

대두 함유 방사선 조사식품을 섭취한 Mouse의 산화적 스트레스*

박선영** · 서대영** · 서광선*** · 이선영**§

충남대학교 생활과학대학 식품영양학과, ** 충남대학교 의과대학 병리학교실***

Oxidative Stress of Mouse Fed with γ -Irradiated Soybean Diet*

Park, Sun Young** · Seo, Dae Young** · Suh, Kwang Sun*** · Ly, Sun Yung**§

Department of Food and Nutrition, ** Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Department of Pathology, *** Chungnam National University, School of Medicine, Daejeon 301-721, Korea

ABSTRACT

Food irradiation has been steadily increased in many countries concomitantly with increasing international trades. Harmful contaminants naturally occurred from foods which contain high levels of unsaturated fatty acids that are easily oxidized can affect the human anti-oxidation system through the generation of free radicals. Moreover, previous studies proved that γ -irradiation may cause production of free radicals in food. We investigated the effect of γ -irradiated soybeans in relation to oxidative stress in mice. Oxidative index of mice was evaluated by TBARS, DNA fragmentation in various organs such as blood lymphocytes, liver and kidney. Forty male ICR mice were equally divided into 4 groups and fed control diet or γ -irradiated diet containing 50% soybeans (5, 10, and 20 kGy, respectively) for 8 weeks. Peroxide values of the irradiated diets were higher than that of the non-irradiated one and increased according to the storage period. There was no significant difference in weight gain as well as in TBARS value in plasma and kidney of all groups. Liver TBARS value of the group fed with irradiated diet at 20 kGy increased significantly compared with the control group ($p < 0.05$). DNA oxidative damage as measured by alkaline comet assay showed that % tail DNA in the blood lymphocytes of 5 kGy and 10 kGy groups increased significantly over the control group ($p < 0.05$). Also, tail moments of 5 kGy and 10 kGy groups were higher than that of the control group. Ultrastructural examination shows myeline figures and swollen mitochondria in parietal and intestinal epithelial cells of the group fed with irradiated diet. Therefore, considering unsaturated fatty acid content, consumption of soybeans γ -irradiated with over 20 kGy or repeatedly may decrease the body's antioxidant mechanism. (*Korean J Nutrition* 40(2): 138~146, 2007)

KEY WORDS : gamma irradiation, DNA damage, alkaline comet assay, cell damage.

서 론

방사선 조사는 식품의 유통기한을 늘려 장기 보존을 가능하게 하며 식품의 물성에 미치는 일부의 긍정적인 효과로 인하여 적극적으로 검토되어 온 식품 처리방법이다. 또한 방사선 조사를 식품에 적용함으로써 얻어지는 다양한 유익과 이에 대한 국가적 또는 국제적 장려에 힘입어 식품의 방사선 조사는 증가 추세에 있다.¹⁻³⁾ 그러나 방사선 조

사는 조사 조건과 조사 후 저장 방법에 따라 식품에 free radical을 형성시키고 불포화 지방의 산패를 일으키는 등 산화적인 변화를 가져올 수 있고 vitamin류의 파괴와 지질 성상의 변화는 생체막의 lipid peroxide의 생성에 의한 세포파괴를 초래할 수도 있다.^{4,5)} 따라서 방사선 조사 식품의 유통량과 소비가 지속적으로 늘어나고 있는 현 시점에서 방사선 조사식품의 영양학적인 검토가 필요하게 되었다.

방사선 조사 식품의 영양학적 타당성에 대하여 국외에서는 1970년대 이후, 주로 고선량 조사의 효과에 대한 연구들이 이루어져 왔으며 1950년 이후부터 1980년대에 이르기까지 고선량으로 방사선 조사된 육류나 기름, 고지방의 생선류, 사료 등을 대상으로 한 연구에서도 독성효과는 거의 없는 것으로 보고되어 왔다.⁶⁻⁹⁾ 그러나 소수의 연구에서는 식품의 방사선 조사가 생체에 유해한 영향을 줄 수도 있음을 보고하고 있는데 그 범위는 단순한 체중 감소¹⁰⁾나

접수일 : 2007년 1월 10일

채택일 : 2007년 2월 12일

*This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government(MOEHRD) (R04-2003-000-10042-0).

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : sunly@cnu.ac.kr

효소 활성의 변화¹¹⁾ 등 가벼운 것에서부터 과다출혈로 인한 사망¹²⁾에 이르기까지 다양하다. 방사선 조사식품의 안전성에 대한 실험동물 대상 연구들 중 1960~1970년대에 이행된 것들은 주로 생체의 번식력과 수명, 기형발생 등에 대한 것들이었으며 1980년대 이후는 주로 돌연변이 유발성에 대한 결과들이 발표되었다.¹³⁾ 그러나 이러한 연구 결과들 중 방사선 조사식품이 생체 조직에 대한 병리적 현상을 유발하였다는 결과들이 많지 않았으므로 free radical이 다량으로 발생하는 조사식품 조차 생체에 심각한 영향을 미치지 않는 것으로 보고되어 왔다.

현재 국제기구 (FAO, IAEA, CODEX)나 국내 식품공전에 허가되어 있는 방사선 조사 허가 내용은 저선량으로 국한되어 있고 국내에서는 건조식육 및 어패류 분말을 제외하고 아직 축육수산물에 대한 허가는 되어 있지 않다. 그러나 최근 단체급식에서 식중독 사고가 빈번해지면서 국내에서도 축육수산물에 대한 방사선 조사 허가를 위한 노력이 이어지고 있다. 방사선 조사는 비교적 높은 선량에서도 조사여부에 대한 육안이나 관능평가적 판별이 어렵고 조사에 따른 식품의 보존성이 우수하므로 식품생산자 및 업체 측에서는 매우 유리한 측면이 있다. 반면, 소비자 단체에서는 단체급식의 위생관련 문제를 근본적으로 해결하지 않고 안전성이 완전히 입증되어 있지 않은 방사선 조사로 대처하려는 움직임에 대해 강하게 저항하고 있다.

