

만성적인 에탄올 섭취가 흰쥐의 엽산대사 및 혈장 호모시스테인 농도에 미치는 영향

임은선 · 서정숙 · 민혜선*

영남대학교 식품영양학과, 한남대학교 가정교육과*

Effects of Chronic Ethanol Administration on Folate Metabolism and Plasma Homocysteine Concentration in the Rats

Im, Eun-Sun · Seo, Jungsook · Min, Hyesun*

Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea
Department of Home Economics Education,* Taejeon 300-791, Korea

ABSTRACT

The present study was conducted to investigate the effect of different levels of ethanol ingestion on folate metabolism and plasma homocysteine concentration in Sprague-Dawley male rats receiving 0, 10, 30% of their caloric intake as ethanol for 5 weeks. Diets containing 10% ethanol had no effect on plasma and red blood cell(rbc) folate. However, in rats fed a 30% ethanol diet, rbc folate increased and plasma folate decreased significantly. In the rats maintained first on a 30% ethanol diet for 5 weeks and then on a control diet for 2 weeks, the levels of plasma and rbc folate were normalized by withdrawal of ethanol. Urinary folate excretion increased markedly in rats fed 10% and 30% ethanol diets and decreased to 51% of controls by withdrawal of ethanol. Plasma homocysteine concentration increased significantly in rats fed a 30% ethanol diet. The results suggest that chronic ingestion of ethanol increased urinary folate excretion markedly, which may decrease plasma folate and deplete liver folate. (Korean J Nutrition 31(6) : 1006~1013, 1998)

KEY WORDS : ethanol · folate status · urinary folate · plasma homocysteine · rats.

서론

인체에 있어 엽산결핍의 주된 원인은 불량한 식사이지만, 만성적으로 에탄올을 섭취하는 사람은 엽산이 결핍되기 쉽다¹⁾. 만성적으로 에탄올을 섭취하는 사람들 가운데 87%가 엽산 결핍상태를 나타냈고, 61%가 거대적아구성 빈혈인 것으로 보고되어 알코올 섭취자의 엽산결핍율이 매우 높은 것으로 조사되었다²⁾. 일반적으로 만성적 에탄올 섭취자 가운데 영양상태가 불량한 사람들에게서 엽산결핍이 많이 나타나지만²⁾, 만성적 에탄올

섭취자의 엽산 결핍증은 영양불량인 경우 뿐 아니라 정상적인 식이를 섭취하는 경우에도 나타난다^{3,4)}.

에탄올을 만성적으로 섭취할 때 엽산이 결핍되는 주된 원인은 확실치 않으나 다음과 같은 몇가지 복합적인 요인들에 의해 엽산 대사가 손상되기 때문인 것으로 보고되었다. 에탄올 섭취자들은 불량한 식사로 인해 엽산 섭취가 부족되기 쉬우며^{5,6)}, 소장에서 엽산의 흡수가 저해되며^{6,9)}, 소변을 통한 엽산의 배설량이 증가되며¹⁰⁻¹⁴⁾, 엽산의 조직간 운반능력이 손상되어^{15,16)} 엽산결핍을 가져올 수 있다.

에탄올이 소장에서의 엽산 흡수를 저해하는 이유는, 1차적으로 에탄올의 독성으로 인해 소장점막이 손상되

채택일 : 1998년 7월 7일

어 엽산의 흡수 및 운반이 불량해져 엽산의 이용률이 저하되며, 2차적으로 에탄올은 엽산결핍을 유발하므로써 소장 점막세포의 손상을 가져오기 때문인 것으로 알려져 있다⁶⁻⁹⁾. 에탄올이 소변내 엽산배설을 증가시키는 기작은 확실치 않으나, 에탄올의 독성으로 인해 근위세뇨관에 있는 엽산 결합단백질의 엽산에 대한 친화력이 저하됨으로써 엽산의 재흡수가 저해되어 신장을 통한 엽산배설이 증가될 수 있으며 이로인해 혈장 엽산수준이 저하되는 것으로 보고되었다^{10,14)}. 또한, 에탄올은 엽산의 저장장소로부터 엽산이 정상적으로 동원되는 과정을 방해하므로써 혈중 엽산농도를 저하시키며, 조직내 저장된 엽산이 골수세포로 수송되는 과정이 저해될 수 있다¹⁵⁾. 즉, 엽산의 혈중 운반형태인 5-methyltetrahydrofolate가 간으로부터 방출되는 과정이 에탄올에 의해 저해되어 혈장내 엽산농도가 감소되는 것으로 제안되었다¹⁵⁾.

합황 아미노산인 호모시스테인은 5-methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase와 betaine homocysteine methyltransferase에 의해 메틸화되어 메티오닌으로 전환되거나 cystathionine β-synthase에 의해 cystathionine으로 대사되며, 이 과정에서 엽산, 비타민 B₁₂, 비타민 B₆가 조효소로 작용한다. 인체 및 실험동물의 혈장 호모시스테인 농도가 높을수록 혈장의 엽산 및 비타민 B₆ 농도가 낮았으며^{17,18)}, 엽산 및 비타민 B₁₂ 영양상태가 저조한 사람에게서 호모시스테인혈증이 높은 비율로 나타나 이들간의 상관관계가 높은 것으로 조사되었다^{19,20)}. 혈액내에 호모시스테인 농도가 비정상적으로 증가되면 조기 폐색성 혈관계 질환의 위험이 높으며²¹⁻²⁵⁾, 조기 폐색성 혈관계 질환자들의 엽산 영양상태가 저조한 것으로 조사되어¹⁸⁻²⁰⁾, 과다한 혈장 호모시스테인 농도가 관상순환계 및 뇌혈관계 질환의 독립적인 위험요인으로 새로이 연구되고 있다.

