J. Fd Hyg. Safety 14(1), 60 - 66(1999)

Diethylnitrosamine에 의한 계배 간 조직 손상 및 지질 성분의 변화

박정현 · 강성조* · 강진순** · 정덕화†

*경상대학교 식품공학과, *경상대학교 농어촌개발연구소, **진주전문대학 가정과*

Diethylnitrosamine Induced Tissue Damage and Change of Lipid Components in the Chick Embryo Liver

Jung-Hyun Park, Sung-Jo Kang*, Jin-Soon Kang and Duck-Hwa Chung†**

Department of Food Science and Technology,

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

***Department of Home Economic, Chinju Technical College, Gyeognam 660-759, Korea*

ABSTRACT — Diethylnitrosamine (DEN) is known as a potential hepatic carcinogen by single administration. This study was designed to measure the effects of DEN-induced cell damage on the triglyceride and cholesterol concentration in the liver, excluding dietary effects. Fertilized chicken eggs, 10 days before hatching, were randomly divided into three groups (n=20) and each egg was injected 10 μl of corn oil (vehicle control), 5 μg of DEN/10 μl and 10 μg of DEN/10 μl into yolk via air sac. After 48 hr and 96 hr incubation, the damage of the chick-embryo liver cell was investigated by electron microscopy and by measuring the concentration of lipid components (total cholesterol, free cholesterol, phospholipid and triglyceride). For eggs administered 10 μg of DEN and incuvated 96 hr, in hepatocyte, the nucleus membrane was roughed, the size of nucleolus was apparently increased and euchromatin was accumulated. Mitochondria were condensed and cristae, located mitochondrial inner membrane, were obscured. Additionally, the levels of triglyceride and cholesterol classes were significantly increased depend on the amount of DEN and incubation time. Especially, triglycerides were notably increased in the group treated with 10 μg DEN at 96 hr, but phospholipids, component of cell membrane, were decreased with significance. As a conclusion, carcinogen induced hepatic lesion was correlated with the changes in lipid component of liver.

Key words □ Diethylnitrosamine, Chick-embryo, Carcinogenesis, Liver lipid component

서 론

암의 발생에는 여러 가지 원인이 있으나 약 80% 정도가 식품 및 환경적 요인에 기인한 화학적 유발물질에 의한다고 추정하고 있다.[1,2] 최근 식품의 가공, 보존 시에 생성되는 유해 유기화합물 및 환경오염에 의한 화학물질에의 노출기회가 증가되면서 이들 물질들과 체내 생리적 환경변화와 발암과의 관계에 대한 연구가 진행되고 있다.[2] 암세포의 생성은 initiation 과정뿐만 아니라 여러 복합적 요인으로 인한 계속적인 promotion 과정이 함께 수행되어야 한다.[3] 즉, 발암 물질에의 노출은 세포내의 여러 가지 생리적 환경을 변화시키고 이는 세포들의 손상을 유도하는 한편, 체내 기능적 변화를 초래하여 직접, 간접적으로 암 진행기로 이행하게 되므로[3] 체내 변화를 알고 이를 조절할 수 있는 노력이 필요하다.

Nitrosamine은 탄 단백질 식품, 절임육류가공품과 같은 음식물에서 발견되는 발암성물질로, 오랫동안 사용되어온 식품 보존료 중 반응성이 대단히 강한 아질산염이, 식품의 가공 · 보존 중에 식품성분의 아민이나 아마이드류 및 첨가물과 쉽게 반응하여 생성한다고 한다.[4] 그리고, 알코올성 음료, 화장품, 절삭기 윤활유, 고무, 담배 등 주변 환경에서 흔히 인체에 오염될 수 있다.[5] 그 중 diethylnitrosamine(DEN)은 nitrosodialkylamine에 속하는$(CH_3CH_2)_2N$-NO의 분자식을 가지는 무취의 황색 액체이다. 사람과 동물에 간장이나

† Author to whom correspondence should be addressed.

신장에 궤양이나 암을 일으키는 것으로 알려졌다. Nitrosamine의 발암성은 투여경로와는 무관하게 기관(organ) 특이성이 높은 특징을 가진다.[6]

DEN은 간의 소포체에 있는 cytochrome P450에 의해 주로 대사 되므로, 간의 1차적 장해는 대사 과정에서 생성된 superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등의 free radical에 의한 세포손상이 발암의 개시 작용을 한다고 알려지고 있다.[7] 한편, 세포는 대부분이 산화되기 쉬운 지질(인지질)로 되어 있으므로, 활성산소의 작용으로 과산화지질로 되어 세포손상을 입기가 쉽다.[8,9] 이러한 간세포의 손상으로 인해 지질, 단백질 및 에너지 대사의 연결이 파괴되어 지질 메커니즘에 다양한 혼란을 초래하여 발암의 promotion으로 작용할 수 있을 것이나, 발암물질의 노출에 대한 세포독성과 총콜레스테롤 및 지질 성분과의 관련에 대한 연구는 많이 되지 않고 있다.

