

β -Carotene 첨가식이 알코올성지방간 쥐의 지질과산화물 수준과 항산화효소 활성에 미치는 영향*

이 은 희 · 천 종 희[§]

인하대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effects of β -Carotene Supplementation on Lipid Peroxide Levels and Antioxidative Enzyme Activities in Alcoholic Fatty Liver Rats*

Lee, Eun-Hee · Chyun, Jong-Hee[§]

Department of Food & Nutrition, Inha university, Incheon 402-751, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effect of dietary β -carotene supplementation on lipid peroxide levels and antioxidant enzyme activities in alcoholic fatty liver rats. Forty five Sprague-Dawley male rats aging 8 weeks were used as experimental animals, which were divided into the control diet (CD) and the ethanol diet (ED) and the ethanol + 0.02% β -carotene diet (E β D) groups and fed the experimental diet respectively for 5 weeks. After the feeding, rats were sacrificed to get blood and liver to analyze lipid and lipid peroxide levels and antioxidant enzyme activities. The mean body weight and food intake of the ethanol diet group was significantly lower than that of the control diet. The liver index (LI) of the ethanol diet group was significantly higher than those of the control diet and the β -carotene supplementation group. Serum levels of total lipid, triglyceride of the ethanol diet group were significantly higher than those of the control diet and the β -carotene supplementation group. Total cholesterol levels were not significantly different among all groups. HDL-cholesterol of the ethanol diet group was significantly lower than those of the control diet and the β -carotene supplementation group. Liver TBARS of the ethanol diet group was significantly higher than those of the control diet and the β -carotene supplementation group. Liver lipofuscin and conjugated diene levels were not significantly different among all groups. The superoxide dismutase activity of the ethanol diet group was significantly lower than those of the control diet and the β -carotene supplementation group. Catalase and glutathione peroxidase activities were not significantly different among all groups. Because β -carotene supplementation significantly decrease the serum total lipid, triglyceride, liver TBARS levels and increase the superoxide dismutase activity in alcoholic fatty liver rats, β -carotene supplementation seems to give beneficial effect for the alcoholics. (*Korean J Nutrition* 38(4) : 289~296, 2005)

KEY WORDS : β -carotene, alcohol, fatty liver, lipid peroxides, antioxidative enzymes.

서 론

발효음료 중의 하나이며 인류의 역사속에서 많은 사랑을 받아오고있는 알코올성 음료는 복잡해지는 현대 생활속에서 그 소비가 과도하게 증가하고 있어 만성적인 섭취나 과량 섭취로 인한 건강장애가 사회문제가 되고 있다.¹⁾

알코올섭취는 생체 내 여러 기관에 광범위한 영향을 미치거나 섭취량과 섭취기간에 따라 그 정도에는 차이가 있다.²⁾ 만성적인 알코올 섭취는 특히 대사에 중추적 역할을 담당하는 간세포의 장애를 초래하고, 알코올성 간염과 지방간 및 간경변의 원인이 되고 있다.³⁻⁵⁾

위장과 소장에서 주로 흡수되는 알코올은 간으로 이동하여 대사되는데, 알코올에 의한 간 손상의 기전은 알코올 자체에 의한 직접적인 요인과 영양불량 등 간접적 요인에 의한 것으로 구분된다.

간에서 알코올대사의 첫단계는 alcohol dehydrogenase (ADH)나 cytochrome P-450에 의한 acetaldehyde로의 전환인데, acetaldehyde는 생체에 독성이 강력하여 알코올

접수일 : 2005년 4월 21일

채택일 : 2005년 5월 11일

*This study was supported by 2003 research grant of Inha University.

[§]To whom correspondence should be addressed.

