogenicity of aflatoxins to AFB₁ in the present model. Further studies are required to look for other biomarkers to predict carcinogenic potency of aflatoxins.

Keywords: Aflatoxins, 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OxodG), Ras, Hepatotoxicity, Biomarker.

서 론

Aflatoxin(AF)은 옥수수, 땅콩 등의 곡물류를 잘못 저장하여 발생한 곰팡이인 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasiticus*로부터 생산되는 독소이다. 아플라톡신들은 AFB₁, B₂, G₁, G₂의 네 종류가 각기 다른 비율로 혼합되어 함께 존재하며 그 중에서 AFB₁의 독성이 가장 강한 것으로 밝혀져 있다 (Wogan and Newberne, 1969).

AFB₁은 hepatitis B virus와 함께 동물 모델 뿐 아니라 특정 오염지역의 사람에게도 간암을 유발한다고 알려졌다 (Hall and Wild, 1994; Peers et al., 1987). AFB₁은 체 내에서 흡수되어, 간의 cytochrome p450(CYP450) 효소에 의해 AFB₁-8,9-*exo*-epoxide로 대사된다(Gallagher et al., 1996; Ueng et al., 1995). 이 epoxide는 DNA의 염기인 guanine의 N7 위치에 결합하여 주요한 DNA adduct인 8,9-dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB₁(AFB₁-N7-guanine)을 형성한다(Croy and Wogan, 1981; Croy et al., 1978; Lin et al., 1974). AFB₁-N7-guanine은 불안정한 형태이므로 두 가지의 더욱 더 안정된 다른 형태로 변화한다. 즉, purine 기가 떨어져 나가서 apurinic site를 형성하거나 AFB₁-N7-guanine 구조에서 imidazole ring이 열리면서 AFB₁-formamidopyrimidine(AFB₁-FAPY)을 형성한다(Busby and Wogan, 1984). 이러한 DNA adduct들이 여러 가지 유전자에 mutation을 유발하여 정상적인 세포를 암세포로 변화시키는 유전독성을 발휘한다.

아플라톡신의 무독화 현상을 알아보면 대표적 아플라톡신인 AFB₁의 가수분해는 일차적으로 cytochrome p450 family에 의하여 AFB₁-aflatoxin 8,9-hydrodiol이 되고 이는 sulfate 또는 glucuronic acid와 효소중합체를 형성하여 수용성 sulfate 혹은 glucuronide esters로 되어 요나 담즙으로 분비됨으로써 무독화된다(Guengerich et al., 1996). 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(Chen et al., 2000; Tiemersma et al., 2001).

한편, 아플라톡신의 대사과정에서 유리되어 나오는 free radical들은 간암과정에 중요한 역할을 하는데, DNA를 공격하여 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine(8-OxodG)을 생성한다(Wild and Turner, 2002). 암발생 및 독성발현과 8-OxodG의 생성과의 관련성은 많은 연구자들에 의해 발암물질들에 의한 암발생 예측에 하나의 biomarker로 사용하여 왔다(Kasai, 1997; Otteneider and Lutz, 1999; Shen et al., 1995). 이러한 DNA adduct가 만약 DNA 수복 기전에 의해 제거 되지 않는다면, AFB₁으로

유도된 간암에 있어서 자주 target이 되는 인체 p53 gene에서 점돌연변이가 일어나게 되어 p53단백질의 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 간암 발생과 밀접한 관련성이 있음이 보고되고 있다(Chao et al., 1999; Donnelly and Massey, 1999; Riley et al., 1997). 포유류의 *ras* family에는 K-*ras*, H-*ras*, N-*ras*의 3 group이 있는데, 이들은 각각의 21-kD의 *ras* 단백질(p21ras)을 coding한다. p21ras는 정상적으로 세포내 신호전달 과정에서 intrinsic GTPase로 작용하여 세포분열과 성장을 촉진하는 역할을 한다(Chao et al., 1999; Donnelly and Massey, 1999; Riley et al., 1997). 그러나 만약 이 유전자가 어떤 원인에 의해 과도하게 발현되거나 mutation되어 지속적으로 활성화되면 세포는 계속 분열하게 되어 정상세포의 종양화를 유발한다. AFB₁에 의해 유도된 rat의 간암에서 K-*ras* gene의 codon 12 및 N-*ras* gene codon 13의 mutation이 확인되었고, 또한 AFB₁을 처리한 mouse lung cell에서도 K-*ras* activation이 확인되었다(Donnelly and Massey, 1999).

