J. Fd Hyg. Safety 14(2), 129 –133 (1999)

T-2 toxin이 흰쥐 혈청 중 지질농도에 미치는 영향

강성조 · 박선자* · 이웅수** · 박정현*** · 정덕화***†

*경상대학교 농어촌개발연구소, *진주보건대학 간호학과, **충주대학교 식품공학과, ***경상대학교 식품공학과*

Effects of T-2 Toxin on Lipid Concentration in Rat Serum

Sung-Jo Kang, Seon-Ja Park*, Ung-Soo Lee, Jung-Hyun Park*** and Duck-Hwa Chung***†**

Institute of Agriculture and Fishery Development, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

**Dept. of Nursing, Chinju Health College, Chinju 660-757, Korea*

***Dept. of Food Engineering, Chungju National University, Chungju 380-702, Korea*

****Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea*

ABSTRACT – This study was designed to observe the effects of T-2 toxin on total cholesterol and lipid concentration in rat serum. T-2 toxin is a secondary metabolite produced by *Fusarium* sp. which is often found on agricultural products including cereals, and it is a causal material of liver injuries in cattle and humans. When we fed rats with standard diet treated with T-2 toxin, the body weight and feed consumption of rats treated with T-2 toxin were decreased. As the results of lipid analysis, the concentrations of total cholesterol and free cholesterol in serum of treated rats were increased compared to non-fed control group, On the other hand, the levels of triglyceride and phospholipid in the serum of T-2 toxin treated experimental groups were declined. In conclusion, T-2 toxin largely influenced on the total cholesterol and lipid levels in rat serum.

Key words □: *Fusarium* sp., T-2 toxin, cholesterol, triglyceride, phospholipid

곰팡이독소(mycotoxin)는 *Aspergillus*속, *Penicillium*속, *Fusarium*속 및 *Alternia*속 등이 생성하는 2차 대사산물로 사람이나 동물이 이를 섭취하면 생체 내에서 독성을 보이는 것으로 알려져 있다. 이 중 *Fusarium*속 곰팡이에 의한 fusariotoxicosis의 원인이 되는 trichothecene류 독소는 식품과 사료에서 자연발생적인 것으로 T-2 toxin, nivalenol, HT-2 toxin, deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol(DAS) 등이 있다. 이러한 trichothecene류 곰팡이독소는 생체 여러 기관, 특히 면역 관련 기관에 독성을 나타내며, 포유동물에서는 단백질 합성 및 DNA 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다.[1,2] 이들은 단독 혹은 혼합되어 사람에서는 Alimentary Toxic Aleukia라고 알려진 식이성 무백혈구증과 같은 질병의 원인체로 작용하며[3] 동물에서는 fusariotoxicosis의 증세를 보인다. 이 중 T-2 toxin[3-hydroxy-4,15-diacetoxy-8-(3-methylbutyryloxy)-12,13-epoxy-Δ^9-trichothecene]이 가장 흔히 분리되며, 독성이 강하여 저장기간이나 조리과정에 의해 파괴되지 않고 섭취하였을 경우 위산에서 1시간 정도 안전하며, 소장에서 쉽게 흡수되어 체내에 확산된다.[4,5] 또한 이들은 대부분 간을 통하여 대사되므로 간이 1차적 손상을 입을 가능성이 크다. 실제로 fungal infection은 그것이 전파되었을 때 간을 침범할 확률이 높고, histoplasmosis, cryptococcosis, mucormycosis, aspergillosis, coccidioidomycosis, sporotrichosis와 actinomycosis 등의 질환을 발생시키고, 이들은 대부분 육아종(granulomas), 간세포괴사(hepatocellular necrosis)와 간종양(liver abscesses) 등 간(liver)의 병리적 변화를 야기시킬 수 있다[6]. 일반적으로 미생물의 경우와 같이 T-2 toxin에 오염되면, 세포내 NADPH 수준이 증가되면서 glycogen 등이 TCA cycle 을 거쳐 산화되지 않고, acetyl CoA에서 지방합성 과정을 거치면서 체내 지방의 함량이 증가되는 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서는 T-2 toxin으로 인한 흰쥐의 혈청 중 지질의 농도에 변화가 있는지를 규명하고자 한다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 T-2 toxin 생성 균주는 일본 동경이과대

Table 1. The composition of PDA[1] medium used for the subculture of *Fusarium sporotrichioides* M-1-1

Ingredient	Per liter
Potato	200 g
Dextrose	20 g
Yeast extract	5 g
Agar	15 g
Distilled water	1 L

[1]PDA: potato dextrose agar. pH was adjusted to 5.6 at 25°C.