한편, 이용이 편리하고 적은 비용으로 많은 수의 공시동물을 이용할 수 있으며, 광범위한 화학적, 물리적 요인에 감수성이 높고 형태학적 발육이 포유동물과 유사한 점에 의해 독성 실험에 이용되고 있는[10] 계배(chick-embryo)는 부화 중 태자 형성기에 물질을 투여하고 계속 부화시키는 형태를 취하게 되는데,[11] 이는 식이와 같은 다른 인자의 영향을 적게 받고 처리물질에 의한 반응을 정확하게 볼 수 있는 장점이 있다. Chick-embryo는 fabricius낭의 발달로 면역기능이 강력하여 발암물질의 영향을 적게 받는다고 보고되고 있지만, 면역에 관련되는 조직이 미처 완성되지 않은 배시기(胚時期)에 DEN의 투여는 급성독성을 평가하는데 좋은 자료를 제공해 줄 수 있을 것이다.

그러므로 본 실험에서는 발생 중인 계배에 DEN을 투여하여 간장의 세포 손상을 전자현미경으로 관찰하고, 아울러 간장의 지질성분의 변화를 조사하여 세포막의 손상이 간장의 지질 성분의 조성에 미치는 영향을 살펴보았다.

재료 및 방법

시약

Diethylnitrosamine(DEN, d=0.95 mg/m*l*), corn oil, osmium tetraoxide, propylene oxide, epon 812, uranyl acetate, lead citrate 등은 Sigma 제품, Ca^{++}, Mg^{++} free phosphate buffered saline (PBS)은 Life technologies 제품, glutaraldehyde(25%)는 Samkun 제품, 그 외 sodium chloride, sodium hydroxide, chroloform, methanol, petroleum ether, ethyl ether, acetic acid, hexan 등은 특급시약을 사용하였다.

실험동물

본 실험에 사용한 계배는 경남 진주시 소재 진주 종축장에서 수정율과 부화율이 90% 이상인 산란용 와렌 G의 종란으로, 임란 11일 발육계란을 검란(檢卵)한 후 실험실 항온기로 옮겨와 하루 안정화시킨 다음 재료처리 하였다. 임란 12일 발육계란의 평균무게는 53±2.4 g이었다.

실험군 설정 및 투여실험

안정화시킨 발육계란을 3군(n=20)으로 나누어 corn oil만을 투여한 군을 대조군으로 하고, DEN을 corn oil에 희석하여 중간농도(5 μg/egg), 고농도(10 μg/egg)로 10 μ*l*씩 난황에 투여한 것을 처리군으로 하여 실험을 실시하였다. 농도는 예비실험에 의해 80%의 생존을 보이는 양을 고농도로 결정하였다. 투여 48시간 후 각 군당 10개의 발육계란을 해체하고, 투여 96시간 후 나머지(n=10)를 해체하여 시간경과에 따른 영향을 평가하였다.

재료처리는 Wyttenbach 등[12]의 방법에 따라 난각(egg shell)을 70% ethanol로 소독한 후 21G의 주사침으로 둥근 선단(round end)난각에 구멍을 뚫고 호흡과 압력을 조절하는 기실 부분(air sac)을 통해 microsyringe(Hamillton Co.)를 이용하여 corn oil 또는 DEN 각 군당 처리용액을 난황으로 10 μ*l*씩 주입하고(Fig. 1) paraffin으로 봉입한 후 온도 37.5°C, 습도 75%로 유지되는 항온기에 두고 부화시키면서 투

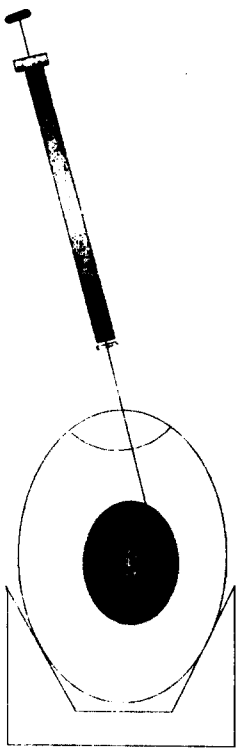

Fig. 1. A cut view of egg with needle inserted.