간암 발생률이 높은 원인중의 하나가 아플라톡신오염과 밀접하게 관련되어 있다는 많은 보고가 있다(Hall and Wild, 1994; Peers et al., 1987). 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 4종류의 아플라톡신(AFB₁, B₂, G₁, G₂)을 단회 노출시킨 후 생체지표들을 이용하여 시간경과(12, 24, 48 hr)에 따른 AF 네 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(Threshine Co.)에서 사육하였고 실험동물용 사료(Samyangoilfeed Co.)를 자유로이 급여하였다. 실험군은 총 13개군으로 대조군, 아플라톡신 B₁, B₂, G₁ 및 G₂ 네 종류에 대해 각각 250, 1250, 2500 µg/kg(Wako Chemical Co. Ltd, Tokyo, Japan)이며 1회 경구투여 하였다. 각 group당 동물 수는 9~10 마리이며, 아플라톡신은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에

용해시킨 후 증류수에 현탁액을 조제하여 투여하였다. 아플라톡신 투여 후 0, 12, 24, 48시간에 동물을 부검하고, 간장의 무게를 측정하고 다음 최종 체중에 대한 백분율로서 표시하였으며, 일부 간 조직을 RNA 및 DNA 분리를 위해 액체 질소에 고정하여 실험에 사용하였다. 고정된 조직은 8-OHdG (또는 8-OxodG) 분석 및 RT-PCR에 사용하였다.

병리조직학적 검사

간장조직을 절제하여 병리조직학적 관찰을 위해 10% 중성완충포르말린에 24시간 이상 고정하여 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀으로 포매하고, 3~4 μm 두께로 조직절편을 만들어 H&E 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

8-OxodG ELISA 분석

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

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/ml)과 준비된 시료 50 μl 씩을 각기 다른 well에 넣고 제1항체용액도 50 μl 씩 넣은 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응종료 후 각 well의 반응액을 버리고, 200 μl 의 세정액을 넣어 닦아내었다. 계

속해서 각 well에 제2항체용액 100 μl 씩 분주한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응종료 후 well의 용액을 버리고, 200 μl 의 세정액을 넣어 닦아낸 후, 기질용액 100 μl 를 반응 well에 분주하고 상온에서 30분간 반응시킨 후, 반응정지액 100 μl 를 가해 반응을 정지시켰다. 표준액의 각 농도의 흡광도의 수치를 대수적으로 그린 후, 작성한 표준곡선을 이용하여 각 시료의 8-OxodG의 흡광도를 읽고 농도를 계산하였다.

Ras 발암유전자의 발현분석(RT-PCR)