Table 1. Composition of the experimental liquid diets (g/250 ml diet)

Ingredients ¹⁾	Experimental diets ²⁾		
	CD	ED	E β D
Casein	41.40	41.40	41.40
DL-methionine	0.30	0.30	0.30
Corn oil	11.20	11.20	11.20
Olive oil	28.40	28.40	28.40
Dextrin-maltose ³⁾	115.20	25.60	25.60
Vitamin mixture ⁴⁾	2.50	2.50	2.50
Mineral mixture ⁵⁾	8.75	8.75	8.75
Choline bitartrate	0.53	0.53	0.53
CMC ⁶⁾	10.00	10.00	10.00
Xanthan gum	3.00	3.00	3.00
Ethanol	-	50.00	50.00
β -carotene	-	-	0.05

1) g weight of ingredients in 250 ml liquid diet

2) CD: control diet, ED: ethanol diet, E β D: ethanol + 0.02% β -carotene diet

3) Dextrin: maltose = 80 : 20

4) Vitamin mixture (g/kg mix): thiamin HCl 0.6, riboflavin 0.6, nicotinamide 25, pyridoxine HCl 0.7, nicotinic acid 3, calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, biotin 0.02, cyanocobalamin 0.001, retinyl palmitate (250,000 IU/gm) 1.6, DL- α -tocopherol acetate (250 IU/GM) 20, cholecalciferol (Vitamin D₃) 0.25, menaquinone (Vitamin K₂) 0.05, sucrose, finely powdered 972.95) Mixture (g/kg of mix): CaHPO₄ 500, NaCl 74, K₂H₂O₇·H₂O 220, K₂SO₄ 52, MgO 24, MnCO₃ 3.57, Fe (C₆H₅O₇) · 6H₂O 6, ZnCO₃ 1.6, CuCO₃ 0.3, KIO₃ 0.01, Na₂SeO₃ · 5H₂O 0.01, CrK (SO₄)₂ 0.55, sucrose, finely powdered 118.00

6) CMC: carboxymethyl cellulose sodium salt

중독의 원인 물질로 보고되어지고 있으며,⁶⁻⁸⁾ 생체내 활성 아민류들과 축합반응을 거쳐 간손상의 주요 매개체로 작용하고, aldehyde dehydrogenase (ALDH)에 의해 대사되어 아세트에이트를 형성한다.

알코올 대사과정의 산물인 acetaldehyde나 ADH에 의한 대사 경로로부터 발생하는 NADH/NAD⁺ 비율의 증가와 acetate의 생성은 체내 영양소 대사에 여러 비정상적인 상태를 유발한다. Acetaldehyde는 반응성이 높은 화합물로서 여러 가지 다른 물질들과 반응하여 독성을 나타내어 간세포의 부종, 미토콘드리아의 구조와 기능의 변화, 미세혈관의 변화 및 괴사, 그리고 지질과산화를 증가시키는 것으로 보고되고 있으며⁹⁾ NADH/NAD⁺비 증가는 고젓산혈증, 저혈당증 및 간의 중성지방 축적 등 대사 이상 상태를 초래할 수 있다.¹⁰⁾

인체는 정상적인 생리 상태에서는 자유라디칼의 생성과 항산화 방어체계의 활성이 균형을 이루고 있다.^{11,12)} 이 균형이 깨어진 상태를 산화적 스트레스라고 한다.¹³⁾ 자유 라디칼에 의한 지질과산화 반응은 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR) 등의 항산화 효소와^{14,15)} 항산화 영양소들로 이루어진 체내 항산화 방어체계에 의하여 억제된다. 따라서 산화적 스트레스의 증가는 체내에서 자유 라디칼이 과다 생성