여 후 48시간, 96시간 째 발육계란을 해체하고 계배의 신장과 무게를 재고 간장을 적출 하여 실험에 사용하였다.

간조직의 전자현미경 검사

DEN이 간 조직에 미치는 영향을 형태학적으로 관찰하기 위하여 전자현미경 관찰을 수행하였다. 대조군과 DEN 처리군의 간을 PBS(pH 7.4, Ca^{++} & Mg^{++} free)로 perfusion하여 혈액을 제거한 후 1~2 mm^3의 크기로 잘라 2.5% glutaraldehyde로 1일 동안 전고정한 후 0.1 M PBS로 3회 세척하여 1% osmium tetroxide로 후고정을 하였으며, 증류수로 3회 세척하였다. 그 후 알콜 농도 20, 30, 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100% 순 10분 간격으로 탈수하고 propylene oxide로 조직을 치환시킨 다음 Epon 812에 포매(embedding)하였다. 포매된 조직은 60°C dry oven에서 24시간 중합시킨 후 초박절기를 이용하여 초박절편(70 nm)을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(Hitachi-600)으로 75 KV에서 관찰하고 사진을 촬영하였다.

지질성분의 분리

김 등[13]의 방법에 따라 간장 0.5 g을 수술용 knife로 잘게 저며 균질화 한 후 chloroform:methanol(C:M=2:1, v/v) 혼액 20 m*l*을 가하여 지질을 추출하고, 각 측정 kit 시약의 표준액농도를 기준으로 총콜레스테롤 측정은 400 μ*l*, 유리콜레스테롤은 500 μ*l*, 중성지질 측정은 100 μ*l*, 인지질 측정은 100 μ*l*의 추출액을 취하여 질소 농축시킨 후 다음의 방법에 의하여 측정하였다.

총콜레스테롤의 함량 측정

총콜레스테롤 측정용 kit(Cholestezyme-V, Eiken사)로 측정하였다.

유리콜레스테롤의 함량 측정

유리콜레스테롤 측정용 kit 시약(Free cholesterol C-Test, Wako사)으로 측정하였다.

중성지질의 함량 측정

중성지질 측정용 kit(Trizyme-V, Eiken사)으로 측정하였다.

인지질의 함량 측정

인지질 측정용 kit 시약(Plzyme, Eiken사)으로 측정하여 산출하였다.

통계처리

대조군과 DEN 투여량에 따른 군들 사이의 결과치는 평균치와 표준오차(mean±SE)로 표기하고 이들의 차이에 대한 통계 처리는 Duncan의 다중 범위 검정(Duncan's multiple range test)을 이용한 분산 분석(ANOVA)을 시행하여 통계적 차이를 검증하였다(α=0.05). 대조군과 DEN 투여량에 따른 군에서 시간별 변화는 Student's t-test를 시행하여 통계적 차이를 검증하였다(α=0.05)

결과 및 고찰

간조직의 전자현미경적 관찰

DEN 투여 후 계배 간의 형태학적 변화를 전자현미경으로 관찰을 하였다. 그 결과 Fig. 2(A)에서 보는 바와 같이 정상적인 세포내의 핵은 구형이었으며 핵 내부에 고루 분포된 진정염색질과 가장자리에 분포하는 이질염색질을 관