학의 Ueno교수로부터 분양 받은 *Fusarium sporotrichioides* M-1-1 이었으며, 실험동물은 평균체중 64.5±2.3 g인 4주령 Sprague Dawley계 숫쥐 45 마리였다. 이들은 온도 22±3°C, 습도 50% 전후, 명암 12시간 주기(조명; 07:00-19:00)로 조정 사육하면서 실험에 이용하였다.

T-2 toxin 생산 균주의 배양

균주를 potato dextrose agar(PDA, Table 1)평면배지에 접종하여 25°C에서 5일간 활성화시킨 다음, 4 mm×4 mm의 agar plug를 만들어 CMC배지(NH_4NO_3 1.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g, yeast extract 1.0 g, blended carboxymethylcellulose 15.0 g, distilled water 1 L, pH 5.6)에 접종 후 진탕 배양(280±10 rpm, 25°C, 5일)하여 conidia를 생성하게 하였다. 생성된 conidia 수를 평판계수계로 측정하여 10^6 conidia/ml 의 농도로 조절한 후 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

T-2 toxin 의 생산

공시균의 T-2 toxin의 생산은 Burmeister 등[7]의 방법에 준하였다. 즉, 쌀배지(쌀 300 g, 수분 40%)에 공시균주인 *Fusarium sporotrichioides* M-1-1의 conidia를 10^6 conidia/ml로 접종한 후 25°C에서 2주 배양한 다음 다시 10°C에서 2주 배양하고, TLC법에 의해 T-2 toxin 생성을 확인하였다. Densitometor로 농도를 확인 한 후 배양물 g당 T-2 toxin 1 mg이 되도록 조정한 쌀배지 배양물을 직접 기초식이에 첨가하여 실험을 하였다.

실험군 설정 및 식이방법

적응된 실험쥐를 무작위로 15마리씩 3군으로 나누어 실험을 실시하였다. 기초사료의 조성은 Table 2와 같으며, 3군으로 나누어 균 배양물을 첨가하였다. 즉, 1군은 대조군으로 기초사료에 일반 쌀가루를 2%(2 g/100 g) 첨가하였으며, 2군은 배양물이 함유된 쌀배지배양물(T-2 toxin 1 mg/100 g) 1%와 쌀가루 1%, 3군은 쌀배지 배양물을 2%(T-2 toxin 2 mg/100 g)가 되도록 첨가하였다. 실험 기간 동안

Table 2. Composition of experimental diets(%)

Casein	20
Mineral mixture	3.5
Vitamin mixture	1.0
Choline bitartrate	0.2
Sucrose	60.3
Cellulose powder	5.0
Lard	10.0

사료와 물을 자유롭게 섭취하게 하였으며 사료 섭취량과 몸무게는 주 3회 측정하였다. 각 실험군의 쥐를 1, 2, 3주째 되는 시기에 희생시켜 채혈하고, 간을 적출하여 0.9% 생리 식염수로 탈혈하여 여과지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하였다. 채혈된 혈액은 1시간동안 냉장 방치한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다.

총 콜레스테롤의 측정

총 콜레스테롤 측정용 kit시약(Cholestenzyme-V, Eiken)으로 측정하였다.

유리 콜레스테롤의 측정

유리 콜레스테롤 측정용 kit시약 (Free cholesterol C-Test, Wako)으로 측정하였다.

중성지질의 측정

중성지질 측정용 kit 시약(Triglyzyme-V, Eiken)으로 측정하였다.

인지질의 측정

인지질 측정용 kit 시약(Plzyme, Eiken)으로 측정하였다.