식품 중 농산물로서 대두와 참깨, 들깨 등의 고불포화지방산 식품과 이들의 가공식품은 수확 후 건조 및 유통과정에서 해충과 미생물의 오염 가능성이 높으므로¹⁴⁾ 위생적 품질개선을 위하여 방사선 조사의 필요성이 거론되고 있으므로 이들 수입농산물의 방사선 조사 가능성을 완전히 배제하기는 어렵다. 국내 유통 농산물의 주요 수입국인 중국의 조사시설은 공식적으로 보고된 것보다 10배 이상 많은 것으로 알려져 있으며 이들 시설에서 조사된 식품의 국제교역량은 수십만 톤에 이르나 공개되어 있지 않으므로¹⁵⁾ 정확한 자료를 얻기가 힘든 상황이다. 중국으로부터의 대두 수입량은 미국 다음으로 많은 것으로 보고되어 있으나¹⁵⁾ 수입되어 오는 식품의 방사선 표시규정이 잘 운영되고 있지 않다. 방사선 조사는 식품별로 조사선량이 제한되어 있고 특히 이미 조사된 식품을 재조사하는 것은 금지되어 있으므로 이에 대한 국가의 관리가 철저히 이루어져야 하나 일부 국가들의 관리 체계는 매우 허술하며 국내의 수입식품에 대한 감시 기능도 미약하다.

본 연구에서는 위에 기술한 바와 같이 여러 가지 이유로 고 불포화지방산 함유 사료의 방사선 조사로 인하여 생성된 free radical과 이로 인해 생성될 수 있는 분해 산물이 생

체에 주입되었을 때 소화기관과 각 장기에 미칠 수 있는 산화적 스트레스의 영향을 알아보고자 TBARS, 조직병리 및 DNA손상 검사를 통하여 검토하였다.

연구 방법

1. 실험 재료

1) 실험동물

체중이 25~29 g인 4주령 ICR mouse 40마리를 중앙실험동물센터로부터 구입하여 온도 23 ± 2°C, 습도 50 ± 5%, dark/light (12시간) 조건의 사육실에서 직접 제조한 분말 사료를 급여하면서 1주간 적응시켰다. 이후 네 군의 평균 체중이 비슷하게 임의로 10마리씩 나누어 폴리카보네이트 케이지에 두 마리씩 넣고 물과 사료 섭취를 제한하지 않고 8주간 사육하였다.

2) 실험식이

실험 식이는 AIN93M diet를 기본으로 하였으며 대두분말은 Table 1과 같이 배합하여 분말 사료를 제조하였다. 실험식이 중 불포화지방산의 급원이 되는 대두분과 방사선 조사로 인하여 변화가 있을 수 있는 비타민과 미네랄의 혼합물을 미리 혼합하여 이 중 1/4은 대조군 사료 재료로 사용하고 나머지는 동량으로 3개로 나누어 합기 포장한 후 각각 5, 10, 20 kGy로 조사하였다. 방사선 조사는 한국원자력연구소의 100,000 Ci Co-60 감마선 조사시설 (AECL IR-79, Canada)을 이용하여 상온에서 8.3 Gy/min의 선량을 조사하였다. 이후 각각의 사료에 탄수화물, 단백질을 정량으로 첨가하여 실험사료를 완성하였다. 실험 사료의 모든 재료를 섞어 조사할 경우 조사 분량이 많아져 본 실험에 사용할 식이 총량의 단회 방사선 조사가 어려웠으므로 방사선 흡수조건을 일정하게 유지하고자 위와 같은 방법으로 단회 조사하였다. 완성한 식이는 진공, 밀봉 포장하여 -20°C 냉동고에 보관하였다가 사용하였으며 실험기간 중 사료는 매일 공급하였다.

2. 실험 방법

1) 시료수집

대두 함유 방사선 조사 식이를 섭취한 8주 후에 쥐를 희생하여 시료를 수집하였으며 희생시키기 전 날 12~16시간 동안 절식 시킨 후 ethyl ether로 마취한 후 헤파린 처리한 주사기를 이용하여 심장에서 전혈을 취하였다. 혈액의 일부는 comet assay에 이용하고 나머지 혈액은 4°C에서 30분 방치 후 2,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈장을

Table 1. Composition of the experimental soybean diet¹⁾ (% of diet)

Ingredient	%
Corn starch	30.1
Soybean powder	50.0
Sucrose	10.0
Soybean oil	0.0
Cellulose	5.0
Mineral MIX (AIN-93M-MX ²⁾)	3.5
Vitamin MIX (AIN-93M-VX ³⁾)	1.0
Choline bitartrate	0.25
L-cystine	0.18
TBHQ (antioxidant)	0.0008
Total	100

1) C : F : P ratio = 58.03 : 21.92 : 20.05

2) AIN-93M-MX composition (%): Calcium Carbonate (35.70), Potassium phosphate monobasic (25.00), Potassium Citrate: monohydrate (2.80), Sodium Chloride (7.40), Potassium Sulfate (4.66), Magnesium Oxide (2.43), Ferric Citrate (0.606), Zinc Carbonate (0.165), Manganous Carbonate (0.063), Cupric Carbonate (0.031), Potassium Iodate (0.001), Sodium Selenate (0.001), Ammonium Paramolybdate (0.001), Sodium Meta-silicate (0.145), Chromium Potassium Sulfate (0.028), Lithium Chloride (0.002), Boric Acid (0.008), Sodium Fluoride (0.006), Nickel Carbonate: hydroxide tetrahydrate (0.003), Ammonium Vanadate (0.001), Sucrose finely ground (20.95)