랫드의 간조직을 5~10 mg 정도로 잘게 자른 후 액체질소로 동결시킨 후 -70°C 이하로 냉동보관 하였다가 사용하였다. 간조직 5~10 mg에 lysis buffer(Bio Rad, Hercules, CA, USA) 300~400 μl 를 첨가한 뒤 homogenizer를 이용하여 분쇄하였다. 현탁액에 100 μl 의 단백질을 침전용액을 첨가한 후 4°C, 13,000 rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 원심분리한 후 상층액을 다시 튜브에 옮겨서 300 μl 의 isopropanol을 첨가한 후 진탕혼합한 후 4°C, 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 75% 에탄올용액으로 세척하여 4°C, 13,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 RNA 펠렛을 15분간 건조시키고 50 μl 의 RNA 수화용액을 첨가한 뒤 얼음위에서 30분간 배양 후, RNA를 1 : 100으로 희석하여 260 nm/280 nm에서 흡광도를 측정하여 absorbance ratio(A_{260}/A_{280})가 1.8~2.0의 범위에 드는지 확인하였다. DEPC 처리수 14 μl , dNTP 4 μl , DTT solution 2.5 μl , RNase Inhibitor(5 U, 10 U) 1 μl , Foreword primer(*ras*) 1 μl , Reverse primer(*ras*) 1 μl , RNA sample 2 μl 를 mix 1, DEPC treated water 12 μl , 5 \times RT-PCR buffer 10 μl , Reverse transcriptase 200 U 1 μl , Tag polymerase 5 U 1~1.5 μl mix 2, 두 가지의 mix를 완전히 섞은 뒤 50°C에서 30분간 배양하고, 4°C에서 5분간 배양한 후 다음과 같은 조건으로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 실시하였다 (Step 1 : 94°C for 4 min, Step 2 : 94°C for 30 sec, Step 3 : 57°C for 30 sec, Step 4 : 72°C for 1 min 20 sec, Step 5 : go to step 2 with recycle 40, step 6 : hold at 4°C). TAE buffer를 이용하여 1% agarose gel에 loading 하였고 Etidium bromide(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 5min)로 염색하였다. 이용된 *ras* primer sequence는 Foreword primer: 5'-TGGCG GAATA TATGC TGGTG-3'이며, Reverse primer: 5'-CTGTA CTGGT GGATG TCCTC-3'이다.

통계학적 분석

본 실험에서 얻은 자료를 통계학적으로 분석하였다. 측

Table 1. The relative weight (%) of liver of rats treated with aflatoxins

Treatment	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Time course (h)		
		12	24	48
Control	0	-	5.2 ± 0.50	-
AFB ₁	250	5.3 ± 0.07	4.8 ± 0.05	4.9 ± 0.16
	1250	6.0 ± 0.55	4.8 ± 0.20	4.8 ± 0.32
	2500	$4.6 \pm 0.11^*$	$4.2 \pm 0.23^*$	4.7 ± 0.19
AFB ₂	250	5.0 ± 0.32	4.8 ± 0.45	4.7 ± 0.19
	1250	5.1 ± 0.22	5.1 ± 0.31	4.7 ± 0.05
	2500	4.9 ± 0.23	4.7 ± 0.21	4.6 ± 0.38
AFG ₁	250	5.4 ± 0.25	5.0 ± 0.32	4.6 ± 0.69
	1250	5.1 ± 0.32	4.6 ± 0.11	4.5 ± 0.36
	2500	4.8 ± 0.06	$4.6 \pm 0.27^*$	$4.6 \pm 0.17^*$
AFG ₂	250	5.0 ± 0.45	4.8 ± 0.16	4.6 ± 0.20
	1250	4.8 ± 0.30	4.8 ± 0.16	4.7 ± 0.45
	2500	$4.6 \pm 0.08^*$	5.0 ± 0.11	5.5 ± 0.77

Relative liver weight (%) was evaluated based on final body weight.

*Significantly different from those of the control at $p < 0.05$. Mean \pm S.D. (n = 3).

정치에 대한 통계학적 분석은 통계처리 컴퓨터프로그램인 Sigma stat를 이용하여 분석하였다. 대조군에 대한 유의성은 $p < 0.05$ 에서 Bonferroni t-test를 실시하였다.

결과 및 고찰

간의 무게변화

Table 1에서와 같이 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂를 단회 경구 투여한 랫드의 간의 상대장기 무게에 있어서 전반적으로 아플라톡신은 간의 상대무게를 감소시켰으며 AFB₁의 고농도 투여 후 12 및 24시간 후 유의적 차이를 보였다($p < 0.05$). AFG₁ 고농도 투여 후 24 및 48시간에서도 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다($p < 0.05$). 한편, Kim *et al.*(2004)은 아플라톡신의 4주 반복 투여 후에 간의 상대무게의 감소가 발견되었으나 유의적 차이는 없었다고 보고하였다(Kim *et al.*, 2004). 이러한 변화는 급성 간독성에 의한 간세포의 괴사에 기인된 것으로 사료되나 정확한 원인은 판단할 수 없었다.

