

난소 절제 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 및 항산화효소에 미치는 비타민 E와 비타민 C의 효과

하 배 진*

신라대학교 신소재·생명공학부

The Effects of Vitamin E and C on Serum Cholesterol and Antioxidative enzyme in ovariectomized rat

Bae-Jin Ha*

Division of New Materials and Biotechnology, Silla University, Pusan 617-736, Korea

Abstract

In order to observe the bioactivity of ovariectomized rats, ovariectomized group (Ovx), nonovariectomized group (Sham), ovariectomized Vitamin C-treat group (Ovx+Vit C), ovariectomized Vitamin E-treat group (Ovx+Vit E) and ovariectomized Vitamin C+Vitamin E-treat group(Ovx+Vit C+E) were made.

Lipidperoxides of liver and kidney, serum total cholesterol and HDL-cholesterol were investigate as follows.

Lipidperoxides of liver and kidney in Ovx group were 1.78 times and 1.61 times increased compared to Sham group respectively. But, they were significantly decreased in Ovx+Vit C group, Ovx+Vit E group, Ovx+Vit C+E group compared to Ovx group.

Serum total cholesterol in Ovx group was increased 2.57 times compared to Sham group. Injections of each substance such as ascorbate, tocopherol, mixture (C+E) make data of Cholesterol become low. When especially Vit C is injected, the data of cholesterol lowed by about 94%.

Serum HDL-cholesterol in Ovx group decreased 36.7% compared to Sham group.

And as the result of the measurement of SOD, Catalase, and GPx which are antioxidant enzyme, SOD and Catalase activities in Ovx group much higher than in Sham group.

Based on the results, it is supposed that more produced free radicals increased antioxidant enzyme. And it is also thought that vitamin can inhibit aging by reducing antioxidant enzyme.

Key words – Ovariectomized rat, Ascorbate, Tocopherol, Cholesterol, Antioxidation

서 론

1992년 보고에 의하면 우리 나라 여성의 평균수명은 75

*To whom all correspondence should be addressed
Tel: 051-309-5466, Fax : 051-309-5176
E-mail : bjha@silla.ac.kr

세로 과거에 비해서 상당히 증가되었고 65세 이상의 노년 여성의 전 인구의 4.7%를 차지하고 있으며 이는 앞으로 더욱 증가될 것으로 예상된다. 여성은 인생의 1/3을 폐경기 후에 보내게 되나 폐경 후에는 estrogen의 생성 저하로 인하여 안면 홍조, 비뇨기생식기 위축, 골다공증 및 콜레스테롤 대사 장애에 의한 심혈관계 질환, 노화현상 등의 여러

가지 질병의 발병률이 높은 것으로 보고된 바 있다[9]. 특히 현대에는 여성의 생식기계 질환을 치료할 목적으로 시행되는 난소절제술은 estrogen의 생성을 저하시켜서 인위적인 폐경을 야기하므로 이로 인한 심혈관계 질환의 발병에 관심이 집중되고 있다. 여성은 폐경 전 수년동안 체내 호르몬 생성의 점진적인 변화에 의해 월경주기가 불규칙해지고 결국에는 월경이 정지된다. 한 조사에 의하면 FSH (follicle-stimulating hormone)는 폐경 이후 1년 이내에 증가하기 시작하여 약 10년 후에는 최고치를 나타내었으며 이와 함께 혈청내 estradiol 량이 급속히 감소됨을 보고하였다[1].

혈중 콜레스테롤은 동맥경화증의 주요한 원인이며, 동일한 연령대의 폐경 이후의 여성은 폐경 전에 비하여 혈청 콜레스테롤수치가 상당히 높게 나타난다[13]고 하였고, 폐경시 총 혈청 콜레스테롤수치가 약 25.4mg/dl 가량 증가되었다고 보고하였다[4]. 폐경 이후의 고콜레스테롤 혈중은 많은 양의 식이성 콜레스테롤과 포화지방산 섭취 이외에 체내 지방대사를 조절하는 지단백이 관여하는 것으로 알려져 있고, 여성에게 있어서 혈장지단백의 주요성분은 월경주기에 따른 estrogen의 분비에 의해서 차이를 나타내며 황체기에는 혈청 내 중성지방 및 LDL (low-density lipoprotein) 함량이 저하되고 HDL (high-density lipoprotein) 함량이 증가된다고 한다. 폐경시 초래하는 estrogen의 생성저하로 인한 콜레스테롤 대사장애에 의한 심혈관계질환의 발병은 폐경 이후 여성들에게 매우 심각한 문제로 대두되고 있다[8].