본 연구에서는 엽산을 충분히 공급받은 흰쥐를 대상으로 저수준 및 고수준의 에탄올 공급, 즉 1일 섭취 열량의 0, 10, 30%를 에탄올로 급여한 실험군 및 30% 에탄올 급여후 2주간 정상식을 공급한 회복군의 체내 엽산상태를 조사하므로써 에탄올이 엽산대사에 미치는 영향을 조사하고, 수준별 에탄올의 급여에 따른 소변의 엽산 배설량을 분석하므로써 에탄올에 의한 엽산 손실량을 조사하여 만성적 에탄올 섭취가 엽산대사를 저해하는 과정을 분석하였다. 또한, 수준별 에탄올 섭취가 흰쥐의 혈장내 호모시스테인 농도에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

본 실험에 사용한 실험동물은 Sprague-Dawley종 숫쥐로서 한국화학연구소에서 분양받아 환경이 조절된 사육실(온도 20±2℃, 습도 55±1%, 조명 8 : 00 a.m. ~ 20 : 00 p.m.)에서 stainless steel wire cage에 한 마리씩 분리하여 평균 체중이 200g이 될 때까지 고형사료로 사육하였다.

만성적 에탄올 급여효과를 조사할 목적으로 혈중 에탄올 농도를 일정하게 유지시키기 위해 Lieber-DeCarli 액체식이^{26,27)}를 사용하였다. 이때, 액체식은 분말형태의 premixture diet을 미리 준비한 후 일정량의 탄수화물이나 에탄올(95% 에탄올 사용)을 매일 혼합하여 액체식이 형태로 공급하였으며, 구체적인 식이조성은 Table 1과 같다. 실험식이 1ml이 1kcal를 공급하도록

Table 1. Composition of experimental liquid diets

Ingredient	g/ℓ Diet
Casein	41.4
L-cystine	0.5
DL-methionine	0.3
Corn oil	8.0
Olive oil	15.0
Dextrin-maltose ¹⁾	153.0
Fiber	10.0
Xanthan gum	3.0
Choline bitartrate	0.53
Vitamin mixture ²⁾	2.55
Mineral mixture ³⁾	9.0
Ethanol ⁴⁾	0

¹⁾Dextrin-maltose content in experimental liquid diets : 153g/ℓ for control group, 128g/ℓ for 10% ethanol diet group(LE), 80g/ℓ for 30% ethanol diet group(HE) and ethanol withdrawal group(HR)

²⁾Vitamin mixture ingredients(mg/1000 kcal) : Thiamin HCl 1.530, Riboflavin 1.530, Pyridoxine HCl 1.785, Niacin 7.650, Calcium pantothenate 4.080, Folic acid 0.510, Biotin 0.510, Vitamin B₁₂, Vitamin E 25.500, Vitamin A, 2.040, Vitamin D₃ 0.638, Sucrose 2.500, P-aminobenzoic acid 12.500, Inositol 25.000

³⁾Mineral mixture ingredients(1000 kcal) CaHPO₄ 4.500g, NaCl 0.666g, Potassium citrate 1.980g, Potassium sulfate 0.468g, Magnesium oxide 0.216g, Manganese carbonate 0.032g, Ferric citrate 0.054g, Zinc carbonate 0.014g, Cupric carbonate 0.090mg, Potassium iodate 0.090mg, Sodium selenite 4.950mg, Chromium potassium sulfate 1.062g, Sucrose 1.062g, Fluoride 0.25mg

⁴⁾Ethanol content in experimental liquid diets : 0g/ℓ for control group, 14g/ℓ for 10% ethanol diet group(LE), 42g/ℓ for 30% ethanol diet group(HE) and ethanol withdrawal group(HR)

구성하였으며, 모든 실험동물들에게 충분한 엽산(0.5mg/1000kcal)을 공급하였다.

원위를 체중에 따라 난괴법을 이용하여 8마리씩 4군으로 나누어, 5주동안 에탄올을 공급하지 않은 대조군(C), 총 열량의 10%를 에탄올로 공급한 LE군, 30%를 에탄올로 공급한 HE군과 30% 에탄올을 5주간 공급한 후 다시 2주간 정상식을 공급한 회복군(HR)으로 설정하였다. 각 실험군에게 일주일간의 에탄올 식이 적응과정을 거치게 한 후 본 실험을 시작하였다. 30% 에탄올 급여군에게 *ad libitum*으로 식이를 공급하고, 이들의 1일 사료공급량을 기준으로 나머지 실험군들에게 pair-feeding하였다. 사료섭취량은 매일 확인하였고, 체중은 1주일 간격으로 측정하였으며, 이를 이용하여 사료효율을 계산하였다.