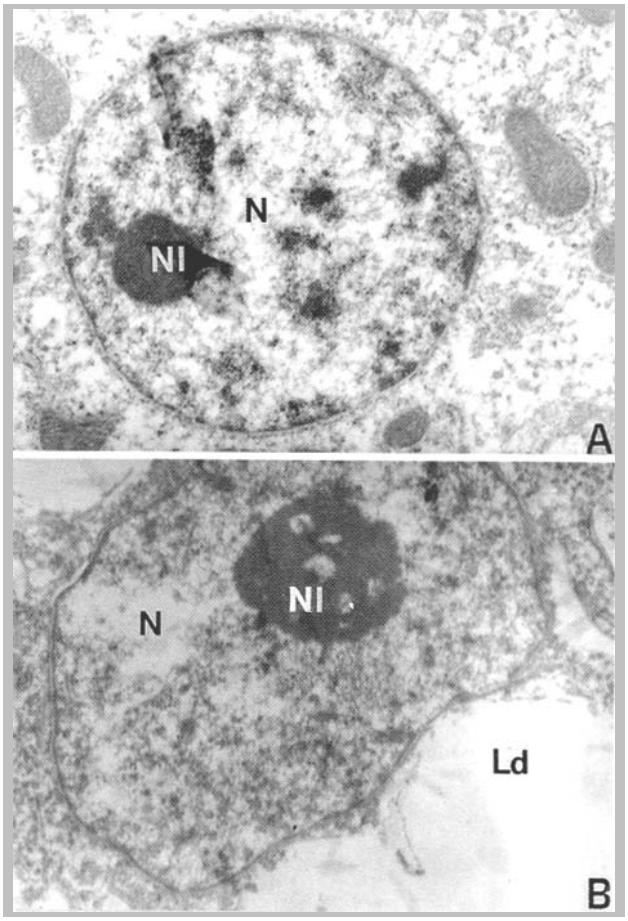

Fig. 2. Electron micrograph of nucleus in hepatocytes from control 16 days old chick-embryo (A) and diethylnitrosamine 10 μg per egg treated and 4 days incubated 16 days old chick-embryo (B). N, nucleus; Nl, nucleolus; Ld, lipid droplet (×20,000).

찰할 수 있었다. 소포체는 핵을 중심으로 발달되어 있었으며 미토콘드리아는 타원형 혹은 긴 간상으로 발달하여 내막의 형태가 명확히 관찰되었다. 그러나 DEN을 10 μg/egg로 투여한 후 96시간이 경과한 계배의 간세포는 Fig. 2(B)에서와 같이 핵막이 불규칙적인 모양으로 굴곡을 보이는 변화가 뚜렷하게 관찰되고 핵 인의 크기도 증가하며, 세포 핵 내 진정염색질 물질의 축적과 세포 주위에 지방과립이 발달하는 모양이 보이는 등 DEN에 의한 간세포 손상을 직접적으로 관찰 할 수 있었다. 그리고 Fig. 3에서와 같이 핵 주위를 더욱 확대해 보았을 때, 세포 소기관인 미토콘드리아는 응축된 구형을 이루고 있고 미토콘드리아 내막의 cristae도 퇴행되어 명확하지 않거나 파괴되어 내부 공동현상을 보였다. 이러한 핵막의 변화, 미토콘드리아 응축은 일반적인 간암의 양상과 유사하게 나타났다.[14] 한편, 특정 조직이

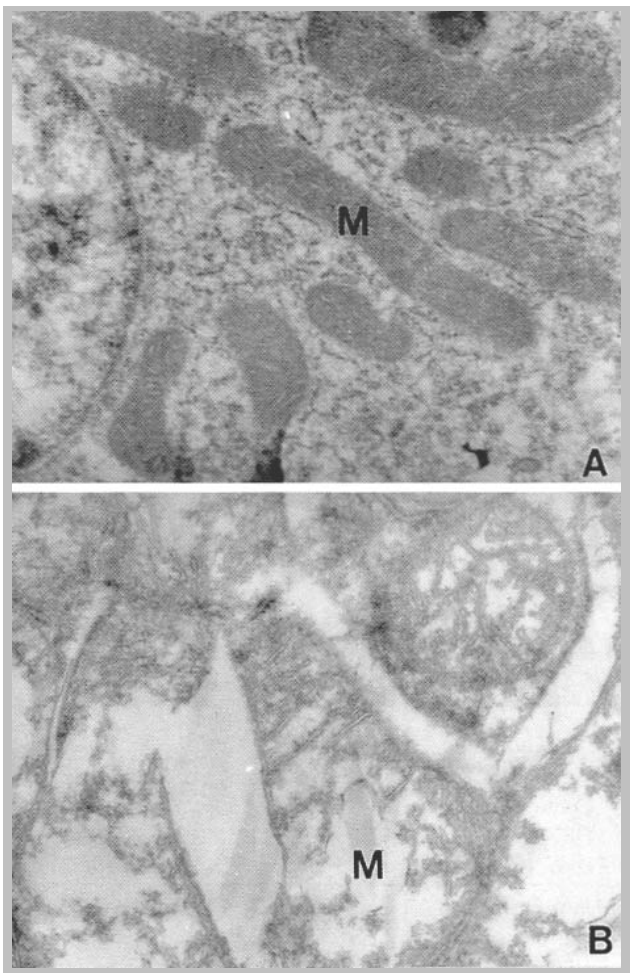

Fig. 3. Electro micrograph of nucleus in hepatocytes from control 16 days old chick-embryo (A) and diethylnitrosamine 10 μg per egg treated and 4 days incubated 16 days old chick-embryo (B). M, mitochondria (×31,000).