병리조직학적 결과

일반적으로 아플라톡신 투여 후에 간의 육안소견상 이상변화는 관찰 할 수 없었다. 아플라톡신 B₁ 고용량(2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$)에서 주된 조직병리학적 소견으로는 간세포의 공포변성(vacuolar degeneration), 단핵세포들이 침윤된 중심정맥성의 국소성 간괴사소(centrilobular hepatic necrosis with inflammatory cell) 등이 관찰되었다(Fig.

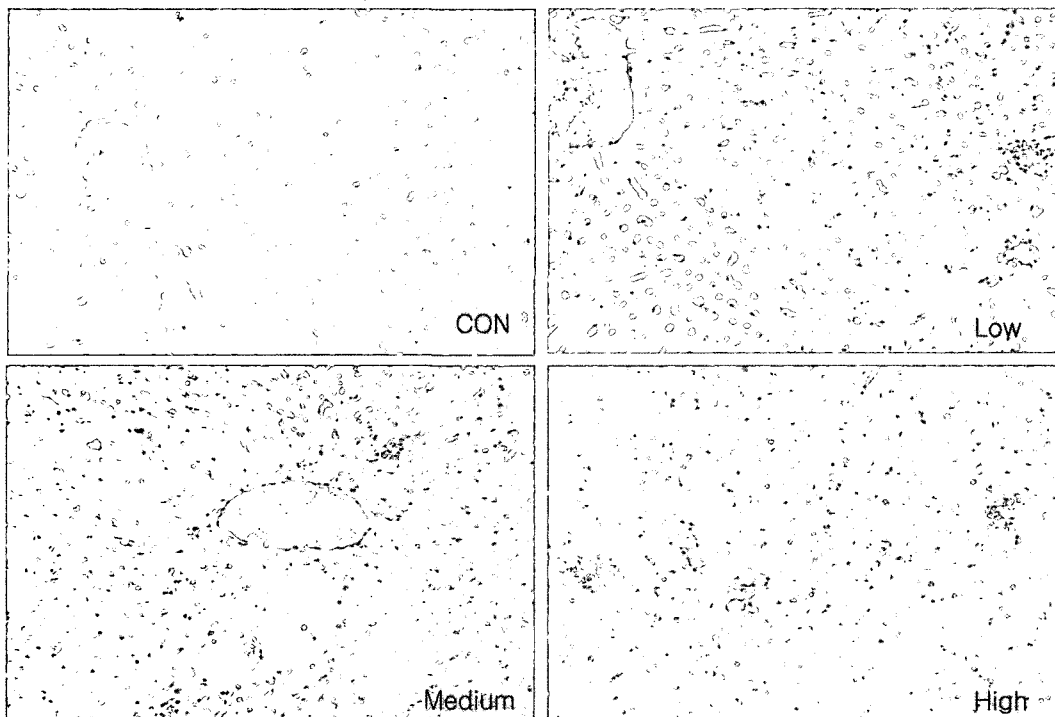


Fig. 1. Histopathological change in the liver of rats treated with Aflatoxin B₁. Centrilobular hepatic necrosis with inflammatory cells are observed in the rat treated with aflatoxin B₁ at the doses of 250 (low), 1250 (medium), and 2500 (high) $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight (H&E, $\times 100$).

1). 또한 특히 고용량의 AFB₁ 투여군의 간세포는 세포질이 강한 호산성을 나타내었으며, 핵은 농축되어 관찰되기도 하였다(Fig. 1). AFB₁이 AFB₂, AFG₁, AFG₂에 비하여 강한 독성을 나타냄을 확인할 수 있었으나, AFB₂, AFG₁, 및 AFG₂ 상호간의 현저한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 1). Kim *et al.*(2004)은 아플라톡신(AFB₁, AFB₂, AFG₁)의 4주 반복투여 후에 H&E 염색상에서 공포변성, 국소성 괴사, 문맥구역에 염증성세포의 침윤, 문맥구역주위에 난원세포의 증식 등의 병변들을 관찰할 수 있었다고 보고하였다(Kim *et al.*, 2004). 본 연구에서는 단회 투여 후 단기간의 변화는 미약했지만 AFB₁의 경우 유사한 변화를 관찰할 수 있었으며 이러한 변화는 AFB₁이 AFB₂, AFG₁ 및 AFG₂에 비해 더욱 강력한 간독성 물질로 생각된다.