2. 시료수집 및 분석

1) 혈액 및 간 조직

실험동물을 희생하기 전 12시간 동안 절식시키고 에테르로 마취하여 개복한 후 즉시 헤파린으로 처리된 주사기를 사용하여 복부 대동맥으로부터 혈액을 채혈하였다. 채취한 혈액 중 0.8ml을 제외한 나머지 혈액을 3000 rpm에서 냉장·원심분리하여 혈장을 분리시킨 후 일정량으로 나누어 -70℃에서 보관하였다. 전혈은 채혈 당일에 엽산분석을 위해 종전과 같은 방법²⁸⁾으로 준비하여 -70℃에서 보관하였다. 혈액 채취 후 즉시 간을 적출하여 부착되어 있는 지방을 깨끗이 제거한 다음 여과지로 물기를 닦고 무게를 측정하여 일정량으로 나누어 -70℃에서 보관하였다.

2) 뇨

실험동물을 희생시키기 2일 전에 24시간 동안 metabolic cage에서 sodium-ascorbate(1g) 분말을 넣은 프라스틱 병에 알루미늄 박을 씌워서 뇨를 수집하였다. 뇨는 수집한 즉시 여과하여 총 부피가 100ml이 되도록 증류수로 희석하여 분석할 때까지 냉동 보관하였다.

3) 조직 및 뇨중의 엽산함량 분석

시료의 엽산 함량은 미생물학적 방법을 이용하여 분석하였으며, Bird등²⁹⁾의 방법을 일부 수정하여 사용하였다¹⁹⁾. 본 실험에 이용된 *Lactobacillus casei*(*L. casei*, ATCC 7469)는 생명공학연구소로부터 분주받았다.

간과 적혈구 추출액은 폐지의 신장으로 부터 추출한 folate conjugase²⁸⁾로 처리한 후 엽산분석에 사용되었으며, 혈장과 소변의 추출액은 folate conjugase로 처리하지 않고 일정 비율로 희석한 후 직접 엽산 분석에

이용되었다.

4) 혈장 호모시스테인의 정량

혈장 호모시스테인 농도는 Araki와 Sako³⁰⁾의 방법을 이용하여 HPLC로 분석하였다. 혈장 호모시스테인의 티올기와 ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulphonate(SBD-F, Wako사)를 반응시켜 높은 형광성을 나타내면서 안정한 성질을 가진 형광물질을 형성시킨 후, 이 형광물질은 fluorescence detector로 정량하였다.

HPLC는 2개의 펌프 시스템과 SCL-10A system controller(Shimadzu)를 사용하여 수행하였다. 시료는 20μl 루프를 사용하여 Rheodyne injector로 주입하였으며, Shim-pack CLC-ODS(150×4.6mm I.D., 5μm particle size)를 분석용 column으로, Shim-pack CLC-G-ODS(10×4.6mm)를 Guard column으로 사용하였다. 형광도를 측정할 때 excitation wave length는 385nm, emission wave length는 515nm에서 Shimadzu RF 10AXL을 사용하여 측정하였다. 측정된 형광도는 Chromatopac C-R6A로 기록·정량하였다.

(1) 시약 및 재료 준비

DL-호모시스테인(Sigma사)을 0.125 M borate buffer용액(pH 9.5, 4mM EDTA 함유)에 녹여 호모시스테인 표준용액으로 준비하였다. 표준용액은 냉장고에서 4일간 안정하며 SBD-F와 반응된 후에는 8일간 안정하였다. Tri-n-butylphosphine(Fluka사)은 dimethylformamide에 녹여 10% 용액으로 준비하였으며, SBD-F 용액은 0.125M borate buffer 1ml당 1mg을 녹여 사용하였다. 1mM EDTA가 함유된 10% Trichloroacetic acid(TCA)용액을 준비하여 냉장고에 보관하였다.

HPLC의 이동상으로는 0.1M acetate buffer(pH 4.0, 2% 메탄올 함유)용액을 A용매로 사용하였고, 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.0, 5% 메탄올 함유)용액을 B용매로 사용하였다. 용매의 flow rate는 1ml/min이었으며, A용매에서 B용매로 linear gradient(0~100%)를 나타내며 20분 동안 흐르게 하였다.

(2) 시료 처리

혈장 300μl를 유리 원심분리관에 넣고 10% tri-n-butylphosphine용액 30μl를 첨가한 후 잘 혼합하여 4℃에서 30분 동안 방치하였다. 냉각된 10% TCA용액 300μl를 가한 후 잘 혼합하여 4℃, 3000g에서 5분간 원

심분리하였다. 상층액 100μl를 취해 1.55M NaOH 20μl, 0.125M borate buffer 용액(pH 9.5, 4mM EDTA 함유) 250μl, SBD-F 용액 100μl를 첨가한 후 60°C에서 1시간 동안 잘 혼합하면서 반응시켰다. 모든 시약과 시료는 HV filter(0.45μm, Millipore사)로 여과한 후 column에 주입하였다.