암 상태로 변화하는 일차적 기작은 initiation 과정으로 투여된 물질과 DNA와의 결합이며 이후 계속적인 promotion 과정이 세포막에 의하여 중재되어야 하는데,[3] DNA 투여로 변화된 핵막은 이들 조직이 promotion 과정임을 나타낸다. 또한 핵 내부 가장자리에 위치하는 이질염색질 사이에서 흰 부분을 관찰할 수 있는데, 이것의 기능이나 역할은 알 수 없으나 핵 내의 이질염색질이 서로 합쳐져 cluster를 이루는 과정에서 나타나는 간극일 것으로 사료된다. 이는 다른 종류의 발암 물질인 CCl_4 및 ethionine과 thioacetamide를 투여하고, 한 시간 후 간세포의 세포질 내에 액포가 보이고, 이와 동시에 소포체도 비정상적으로 되면서 소포체의 막이 잘 보이지 않는다고 한 Magee[15]의 결과와 유사하였다. 한편, Hoffsten 등[16]과 Parke 등[17]은 지질과산화반응에 의해 미토콘드리아의 부종이 나타났다고 하였다. DEN도 대사과정 중 cytochrome P450에 의해 주로 대사 되므로[18] 본 실험의 결과에서 미토콘드리아의 파괴와 인지질 막의 손상이 많은 것으로 보아 free radical과 세포손상과의 연관성[7]도 생각해 볼 수 있고, 이에 의한 발암의 개시 작용이 될 수 있는것으로 보여진다.

간장 총콜레스테롤 수준에 미치는 영향

DEN 투여로 인한 계배 간장의 조직 손상이 총콜레스테롤 수준에 미치는 영향을 분석한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 DEN 투여 48시간 후에는 희석용매만 투여한 대조군에 비해, 고농도로 투여했을 경우 총콜레스테롤 수치가 유의성(α=0.05) 있게 증가하였고, 투여 96시간 후에는 중간 용량으로 투여했을 경우에도 유의성 있는 증가를 보였다. 고농도로 처리했을 경우 96시간 후에는 오히려 감소 경향을 나타내었으나, 유의성은 보이지 않았다. 동일 농도 투여 시 시간의 경과에 따른 변화들은 증가를 보이지만 통계적

Table 1. Contents of total cholesterol in liver of chick-embryo treated with diethylnitrosamine (mg/g)

Group	Time following treatment		p-value
	48 hr	96 hr	
Control	3.7 ± 0.3^{a}	2.5 ± 0.7^{d}	NS
DEN 5 mg/egg	3.2 ± 0.2^{a}	4.1 ± 0.6^{e}	NS
DEN 10 mg/egg	4.4 ± 0.3^{b}	3.8 ± 0.2^{e}	NS

Means in the same column not sharing a common superscript letters are significantly different (α=0.05): the results of all treatment groups classified by dose and control group were analyzed by ANOVA with Duncan's multiple range test for variable. The changes by the time in the treatment groups and control group were analyzed by Student's *t*-test (α=0.05). All data are given as mean standard error. Hours indicates the sampling time following single intraovo injection.

인 유의성은 없었다. 체내의 콜레스테롤은 인체에 의해 이용되는 여러 가지 스테로이드의 합성 및 담즙, 호르몬, prostaglandin, 비타민 D와 같은 필수 구성성분들을 합성하므로 필수 구성성분이기는 하나, 비정상적인 증가는 고지혈증, 동맥경화증, 심장질환과 담석증 등 순환기계질환과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다.[19] DEN에 의한 총콜레스테롤의 증가는 간질환에 의해 유도되기도 하지만 간질환을 직접적으로 유도하므로 간암의 promotor로 작용한다고 한다. 한편, N-nitrosamine은 아민과 아질산과의 반응에 의해 생체내에서 생성될 수 있으므로 무의식중에 노출량이 증가될 수 있다.[4] 즉 어패류 및 단백질, 아미노산, 인지질에서 쉽게 생성되는 아민류와 육류의 발색, 색소고정, 보존을 위해 첨가되는 아질산염 및 질산염과의 반응이 생체내에서 pH 1~3의 범위에서 생성된다고 한다. 그리고 여러 식품에서 다양하게 검출되므로[6] DEN에 의한 체내 총콜레스테롤의 증가는 발암환경을 조장할 수 있을 것이다.