8-OxodG(DNA adduct)의 변화

AFB₁의 단회 투여군에서 간의 8-OxodG의 생성, 즉 간의 DNA adduct형성에 있어서 대조군과 비교하여 12 및 24시간 후에 농도에 따른 유의성 있는 증가를 보였으나 ($p < 0.05$), 48시간 후에는 다시 대조군의 수준으로 환원되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 아플라톡신의 투여 후 신속하게 간의 DNA 부가체를 형성하고 약 48시간 이내에서 정상수준으로 DNA가 수복이 되는 것으로 생각된다. AFB₂,

AFG₁, 및 AFG₂의 경우에는 농도에 의한 변화 뿐 아니라 시간에 따른 8-OxodG의 생성에 대한 특별한 변화를 발견할 수 없었다(Fig. 2). 8-OxodG는 그 자체만으로도 유전독성이 있으며 자체의 base pairing(G≡C)이 되지않아 mispairing되기도 하지만 인접 base에도 영향을 주어 gene발현이 되지 않거나 비정상적인 발현이 되도록 유도되어 종양으로의 진행을 촉진하는 DNA adduct로서 발암조기 예측인자로 이용될 수 있음이 시사되어왔다(Otteneider and Lutz, 1999; Shen *et al.*, 1995). 본 실험에서 AFB₁ 투여군에서만 조기에 DNA adduct 형성이 용량 의존적으로 나타나 8-OxodG가 AFB₁의 경우 간암 예측인자로 사용될 수 있음을 보여주고 있다. 그러나 AFB₁을 제외한 다른 종류들이 주목할 만한 독성을 나타내지 않았다. 아플라톡신(AFB₁, AFB₂, AFG₁)의 4주 반복 투여 후에도 8-OxodG의 변화는 대조군에 비해 유의적 차이를 보이지 않았으며 따라서 이 지표의 사용은 상대 독성의 평가로는 유용하지 않은 것으로 사료된다(Kim *et al.*, 2004). Lee *et al.*(2004)도 아플라톡신(AFB₁, AFB₂, AFG₁)의 저용량(250 µg/kg) 투여 후 초기 8-OxodG의 변화를 관찰 했는데, 본 실험과 매우 유사한 결과를 보였다(Lee *et al.*, 2004).본 연구에서 AFG₂의 경우도 다른 아플라톡신들과 특이한 변화를 관찰 할 수 없었다.