되거나 혹은 항산화 방어체계의 기능이 감소되어 일어난다.¹¹⁾

Carotenoids는 적색 또는 황색 색소로 자연에는 약 600여종이 존재한다. 이 중 약 10%정도만이 비타민 A로 전환될 수 있는데, 특히 β -carotene은 isoprene의 긴 사슬 앞뒤에 두개의 β -ionone ring을 갖고 있어 매우 우수한 비타민 A의 전구체로서 식품속에 풍부하게 존재한다.^{16,17)} 그러나 β -carotene 이외에도 일부 carotenoids는 비타민 A로 전환되지 않고 그 자체로 singlet oxygen을 제거시키는 능력이 있고 특히 지질과산화에 관련되는 과산화 radical을 직접 저지시키는 항산화 기능이 있음이 보고되었다.¹⁸⁾ 특히 β -carotene은 암을 비롯한 각종 질병에 대해 치료 및 예방 효과를 가지고 있음이 여러 역학조사나 동물실험, 임상연구를 통해 입증되고 있으며 β -carotene의 항산화성은 부분적으로 암, 동맥경화증, 관절염, 백내장 같은 질병을 유발시키는 산화적 스트레스로부터 신체를 방어하는데 중요하게 작용한다고 알려져 있다.¹⁷⁾

이와 같이 최근 지질과산화에 대한 비효소적 방어체계의 항산화영양소들의 중요성이 부각되면서 에탄올에 의한 산화적 스트레스 증가가 항산화 영양소의 적정 공급을 통해서 미리 예방될 수도 있다는 주장이 제기되고 있다.¹⁹⁾

따라서 본 연구에서는 만성적인 알코올 섭취로 인해서 알코올성지방간이 유발된 쥐에게 β -carotene 보강식을 공급하여 체내 지질과산화물 생성 및 항산화 효소 활성도에 β -carotene 보충이 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험식이

실험동물로는 생후 5주된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 45마리를 구입하여 사육실 (실내 온도 20~22°C, 명암 주기 12시간 cycle)에서 표준사료와 탈이온수를 완전 자유급식 (*ad libitum*)으로 2주간 공급하여 환경에 적응시켰다. 그 후 다시 일주일간 액체식이 적응기간을 거친 뒤 8주령이 되어 체중이 약 180~200 g이 되었을 때 실험에 사용하였다. 실험동물은 정상식이군 (CD)과 에탄올식이군 (ED), 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D)으로 각 군당 15마리씩 나누어 실험식이를 5주간 공급하였다.

실험식이는 에탄올이 함유된 액체식이를 섭취시켜 지방간을 유도시키는데 성공한 De Carli와 Lieber²⁰⁾ 그리고 Yamada²¹⁾의 방법에 준하여 액체 형태로 제조하였다. 정상식이군 (CD)의 경우 총열량의 18%를 단백질로, 35%를 지방, 그리고 나머지 47%를 당질로 제공하였고 다른 두 식이도 단백질과 지방함량은 정상식이군과 동일하게 제조하였다 (Table 1).

에탄올식이군 (ED)은 정상식이군 (CD)과 동일하되 50 g/L의 에탄올을, 에탄올 + 0.02% β-carotene첨가군 (EβD)은 에탄올식이군 (ED)과 동일하되 0.02%의 β-carotene을 각기 포함하였으며, 두 식이에 첨가된 에탄올은 총열량의 36%에 해당되므로 같은 양의 열량을 당질에서 제하여 세 실험식이 모두 같은 양의 열량을 함유하도록 조정하였다. 실험 동물이 에탄올 섭취에 적응하는 기간을 두기 위하여 에탄올식이군의 에탄올 농도는 20 g/L에서부터 시작하여 3일 간격으로 10 g/L씩 증량하여 50 g/L까지 점차적으로 늘려 나갔다. 실험식은 매일 식이공급 직전에 제조하여 공급하였다.

실험동물은 스텔레스 스틸 사육장에 한 마리씩 분리하여 사육하였으며 식이 섭취량은 매일, 체중은 매주 한번씩 측정하였다.

2. 시료수집 및 전처리

실험동물은 희생시키기 전 12시간동안 금식 시키고, ethyl ether로 마취시킨 뒤 개복하여 심장으로부터 혈액을 채취하였다. 간장은 적출하여 생리적 식염수 (0.9% NaCl)로 충분히 세척하여 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 액체질소로 급속 냉동시켜 -70°C에 냉동 보관했다가 지질과산화물 농도와 항산화효소활성 측정에 사용하였다.