간장 유리콜레스테롤 수준에 미치는 영향

DEN 투여후 계배 간장의 조직 손상이 유리콜레스테롤(free cholesterol) 수준에 미치는 영향을 분석한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 DEN 투여 48시간 후에는 희석용매만 투여한 대조군에 비해, 용량 의존적으로 증가하였고, 같은 농도로 투여했을 경우 시간이 지남에 따라 유리콜레스테롤 수치가 증가하였다. 특히 DEN 5 μg/egg 투여군에서는 시간이 지남에 따라 유의성($p<0.02$)있게 증가하였다. 이는 유리콜레스테롤의 증가가 세포독성이 진행이 된 시기에서 보다 시작되는 시기에 더 증가되는 것과 관련이 있는 것으로 보인다. 콜레스테롤은 혈장이나 간에서 유리상태이거나 지방산과 결합하여 에스테르화 되어, 일차적으로 β-lipoprotein과 결합되어진다. 유리콜레스테롤은 간에 함유된 lecithin-cholesterol acyltransferase(LCAT)에 의해 에스테르로 전환되고 조직사이에서 상호 교환되므로, 혈장내 유리콜레스테롤 수준의 변화는 체내 총콜레스테롤 수준을 반영한다고 할 수 있다.[20] 지질 축적으로 인한, 일차적인 담도경화(biliary cirrhosis)시 유리콜레스테롤과 저밀도지단백(low density lipoprotein: LDL)이 증가하는 것으로 알려져 있으므로,[21] DEN에 의한 유리콜레스테롤의 증가는 간장의 지질축적을 유도한다고 사료된다.

간장 중성지질 수준에 미치는 영향

DEN이 계배 간장의 중성지질 수준에 미치는 영향을 분석한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 DEN 투여 48시간 후에는 희석용매만 투여한 대조군에 비해, 수치가 유의성($\alpha=0.05$) 있게 증가하였고, 투여 96시간 후 중간용량으로 투여했을 경우도 유의성 있는 증가를 보였다. 고농도로 처리했을 경우 96시간 후에는 급격한 증가를 보여, 독성노출에 농도 · 시간에 의존적으로 중성지질이 증가함을 나타내었다. 이는 생체 내에 가장 많이 존재하는 중성지질은 한 분자의 glycerol에 세분자의 지방산이 ester 결합으로 이루어 졌는데, 여러 가지 지방산들의 대사 장소인 미토콘드리아의 파괴로 인해 지방산들의 대사가 저하되고 인지질 및 담즙산의 결합으로 중성지질의 양이 증가한 것으로 보인다. 또, 미토콘드리아의 응축으로 긴사슬 지방산이 미토콘드리아 기질 내로 들어가지 못하여 연쇄적으로 일어나는 대사저해가 원인인 것으로 생각된다. 또, Glickman에 의하면 단백질의 합성이 손상을 받으면 세포내 중성지방이 축적된다고도 하는데,[22] 이런 원인들 때문으로 다른 지질보다 급격한 증가를 보인 것으로 생각된다. 간 손상의 가장 흔하면서 특별한 반응은 지방간으로, 지방간의 간세포내 골기체로부터 형성된 지방 소적이 시간이 지날수록 큰 지방 소적이 되고 세포

Table 2. Contents of free cholesterol in liver of chick-embryo treated with diethylnitrosamine (mg/g)

Group	Time following treatment		p-value
	48 hr	96 hr	
Control	1.7 ± 0.1^{a}	1.6 ± 0.1^{d}	NS
DEN 5 mg/egg	1.9 ± 0.1^{a}	2.4 ± 0.2^{de}	0.02*
DEN 10 mg/egg	3.0 ± 0.4^{b}	3.6 ± 1.0^{e}	NS

Means in the same column not sharing a common superscript letters are significantly different ($\alpha=0.05$): the results of all treatment groups classified by dose and control group were analyzed by ANOVA with Duncan's multiple range test for variable. The changes by the time in the treatment groups and control group were analyzed by Student's *t*-test ($\alpha= 0.05$). All data are given as mean standard error. Hours indicates the sampling time following single intraovo injection.

Table 3. Contents of triglyceride in liver of chick-embryo treated with diethylnitrosamine (mg/g)

Group	Time following treatment		p-value
	48 hr	96 hr	
Control	4.4 ± 0.2^{a}	5.2 ± 0.7^{d}	NS
DEN 5 mg/egg	12.0 ± 0.2^{b}	11.8 ± 1.2^{e}	NS
DEN 10 mg/egg	12.5 ± 1.3^{b}	30.6 ± 1.7^{f}	0.0036*

Means in the same column not sharing a common superscript letters are significantly different ($\alpha=0.05$): the results of all treatment groups classified by dose and control group were analyzed by ANOVA with Duncan's multiple range test for variable. The changes by the time in the treatment groups and control group were analyzed by Student's *t*-test ($\alpha= 0.05$). All data are given as mean standard error. Hours indicates the sampling time following single intraovo injection.