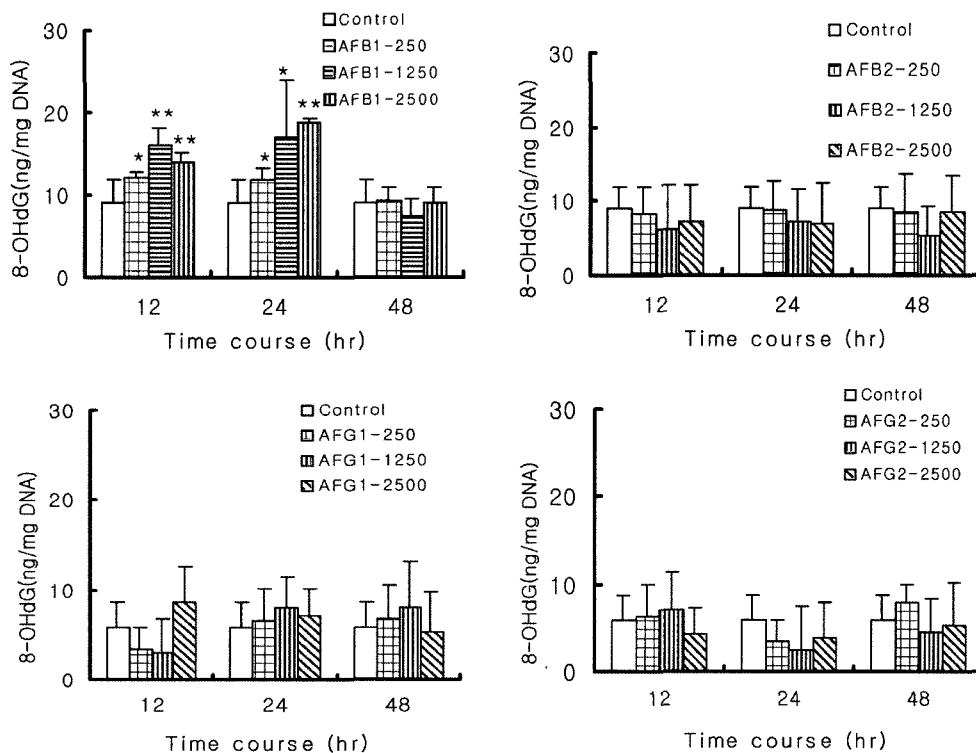


Fig. 2. Time course changes of 8-OHdG levels in the liver of rats treated with aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂. ***Significantly different from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

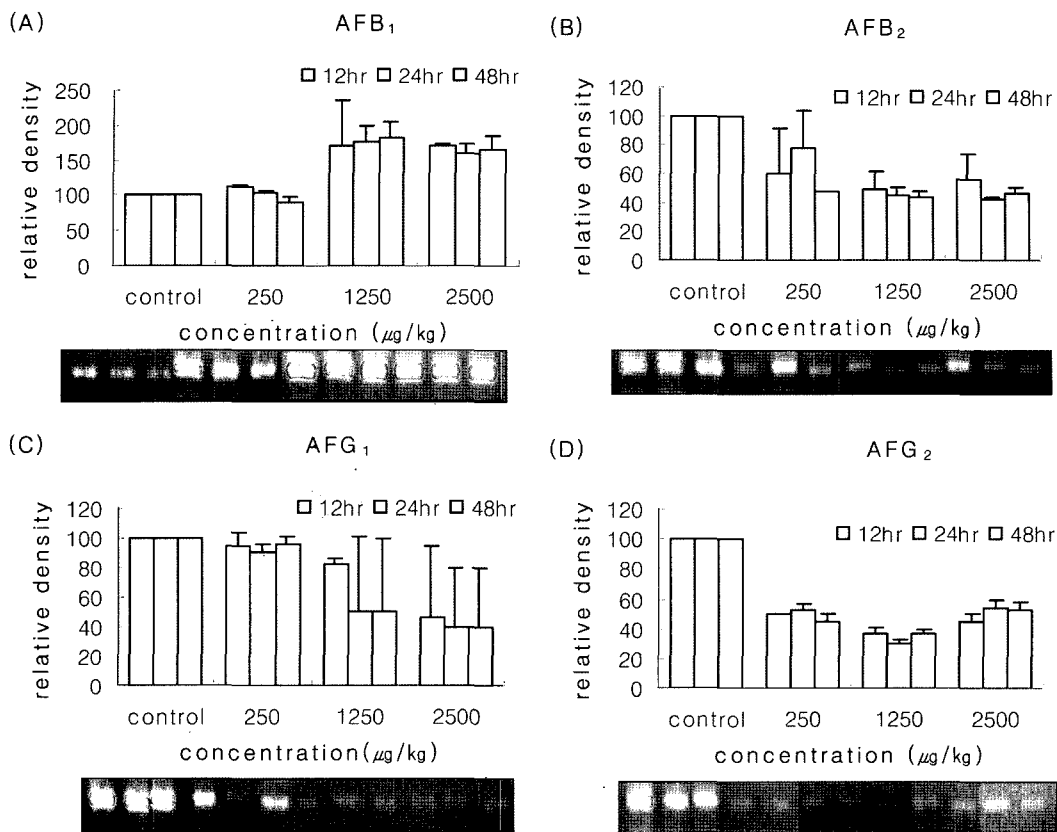


Fig. 3. The expression of *ras* mRNA in the liver of rats treated with aflatoxin B₁(A), aflatoxin B₂(B), aflatoxin G₁(C), and aflatoxin G₂(D).