노화과정의 기전으로 제시되고 있는 대부분의 가설에 의하면 노화과정의 진행은 현재 의학기술로는 도저히 자연시킬 수 없는 비가역적이고 지속적인 것으로 여겨지고 있으나, free radical 반응설에 의하면 이미 밝혀진 지식으로도 노화과정을 자연시킬 수 있는 가능성을 제시 할 수 있다.

산소유리기(oxygen free radical)는 산소를 이용하는 세포에서 생성되는 독성이 강한 물질로서 DNA, 세포막의 지질 및 단백질 등을 손상시키며 세포의 노화를 촉진시킨다. 이때 건강한 상태에서는 산소유리기를 제거하는 방어기전이 작동하여 세포손상을 방지할 수 있지만, 방사선 조사나 화학약품 및 고농도의 산소투여 등에 의해서 산소유리기의 생산이 증가되거나, 여러 가지 병리현상에 의해서 산소유리기의 제거 능력이 저하되면 산소유리기 생성과 제거의 불균형으로 세포 손상을 초래하게 된다.

세포에 유해한 산소유리기를 제거하는데 필요한 방어기전에는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) 등의 항산화효소들과 환원형 glutathione (GSH), uric acid 등 여러 가지 비효소 항산화물질들이 존재한다. 이 중 SOD는 superoxide radical (O_2^-)을 H_2O_2 와 O_2 로 전환시키는 역할을 하고, 이때 생성된 H_2O_2 는 catalase 와 glutathione peroxidase에 의해 제거되는데, glutathione peroxidase는 GSH를 산화형 glutathione (GSSG)으로 산화시키면서 H_2O_2 를 제거하게 된다. 산화된 GSSG는 glutathione reductase에 의해 NADPH를 소모하면서 다시 GSH로 환원되므로 glutathione은 GSH와 GSSG의 두 가지 형태로 균형을 이루면서 존재하게 되는데 세포내의 독성 또는 산화적 손상이 일어난 경우에는 GSSG가 서서히 증가하게 되어 GSH/GSSG의 불균형을 초래함으로써 방어기전으로서의 역할이 소실된다. 따라서 GSH는 SOD와 더불어 산소유리기에 의한 세포손상을 방지하고 세포내 해독작용을 담당하는 중요한 물질로 여겨지고 있다[17].

현대에는 노화속도를 조절하기 위하여 주로 운동, 항산화제 투여 및 식이제한 등이 행해지고 있다. 이 중 항산화제는 활성산소 라디칼에 기인해서 일어나는 지질과산화 등의 생체내 라디칼 반응을 저해하는 약물로서 항산화 물질의 수명연장 효과는 여러 실험에서 검토되어 왔다[7].

Vitamin 중에서 특히, Vitamin C (ascorbic acid)는 감귤, 양배추, 꽃양배추, 메론, 감자등에 주로 발견되는데 이것은 강한 환원제로써 수산화 반응에 보조인자로 작용한다. 또한 신경전달 물질과 적혈구 세포 형성에도 필요하다. Vitamin E는 세포막의 microsome과 mitochondria에 많이 분포되어 있는 불포화 지방산의 peroxidation과정에서 chain reaction의 자동산화를 방지하여 과산화물 형성을 방지하므로써 궁극적으로 생체막을 보호하여 세포의 정상적인 기능을 유지하는데 기여한다고 알려져 있다[10]. 이렇듯, ascorbic acid, vitamin E등이 rat의 평균수명을 10~20%연장시키는 효과가 인정되어졌으며, 또한 이들은 암발생을 방지하고, 면역능을 증강시키며, 동맥경화증 등의 노인성 질환의 발생을 억제한다고 한다.