3) AIN-93M-VX composition (%): Nicotinic Acid (0.30), Calcium Pantothenate (0.16), Pyridoxine HCl (0.07), Thiamin HC (0.06), Riboflavin (0.06), Folic Acid (0.02), D-Biotin (0.002), Vitamin B₁₂: 0.1% in mannitol (0.25), DL-Alpha Tocopheryl Acetate: 500 IU/g (1.50), Vitamin A Palmitate: 500,000 IU/g (0.08), Vitamin D₃ 50,000 IU/g (0.02), Vitamin K (0.007), Sucrose finely ground (97.47)

취해 분리한 후 지질과산화물의 측정을 위해 분석 전까지 -70°C에 냉동 보관하였다. 심장 채혈 후 바로 개방하여 간을 취해 4°C 생리 식염수로 혈액을 씻어 흡습지로 수분을 제거한 후 전체 무게를 측정하였다. 우엽 가장 바깥부분에서 100 mg을 취하여 다시 한 번 식염수로 세척한 후 세절하여 comet assay에 이용하기 위하여 homogenize buffer (0.075M NaCl, 0.024M Na₂EDTA, 10% DMSO: pH 7.5)에 넣어 얼음에 보관하였다. 우엽의 일정 부분에서 새로 300 mg을 취하여 혈액을 제거한 후 질소 가스를 충전하여 분석 시까지 -70°C에 보관하였다가 지질과산화물 (TBA)의 측정에 사용하였다.

신장은 perirenal fat과 fibrous capsule을 제거한 후 좌, 우 각각의 무게를 측정하고, 좌측 신장 100 mg을 취하여 comet assay에 사용하였으며 좌측 신장의 나머지는 식염수로 다시 한 번 혈액을 제거하고 질소 가스를 충전하여 -70°C에 보관하였다가 지질과산화물 (TBA)의 측정에 사용하였다.

세포의 전자현미경 관찰을 위하여 위장 조직으로 위체부에서 사방 5 mm 정도를 취하였으며 소장은 장막 외부의 지방을 제거하고 4°C 생리 식염수로 세척한 후 회장 말단을 3 mm 정도 취하여 각각을 electron microscope (EM) 측정용 용액에 넣어 냉장 보관하였다. 나머지 소장 모두를 취하여 펼친 후 점막을 긁어 0°C 10 mM sodium phosphate buffer에서 균질화하고 질소 가스를 충전하여 분석 전까지 -70°C에 보관하였다가 지질과산화물의 측정을 위해 사용하였다.

2) 사료의 Peroxide value (POV) 측정

사료의 과산화물가 측정은 Yagi법¹⁶⁾에 따라 측정하였다. 즉, 사료의 지방 성분을 chloroform-acetic acid 25 ml (2 : 3, v/v)로 녹이고 질소 가스로 치환한 혐기적인 조건하에서 KI 포화용액과 반응시킨 후 1% 전분시액 1 ml을 첨가하여 0.01N Na₂S₂O₃ 용액으로 I₂를 역적정하였다. 대조군과 실험군 사료의 조사 전과 조사 직후의 POV값을 측정하였고 사료를 냉동보관하면서 조사 직후, 2주, 4주, 6주, 11주 후에 측정하였다. 실험식이의 POV 측정은 실제 동물들이 섭취하는 사료의 조건과 동일하게 하기 위해 사육실 조건에서 24시간 동안 방치시킨 후 측정에 이용하였다.

3) 혈청과 조직에서의 과산화지질 측정

혈장, 간, 신장, 소장점막의 지질과산화물은 전보¹⁷⁾에 기술한대로 thiobarbituric acid (TBA) 방법^{18,19)}을 이용하여 측정하였다.

4) DNA fragmentation 측정

DNA 손상정도를 측정하는 여러 가지 방법 중 Singh 등의 방법²⁰⁾과 Sasaki 등,²¹⁾ Vasquez & Tice²²⁾의 방법을 참고하여 혈액림프구와 간, 신장 조직에서 alkaline comet assay를 실시하였다. 희생시 100 mg씩 취한 간과 신장은 세절하여 4 ml의 homogenizing buffer (0.075M NaCl, 0.024M Na₂EDTA, 10% DMSO, pH 7.5)에서 tissue homogenizer (EYELA, Japan)를 이용하여 600 rpm에서 균질화하였다. 이 용액을 4°C 1,680 rpm에서 10분간 원심분리한 후 침전물에 다시 3 ml의 homogenizing buffer를 넣고 한 번 더 균질화한 조직액을 시료로 사용하였다. Heparin 처리된 전혈은 lysis과정을 통해 적혈구를 제거하고 나머지 혈구를 취하여 comet assay를 실시하였다. Slide 제작은 전보¹⁷⁾에 기술한 방법에 따라 실시하였으며 제작된 slide를 공기 중에서 건조시킨 후 75 µl의 ethidium bromide (20 µg/ml)로 염색하였다. CCD camera (Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 Komet 4.0 comet im-

age analysis software (Kinetic imaging Ltd., UK)을 사용하여 분석하였다. DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA파편의 거리 (tail length, TL)와 tail 내의 DNA 파편 함량 (%), 그리고 tail 길이와 tail내 DNA 파편 (fragment)의 곱으로 표시한 tail moment (TM)로 나타내었으며, TL 및 TM 값이 증가할수록 DNA 손상도가 높음을 의미한다. 각 시료마다 준비된 2개의 slide에서 각각 50개씩 총 100개의 세포핵을 무작위로 선택하여 측정하였다.

5) 위장 및 소장 점막의 전자현미경 소견 조직검사

실험동물의 희생직후 절취한 위체부의 조직과 회장 말단의 조직을 1 mm³ 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde (in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4) 용액과 1% osmic tetraoxide (OsO₄) 용액에 각각 고정시킨 후 고정된 시료를 50~100% ethyl alcohol의 농도 순으로 탈수하고 propylene oxide로 치환한 뒤 propylene oxide와 epon 혼합액에 침투시켰다. 그 후 epon 혼합액으로 포매 (embedding)한 후 35°C, 45°C, 60°C의 항온조에서 각각 24시간씩 방치시켜 중합을 완료하였다. 포매된 소장조직은 초박 절편기 (ultramicrotome, RMC-MT-XL)를 이용하여 1 μm의 준초박절편 (semi-thin section)을 만들어 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 검경부위를 결정하였다. 결정된 시료는 다시 50~60 nm 두께로 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자 염색한 후 전자현미경 (Hitachi H-600, Japan)으로 관찰하였다.