헤파린 처리된 시험관을 사용하여 채취한 혈액은 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리한 후 즉시 TBARS 분석에 사용하였다. Polyethylen tube에 채취한 혈액은 약 1시간동안 방치 후 3000 rpm (4°C)에서 15분간 원심분리하여 혈청을 만들었으며, 분석 전까지 -70°C에서 냉동 보관한 후 총 지질, 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도를 분석하였다.

3. 분석 방법

1) 혈청 지질

총 지질의 농도는 Frings과 Dunn의 sulfophosphovanillin 방법²²⁾으로 UV-visible spectrophotometer (HP8435, Hewlett Packard, U.S.A)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤은 효소법을 이용한 kits (영동제약)를 사용하여 효소비색법으로 측정하였다.

2) TBARS

혈장과 간의 TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances)는 2-thiobarbituric acid 방법²³⁾을 이용하여 UV-visible spectrophotometer (HP8435, Hewlett Packard, U.S.A)로 측정하였고 표준용액으로는 1, 1, 3, 3-tetra-

Table 2. Food intake and weight gain in rats fed experimental diet

Group	Food intake (ml/day)	Weight gain (g/day)	FER ¹⁾
CD	78.54 ± 1.21 ^{2)a}	6.41 ± 0.21 ^a	0.08 ± 0.01 ^a
ED	63.11 ± 5.48 ^{2)b}	4.20 ± 0.57 ^c	0.07 ± 0.01 ^b
EβD	69.88 ± 4.43 ^b	5.28 ± 0.21 ^b	0.08 ± 0.01 ^{ab}

CD: control diet

ED: ethanol diet

EβD: ethanol + 0.02% β-carotene diet

1) Food efficiency ratio: weight gain (g)/food intake (g)

2) Values are mean ± SD

3) Means with different superscripts within a given column are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

thoxypropane을 사용하였다.

3) Lipofuscin과 conjugated diene 함량

간 균질액에서 지방을 추출한 후 그 추출액에서 lipofuscin 및 conjugated diene의 함량을 측정하였다. Lipofuscin은 spectrofluorometer를 이용하여 excitation 파장 380 nm, emission 파장 480 nm에서 형광도를 측정하였고, blank로는 chloroform을 사용하였다.²³⁾ Conjugated diene의 측정은 Recknagel & Glende의 방법을 이용하여 UV-visible spectrophotometer (HP8435, Hewlett Packard, U.S.A)로 234 nm에서 흡광도를 측정하였다.²⁴⁾

4) 항산화 효소 활성도

간의 cytosol에서 Cu/Zn SOD의 활성은 Misra 와 Fridorich의 방법을 이용하였다.²⁵⁾ 간의 mitochondria에서 catalase 활성도는 Aebi의 방법²⁶⁾을 이용하여 측정하였고, 간의 cytosol에서 GSH-Px 활성도는 Tappel의 방법²⁷⁾을 이용하였다.

단백질 정량은 bovine serum albumin 표준 단백질 용액을 사용하여 Lowry 등의 방법²⁸⁾을 이용한 Protein Assay Kit (Sigma, U.S.A)를 사용하여 비색정량 하였다.

4. 통계처리

실험의 결과는 SAS version 8.1 program을 이용하여 각 실험군 마다 평균과 표준편차를 계산하였고 ANOVA test 후에 Duncan's multiple range test에 의해 p < 0.05수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 식이섭취량과 체중변화

각 실험군의 식이섭취량과 체중변화는 Table 2에 나타나 있었다. 에탄올 액체식으로 5주간 실험동물을 사육한 결과 식이섭취량은 정상식이군이 알코올을 공급한군 (ED군 + EβD군)에 비해 유의하게 높게 나타났고 (p < 0.05), 알코올을 공

Table 3. Liver index (LI) and alcoholic fatty liver level in rats fed experimental diet