Ras 발암유전자 발현의 변화

AFB₁ 중농도(1250 μg/kg) 및 고농도(2500 μg/kg) 투여군에서 *ras* oncogene의 발현이 대조군의 약 두 배 정도의 수준으로 증가하였다(Fig. 3). 중농도 투여군과 고농도 투여군 간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 중농도와 고농도 AFB₁ 투여군의 경우 투여 후 48시간까지 mRNA가 높게 유지되었으며 경시별로 뚜렷한 차이는 보이지 않았다(Fig. 3). AFB₁ 투여군을 제외한 AFB₂, G₁, G₂ 투여군은 전 용량에서 *ras* oncogene 발현정도가 오히려 대조군 보다 낮게 나타났다. 경시별 양상이나 농도별 양상도 일정한 형태를 나타내지 않았다(Fig. 3). AFB₁ 중농도와 고농도를 단회 투여한 후 *ras* oncogene의 활성이 투여 24시간까지 지속되었으며 이는 정상 간세포의 조기 발암과정에 중요하게 작용할 것으로 생각된다. 그러나 중농도 투여군과 고농도 투여군간에 유의한 차이가 보이지 않는 것으로 보아 어느 정도 이상의 용량에서는 *ras* oncogene의 활성이 더 이상 증가되지는 않는 것으로 보인다. 투여 후 12시간 이전에 이미 *ras* mRNA가 증가하기 시작한 것으로 보이며 다시 정상 수준으로 감소되는지의 여부와 그 시간은 알 수 없었다. 또한 이러한 *ras* oncogene

activation이 mutation의 결과인지는 알 수 없으므로, 이에 대한 추가적 실험으로 확인해 볼 필요가 있다. AFB₁을 제외한 AFB₂, G₁, G₂ 투여군은 *ras* oncogene이 일정한 양상을 나타내지 않았으므로 그들 간의 정확한 상대적 독성을 평가에는 어려움이 있었다. 한편, Kim *et al.*(2004)은 4주간 저농도(10, 50, 250 μg/kg)에서 AFB₁, AFB₂ 및 AFG₁의 반복투여는 용량 의존적이지는 않았지만 *ras*의 증가된 발현을 보였다고 보고하였으나, 본 연구에서의 단회 투여에 의한 변화와는 다른 양상을 보였다(Kim *et al.*, 2004). 따라서 이러한 *ras* 발현 지표로는 용량 반응관계 설정이 어려우며 아플라톡신의 발암예측인자로서의 사용에 제한적일 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서 SD 랫드에서 AFB₁, B₂, G₁ 및 G₂를 각각 250, 1250, 2500 μg/kg 체중의 용량으로 투여한 후 12, 24, 48시간에 부검하여 DNA adduct인 8-OxodG의 생성 및 *ras*의 발현을 측정된 결과 AFB₁ 단회 투여에 의해 8-OxodG의 DNA adduct 형성은 초기 24시간까지 용량 의존적으로 높게 나타났으나 AFB₂, AFG₁ 및 AFG₂의 경우는 대조군과 차이가 없었으며 *ras*의 경우는 AFB₁의 경우만이 1250 및 2500 μg/kg 농도에서만

증가된 수치를 보였다. 이러한 결과로서 AFB₁을 제외한 다른 아플라톡신의 독성 평가에는 더욱 민감성이 있는 다른 생체지표의 이용이 요구되며, 또한 이러한 생체지표로는 아플라톡신 B₁, B₂, G₁ 및 G₂의 상대독성치를 구할 수가 없었다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 식품의약품안전청 국립독성연구원 에서 시행한 국가독성관리체계를 위한 용역연구개발사업 의 연구결과입니다.