따라서, 본 실험에서는 난소를 절제하지 않은 쥐와 노화모델로서 난소를 절제한 쥐, 그리고 인위적으로 난소를 절제하여 노화를 촉진한 쥐에 항산화물질이라고 알려져 있는 ascorbic acid (vitamin C), tocopherol (vitamin E), Vitamin

C와 Vitamin E를 복합적으로 투여한 다음 이들 물질들이 얼마만큼의 항산화효과를 가지고 있는지를 알아보기위해 SOD, catalase, 총glutathion량 및 glutathion peroxidase의 활성도를 측정하고, 간 조직 중 과산화지질 및 혈청 중 cholesterol량과 HDL-cholesterol의 양을 측정함으로써 항산화계의 변화 및 생리활성 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험 동물 및 식이

실험 동물은 체중 150±10g의 female rat을 실험실에서 1주일간 적응시킨 후 Table 1과 같이 정상군과 노화모델로서 난소를 절제한 노화군, 난소를 절제하고 각각 ascorbic acid, tocopherol, ascorbic acid와 tocopherol을 함께 투여한 군의 총 5군으로 나누었다. 고형사료를 사용하고 물은 자유롭게 섭취하도록 하며 3일 후부터 난소를 절제하지 않은 정상군(nonovariectomized group)과 난소를 절제한 노화군(ovariectomized group)은 0.9% saline, 난소를 절제한 각각의 rat에 kg당 100mg의 ascorbic acid, tocopherol, ascorbic acid+tocopherol을 이틀에 한 번 두달간 복강내로 각 물질을 투여하였다.

혈액 및 장기 채취

실험 종료 후 실험 동물을 ether 마취 하에서 개복하여 심장에서 채혈하여 30분 후 3000rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였으며, 간, 신장은 적출하여 0.9% 생리 식염수용액으로 세척하여 vial에 담아 -70°C freezer에 보관하여 실험에 사용하였다.

간(신장) 조직 중의 과산화지질 정량

간(신장) 1g을 취하여 간(신장)무게의 5배 용량인 5mℓ의 1/20 M phosphate buffer (pH 7.4)에 homogenation 시켜 TBA (thiobarbituric acid)와 반응시킨 후, sodium dodecyl sulfate 가용화법을 바탕으로 butanol을 이용하여 malone-dialdehyde 성분을 추출해서 535nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈청 중 콜레스테롤 함량 분석

혈청 중 콜레스테롤 함량은 총 콜레스테롤 측정용 시약 (영동제약 kit 시약)을 사용하여 분석하였다. 검체용, 표준용, 시약 Blank에 각각 시료 0.02mℓ씩 취한 다음 효소 시약 3.0mℓ씩을 첨가하고 잘 혼합하여 37°C에서 5분간 방치한 다음 시약 blank를 대조로 하여 60분 이내에 파장 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈청 중 HDL-콜레스테롤 함량 분석

혈청 중 HDL-콜레스테롤 함량은 HDL-콜레스테롤 측정 용 시약(영동제약 kit 시약)을 사용하여 분석하였다. 혈청 1.0mℓ를 원심분리용 시험관에 넣고 침전시약 0.1mℓ를 넣어 혼합하여 실온에서 5분간 방치한 후 10분간 원심 분리하여 상등액 0.02mℓ와 효소용액 3.0mℓ를 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시킨 후 1시간이내에 맹검을 대조로 하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

간 조직 중 단백질 함량 분석 (protein assay)

단백질의 정량은 Lowry등의 방법에 의해서 750nm에서 흡광도를 측정하고 표준단백 시료를 bovine serum al-

Table 1. Classification of experimental group

experimental group	injection sample (mg/kg)	injection dose (mL/kg of body wt.)
Sham (10rats)	0.9% saline	4mL/kg
Ovx (10rats)	0.9% saline	4mL/kg
Ovx+Vit C (10rats)	100mg/kg ascorbic acid	4mL/kg
Ovx+Vit E (10rats)	100mg/kg tocopherol	4mL/kg
Ovx+Vit C+E (10rats)	100mg/kg ascorbic acid+tocopherol (1:1)	4mL/kg

Sham : nonovariectomized group

Ovx : ovariectomized group

Ovx+Vit. C : ovariectomized ascorbic acid group

Ovx+Vit. E : ovariectomized tocopherol group

Ovx+Vit. C+E : ovariectomized ascorbic acid+tocopherol (1:1) group

였고, 신장의 경우도 Ovx+Vit E군이 99%의 파산화지질량 억제율을 보였다. 이 중 Ovx+Vit C군도 좋은 수준의 억제율을 보였지만, Vit E를 같이 투여했을 때 억제율이 더 큰 것으로 나타났다.