Group	Liver weight (g)	Liver index (g/100 g b.w)	5% level ¹⁾ (g)	Liver total lipid (g)
CD	5.81 \pm 0.31 ^{2)NS}	2.58 \pm 0.02 ³⁾	0.29 \pm 0.01	0.24 \pm 0.08 ^b
ED	5.57 \pm 0.82	3.14 \pm 0.22 ^a	0.28 \pm 0.04	0.36 \pm 0.08 ^a
E β D	5.34 \pm 0.55	2.88 \pm 0.17 ^b	0.26 \pm 0.02	0.31 \pm 0.12 ^{ab}

CD: control diet

ED: ethanol diet

E β D: ethanol + 0.02% β -carotene diet

1) 5% level of liver weight (g)

2) Values are mean \pm SD3) Means with different superscripts within a given column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

NS: not significant

Table 4. Serum lipid contents in rats fed experimental diet

Group	Total lipid (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	HDL-cholesterol (mg/dl)
CD	178.78 \pm 59.43 ^{1)b}	80.24 \pm 32.86 ^{NS}	42.18 \pm 13.94 ^b	52.24 \pm 14.56 ^a
ED	249.95 \pm 26.88 ²⁾	100.08 \pm 28.43	86.66 \pm 23.69 ^a	38.35 \pm 8.90 ^b
E β D	193.22 \pm 49.90 ^b	90.47 \pm 14.24	36.84 \pm 19.62 ^b	61.40 \pm 3.64 ^a

CD: control diet

ED: ethanol diet

E β D: ethanol + 0.02% β -carotene diet1) Values are mean \pm SD2) Means with different superscripts within a given column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

NS: not significant

급한군 (ED군 + E β D군)내에서는 에탄올식이군 (ED군)의식이섭취량이 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)보다 유의적으로 낮게 나타났다 ($p < 0.05$).

체중증가량도 정상식이군이 알코올을 공급한군 (ED군 + E β D군)에 비해 유의하게 높게 나타났고 ($p < 0.05$), 알코올을 공급한군 (ED군 + E β D군)내에서는 에탄올식이군 (ED군) 체중증가량이 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)보다 유의적으로 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 쥐에게 7% 에탄올을 음용수에 첨가시켜 섭취시킨 결과 체중이 대조군에 비해 유의하게 감소 하였다고 한 Rothwell과 Stock²⁹⁾의 보고와, 다량의 알코올을 만성적으로 섭취한 환자를 대상으로 한 실험에서 알코올 섭취시식이섭취량의 감소와 여러 영양소의 흡수장애로 체중 감소를 초래한다는 Liber와 Decarli의 보고³⁰⁾와도 일치하였다. 알코올군의 체중 감소는 식이 섭취량의 감소 뿐 만 아니라 알코올 자체의 독성 효과로 인한 소화율 감소, 영양소의 흡수 장애, 그리고 고농도의 에탄올 섭취로 인한 열 발생을 통해 에너지 소모가 증가했기 때문인 것으로 사료된다.³¹⁾ β -carotene의 보충은 알코올에 의한 식이섭취 감소와 체중증가 감소 영향을 완화시킴을 알 수 있다.

2. Liver index와 알코올성지방간 수준

체중으로 인한 간 무게의 차이를 최소화하기 위해 간의 무게를 체중 100 g당 무게로 환산한 liver index (LI)는 Table 3에 나타내었다. 간의 무게는 에탄올을 공급한군 (ED군 +

E β D군)이 정상식이군에 비해 유의적으로 높게 나타나 ($p < 0.05$), 알코올을 섭취시킨 쥐의 간 중량이 증가되었다는 Yamada 등²¹⁾의 보고와 일치하였다. 알코올을 공급한군 (ED군 + E β D군)에서는 에탄올식이군 (ED군) 비해 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)이 유의하게 ($p < 0.05$) 낮게 나타나 β -carotene을 급여하였을 때 이러한 간 비대 현상이 완화된 것으로 나타났다.