통계처리

분석결과의 통계처리는 실험군당 평균치와 표준편차(mean ±S.D.)로 표기하였고 SAS program의 Duncan's multiple test를 이용한 분산분석(ANOVA)을 시행하여 $p<0.05$ 수준에서 통계적 차이를 검정하였다.

결과 및 고찰

T-2 toxin이 실험동물의 체중 및 장기 무게에 미치는 영향

F. sporotrichioides M-1-1에 의해 생성된 T-2 toxin이 흰쥐의 지질대사에 어떠한 영향을 미치는지 실험하기에 앞서 배양물의 T-2 toxin의 농도에 따른 흰쥐의 체중 및 간

Table 3. Sequential changes in body and liver weight of rats treated with T-2 toxin

Items	Treatment (toxin / diet)	Time following treatment (week)		
		1	2	3
Body weight (g)	Control	114.32 ± 4.4[a]	167.80 ± 5.2[a]	218.30 ± 8.6[a]
	1 mg/100 g	102.13 ± 3.0[b]	111.59 ± 5.6[b]	131.20 ± 17.4[b]
	2 mg/100 g	79.76 ± 14.2[c]	99.86 ± 11.1[c]	104.45 ± 25.3[c]
Liver weight (g)	Control	4.85 ± 0.8[a]	7.76 ± 0.7[a]	8.62 ± 1.3[a]
	1 mg/100 g	4.02 ± 0.7[b]	4.89 ± 0.9[b]	4.49 ± 1.1[b]
	2 mg/100 g	3.08 ± 0.9[c]	3.91 ± 0.7[b]	4.24 ± 1.3[b]

Means in the same column not sharing a common superscript letters are significantly different ($p<0.05$). All data are given as mean ± S.D.

Table 4. Sequential changes for feed consumption of rats treated with T-2 toxin

Treatment (toxin/diet)	No. of rats	Time following treatment (week)		
		1	2	3
Control	5	82.8 ± 5.5[a]	113.8 ± 2.0[f]	130.4 ± 3.7[e]
1 mg/100 g	5	60.8 ± 4.2[b]	80.6 ± 2.9[bc]	101.5 ± 4.9[f]
2 mg/100 g	5	64.7 ± 2.8[b]	70.9 ± 1.9[bc]	83.3 ± 3.4[c]

Means in the same column and row not sharing a common superscript letters are significantly different ($p<0.05$). All data are given as mean ± S.D.

Table 5. Concentration of total cholesterol in rat serum (mg/dl)

Treatment (toxin/diet)	Time following treatment (week)		
	1	2	3
Control	61.10 ± 3.0[a]	63.67 ± 6.3[b]	60.11 ± 7.7[a]
1 mg/100 g	66.08 ± 2.8[c]	69.62 ± 11.1[d]	67.75 ± 7.8[c]
2 mg/100 g	71.63 ± 9.5[d]	73.23 ± 5.1[e]	77.23 ± 3.8[f]

Means in the same column and row not sharing a common superscript letters are significantly different ($p<0.05$). All data are given as mean ± S.D.

의 무게변화를 측정한 결과, Table 3과 같이 대조군에 비해 T-2 toxin 노출군이 낮아지는 경향을 나타내었으며, 간의 무게도 시간의 경과에 따라 노출군에서 비교적 낮아지는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Doerr[8]와 Chi[9]의 닭에서의 실험과도 일치하였다.

사료 섭취량의 변화

실험기간 동안 사료 섭취량의 변화를 측정한 결과, Table 4와 같이 나타났으며 이는 체중 및 간의 무게변화와 같은 양상으로 대조군에 비해 노출군에서 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 Kosuri[10], Tookey[11]의 결과와도 일치하였다.