3. 통계처리

실험 결과의 통계 처리는 SAS package를 이용하여 수행하였다. 실험식이의 처리에 의한 각 분석항목의 분석치는 각 식이별로 평균값과 표준편차로 나타냈으며, 식이별 평균치간의 차이에 대한 유의성은 Duncan's multiple range test에 의해 유의수준 α=0.05에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 식이섭취량과 성장

실험식이를 5주간 공급하였을 때 실험동물들의 식이섭취량은 모든 식이군에서 유의적인 차이가 없었으나 30% 에탄올급여군의 체중증가율이 pair-fed한 대조군보다 대체로 낮은 경향이였으며, 회복군의 체중증가율 및 사료효율은 대조군보다 유의적으로 낮았다(Table 2). 이러한 결과로부터, 5주 동안의 30% 에탄올 급여가 동물의 체중증가를 다소 둔화시키며, 그후 2주 동안 정상식이 공급을 통한 회복기간에도 체중증가의 둔화현상이 개선되지 않음을 알 수 있었다. 만성적으로 에탄올을 공급할 때 체중이 감소되는 이유는 식이섭취량의 감소, 흡수율의 감소 및 대사이상으로 인한 영양소

의 손실증가에 기인하거나, 에너지의 소비가 증가되기 때문인 것으로 보고되었다³⁾. 회복군의 식이섭취량과 체중이 30% 에탄올 급여군보다 낮은 이유는 30% 에탄올 급여군의 경우 5주간 사육하였으나 회복군은 그후 2주간 더 사육하였기 때문에 실험동물의 성장률이 저하된 이후의 성장속도가 회복군에 반영되었으며, 2주간의 짧은 기간동안에 에탄올급여로 인한 영향이 완전히 회복되지 않았기 때문인 것으로 사료된다. 에탄올을 섭취열량의 10% 수준으로 공급하였을 때 체중의 증가는 대조군보다 다소 높았으나 유의적인 차이는 없었다(Table 2).

간의 무게를 체중 100g당의 무게로 환산하였을 때, 에탄올 급여정도에 따라 간의 무게가 차이가 없는 것으로 나타났으며(Table 2), 지방간의 증세도 없는 것으로 관찰되었다. Carreras 등³¹⁾은 20주 동안 30% 에탄올을 수용액 상태로 공급하였을 때 체중과 간의 무게가 감소되었다고 보고하였으며, Hidiroglou 등³²⁾은 5% 에탄올급여군의 체중이 대조군보다는 낮았지만 간의 무게는 증가하였다고 보고하였다. 본 실험에서 간의 무게가 에탄올의 급여에 의해 영향을 받지 않은 이유는 에탄올 급여기간이 비교적 짧았기 때문인 것으로 보인다.

2. 간의 엽산 함량

모든 실험군에서 간의 엽산함량이 정상범위에 속했으나, 대체로 에탄올급여군(LE, HE, HR)이 대조군보다 유의적으로 낮은 간조직내 엽산 저장량을 나타냈으며 특히 30% 에탄올급여군에서 가장 낮았다(Table 3). 이와같이 5주간의 에탄올급여에 의해 실험동물의 간조직내 엽산이 현저히 고갈되는 현상은 관찰되지 않았으나, 에탄올의 급여율이 증가될수록 간조직내 엽산

Table 2. Effect of chronic ethanol consumption on food intake, body weight gain, food efficiency ratio, and relative wet weight of liver in rats¹⁾

Group	% Ethanol	Food intake(ml/day)	Weight gain(g/day)	F.E.R. ²⁾	Liver weight (g/100g body weight)
C	0	89.1±0.7 ^{NS3)}	4.6±0.3 ^{ab4)}	0.051±0.004 ^{ab}	2.78±0.14 ^{NS3)}
LE	10	90.1±0.3	4.8±0.4 ^a	0.054±0.003 ^a	2.82±0.17
HE	30	88.6±0.7	4.3±0.3 ^b	0.049±0.003 ^b	2.78±0.17
HR	30 and 0	90.4±1.4	3.8±0.3 ^c	0.042±0.003 ^c	2.88±0.20

¹⁾Mean±standard deviation

²⁾Food Efficiency Ratio

³⁾NS : not significant

⁴⁾Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple-range test

Table 3. Effect of chronic ethanol consumption on the level of folate in liver, red blood cell, and plasma in rats¹⁾

Group	% Ethanol	Liver folate(μg/g)	rbc folate(ng/ml)	plasma folate(ng/ml)
C	0	12.9±1.1 ^{a2)}	555.2±83.3 ^b	245.7±19.8 ^a
LE	10	11.9±0.6 ^b	634.4±96.5 ^b	221.1±27.1 ^{ab}
HE	30	10.8±0.7 ^c	766.6±95.2 ^a	205.1±28.4 ^b
HR	30 and 0	11.9±1.0 ^b	653.0±65.1 ^b	259.2±56.1 ^a

¹⁾Mean±standard deviation

²⁾Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple-range test

합량은 감소하는 경향을 나타냈다. 회복군의 간 엽산함량은 대조군의 수준에는 미치지 못했지만 30% 에탄올 급여군 보다 높게 나타남으로써 에탄올 급여를 중단한 다음 2주후에 간의 엽산함량이 회복됨을 보여주었다 (Table 3).

일반적으로 엽산 결핍식이를 급여받은 흰쥐의 조직내 엽산저장이 고갈되기 위해서는 8~12주일이 소요되었고¹¹⁾, 충분한 엽산을 공급받은 흰쥐를 대상으로 에탄올 식이를 공급하였을 때 조직내 엽산이 고갈되는 기간은 12주 이상이 소요되어¹¹⁾ 엽산 결핍식이에 의해 조직내 엽산저장량이 고갈되는 데 소요되는 기간보다 에탄올 급여에 의해 엽산저장량이 고갈되는데 필요한 시간이 더 긴 것으로 보고되었다. 본 연구에서 실험동물에게 공급한 식이내 엽산량(0.5mg/1000kcal)은 상당량의 여유분이 가산된 수준이므로 간조직내 엽산량이 고갈되기 위해서는 상당한 기간이 소요될 가능성이 있다. 인체에 있어서도 식이내 엽산 섭취량이 한계수준일 때 에탄올이 엽산저장을 고갈시키는 효과가 훨씬 높은 것으로 보고되었다⁹⁾.