혈청 중 총 콜레스테롤 함량 분석 및 HDL-콜레스테롤 함량 분석

혈청 중 총 cholesterol 활성변화를 살펴보면 Table 2와 같이 노화군(Ovx)의 혈청 cholesterol량은 정상군(Sham)의 혈청 cholesterol량보다 2.57배 높게 나타났다. 본 연구에서 vitamin의 경우는 cholesterol 축적을 방지하는 효과가 있어서 성인병 발생을 감소시킨다고 알려져 있는데 Ovx+Vit C군의 경우 94%정도로 탁월한 억제효과를 보였다.

혈청중 HDL-cholesterol활성변화를 살펴보면 Table 2와 같이 정상군(Sham)의 혈청 HDL-cholesterol량은 노화군(Ovx)의 HDL-cholesterol량보다 1.58배 높게 나타났다. 본 연구에서 Ovx+Vit C, Ovx+Vit C+E군 모두 HDL-cholesterol을 좋은 수준으로 증가시켰는데, Ovx+Vit E군의 경우 HDL-cholesterol량이 현저히 증가한 것으로 보아 동맥경화를 비롯한 심혈관계 질환의 예방효과도 높은 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다[11].

동맥경화지수를 살펴보면 노화군(Ovx)은 동맥경화가 일어 날 확률이 정상군(Sham)에 비해 약 11배 높은 것으로 나타났다. Ovx+Vit C, Ovx+Vit E, Ovx+Vit C+E군의 경우는 노화군(Ovx)에 비해 동맥경화가 일어날 확률이 각각 14

배, 32배, 23배 낮게 나타났다. 이와 같은 결과로 볼 때 vitamin계열이 동맥경화 예방에 상당히 좋은 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.

간 조직 중 SOD(superoxide dismutase)와 catalase의 활성측정

SOD 활성변화는 Table 3에서와 같이 노화군(Ovx)은 간의 SOD 활성수치가 정상군(sham)의 간 SOD 활성수치 비해 약 5.3배 높게 나타났으며, 본 연구에 사용한 물질 모두 Sham군과 유의하게 좋은 효과를 보였다. 노화군(Ovx)의 간에서 항산화 효소의 활성이 높았으며, 이는 노화군(Ovx)에서 훨씬 더 많은 free radical이 생성된 것으로 관찰되어 진다[6]. Table 3에서 보는 바와 같이 노화군(Ovx)의 간 조직의 Catalase 활성도는 정상군(Sham)의 간 조직의 Catalase 활성도에 비해 1.58배 정도 높게 나타났다.

특히 난소절제술 시행 후 Vit C를 투여한 군(Ovx+Vit C)에서 탁월한 감소효과를 보인 것은 Vit C 가 생체내 free radical 생성을 억제함으로써 항산화 효소인 Catalase 활성도를 낮춘 것으로 사료된다. Vit E, Vit C+Vit E도 노화 예방에 좋은 효과를 보였음을 본 실험을 통해서 알 수 있었다.

Catalase는 microsome에서 합성되어 골지체로 이동하여 부착되며 세포내의 peroxisome에 존재하여 내인적으로 생성된 H₂O₂를 H₂O와 O₂로 분해하는 역할을 한다[3].