질과 핵을 변연으로 밀어 마침내는 풍선형 세포가 된다. 일반적인 의미의 지방간은 대개 에스테르 혹은 아마이드 형의 중성지방의 축적을 의미한다. 독성 지방간의 대부분은 중심소엽부에 먼저 지방 침윤이 나타나는데, 이는 cytochrome P450-dependent microsomal monoxygenase system이 주로 중심 소엽부에 있기 때문으로 알려져 있다.[23] 즉, DEN 투여에 의한 미토콘드리아의 손상은 계배 간장의 중성지질의 함량을 급격하게 증가시켜 지방 축적을 일으키는 것으로 나타났다.

간장의 인지질 수준에 미치는 영향

DEN이 계배 간장의 인지질 수준에 미치는 영향을 분석한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 DEN 투여 48시간 후에는 희석용매만 투여한 대조군에 비해, 수치가 농도 의존적으로 약간 증가를 보였으나 유의성(α=0.05)은 없었다. 투여 96시간 후 중간용량으로 투여했을 경우도 증가를 보였지만 통계적으로 유의하지는 않았다. 고농도로 처리했을 경우 96시간 후에는 오히려 감소를 보여, 독성노출 농도 · 시간 의존적 손상이 가중되면 세포막의 구성성분인 인지질의 수준은 감소하는 경향을 나타내었다. 인지질은 지방산 및 인산으로 구성된 화합물의 총칭으로 콜레스테롤과 함께

Table 4. Contents of phospholipid in liver of chick-embryo treated with diethylnitrosamine (mg/g)

Group	Time following treatment		p-value
	48 hr	96 hr	
Control	8.9±0.3[a]	9.0±0.3[d]	NS
DEN 5 mg/egg	10.7±0.3[a]	10.6±0.2[d]	NS
DEN 10 mg/egg	11.2±0.1[a]	8.5±0.1[d]	NS

Means in the same column not sharing a common superscript letters are significantly different (α=0.05): the results of all treatment groups classified by dose and control group were analyzed by ANOVA with Duncan's multiple range test for variable. The changes by the time in the treatment groups and control group were analyzed by Student's *t*-test (α= 0.05). All data are given as mean standard error. Hours indicates the sampling time following single intraovo injection.

생체막의 중요한 구성성분으로, 대부분의 세포막 구성성분에 매우 중요한 역할을 수행하므로 인지질의 저하는 인체 내부의 여러 가지 장해를 예측할 수 있다. 전자현미경 사진에서 확인한 미토콘드리아의 파괴와 세포막의 손상은 인지질의 농도저하와 관련성을 가지는 것으로 확인되었다. 이는 간 독성을 일으키는 mycotoxin인 ochratoxin,[24] T-2 toxin[25] 등의 결과와도 유사하게 나타났다.

국문요약

Diethylnitrosamine(DEN)은 단일투여로 간암을 일으킨다고 알려지고 있다. 이 실험은 식이에 의한 영향을 배제시키고, 발암물질에 의한 세포손상이 간장의 중성지질 및 여러 콜레스테롤의 함량에 미치는 영향을 살펴보기 위해 실시되었다. 부화되기 10일 전인 발생중의 계란을 무작위로 세 군(n=20)으로 나누고 각 각 10 μl의 corn oil (vehicle control)/egg, 5 μg DEN/10 μl/egg과 10 μg DEN/10 μl/egg을 기실을 통해 난황에 투여하였다. 48 hr, 96 hr 항온 · 발생시킨 후, 계배(chick-embryo) 간세포의 손상의 정도를 전자현미경 사진으로 관찰하고, 아울러 간장의 총 콜레스테롤, 유리콜레스테롤, 인지질, 중성지질의 함량을 측정하여 DEN의 발암성과 지질대사 변화에 대한 연관성을 알아보았을 때 다음과 같은 결과를 얻었다. DEN을 10 μg/egg로 투여한 후 96 시간이 경과한 계배의 간세포는 핵막의 변화가 뚜렷하게 관찰되고, 세포 핵 내에서의 핵 인의 크기도 증가하며, 진정염색질의 축적이 보였다. 세포 소기관인 미토콘드리아는 응축된 구형을 이루고 있고, 내막의 cristae도 퇴행되어 명확하지 않거나 파괴되어 내부 공동현상을 보였다. 그리고, 세포 주위에 지방체의 축적을 보이는 등 DEN에 의한 간세포 손상을 직접적으로 관찰 할 수 있었다. 중성지질 및 총콜레스테롤, 유리콜레스테롤은 대조군에 비해 시간, 용량 의존적으로 유의성있게 증가하였고, 특히 10 μg/egg로 투여한 후 96 시간이 경과한 군에서 triglyceride는 급격히 증가하였다. 세포막의 구성성분인 인지질의 경우 유의성은 없지만 감소하여 세포막 손상으로 인한 간세포의 병변과 간장 지질성분 변화의 연관성을 나타내었다.