3. 통계처리

실험결과는 SPSS/windows version 11.0을 이용하여 통계처리 하였고 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 각 그룹간의 평균치 차이에 대한 유의성은 일원배치 분산 분석 (one-way ANOVA) 후, Duncan's multiple range test를 이용하여 검증하였다. 모든 통계적인 유의성은 α = 0.05 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 사료의 Peroxide value(POV)

사료의 조사전과 조사 직후, 조사 후 저장기간에 따른 각각의 POV값을 Table 2에 제시하였다. 조사전 0.00 meq/kg diet에서 5, 10, 20 kGy의 선량으로 조사 직후 각각 0.20 meq/kg diet, 0.20 meq/kg diet, 0.60 meq/kg diet로 20 kGy에서 높은 값을 보였다. 대조군 사료의 POV값은 저장 2주 후 0.20 meq/kg diet로 조사전보다 소폭으로 증가하였다가 저장 4주 후 0.00 meq/kg diet으로 감소하

Table 2. Comparison of peroxide value of the control and irradiated soybean diets during storage period¹⁾

Storage period (week)	Peroxide values (meq/kg diet)			
	Control	Irradiation doses (kGy)		
		5	10	20
0	0.00	0.20	0.20	0.60
2	0.20	0.40	0.60	1.53
4	0.00	0.27	0.93	2.07
6	0.67	1.20	9.60	12.27
11	1.10	1.10	1.60	2.10

1) Each value is the average of triplicate determinations

였고 6주 이후 0.67 meq/kg diet으로 꾸준한, 그러나 소폭으로 증가하였다. 이에 반하여 5, 10, 20 kGy로 방사선 조사한 사료의 POV값은 대조군에 비하여 큰 폭으로 증가하여 2주, 4주째에는 선량에 비례하여 증가하였으며 6주째에는 20 kGy에서 조사된 사료의 POV값이 12.27 meq/kg diet으로 가장 높게 나타났다. 이 같은 결과로 방사선 조사를 하지 않은 사료의 과산화물가에 비해 조사된 사료의 과산화물가가 선량에 비례하여 높게 나타나고 저장기간에 따라 꾸준히 증가하여 방사선 조사가 사료의 지질과산화물 형성을 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 전보¹⁷⁾에서 고등어와 함께 등을 혼합한 사료에 비하여 POV값은 현저하게 낮아 불포화지방산의 조성에 따라 방사선 조사 후의 지질과산화물 생성 정도가 다르게 나타나고 있었다. 방사선 조사 후 11주가 지난 후에는 POV 값이 대조군 수준으로 감소하였으며 방사선 조사선량에 따른 차이도 보이지 않았다.

2. 체중 증가 및 장기 무게

각 군의 실험 기간 동안 주령별 체중 증가량과 희생 시 장기 무게 (mg/g BW)는 Table 3에 제시하였다. 체중은 주령에 따라 증가하였으며 4주까지는 군 간의 차이를 보이지 않다가 8주령에서 방사선 조사사료를 섭취한 군들의 체중이 대조군에 비하여 감소하였다. 사료의 방사선 조사선량이 높을수록 체중은 감소하여 20 kGy에서 가장 낮은 값을 보여주었다. 그러나 시험 종료 후 간, 신장 등의 장기 무게는 각 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

본 연구에서 사료의 단백질 급원은 모두 대두단백질로 단백질가는 높지 않았으나 전보¹⁷⁾에서 고등어분과 카제인을 혼합한 사료를 섭취시키면서 동일한 조건에서 사육한 mouse들에 비하여 체중이나 장기 무게가 적지 않았으므로 사료의 성분과 조성의 차이로 인한 성장장애는 거의 없었던 것을 알 수 있다. 그러나 전보¹⁷⁾에서 동물성 단백질 급원 사료를 방사선 조사하여 동물에 급여하였을 때 비조사 사료

군에 비하여 성장률에 차이가 없었던 반면, 단백질의 급원이 모두 대두단백이었던 본 연구에서는 사료의 방사선 조사선량이 높을수록 증체량이 적었다. 다양한 동물 종들에게 방사선 조사 처리된 사료를 먹인 후 성장률을 관찰하였던 Eggum²³⁾은 70 kGy이상의 고선량으로 방사선 조사된 사료 내 단백질의 소화율과 생물가가 변함이 없었다고 하여 본 연구 결과와는 일치하지 않는 결과를 제시하였다.

3. 혈장과 조직에서의 지질과산화

방사선 조사된 사료가 mouse의 체내에서 지질과산화를 일으키는 정도를 조사선량에 따라 비교하기 위해 0, 5, 10, 20 kGy로 조사하여 4주 동안 섭취시킨 후 혈장, 간, 신장 및 소장점막에서 각각 TBA값을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 간 조직에서 비조사군 (대조군)의 TBA가인 9.18 nmole/mg protein 보다 10 kGy 조사군과 20 kGy 조사군의 TBA가 각각 10.34 nmole/mg protein과 15.57 nmole/mg protein으로 높았으나 ($p < 0.05$) 혈장과 다른 조직에서는 군간에 유의적인 차이를 볼 수 없었다. 방사선 조사 사료의 POV가 상대적으로 높았던 전보¹⁷⁾에서는 혈장과 신장, 소장점막의 TBA가 본 연구의 결과에 비하여 높았다. 그러나 간조직에 있어서는 대조군의 TBA가 차이가 없는 반면 방사선 조사선량이 높은 사료를 섭취한 군들의 TBA가 유의적으로 증가하고 있어 간세포에 산화적 스트레스가 가해졌을 가능성을 보여주고 있었다. 방사선 조사는 식품의 저장기간을 높이는 장점이 있으나 방사