Table 2. Effect of total-cholesterol and HDL-cholesterol values in rat serum

Group	Sham	Ovx	Ovx+Vit. C	Ovx+Vit. E	Ovx+Vit. C+E
Cholesterol unit/ml	94.59± 7.51	243.51±38.65	102.93± 8.50 ^{**}	121.29± 0.99 ^{**}	99.31±4.68 ^{**}
HDL-Cholesterol unit/ml	65.76±28.99	41.62± 4.54	76.68±12.14 ^{**}	105.05±12.01 ^{**}	82.02±6.97 ^{**}
AI	0.43	4.85	0.34	0.15	0.21

Atherosclerotic index = (total cholesterol - HDL-cholesterol) / HDL - cholesterol

All values are mean±SD.

Significantly different from the value of Ovx group at *p<0.05, **p<0.01, respectively.

Sham: nonovariectomized group

Ovx: ovariectomized group

Ovx+Vit. C: ovariectomized ascorbic acid group

Ovx+Vit. E: ovariectomized tocopherol group

Ovx+Vit. C+E: ovariectomized ascorbic acid+tocopherol (1:1) group

(Ovx)에 비해 1.43배로 가장 좋게 나타났다. 이는 vitamin E의 투여로 인해 체내 free radical 생성이 감소되어, GSH 소모가 감소된 결과라고 할 수 있겠다. 그러나 본 연구에서 GPx의 활성 수치 변화는 그다지 유의한 변화를 나타내지는 않았다[6]. 총 glutathion량에 대한 oxidized-glutathion (GSSG)의 비율은 Ovx+Vit E군과 Ovx+Vit C+E군이 정상군(Sham)과 유의한 값을 보였는데, 이것 역시 vitamin계열이 항산화에 좋은 효과가 있음을 알 수 있었다.

요 약

난소를 절제한 female rat에 Vit C, Vit E, Vit C와 Vit E를 복합적으로 투여했을 때 rat의 간 조직의 손상 정도 및 항산화 효소 활성을 관찰하기 위해 체중 150 ± 10 g이 되는 female rat에 100mg/kg함량의 각 실험 물질들을 이틀에 한 번 두달 간 복강내로 투여한 뒤 간 조직 중 과산화지질량 및 항산화 효소인 SOD, catalase, 총 glutathion량 및 Glutathion peroxidase의 활성도를 측정함으로써 항산화제의 변화 및 생리 활성 변화를 살펴 보았다.

1. 간, 신장 조직 중의 과산화지질 함량은 노화군(Ovx)이 정상군(Sham)에 비해 각각 1.78배, 1.61배 증가하였다. 그리고 각 비타민 투여군은 난소를 절제한 군에 비해 과산화지질함량이 현저히 감소하였다.

2. 혈청 중 총cholesterol량은 노화군(Ovx)이 정상군(Sham)에 비해 2.57배 높게 나타났다.

각 비타민 투여군은 노화군에 비해 수치가 현저히 감소하였는데, Ovx+Vit C 군의 경우는 94%정도의 억제율을 보였다.

HDL-cholesterol은 노화군(Ovx)이 정상군(Sham)에 비해 36.7% 감소하였다. 각 비타민 투여로 HDL-cholesterol함량이 좋은 수준으로 증가되었고, Ovx+Vit E군은 노화군보다 2.52배 높게 나타났다.

동맥경화지수도 Ovx+Vit E 군이 아주 낮게 나타났다.

3. 간 조직 중 SOD 활성도는 노화군(Ovx)이 정상군(Sham)보다 5.3배 높게 나타났고, 각 비타민 투여로 free radical생성이 억제되어 항산화효소인 SOD 활성도를 감소시켰다.

간 조직 중 catalase 활성도는 노화군(Ovx)이 정상군(Sham)보다 1.58배 정도 높게 나타났는데, 각 비타민 투여로

catalase활성도가 낮아졌고, Ovx+Vit E 군은 탁월한 감소효과를 보였다.

4. 간 조직 중의 총 glutathion의 활성도는 정상군(Sham)이 노화군(Ovx)에 비해 1.22배 정도 높게 나타났고, 각 비타민 투여군 중 Ovx+Vit E군의 경우 간 조직 중 총 glutathion량이 가장 높게 나타났다.

간조직 중 reduced-glutathion (GSH)함량과 총 glutathion량에 대한 oxidized-glutathion (GSSG)의 비율, 또한 Ovx + Vit E 군의 수치가 가장 높게 나타났다. Vit E가 항산화에 좋은 효과가 있음을 알 수 있었다.