지방간이란 보통 간의 무게에서 총 지방이 차지하는 비율이 5%가 넘는 경우를 말한다.³²⁾ 정상식이군은 간의 총 지방량이 간무게의 5%수준에 해당하는 지방량보다 적어 알코올성지방간이 유발되지 않았으나, 에탄올식이군 (ED군)은 간의 지방 함량이 정상식이군에 비해 유의적으로 높았으며 ($p < 0.05$) 간무게의 5%를 초과하여 알코올성지방간 상태를 나타내었다 (Table 3). 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)도 간의 총 지방량이 간무게의 5%수준에 해당하는 지방량 보다 높게 나타나 알코올성지방간 상태를 나타내었으나, 에탄올식이군 (ED군)에 비해 유의적이지는 않으나 적은 지방량을 보여 알코올성지방간 수준 감소에 β -carotene이 다소 유용할 것으로 사료된다.

3. 혈청 지질 농도

혈청 총 지질, 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤 함량은 Table 4에 나타내었다. 총 지질 함량은 에탄올식이군 (ED군)이 정상식이군보다 유의하게 ($p < 0.05$) 높게 나타나 알코올 섭취에 의해 혈청 총 지질이 증가하는 것을 알

Table 5. Plasma and liver lipid peroxide contents in rats fed experimental diet

Group	Plasma TBARS ¹⁾ (nM/mg plasma)	Liver TBARS (nM/mg protein)	Lipofuscin (fluorescence/10 mg protein)	Conjugated diene (O.D./mg lipid)
CD	1.79 ± 0.88 ^{2b}	8.96 ± 2.32 ^c	9.85 ± 1.71 ^{NS}	0.27 ± 0.12 ^{NS}
ED	2.89 ± 0.71 ^{3a)}	21.20 ± 2.06 ^a	13.18 ± 3.71	0.38 ± 0.14
EβD	2.13 ± 0.24 ^{ab}	12.70 ± 1.58 ^b	11.57 ± 3.14	0.29 ± 0.03

CD: control diet

ED: ethanol diet

EβD: ethanol + 0.02% β-carotene diet

1) TBARS: thiobarbituric acid reactive substances

2) Values are mean ± SD

3) Means with different superscripts within a given column are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

NS: not significant

수 있었다. 또한 β-carotene의 첨가군 (EβD군)이 에탄올 식이군 (ED군)보다 혈청 총 지질함량이 유의적으로 낮게 나타나 β-carotene이 알코올 섭취에 의해 증가된 혈청의 총 지질 함량을 감소시키는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

총 콜레스테롤함량은 정상식이군과 에탄올식이군 (ED군), 그리고 에탄올 + 0.02% β-carotene첨가군 (EβD군) 모두에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 에탄올식이군 (ED군)에서 좀더 높은 경향을 보였다. 이러한 결과는 동물을 대상으로 한 연구보고에서 알코올 섭취 후 혈청의 콜레스테롤 함량에 변화가 없었다는 보고³³⁾와 일치하였다. 그러나 알코올의 섭취와 심혈관계 질환과의 관계에 있어서는 알코올의 섭취량과 기간이 중요한 영향을 줄 것이라고 여겨지며, 알코올 섭취가 사람과 동물의 혈청의 콜레스테롤에 어떠한 영향을 주는지에 대해서는 좀 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

중성지방 함량은 에탄올식이군 (ED군)이 정상식이군과 에탄올 + 0.02% β-carotene첨가군 (EβD군) 보다 유의적으로 높게 나타내었다 (p < 0.05). 이는 남자 알코올중독 환자 10명을 대상으로 연구한 결과 혈액의 중성지방 함량이 정상인의 2배까지 증가 하였다고 한 Schapiro³⁴⁾보고와 일치하였고, 전체 열량의 20%에 해당하는 알코올을 쥐에게 섭취시켰을 때 알코올 섭취군이 알코올 비섭취군보다 중성지방 함량이 높았다고한 Kim 등³⁵⁾의 보고와도 일치하였다. 또한 에탄올 + 0.02% β-carotene첨가군 (EβD군)이 에탄올식이군 (ED군)보다 중성지방의 함량이 유의하게 낮아 β-carotene의 식이첨가는 에탄올에 의한 혈청 중성지방 함량 증가를 현저히 낮추었음을 볼 수 있다.