Tamura 등³⁰⁾은 흰송이를 대상으로 2년간 영양적으로 균형잡힌 에탄올식이를 공급하였을 때 간의 엽산수준이 50% 감소된 것으로 보고하였으며, 이와같이 간조직내 엽산이 만성적 에탄올 급여에 의해 감소되는 이유는 소장에서의 흡수불량³⁰⁾, 간조직으로의 엽산 유입의 감소³³⁾ 및 소변을 통한 엽산 손실량의 증가¹¹⁾ 등 복합적인 요인이 작용하기 때문인 것으로 제안하였다. 그러나, 이와 대조적으로 식이열량의 30%를 알코올로 공급하였을 때 간에서 folylpolyglutamate의 합성율이 증가하며 5-methyltetrahydrofolate의 생성율이 감소하여 간으로부터 혈액으로의 엽산유출이 저해되어 간의 엽산 저장량이 대조군보다 오히려 높았고¹⁵⁾, 만성적인 에탄올 급여(20주간 30% 에탄올급여)시 소장에서는 이를 보상하기 위한 작용으로 인해 엽산의 흡수가 증가된다는 보고³¹⁾도 있다.

3. 적혈구 및 혈장의 엽산 농도

적혈구와 혈장의 엽산 농도는 Table 3에 제시하였다. 적혈구의 엽산농도는 30% 에탄올급여군이 대조군보다 유의적으로 높았으며, 10% 에탄올급여군과 회복군은 대조군과 유의적인 차이가 없었다(Table 3). 이와 같은 결과는 돼지에게 60% 에탄올을 11개월간 먹었을 때 에탄올급여군의 적혈구 엽산농도가 대조군보다 높게 나타났다는 결과⁷⁾와 유사했다. 그러나, 간조직내 엽산함량이 에탄올 급여에 의해 감소된 결과(Table 3)로부터 판단할 때, 본 연구에서 나타난 적혈구 엽산농도

가 에탄올 급여에 의해 증가된 이유는 확실치 않다.

혈장 엽산농도는 10% 에탄올급여에 의해 다소 저하되었으나 유의적인 차이는 없었으며 30% 에탄올급여군의 혈장 엽산농도는 대조군보다 유의적으로 낮았다 (Table 3). 에탄올의 급여를 중단하였을 때 회복군의 혈장내 엽산농도가 대조군보다 다소 높은 수준으로 회복되어 (Table 3) 혈장내 엽산함량은 알코올 급여수준 및 알코올의 급여증지에 의해 영향을 민감하게 받는 것으로 나타났다. McMartin 등¹¹⁾은 에탄올을 급여받은 흰쥐의 소변내 엽산배설량이 빠른 시일(2주)내에 크게 증가되고, 그 이후에 혈장엽산 농도가 저하된다는 사실로부터 소변을 통한 엽산손실이 알코올 섭취자들의 엽산결핍의 주요 원인으로 작용하는 것으로 제안하였다. Wilkinson 등³⁵⁾은 30% 에탄올식이를 급여했을 때 혈장의 엽산농도가 대조군과 유의적 차이가 없는 것으로 보고하여 본 실험과 차이가 있었다.

4. 소변내 엽산 배설량

24시간 동안 소변으로 배설된 엽산배설량은 10%와 30% 에탄올급여군이 대조군보다 유의적으로 크게 높았다(Fig. 1). 소변내 엽산배설량은 10% 에탄올급여군이 대조군의 153.5%, 30% 에탄올급여군이 대조군의 188.4%로서 낮은 수준(10%)의 에탄올 급여도 소변내 엽산배설량을 크게 증가시켰다. 5주 동안의 30% 에탄올 급여를 중단한 다음 2주후, 회복군의 소변내 엽산배설량은 대조군의 51.0% 수준으로 저하되어 에탄올의 급여를 중단하면 소변내 엽산 배설량이 오히려 정상수준 이하로 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 1). McMartin 등¹¹⁾은 충분한 엽산을 공급받은 흰쥐에 있어 에탄올이 소변내 엽산배설량을 크게 증가시키는 효과가 빠른 시일(2주) 이내에 나타나며 간조직내 엽산 저장량의 고갈현상에 선행하여 나타나는 것으로 보고하였으며, 본 실험을 통해 에탄올급여시 소변을 통한 엽산 손실이 혈장 및 간조직내 엽산 고갈의 주요한 요인으로 작용할 수 있음을 확인하였다.

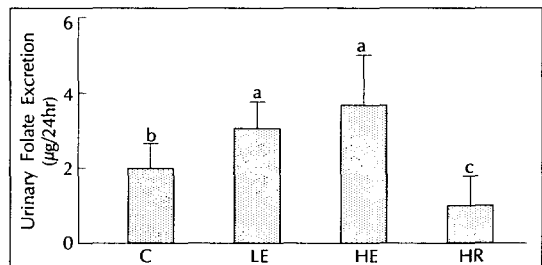


Fig. 1. Effect of chronic ethanol consumption on the level of urinary folate excretion in rats. Values with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple-range test.