그러나, GPx의 활성 수치는 그 다지 유의한 변화를 나타내지는 않았다.

감사의 말

본 연구는 1999년 신라대학교 교내학술연구비로 수행되었음을 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Aabe, T., et al. 1977. Correlation between climacteric symptoms and serum level of estradiol, progesterone, follicle - stimulating hormone. *Am. J. Obstet.. Gynecol.* **129**, 65-67.
- Ahn, Bong-Whan, K. O. Chay, J. S. We, et al. 1994. Change in prooxidant activity in rat lung cytosol with age. *Kor. J. Gerontol.* **4**(1), 8-13.
- Baek, Yeong-Ho, K. W. Kim, T. H. Nam. 1997. Effects of aerobic exercise on hepatic antioxidant enzymes in cholesterol-dietary rats. *Kor. J. Gerontol.* **7**(3), 55-64.
- Baird, D. D., et al. 1985. Mannusl drugs in serum cholesterol. *Am. J. Epidemiology*, **112**(6), 982-993.
- Buege, A. J. and Aust, D. S. 1978. Microsomal lipid peroxidation. in "method in enzymology.", fleschner, S. aand Packer, L., (eds.), Academic press, New York. **52**, 322.
- Ji, L. L., Dillon, D. and Wu, E. 1990. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. physical.* **258** (Regulatory Integrative Comp Physiol 27, R918 - R923)
- Kim, J.-W., K.-H. Shim., K.-H. Lee., W.-C. Choi., W.-K. Lim and J.-H. Choj. 1998. Effects of Magnesium

- Lithospermate B from *Salvia miltorrhiza* on Hepatic Antioxidant System in Senescence Accelerated Mouse (SAM-R/1). *Kor. J. Gerontol.* 8(1), 83-89.
8. Kuller, L.H., et al. 1990. Relationship of endogenous sex steroid hormones to lipid and apoproteins in post-menopausal women. *Atherosclerosis*. 10, 1058-1066.
9. Lerner, D. J., Kannel, W. B., et al. 1986. Pattern of coronary disease morbidity and mortality. *Am. Heart. J.* 111, 383.
10. Panganamala, R. V. and cornwell, D. G. 1982. The effect of vitamin E on arachidonic acid metabolism. *Ann. NY. Acad. Sci.* 393, 376-393.
11. Soon-Jae, Lee, S. O. Kim. 1993. Effect of Dietary Vitamin E and Selenium Levels on Lipid Peroxidation in Liver of Cadmium. *Hyosung Womens University application Science research paper.* (2), 19-30.
12. Urano, S., Midori, H. H., Tochihi, N., Matsuo, M., Shiraki, M. 1991. In vitamin E and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids* 26(1), 58-61.
13. Weeiss, N. S. 1972. Relationship of Menopausal to serum cholesterol and Arterial Blood Pressure -The United States Health Examination Survey of Adults. *Am. J. Epidemiol.* 96(4), 237-241.
14. Yang, Sung-Yeul, Tae-Seok, Park, et al. 1993. Characterization of microsomal glutathione-dependent peroxidation inhibiting factor of the rat liver. *Kor. J. Gerontol.* 3(2), 102-108.
15. 고영도, 오세인, 이미숙, 강창모, 최명애, 성상철, 박상철. 1997. 흰쥐에서 난소절제술후 투여한 에스트로겐이 골격근의 항산화효소 활성에 미치는 영향. *한국노화학회지*. 7(3), 1-10.
16. 박종완, 정명희, 전양숙, 김주섭, 박종권, 최철희, 유호진, 김명석. 1996. 노화촉진 생쥐의 산화손상과 항산화효소 활성에 관한 연구. *한국노화학회지*. 6(1).
17. 장은아, 김성원, 채석래, 차영주. 1997. 적혈구내 Reduced Glutathion의 측정. *대한 임상병리학회지*. 17(2).
18. 최형호, 고광삼, 임동윤. 1995. 알록산 유도 당뇨쥐의 폐에서 항산화제의 변화. *조선대학교 의과대학 연구논문집*. 39(6).