선 에너지를 흡수한 식품에 free radical을 다량 생성하게 하고, 이는 식품의 불포화지방산과 반응하여 자동산화과정에 의하여 지질과산화를 일으키므로 관능적인 품질을 저하시키고 식품의 항산화영양소 함량에도 영향을 주게 된다.²⁴⁾ 생체 내 지질, 단백질 등 주요 물질의 변성 및 파괴의 원인 중 활성산소와 관련된 free radical 이론이 많이 논의되는데^{25,26)} 이러한 free radical에 의해 일어나는 여러 가지 생체 내 반응에는 세포 또는 세포 소기관의 막 지질 과산화에 의한 microsome, mitochondria 등의 소기관 손상, 효소 단백질 중의 아미노산 잔기의 산화를 통한 비가역적 불활성화, 핵산염기의 변형 및 산화적 분해 절단을 통한 손상, 생체 내로 침입한 병원체에 대한 대식구의 방어과정에서 생겨나는 주위조직의 손상, 그리고 DNA 손상에 의한 세포의 암화 (carcinogenesis) 등이 있다.²⁰⁾

4. DNA 손상

방사선 조사된 대두를 함유한 사료를 8주 동안 섭취한 mouse의 혈액 림프구와 간, 신장 조직의 단일 세포에서 DNA fragmentation의 양상을 관찰한 결과를 Table 5에 기술하였다. 혈액 림프구의 tail내 DNA%는 대조군 ($18.01 \pm 2.5\%$)에 비하여 5 kGy와 10 kGy로 조사한 사료를 섭취한 군에서 각각 $20.79 \pm 2.5\%$ 와 $22.40 \pm 1.6\%$ 로 증가하였고 ($p < 0.01$) tail length (TL) 대조군에 비하여 20 kGy 조사군에서 오히려 감소하였으나 tail moment (TM) 값은 10 kGy 조사군 (7.24 ± 0.4)이 대조군 (5.73 ± 0.8)에 비

Table 3. Body and organ weights of the mouse fed gamma irradiated soybean diet

Irradiation dose (kGy)	Body weight (g)			Liver (mg/g BW)	Kidney (mg/g BW)
	2 wks	4 wks	8 wks		
0	31.99 ± 1.7 ¹⁾	33.43 ± 3.0	40.41 ± 3.5 ^{2a)}	40.82 ± 4.4	13.48 ± 1.4
5	31.82 ± 1.5	32.07 ± 2.0	39.71 ± 3.2 ^{2b)}	41.50 ± 4.8	13.35 ± 0.9
10	30.86 ± 1.8	30.97 ± 3.5	36.47 ± 4.9 ^{2c)}	39.23 ± 3.6	12.71 ± 2.0
20	30.71 ± 1.8	31.72 ± 3.7	35.69 ± 4.0 ^{c)}	38.78 ± 5.4	13.21 ± 1.1

1) Mean ± S.D

2) Different superscripts indicate significant difference between groups by Duncan's multiple range test

Table 4. Mean TBA values (nmole/mg protein) in plasma, liver, kidney and intestinal mucosa of mouse fed with irradiated soybean diets

Tissue	Control	Irradiation dose (kGy)			p-value
		5	10	20	
Plasma (μmole/ml)	34.4 ± 12.6 ¹⁾	25.6 ± 12.8	22.2 ± 9.3	25.5 ± 10.5	0.117
Liver	9.2 ± 2.9 ^{2a)}	8.4 ± 1.9 ^{c)}	10.3 ± 4.2 ^{c)}	15.6 ± 7.5 ^{b)}	0.006
Kidney	2.9 ± 1.3	2.7 ± 1.1	2.6 ± 0.7	2.8 ± 0.9	0.928
Intestinal mucosa	0.89 ± 0.3	0.89 ± 0.1	0.82 ± 0.4	0.84 ± 0.7	0.973

1) Mean ± S.D

2) Different superscripts indicate significant difference between groups by Duncan's multiple range test

Table 5. DNA damage between the control and irradiation groups for soybean diet

Tissue		Control	Irradiation dose (kGy)			p-value
			5	10	20	
Blood lymphocytes	Tail DNA (%)	18.0 ± 2.5 ^{1)a2)}	20.8 ± 2.5 ^b	22.4 ± 1.6 ^b	20.2 ± 3.0 ^{ab}	0.005
	Tail length (μm)	55.3 ± 7.0 ^b	54.8 ± 5.2 ^b	52.7 ± 2.5 ^{ab}	47.9 ± 5.5 ^a	0.001
	Tail moment	5.7 ± 0.8 ^a	6.5 ± 0.7 ^{ab}	7.2 ± 0.4 ^b	5.6 ± 1.4 ^a	0.016
Liver	Tail DNA (%)	23.4 ± 6.4	24.1 ± 5.4	21.7 ± 2.7	23.3 ± 5.0	0.755
	Tail length (μm)	51.6 ± 10.8	52.7 ± 7.2	50.1 ± 3.8	49.6 ± 6.1	0.776
	Tail moment	6.9 ± 2.3	7.2 ± 2.0	6.6 ± 0.9	7.3 ± 1.6	0.815
Kidney	Tail DNA (%)	33.1 ± 3.9	30.7 ± 3.6	31.3 ± 3.5	29.3 ± 2.4	0.102
	Tail length (μm)	44.5 ± 4.7	43.4 ± 2.7	43.9 ± 4.2	41.9 ± 2.7	0.439
	Tail moment	11.3 ± 1.5	11.0 ± 0.9	11.0 ± 0.8	10.6 ± 0.9	0.505

1) Mean ± SD

2) Different superscripts indicate significant difference between groups by Duncan's multiple range test