에탄올은 신장에서의 사구체 여과율에는 영향을 주지 않지만 이눌린제거율 대비 엽산제거율을 증가시킴으로써 소변내 엽산배설량을 증가시키는 것으로 보고되었다³⁶⁾. 엽산은 사구체에서 여과된 후 근위세뇨관에서 대부분이 재흡수되며³⁷⁾, 엽산이 신장에서 재흡수되는 첫단계는 근위세뇨관의 brush border membrane에 있는 특정 결합단백질과의 결합에 의해 이루어지고 이어서 다음 단계인 엽산의 운반과정이 뒤따른다³⁶⁾. 에탄올은 근위세뇨관내 결합단백질의 엽산에 대한 친화력을 저하시키거나 운반과정을 저해하므로써 엽산의 재흡수를 저해하는 것으로 보고되었다²⁶⁾. 본 연구에서 회복군이 정상식을 2주간 급여받은 후 소변내 엽산함량이 크게 감소된 결과(Fig. 1)로부터 에탄올에 의해 신장내 엽산 재흡수가 저해되는 영향이 신속히 제거되므로써 회복군의 혈장내 엽산농도가 회복되는데 기여한 것으로 보인다.

급성 및 만성적 에탄올급여가 소변내 엽산배설량을 증가시키는 것으로 알려져 있다^{12,38)}. 소변내 엽산 배설량이 만성적 에탄올 급여에 의해 증가되는 현상은 엽산 결핍식이를 공급받은 흰쥐에서는 나타나지 않았으며, 이때 엽산 결핍식이를 공급받은 쥐는 24시간 굶긴 쥐와 유사하게 매우 소량의 엽산을 소변으로 배설하였다. 이와 대조적으로 흰쥐를 16시간 굶긴 상태에서 20% 에탄올 용액을 1시간 간격으로 6시간 동안 급성적으로 위내 투여 하였을 때 엽산배설량이 6배 이상 증가되었다¹⁴⁾. 식이내 엽산공급을 중단하였을 때 만성적인 에탄올급여가 소변내 엽산배설량에 영향을 주지 않는 이유는 체내 엽산을 보유하기 위한 적응기전에 의해 엽산배설량이 저하되기 때문이며, 이러한 적응현상은 엽산 결합단백질을 매개로 이루어지는 신장에서의 재흡수과정이 변화되기 때문인 것으로 보고되었다³⁹⁾.

5. 혈액의 호모시스테인 농도

실험동물이나 인체의 엽산이 결핍되면 혈장 호모시스테인 농도가 증가되어 혈청 엽산농도가 양호한 대조군보다 높았으며^{18,20,25)}, 만성적인 에탄올 섭취자들의 혈장 호모시스테인 농도가 대조군보다 두배 높은 것으로 나타났다³⁴⁾. 호모시스테인혈증은 관상동맥경화증의 원인 인자로서, 혈중 low density lipoprotein(LDL) 농도가 낮아도 혈장의 호모시스테인 농도가 높을 때 관상동맥경화증이 나타날 수 있기 때문에 LDL의 농도와는 독립적으로 관상동맥성 질병에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. 또한, 관상동맥경화증 환자 혹은 급성 심근경색증 환자에게 엽산이나 비타민 B₆과 비타민 B₁₂을 보충하여 공급하면 호모시스테인의 농도가 감소되어

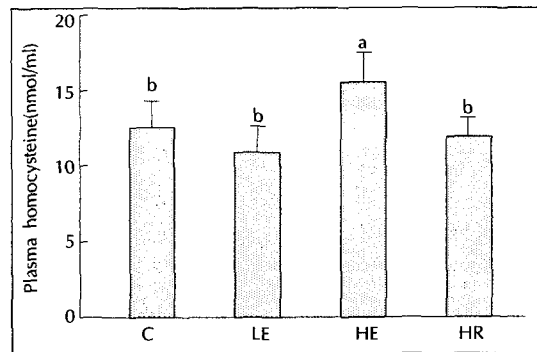


Fig. 2. Effect of chronic ethanol consumption on the level of plasma homocysteine in rats. Values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple-range test.

호모시스테인혈증이 개선되는 것으로 보고되었다^{17,19,20)}.

본 실험에서 조사된 혈장 호모시스테인의 농도는 대조군(12.3nmol/ml)과 모든 실험군에 있어서 정상범위에 속했으므로(Fig. 2), 5주간의 에탄올 급여는 심한 호모시스테인혈증을 일으키기에는 다소 부족한 조건이었던 것으로 사료된다. Fig. 2에 제시된 바와 같이 30% 에탄올급여군의 혈장 호모시스테인 농도는 대조군보다 유의적으로 높았으며, 10% 에탄올급여군의 혈장 호모시스테인 농도는 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 이때, 회복군의 혈장 호모시스테인 농도는 대조군과 유사하여 에탄올급여를 중단하였을 때 혈장 호모시스테인 수준이 개선되는 경향을 보였다(Fig. 2). 본 실험에서 30% 에탄올급여군의 혈장내 호모시스테인 수준이 대조군에 비해 다소 높게 나타난 것은 에탄올에 의해 엽산 영양상태가 다소 저하되었기 때문인 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 수준별 에탄올의 만성적 급여와 에탄올의 급여 중단이 체내 엽산 영양상태, 소변내 엽산배설량 및 혈장 호모시스테인 농도에 미치는 영향을 조사하였다. Sprague-Dawley종 흰쥐 32마리를 5주 동안 10% 및 30% 에탄올을 급여한 실험군(LE, HE)과 30% 에탄올을 5주간 급여한 후 2주간 정상식이를 공급한 회복군(HR)으로 구분하여 실험식이를 급여한 후 pair-fed한 대조군(C)과 비교·분석하였다. 그 결과를 종합하면 다음과 같다.