혈청 총 콜레스테롤의 농도에 미치는 영향

T-2 toxin 처리가 흰쥐 혈청 중의 총 콜레스테롤 함량에 미치는 영향을 분석한 결과 Table 5에 나타난 것과 같이 대조군에 비하여 T-2 toxin 노출군에서 함량이 높게 나타났다. 체내의 콜레스테롤은 그 대부분이 간에서 acetyl CoA를 이용해서 합성되며[12], 또한 콜레스테롤은 인체에 의해 이용되는 여러 가지 다른 스테로이드의 합성을 개시하는 물질로서도 제공되며, 특히 동물세포에 많이 존재하는 스테로이드는 콜레스테롤로 이것은 혈관에 축적되어 혈류를 막기도 하지만 담즙, 비타민 D, prostaglandin과 같은 생리적으로 꼭 필요한 물질의 합성에 있어 전구체(precursor)로 작용하므로 없어서는 안될 체내 구성물질이다[13]. 그러나 혈청 중 총 콜레스테롤 농도의 비정상적인 증가는 순환기계 질환과 밀접한 관련이 있으며, 혈소판의 응집, 염증, 혈압 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서 T-2 toxin이 흰쥐의 혈청 중 총 콜레스테롤 농도에 유의한 영향을 미친 것을 알 수 있었다.

Table 6. Concentration of free cholesterol in rat serum (mg/dl)

Treatment (toxin/diet)	Time following treatment (week)		
	1	2	3
Control	11.89 ± 1.8[a]	12.08 ± 2.1[a]	13.37 ± 1.4[b]
1 mg/100 g	12.45 ± 0.4[a]	12.79 ± 1.3[ab]	14.38 ± 2.2[b]c
2 mg/100 g	12.66 ± 2.8[a]	14.71 ± 1.4[c]	15.11 ± 1.3[c]

Means in the same column and row not sharing a common superscript letters are significantly different ($p<0.05$). All data are given as mean ± S.D.

혈청 유리 콜레스테롤의 농도

T-2 toxin의 처리가 흰쥐 혈청 중의 유리 콜레스테롤 함량에 미치는 영향을 분석한 결과는 Table 6과 같다. 즉 혈청 중 유리콜레스테롤 농도가 대조군 보다 노출군에서 높게 나타났다. 정상적인 식생활을 할 경우 섭취한 콜레스테롤의 약 30~60%만 흡수되는데, 흡수된 콜레스테롤 중 일부는 acyl-CoA(cholesterol transferase)에 의해 에스테르화(esterification)되고 유리 콜레스테롤(free cholesterol)은 유미지립(chy-

Table 7. Concentration of triglyceride in rat serum (mg/dl)

Treatment (toxin/diet)	Time following treatment (week)		
	1	2	3
Control	157.37±15.7^{a}	155.28±16.6^{a}	156.49±18.8^{a}
1 mg/100 g	145.01±13.5^{b}	139.61±9.9^{bc}	130.92±13.9^{c}
2 mg/100 g	141.09±15.4^{b}	134.34±14.3^{bc}	129.49±27.3^{c}

Means in the same column and row not sharing a common superscript letters are significantly different ($p<0.05$). All data are given as mean ± S.D.

Table 8. Concentration of phospholipid in rat serum(mg/dl)

Treatment (toxin/diet)	Time following treatment (week)		
	1	2	3
Control	149.51±11.4^{a}	141.53±10.9^{a}	144.21±10.1^{a}
1 mg/100 g	125.75±11.7^{b}	118.57±14.9^{b}	108.23±6.7^{bc}
2 mg/100 g	112.04±8.2^{bc}	106.39±22.1^{bc}	101.78±13.2^{c}

Means in the same column and row not sharing a common superscript letters are significantly different ($p<0.05$). All data are given as mean ± S.D.