하여 높았다. 5~20 kGy의 선량으로 방사선 조사한 사료를 8주간 섭취한 mouse의 림프구에서 DNA 손상정도를 측정하는 Seo 등의 연구¹⁷⁾에서는 tail내 DNA%는 20 kGy 조사군에서, TL은 10kGy 이상의 조사군에서, 그리고 TM 값은 5 kGy 이상의 조사군에서 유의적인 증가를 보였으나 본 실험의 결과는 이에 비하여 일관성이 떨어지고 그 정도도 미약한 것으로 나타나고 있다. 이는 앞서 기술한 바와 같이 사료의 지방급원이 다르기 때문으로 볼 수 있다. Wills²⁷⁾는 방사선 조사시 식물성 지방보다는 불포화도가 큰 C20 : 4, C20 : 5, C22 : 6과 같은 고불포화지방산을 많이 함유한 청어기름이 지질과산화도를 더 크게 일으킨다고 보고하였다. 이러한 사실을 입증하듯 8주간의 조사사료 섭취 후 본 연구의 결과는 전보¹⁷⁾의 결과에 비하여 전반적으로 tail moment 값이 작아 상대적으로 산화적 스트레스가 적었음을 보여주고 있다. 이러한 결과는 방사선 조사 후 저장기간 동안 사료의 POV 값에서도 예측하였던 결과이다. 한편, 간과 신장조직에서는 tail 내 DNA% 및 TM 수치 모두에서 유의적인 차이가 없었다. Seo 등¹⁷⁾의 in vivo 연구에서 혈청 림프구, 간, 신장, peyer's patch 중 DNA 손상이 가장 예민하게 감지되었던 부위는 혈청 림프구였음을 보고하고 있다. 본 연구의 혈청 림프구에서 나타난 DNA fragmentation 정도가 미미한 것으로 볼 때 각 장기의 세포에서 DNA 손상이 감지되기는 어려웠을 것으로 사료된다. 이러한 결과로부터 대두와 같이 식물성 지방만을 함유한 사료의 방사선 조사는 고도의 불포화지방산을 함유하는 동물성 지방에 비하여 지질과산화 정도가 적어 동물실험에서 그 유해성이 적게 나타나고 있음을 알 수 있었다.

생체 세포의 유전독성학적 연구는 최근들어 DNA Comet assay가 도입되면서 매우 활발히 진행되고 있다. 이 방법은 1984년 Ostling & Johanson²⁸⁾에 의해 개발되었으며

Singh 등²⁰⁾에 의해 DNA 손상을 보다 민감하게 평가하는 방법으로 개량되었다. 이는 방사선 조사에 의해 생성된 손상 DNA 절편을 정량화하는 방법으로 단일세포에서 DNA 손상 정도를 직접 측정할 수 있다. 또한 분석에 필요한 시료의 양이 적으며 세포 간 DNA 손상 정도와 회복의 차이 점을 알 수 있고, 분석 결과를 빠른 시간 안에 얻을 수 있는 장점이 있다. 지금까지는 주로 약제의 독성, 환경 물질의 독성 test에 많이 이용되어 왔으며 최근 일본에서는 식품 첨가물의 유해성을 판별하는데 이 방법을 도입하여 얻은 결과를 발표한 바 있다.^{29,30)}

5. 위장 및 소장 조직검사

방사선 조사한 사료를 8주 동안 먹인 후 투과전자 현미경을 이용하여 위장 및 소장 점막을 관찰하였을 때 위장 및 소장 점막 일부에서 초기의 가역적인 세포 손상 단계에서 발견되는 myelin figure가 관찰되었다. 위장은 대조군에 비해 5 kGy와 10 kGy에서는 큰 차이를 볼 수 없었고, 20 kGy에서 myelin figure와 swollen mitochondria가 관찰되었다(Fig. 1, 2). 이에 비하여 소장 조직에서는 대조군에 비해 5 kGy, 10 kGy 그리고 20 kGy 모든 방사선 조사 사료군에서 myelin figure가 관찰되었으며 5 kGy와 10 kGy 조사사료군에 비하여 20 kGy 조사 사료군에서 손상범위도 넓고 myelin figure의 성상이 더 뚜렷하게 나타났다(Fig. 3-6). Myelin figure는 지질층과 물층이 결합된 것이 한 단위를 이루고 두께는 거의 6 nm정도이고 모양이 신경 myelin sheath와 비슷하여 myelin figure라 한다. 이것은 세포의 apoptosis 발생 초기에 관찰되는 것으로 apoptosis는 유전적으로 형성되는 활성 과정과 외부적으로 유래하는 여러 가지 단백질, 사이토카인, 호르몬, 방사선, 산화 스트레스 (oxidative stress), 저산소 (hypoxia) 등에 의

하여 활성화된다.³¹⁾ 세포질에 myelin figure가 보이는 시기에는 swollen mitochondria가 관찰되며 이는 세포막의 수분과 이온 투과성이 증가하여 보이는 현상이다. 이러한

변화는 가역적인 변화로 세포 손상의 초기 단계에서 보이나 만일 지속적으로 자극원에 노출되면 식품의 free radical과 같은 미약한 자극원이라 해도 손상 범위가 넓어지면서 비

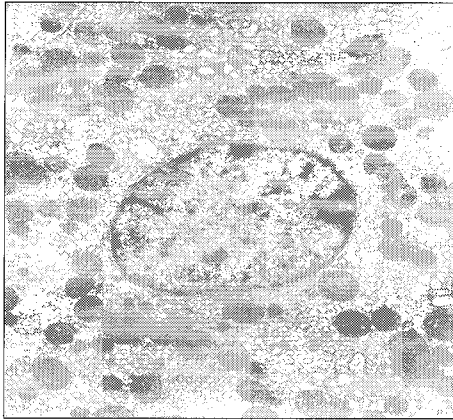


Fig. 1. Transmission electron microscopic image of gastric parietal cell in control group ($\times 14,000$).