참고문헌

- Allameh, A., Farahani, M. and Zarghi, A. (2000): Kinetic studies of aflatoxin B₁-glutathione conjugate formation in liver and kidney of adult and weanling rats. *Mech. Ageing. Dev.*, **115**, 73-83.
- Busby, W.F. Jr. and Wogan, G.N. (1984): Chemical Carcinogens (Searle, C. ed.) pp. 945-1136, Am. Chem. Soc., Washington, DC.
- Chao, H.K., Tsai, T.F., Lin, C.S. and Su, T.S. (1999): 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.*, **26**, 69-73.
- Chen, S.Y., Chen, C.J., Tsai, W.Y., Ahsan, H., Liu, T.Y., Lin, J.T. and Santella, R.M. (2000): Associations of plasma aflatoxin B₁-albumin adduct level with plasma selenium level and genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M₁ and T₁. *Nutr. Cancer*, **38**, 179-185.
- Croy, R.G. and Wogan, G.N. (1981): Temporal patterns of covalent DNA adducts in rat liver after single and multiple doses of aflatoxin B₁. *Cancer Res.*, **41**, 197-203.
- Croy, R.G., Essigmann, J.M., Reinhold, V.N. and Wogan G.N. (1978): Identification of the principal aflatoxin B₁-DNA adduct formed *in vivo* in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **75**, 1745-1749.
- Donnelly, P.J. and Massey, T.E. (1999): Ki-*ras* activation in lung cells isolated from AC3F1 (A/J×C3H/HeJ) mice after treatment with aflatoxin B₁. *Mol. Carcinog.*, **26**, 62-67.
- Gallagher, E.P., Kunze, K.L., Stapleton, P.L. and Eaton, D.L. (1996): The kinetics of aflatoxin B₁ oxidation by human cDNA-expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **141**, 595-606.
- Guengerich, F.P., Johnson, W.W., Ueng, Y.F., Yamazaki, H. and Shimada, T. (1996): 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.*, **104**, 557-562.
- Hall, A.J. and Wild, C.P. (1994): Epidemiology of aflatoxin related disease. *In The Toxicology of Aflatoxins. Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance.* p 233, Academic Press, New York.
- Kasai, H. (1997): Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **387**, 147-163.
- Kim, D.J., Lee, B.J., Kim, T.M., Lee, S.J., Nam, S.Y., Hong, J.T., Park, C.B., Kim, C.K., Kan, J.K. and Yun, Y.W. (2004): Expression of CYP450 1A1, p53, and *ras* in the rat liver treated with aflatoxins for four weeks. *Kr. J. Lab. Ani. Sci.*, **20**, 398-408.
- Lee, B.J., Lee, S.J., Kim, T.M., Kim, D.J., Nam, S.Y., Hyun, S.H., Kang, J.K., Hong, J.T., Kim, C.K. and Yun, Y.W. (2004): CYP450 1A1 and p53 expression and DNA adduct formation in the liver of rats treated with a single dose of aflatoxins. *Kr. J. Vet. Res.*, **44**, 507-513.
- Lin, J.K., Miller, J.A. and Miller, E.C. (1977): 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.*, **37**, 4430-4438.
- McMahon, G., Hanson, L., Lee, J.J. and Wogan, G.N. (1986): Identification of an activated c-Ki-*ras* oncogene in rat liver tumors induced by aflatoxin B₁. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9418-9422.
- Otteneider, M. and Lutz, W.K. (1999): Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts. *Mutat. Res.*, **424**, 237-247.
- Peers, F., Bosch, X., Kaldor J., Linsell, A. and Pluijmen, M. (1987): Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland. *Int. J. Cancer*, **39**, 545-553.
- Riley, J., Mandel, H.G., Sinha, S., Judah, D.J. and Neal, G.E. (1997): *In vitro* activation of the human Ha-*ras* proto-oncogene by aflatoxin B₁. *Carcinogenesis*, **18**, 905-910.
- Shen, H.M., Ong, C.N., Lee, B.L. and Shi, C.Y. (1995): Aflatoxin B₁-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. *Carcinogenesis*, **16**, 419-422.
- 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. (2001): Role of genetic polymorphism of glutathione-S-transferase T1 and microsomal epoxide hydrolase in aflatoxin-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **10**, 785-791.
- Ueng, Y.F., Shimada, T., Yamazaki, H. and Guengerich, F.P. (1995): Oxidation of aflatoxin B₁ by bacterial recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 218-225.
- Wild, C.P. and Turner, P.C. (2002): The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, **17**, 471-481.
- Wogan, G.N. and Newberne, P.M. (1969): Dose-response characteristics of aflatoxin B₁ Carcinogenesis in the rat. *Cancer Res.*, **27**, 2370-2376.