lomicron)의 표면에 존재하게 된다. 이러한 과정을 통해 다량의 중성지방과 소량의 cholesterylester가 유미지립의 핵심(core)을 형성하게 되며, 그 표면은 인지질, 유리 콜레스테롤, 아포단백질(apoprotein) 등으로 이루어지게 된다.[6] 콜레스테롤은 혈장 내에서 유리상태이거나, 지방산과 결합하여 에스테르화하였을 때 이들은 일차적으로 β-lipoprotein과 결합되어진다. 혈장과 간에 함유된 lecithin-cholesterol acyltransferase(LCAT) 효소는 유리 콜레스테롤에서 에스테르로의 전환에 참여한다. 이들은 유리콜레스테롤과 조직 사이에서 상호 교환되므로 혈장 내 콜레스테롤 수준의 변화는 체내 총 콜레스테롤 수준을 반영한다. 혈장 내 콜레스테롤 에스테르의 저하는 간 손상과 간성 콜레스테롤 에스테르화의 이상을 의미하며 지질 축적으로 인한 일차적인 담도경화(biliary cirrhosis)시 혈장 내 유리콜레스테롤과 저밀도지단백(low density lipoprotein; LDL)이 증가하는 것으로 알려져 있다.[12] Table 6의 결과와 같이 T-2 toxin이 혈청 중 유리 콜레스테롤의 농도를 증가시켰을 뿐만 아니라 2차적으로 동물이나 인체의 간 손상까지 유발 할 수 있다는 것을 시사하므로, 이에 대한 계속적인 연구가 필요 할 것으로 사료된다.

혈청 중성지질의 농도

T-2 toxin으로 처리한 흰쥐의 혈청 중 중성지질의 농도는 Table 7과 같다. 대조군에 비하여 노출군 모두 낮게 나타났으며, 특히 T-2 toxin의 농도가 높게 처리된 기초식이 공급군 및 노출 시간이 많은 군에서 유의성 있게 감소하는 경향을 보였다. 생체 내에서 가장 많이 존재하는 중성지질은 한 분자의 glycerol에 세분자의 지방산이 ester결합되어 있으며, 공복시 혈액에 존재하는 중성지질의 90% 이상은 간에서 합성된다. 초저밀도지단백(very low density lipoprotein; VLDL)의 형태로 말초조직까지 운반되고, VLDL의 60~70%는 중성지질, 10~15%는 인지질과 콜레스테롤, 약 10%는 단백질로 이루어져 있다. 정상인의 VLDL에 포함된 중성지질과 인지질의 비는 약 5 : 1로 균형을 유지하며, 간으로 운반된 cholesterol의 일부는 담즙산(bile salt)으로 전환되고, 일부는 담즙(bile juice)으로 배설되며 일부는 지단백질(lipoprotein)을 통해 다른 세포로 전달된다.[6] 따라서 간이 어떠한 독성물질(toxic material)에 의해서 영향을 받게 되면, 이들의 합성 및 분비 경로에 장해를 받게 되므로 중성지질의 혈장 수준에 변화를 초래하게 된다. 실제로 세포 내에서 중성지방이 가수분해되는 과정(lipolysis)에는 triglyceride lipase, diglyceride lipase 및 monoglyceride lipase가 관여하는데, triglyceride lipase 만이 조절효소로서 주로 catecholamine, 성장 호르몬, glucocorticoid, glucagon에 의해 그 활성도가 조절된다. Kinnunen 등[14]에 의하면 혈청 중성지질의 농도 저하 작용은 모세혈관벽에 존재하는 lipoprotein lipase(LPL)가 chylomicron과 VLDL의 분해를 촉매하기 때문이라고 보고하였다.

혈청 인지질의 농도

T-2 toxin을 처리한 흰쥐 혈청 중 인지질의 농도는 Table 8과 같이 대조군에 비하여 실험군에서 낮게 나타났으며, 특히 배양물의 섭취가 많을수록 감소하는 경향을 나타내었다. 인지질은 지방산 및 인산으로 구성된 화합물의 총칭으로 콜레스테롤과 함께 생체막의 중요한 구성성분으로, 글리세롤에 두개의 지방산과 인산이 결합된 phosphatidic acid로, 인산부위에 choline, serine, ethanolamine 등이 결합하여 각각 그 성질을 달리한다. 이들 중 특히 인산부위에 choline이 결합되면 phosphatidyl choline으로 되어, 계란노른자에 많이 존재하는 레시틴(lecithin)이 되며, 이 lecithin은 동물조직에서 가장 풍부한 인지질로서, 대부분의 세포막 구성성분에 매우 중요한 역할을 수행한다. 또한 폐의 계면활성제로도 알려져 있으므로, 태아의 미숙한 폐가 적절한 양의 lecithin을 합성하지 못하면 태아사망의 주요 원인 중의 하나인 호흡곤란증(respiratory distress syndrome: RDS)을 일으킨다. Phosphatidyl ethanolamine, phophatidyl serine, phosphatidyl inositol, phophatidyl choline 등이 세포막에서 발견되는 중요한 인지질이며 이것들은 뇌조직에도 풍부하다[13]. 그러므로 이 실험 결과와 같은 혈청 내 인지질의 비정상적인 저하는 동물이나 인체 내부의 다양한 부분에서 여러 가지 장해를 예측할 수 있다.