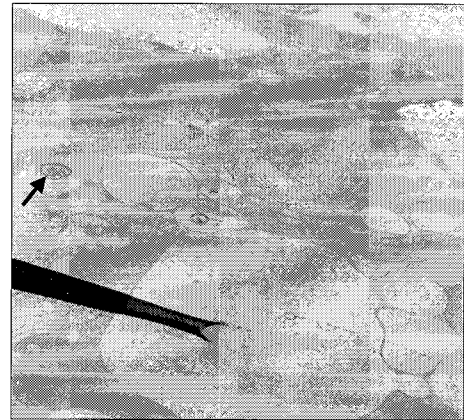


Fig. 4. Transmission electron microscopic image of intestinal mucosa in 5 kGy group ($\times 14,000$).



Fig. 2. Ultrastructural examination shows myelin figures (\rightarrow) in the cytoplasm of gastric parietal cells in 20 kGy group ($\times 14,000$).

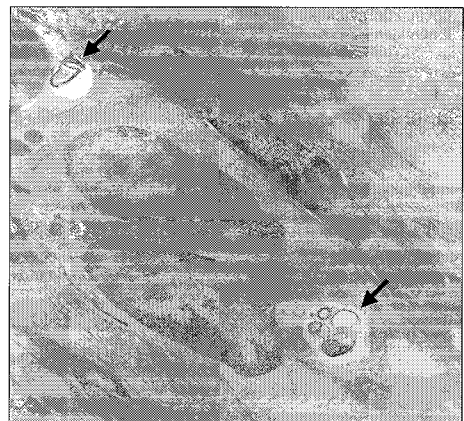


Fig. 5. Ultrastructural examination shows myelin figures (\rightarrow) in the cytoplasm of enterocytes of the small intestine in 10 kGy group ($\times 14,000$).

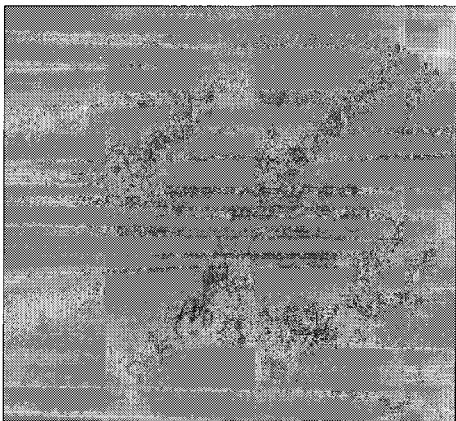


Fig. 3. Transmission electron microscopic image of intestinal mucosa in control group ($\times 14,000$).

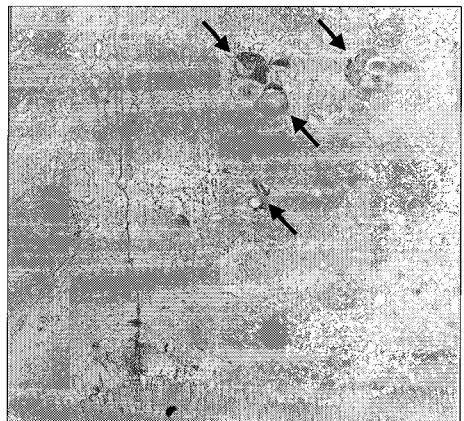


Fig. 6. An increased number of myelin figures (\rightarrow) is present in the cytoplasm of enterocytes of small intestine in 20 kGy group ($\times 14,000$).

가역적인 상태로 진행될 수 있으므로 지속적인 노출은 바람직하지 못하다.

요약 및 결론

본 연구는 방사선 조사 식품의 유통이 지속적으로 증가하고 있는 현실에서 방사선 조사 식품, 특히 다가 불포화 지방산 함유식품의 영양학적 안전성 검토를 위해 실시되었다. 국내에서 다량 소비되는 대두를 함유하는 방사선 조사 사료를 섭취한 mouse의 혈청 및 조직에서 지질과산화와 DNA 손상, 조직 검사를 통하여 방사선 조사된 사료가 mouse에 산화적 스트레스를 주었는지 알아보려고 하였다. 체중 증가량은 가령에 따라 증가된 것은 볼 수 있었지만 같은 주령에서 방사선 조사사료 섭취여부에 따라서는 방사선 조사식이 섭취군 모두에서 차이가 없었고, 간, 신장의 장기 무게에서도 유의적인 차이가 없었다. 대두를 함유한 식이 방사선 조사하였을 때 방사선 비조사 사료에 비하여 과산화물가가 높게 나타났으며 저장기간에 따라서도 증가하였다. 혈장 및 조직에서의 TBARS 측정결과 방사선 식이 섭취군의 간 조직에서 대조군에 비해 조사군의 TBARS가 10 kGy와 20 kGy군에서 유의적으로 높게 나타났다. 혈액 림프구 및 조직에서의 DNA 손상정도 측정 결과 5 kGy와 10 kGy 조사사료군의 혈액 림프구에서 tail내 DNA%와 tail moment (TM) 값이 유의적으로 증가하였다. 그러나 간과 신장에서는 tail내 DNA%와 tail moment (TM) 값이 모두 유의적인 차이를 보이지 않았다. 위벽세포의 세포질에서는 20 kGy에서 myelin figure가 관찰되었고 소장 세포질에서는 5 kGy, 10 kGy 그리고 20 kGy 모두에서 myelin figure가 관찰되었으며 20 kGy에서의 손상정도가 확실하게 나타났다. 위의 결과에서 방사선 식이 섭취군의 혈장 및 신장, 소장 각각에서 TBA의 유의적인 차이 없었지만 조사선량이 높을수록 간의 TBA가 높게 나타나고 선량으로 조사한 식품을 섭취하였을 경우 생체에 산화적인 스트레스를 줄 수 있는 가능성을 보여주었다. DNA 손상정도를 측정하는 comet assay를 통해서도 혈액 림프구에서 방사선 비 조사 사료를 섭취한 군보다 방사선 조사 사료를 섭취한 군에서 tail내 DNA %와 TM 수치가 유의적으로 증가하여 DNA가 손상되었음을 알 수 있었다. 조직 병리 검사 중 투과전자현미경 관찰 결과 사료의 방사선 조사 선량이 높을수록 위장 및 소장조직에서 뚜렷한 초기 병리적 소견을 보였다.