참고문헌

1. International Agency for Research on Cancer IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Overall Evaluations of Carcinogenicity at Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42 Lyon: IARC, (1987).
2. Shields, P.G. and Harris, C.C.: Environmental causes of cancer. *Med. Clin. North Am.*, **74**, 263-267 (1990).
3. Foulds, L.: The experimental study of tumor progression, *Cancer Res.*, **14**, 327-328 (1954).
4. 김동훈: 식품화학. 탐구당, 서울, pp.761-762 (1997).
5. Bartsch, H., Ohshima, H. Shuker, D.E., Pignatelli, B. and Calmels, S.: Exposure of humans to endogenous N-nitroso compounds: implicatiopn in cancer etiology. *Mutat Res.*, **238**, 255 (1990).
6. Srinivasan, S. and Glauert, H.P.: Formation of 5-hydroxymethyl-2"-deoxyuridine in hepatic DNA of rats treated with gamma-irradiation, diethylnitrosamine, 2-acetylaminofluorene or the peroxisome proliferator ciprofibrate. *Carcinogenesis*, **11**, 2021-2024 (1990).
7. Horton, A.A. and Fairhurst, S.: Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol.*, **18**, 27-79 (1987).
8. 장동석, 신동화, 정덕화, 김창민, 이인선: 자세히 쓴 식품위생학. 정문각, 서울, pp.154-166 (1999).
9. Witz, G.: Active oxygen species as factors in multistage carcinogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **198**, 675-682 (1991).
10. Wilson, J.G.: Survey of in vitro systems: Their potential use in teratogenicity screening. In Handbook of Teratology (J. G. Wilson and F. C. Franser, eds.), Vol. 4, Plenum, New York, London, pp.135-153 (1978).
11. 이영순: Chick Embryo를 이용한 식품첨가물의 기형독성 시험, *Kor. J. Food Hygiene* **2**, 41-49 (1987).
12. Wyttenbach, C.R., Thompson, S.C. and Kitos, P.A.: Precision delivery of small volumes of liquids to very young avian embryos. I. Locating and positioning the embryo in ovo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 40-96 (1981).
13. 김한수, 정승용: 버터, 정어리유 및 홍화유의 혼합 급이가 흰쥐의 혈청 지질성분 및 간기능 효소 활성에 미치는 영향, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 608-616 (1992).
14. Williams, G.M.: The pathogenesis of rat liver cancer by chemical carcinogens. *Biochim. Biophys. Acta.*, **605**, 167-189 (1980).
15. Magee, P.N.: Toxic liver necrosis, *Lab. invest.*, **15**, 111-131 (1966).
16. Hoffsten, P.E., Hunter, F.E. Jr., Gebicki, J.M. and Weinstein, J.: Formation of "lipid peroxide" under conditions which lead to swelling and lysis of rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **7**, 276-280 (1962).
17. Parke, D.V. and Sapota, A.: Chemical toxicity and reactive oxygen species. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, **9**, 331-340 (1996).
18. 이혜영, 류재혁, 지관자 Diethylnitrosamine(DEN)에 의한 흰쥐 간세포의 변화. *Korean J. Zool.*, **34**, 403-409 (1991).
19. 생명과학연구회: 현대생명과학, 탐구당, 16-56 (1991).
20. Harrison, T.R.: Principles of internal medicine, Thirteenth Edition, *McGRAW-HILL, Inc.* **2**, 2058-2069 (1994).
21. Guido M. and Isabelle J.: Cells, Tissues and DIsease, Blackwell Science, pp. 103-108 (1994).
22. Glickman, R.M., Kilgore, A. and Khorana. J.: *J. Lipid Res.*, **19**, 260 (1978).
23. Gooding, P.E., Chayen, J., Sawyer, B. and Slater, T.F.: Cytochrome P450 distribution in rat liver and the effect of sodium phenobarbitone administration. *Chem Biol. Interac.* **20**, 299-310 (1978).
24. 박정현: Ochratoxin A 유발 산화적 손상 및 항산화비타민에 의한 저독효과, 경상대학교 석사학위논문 (1999).
25. 제정인: T-2 toxin의 면역독성 및 변이원성에 관한 실험적 연구, 경상대학교 박사학위논문 (1994).
26. Ramesh G.: Effect of dietary fat on diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Cancer lett.*, **95**, 237-245 (1995).
27. Lobaridi, B.: Considerations on the pathogenesis of fatty liver. *Lab. Invest.* **15**, 1-20 (1966).