국문요약

본 연구에서는 T-2 toxin이 흰쥐의 혈청에서 지질농도에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 시도되었다. T-2 toxin은 *Fusarium*속에 의해 생성되는 2차 대사산물이며, 이것은 곡류를 포함한 농산물에서 자주 발견되고, 가축이나 인체의 간 손상을 유발시키는 원인 물질이다. 이 실험에서 T-2 toxin을 흰쥐의 사료와 함께 섭취시켰을 때 대조군에 비하여 T-2 toxin 노출군의 체중 및 사료섭취량이 현저하게 감소하는 경향을 나타내었다. 지질 분석에 따르면, T-2 toxin 노출군에 있어서 총 콜레스테롤 및 유리콜레스테롤의 양은 대조군에 비하여 증가되었으나, 다른 한편으로 흰쥐 혈청 내 중성지질과 인지질의 양은 감소되었다. 따라서, 본 연구에서는 T-2 toxin이 흰쥐의 혈청 내 지질의 농도에 유의한 영향을 미쳤음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Cundliff, E., Canon, M. and Davies, J.: Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 30-34 (1984).
2. Ehrich, K.C. and Daigle, K.W.: Protein systhesis by mammalian cells treated with C-3-modified analogs of the 12, 13 epoxytrichothecenes T-2 toxin and T-2 tetraol. *Appl. Environ. Microbiol*, **50**, 914-918 (1985).
3. Lillehoj, E.G.: Feed sources and condition conductive to production of aflatoxin, ochratoxin, Fusarium toxins and zearalenone. *J. Am. Vet. Med. Ass*, **163**, 1281-1284 (1973).
4. Ellison, R.A. and Kotsonis, F.N. : *In vitro* metabolism of T-2 toxin. *Appl. Microbiol*, **27**, 423-424 (1974).
5. Muscoplat, C.C.: Development of specific in vitro lymphocyte responses in cattle infected with mycobacterium bovis and with mycobacterium avium, *Am. J. Vet. Res*, **36**, 395-398 (1975).
6. Harrison, T.R.: Principles of internal medicine, Thirteenth Edition, McGRAW-HILL, Inc. volume **2**, 2058-2069 (1994).
7. Burmeister, H.R., Ellis, J.J. and Yates, S.G.: Correlation of biological to chromatographic data for two mycotoxins elaborated by *Fusarium*. *Appl. Microbiol.* **21**, 673-675 (1971).
8. Doerr, J.A.: A survey of T-2 toxin, ochratoxin, and aflatoxin B1 for their effect on the coagulation of blood in young broiler chickens. *Poultry Science*, **53**, 1728-1734 (1974).
9. Chi, M.S.: Acute toxicity of T-2 toxin in broiler chicks and laying hens. *Poultry Science*, **56**, 103-106 (1977).
10. Kosuri, N.R.: Response of cattle to mycotoxins of *Fusarium* tricinctum isolated from corn. *J. AM. Vet. Res*, **157**, 938-940 (1970).
11. Tookey, H.L.: Toxic effects of a butenolide mycotoxin and of *Fusarium tricinctum* cultures in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, **160**, 1522-1526 (1972).
12. Guido, M and Isabelle, J.: Cells, Tissues, and Disease. Blackwell Science(1994).
13. 생명과학연구회: 현대생명과학. 탐구당, 16-56 (1991).
14. Kinnunen, P.K. J., Virtanen, J.A. and Vainio, F.M.: Lipoprotein lipase and hepatic endothelial lipase. *Artheroscler. Rev*, **11**, 65-99 (1983).