1) 에탄올급여군들(LE, HE)의 식이섭취량은 pair-fed한 대조군과 유의적인 차이가 없었으나, 30% 에탄

을급여군의 체중증가율과 사료효율이 대조군보다 다소 높은 경향이었으며, 회복군의 체중증가량과 사료효율은 대조군보다 유의적으로 낮아 다량의 에탄올 급여에 의해 체중증가가 둔화되었다.

2) 간의 엽산함량은 대조군과 에탄올급여군(LE, HE, HR)이 정상범위를 나타냈으나, 에탄올 급여수준이 증가함에 따라 감소되었으며 에탄올의 급여를 중단한 회복군의 간조직내 엽산량은 회복되는 경향을 나타냈다. 적혈구의 엽산농도는 30% 에탄올급여군이 대조군보다 유의적으로 높았으며 10% 에탄올급여군과 회복군은 대조군과 유의적 차이가 없었다. 혈장 엽산농도는 10% 에탄올급여군은 대조군과 유의적인 차이가 없었으나, 30% 에탄올급여군의 혈장 엽산농도는 대조군보다 유의적으로 낮았다. 에탄올의 급여를 중단한 회복군의 혈장 엽산농도는 대조군보다 다소 높은 수준으로 회복되어 에탄올 급여중단에 의해 가장 예민하게 영향을 받았다.

3) 소변의 엽산배설량은 10% 및 30% 에탄올급여군이 대조군의 153.5% 및 188.4%로서 크게 높았으며, 회복군의 엽산배설량은 대조군의 51.0% 수준으로 감소되어 소변내 엽산배설량은 에탄올 급여수준 및 에탄올 급여중단에 의해 민감하게 변화되었다. 이 결과로부터 에탄올급여시 소변을 통한 엽산 손실이 혈장 및 조직내 엽산고갈의 주요한 요인으로 작용할 수 있음을 확인하였다.

4) 혈장 호모시스테인 농도는 대조군과 모든 실험군(LE, HE, HR)이 정상범위에 속했으나, 30% 에탄올 급여군이 대조군보다 유의적으로 높았다. 30% 에탄올 급여군의 혈장내 호모시스테인 수준이 대조군에 비해 다소 높게 나타난 것은 에탄올에 의해 엽산 영양상태가 다소 저하되었기 때문인 것으로 사료된다.

이상의 결과로부터 10% 에탄올급여 수준이 체내 엽산 영양상태에 미치는 영향은 대조군과 비교할 때 유의적인 차이가 없었으나 30% 에탄올급여군은 대조군과 뚜렷한 차이가 있었다. 그러나, 엽산공급이 충분한 흰쥐를 대상으로 식이열량의 10% 또는 30%를 에탄올로 5주간 급여하였을 때 조직내 엽산저장량이 5주내에 정상수준 이하로 저하되지는 않았으나 에탄올의 급여량에 따라 유의적인 차이를 나타냈다. 소변을 통한 엽산 배설량은 소량의 에탄올(10%) 급여에 의해서도 크게 증가되어 혈장 엽산농도를 저하시키는데 요인으로 작용하므로써 장기간에 걸친 만성적 에탄올 급여시 엽산 영양상태를 저하시키는 주요 요인으로 작용하는 것으로 사료된다.

■ Acknowledgements

This research was supported by the 1996 Korean Science and Engineering Foundation(KO-SEF) grant(No. 961-0604-028-2).

Literature cited

- 1) Herbert V, Zalusky R, Davidson CS. Correlation of folate deficiency with alcoholism and associated macrocytosis, anemia, and liver disease. *Ann Intern Med* 58 : 977-988, 1963
- 2) Halsted CH. Folate deficiency in alcoholism. *Am J Clin Nutr* 33 : 2736-2740, 1980
- 3) Mezey E. Alcoholic liver disease : Roles of alcohol and malnutrition. *Am J Clin Nutr* 33 : 2709-2718, 1980
- 4) Halsted CH. Alcoholism and malnutrition. Introduction to the symposium. *Am J Clin Nutr* 33 : 2705-2708, 1980
- 5) Eichner ER, Hillman RS. Effect of alcohol on serum folate level. *J Clin Invest* 52 : 584-591, 1973
- 6) Halsted CH, Robles EA, Mezey E. Intestinal malabsorption in folate-deficient alcoholics. *Gastroenterology* 64 : 526-532, 1973
- 7) Reisenauer AM, Buffington CAT, Villanueva JA, Halsted CH. Folate absorption in alcoholic pigs : in vivo intestinal perfusion studies. *Am J Clin Nutr* 50 : 1429-1435, 1989
- 8) Naughton CA, Chandler CJ, Halsted CH. Folate absorption in alcoholic pig : in vitro hydrolysis and transport at the intestinal brush border membrane. *Am J Clin Nutr* 50 : 1436-1441, 1989
- 9) Halsted CH, Robles EA, Mezey E. Decreased jejunal uptake of labeled folic acid(³H-PGA) in alcoholic patients : Roles of alcohol and nutrition. *New Eng J Med* 285(23) : 701-707, 1971
- 10) Ross DM, McMartin, KE. Effect of ethanol on folate binding by isolated rat renal brush border membranes. *Alcohol* 13(5) : 449-454, 1996
- 11) McMartin KE, Collins TD, Eisenga BH, Fortiney T, Bates WR. Effects of chronic ethanol and diet treatment on urinary folate excretion and development of folate deficiency in the rats. *J Nutr* 119 : 1490-1497, 1989
- 12) McMartin KE, Collins TD, Bairnsfather L. Cumulative excess urinary excretion of folate in rats after repeated ethanol treatment. *J Nutr* 116 : 1316-1325, 1986
- 13) McMartin KE, Collins TD. Role of ethanol metabolism in the alcohol-induced increase in urinary folate excretion in rats. *Biochem Pharmacol* 32 : 2549-2555, 1983
- 14) Eisenga BH, Collins TD, McMartin KE. Differential effects of acute ethanol on urinary excretion of folate deri-