따라서 이러한 평가 연구를 좀 더 확대하여 대두 뿐 만 아니라 국내 다소비 식품으로 수입 의존량이 높고 운송 중

부패 및 산패 등을 방지하거나 유통기한을 늘리기 위해 방사선 조사 가능성이 큰 많은 식품들에 대한 안전성 검토가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) ICGFI, Facts about food irradiation, International Consultative Group on Food Irradiation, Vienna, 1991
- 2) WHO, Wholesomeness of Irradiated Food, WHO Technical Report Series, 604, Geneva, 1977
- 3) FCA, Irradiation in the production, processing, and handling of food, Federal register, 51, 13376, 1986
- 4) Mukai FH, Goldstein BD. Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science* 191: 868-869, 1976
- 5) Rose CS, Gyorgy P. Specificity of hemolytic reaction in vitamin E-deficient erythrocytes. *Amer J Physiol* 168: 414-420, 1952
- 6) Raltech Scientific Services, A chronic toxicity, oncogenicity, and multigeneration reproductive study using CD-1 mice to evaluate frozen, thermally sterilized, cobalt-60 irradiated, and 10MeV electron irradiated chicken meat, Final Report Contract DAMD-17-76-C-6047, NTIS Order Number PB84-187012, 1983
- 7) Takagawa A, Danbara H, Ohyama Y. Gamma ray irradiation to semi-purified diet-peroxide formation and its effects on chicks. *Jap J Zootech Sci* 47: 292-302, 1976
- 8) Nadudvari I. Experience of radiation treatment of laboratory and farm animal feeds in Hungary. In: Decontamination of Animal Feeds by Irradiation, Proceedings of an FAO/IAEA Advisory Group Meeting, pp.33-41, International Atomic Energy Agency, Vienna, 1977
- 9) Joner PE, Underdal B, Lunde G. Mutagenicity testing of irradiated cod filets. *Lebensm Wiss & Technol* 11: 224-226, 1978
- 10) Read MS, Kraybill HF, Worth W, Thompson SW, ISAAC GJ. Successive generation rat feeding studies with a composite diet of gamma-irradiated foods. *Toxicol Appl Pharm* 3: 153-173, 1962
- 11) Phillips AW, Newcomb HR, Shanklin D. Long-term rat feeding studies-irradiated chicken stew and cabbage. US Army Contract DA-49-007-MD- 783, 1961
- 12) Malhotra OP, Reber EF, Norton HW. Effect of methionine and vitamin K₃ on hemorrhages induced by feeding a ration containing irradiated beef. *Toxicol Appl Pharm* 7: 402-408, 1965
- 13) Olson DG. Irradiation processing, In: Murano EA, ed. Food Irradiation-A sourcebook, pp.3-27, Iowa State University Press, Ames, 1995
- 14) Yi SD, Yang JS. Thermoluminescence of mineral separated from imported sesame and perilla seeds treated with ionizing radiation. *Food Sci Biotechnol* 10: 231-225, 2001
- 15) Byun M, Lee J. Application of irradiation technology for food safety and security. *Food Science and Industry* 36: 25-41, 2003
- 16) Yagi K, Nishigaki I, Ohama H. Measurement of serum TBA value. *Vitamins (Jpn)* 37: 105-112, 1968
- 17) Seo DY, Park SY, Kang MH, Suh KS, Ly SY. Oxidative stress of mouse fed irradiated diet containing high unsaturated fatty acid. *Korean J Nutrition* 39(7): 599-609, 2006

- 18) Lee JW. Development and application of a new 2-thiobarbituric acid assay detection serum lipid peroxide value. Ph. D. Dissertation, Graduate School of Seoul National University, 1985
- 19) Jang HH, Kang MH, Yang JS, Ly SY. Plasma, tissue thiobarbituric acid reactive substance and lymphocyte oxidative DNA damage in mouse fed gamma irradiated diet. *Korean J Nutrition* 36(3): 255-261, 2003
- 20) Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitaion of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191, 1988
- 21) Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Reserach* 519: 103-119, 2002
- 22) Vasquez M, Tice RR. Detecting genotoxic activity against high molecular weight DNA using the alkaline single cell gel (SCG) assay. *Environ Mol Mutagen* 29: S28-53, 1997
- 23) Eggum Bo. Effect of radiation treatment on protein quality and vitamin content of animal feeds. In: Decontamination of Animal Feeds by Irradiation, Proceedings of an FAO/IAEA Advisory Group Meeting, pp.55-67, International Atomic Energy Agency, Vienna, 1979
- 24) Scott MT. Advances in our understanding of vitamin E. *Fed Proc* 39: 2736-2739, 1980
- 25) Halliwell B. Free radicals in biology and medicine, 2nd ed, pp.20-21, Clarendon, Oxford, 1989
- 26) Thayer DW. Food irradiation. Benefits and concerns. *J Food Qual* 13: 147-169, 1990
- 27) Wills ED. Studies of lipid peroxide formation in irradiated synthetic diets and the effects of storage after irradiation. *Int J Radiat Biol* 37: 383-401, 1980
- 28) Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298, 1984
- 29) Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Res* 26(1): 103-119, 2002
- 30) Sasaki YF, Sekihashi K, Izumiyama F, Nishidate E, Saga A, Ishida K, Tsuda S. The comet assay with multiple mouse organs; comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and US NTP carcinogenicity database. *Crit Rev Toxicol* 30: 629-799, 2000
- 31) Sarraf CE, Bowen ID. Proportions of mitotic and apoptotic cells in a range of untreated experimental tumors. *Cell Tissue Kinet* 21: 45-49, 1988