- vatives in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 248(3) : 916-922, 1988
- 15) Horne DW, Briggs WT, Wagner C. Ethanol stimulates 5-methyltetrahydrofolate accumulation in isolated rat liver cells. *Biochem Pharmacol* 27 : 2069-2074, 1978
 - 16) Weir DG, Mcging PG, Scott JM. Folate metabolism, the enterohepatic circulation and alcohol. *Biochem Pharmacol* 34(1) : 1-7, 1985
 - 17) Ubbink JB, Vermaak WJH, Merwe A, Becker PJ. Vitamin B₁₂, vitamin B₆, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 57 : 47-53, 1993
 - 18) Lin JY, Kang SS, Zhou J, Wong PWK. Homocysteinemia in rats induced by folic acid deficiency. *Life Sci* 44 : 319-325, 1988
 - 19) Kang SS, Wong PWK, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 36(5) : 458-462, 1987
 - 20) Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 81 : 466-474, 1988
 - 21) Kang SS, Wong PWK, Cook HY, Norusis M, Messer JV. Protein bound homocysteine. A possible risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 77 : 1482-1486, 1986
 - 22) Israelsson B, Brattstrom LE, Hultberg BL. Homocysteine and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 71 : 227-233, 1988
 - 23) Genest JJ, McNamara DN, Salem JR, Wilson PWF, Scafer EJ, Malinow MR. Homocyst(e)ine levels in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 16 : 1114-1119, 1990
 - 24) Malinow MR, Sexton G, Averbuch M, Grossman M, Wilson D, Upson B. Homocyst(e)inemia in daily practice : levels in coronary artery disease. *Coronary Artery Disease* 1 : 215-220, 1990
 - 25) Clarke R, Daly L, Robinsn K, et al. Hyperhomocysteinemia : an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 324 : 1149-1155, 1991
 - 26) Lieber CS, Decarli LM. The feeding of ethanol in liquid diets. *Exp Res* 10 : 550-553, 1986
 - 27) Lieber CS, Decarli LM. Animal models of chronic ethanol toxicity. *Method Enz* 233 : 585-594, 1994
 - 28) Min H, Kim CK. A study of blood folate levels in adolescent girls. *Korean J Nut* 28(11) : 104-111, 1996
 - 29) Bird OD, McGlohon VM, Vaitkus JW. A microbiological assay system for naturally occurring folate. *Can J Microbiol* 15 : 465-472, 1969
 - 30) Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by HPLC with fluorescence detection. *J Chromatogr* 422 : 43-52, 1987
 - 31) Carreras O, Vazquez AL, Rubio JM, Delgado MJ, Murillo ML. Comparative effects of intestinal absorption of folic acid and methyl tetrahydrofolic acid in chronic ethanol-fed rats. *Ann Nutr Metab* 38 : 221-225, 1994
 - 32) Hidioglou N, Camilo ME, Beckenhauer HC. Effect of chronic alcohol ingestion on hepatic folate distribution in the rat. *Biochem Pharm* 47(9) : 1561-1566, 1994
 - 33) Tamura T, Romer JJ, Watson JE, Gong EJ. Hepatic folate metabolism in the chronic alcoholic monkey. *J Lab Clin Med* 97 : 654-661, 1981
 - 34) Romero JJ, Tamura T, Halsted CH. Intestinal absorption of ³H-folic acid in the chronic alcoholic monkey. *Gastroenterology* 80 : 99-102, 1981
 - 35) Wilkinson JA, Shane B. Folate metabolism in the ethanol-fed rat. *J Nutr* 112 : 604-609, 1982
 - 36) Eisenga BH, McMartin KE. The effect of acute ethanol administration on the clearance of ³H-PteGlu by the rat kidney. *Nutr Res* 7 : 1051-1060, 1987
 - 37) Goresky CA, Watanabe H, Johns DG. The renal excretion of folic acid. *J Clin Invest* 42 : 1841-1849, 1963
 - 38) McMartin KE, Collins TD, Shiao CQ, Vidrine L, Redetzki HM. Study of dose dependence and urinary folate excretion produced by ethanol in humans and rats. *Alcoholism Clin Exp Res* 10 : 419-424, 1986
 - 39) Kamen BA, Capdevila A. Receptor-mediated folate accumulation regulated by the cellular folate content. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 5983-5987, 1986