HDL-콜레스테롤 함량은 에탄올식이군 (ED군)이 정상식이군과, 에탄올 + 0.02% β-carotene첨가군 (EβD군) 보다 유의적으로 낮게 나타났다고 보고한 Jang 등⁴⁰⁾의 결과와 일치하였다.

것으로 사료된다. 그러나, 여러 조직내의 콜레스테롤을 간으로 운반하고, 간에서 콜레스테롤의 산화, 분해 및 배설을 촉진하여 총 콜레스테롤 함량을 낮추는 것으로 알려진 HDL-콜레스테롤이 알코올 섭취와 혈액내 수준과의 상호연관성에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

4. 지질과산화물 농도

혈장과 간의 TBARS 함량, 간의 conjugated diene 및 lipofuscin 함량은 Table 5에 나타내었다. 정상식이군보다 에탄올식이군 (ED군)의 혈장 TBARS 함량이 유의적으로 높게 나타났다고 보고하고 있다. 식이에 알코올을 공급한군 (ED군 + EβD군)에서는 β-carotene첨가 유무에 따라서 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나 0.02% β-carotene을 첨가한군 (EβD군)의 TBARS함량이 좀더 낮은 경향을 보였다.

간조직의 microsome에서 생체막 지질과산화정도를 결정하는데 널리 이용되는 TBA (Thiobarbituric acid) 방법으로 지질과산화물인 TBARS 함량을 측정된 결과는 정상식이군보다 식이에 에탄올을 공급한군 (ED군 + EβD군)의 간 TBARS함량이 유의적으로 높게 나타났다고 보고하고 있다. Diluzio,³⁶⁾ Comporti 등,³⁷⁾ MacDonald,³⁸⁾ Sinaceur 등³⁹⁾의 보고에서도 흰쥐에게 에탄올을 투여 한 후 지질과산화가 촉진되었다고 보고하고 있다. 식이에 알코올을 공급한군 (ED군 + EβD군)에서는 에탄올 + 0.02% β-carotene첨가군 (EβD군)이 에탄올식이군 (ED군)보다 유의적으로 간 TBARS 함량이 낮게 나타나 (p < 0.05) β-carotene첨가가 지질과산화를 감소시키는 것으로 사료된다. 이는 비타민 A와 β-carotene의 급여가 에탄올의 급성 투여에 의한 흰쥐의 산화적 손상에 미치는 영향에서 β-carotene을 공급시킨 군에서 지질과산화물 함량이 가장 낮게 나타났다고 보고한 Jang 등⁴⁰⁾의 결과와 일치하였다.

노화, 산화적 스트레스 증가와 항산화 영양소 부족 등으로 인해 체내에 lipofuscin 색소가 축적됨은 잘 알려져 있다. 특히 lipofuscin이 축적은 mitochondria와 microsome의 지질과산화와 밀접한 관계를 가진다.^{41,42)}

Table 6. Liver antioxidative enzyme activities in rats fed experimental diet

Group	SOD ¹⁾	Catalase	GSH-Px ²⁾
	(U/mg protein)	(μ moles H ₂ O ₂ decomposed/min/mg protein)	(nmoles NADPH oxidized/min/mg protein)
CD	2.11 \pm 0.2 ³⁾¹⁾	109.79 \pm 40.44 ^{NS}	12.23 \pm 3.48 ^{NS}
ED	0.54 \pm 0.11 ⁴⁾	97.52 \pm 22.09	7.38 \pm 2.52
E β D	2.50 \pm 0.10 ²⁾	108.43 \pm 32.96	9.04 \pm 2.87

CD: control diet

ED: ethanol diet

E β D: ethanol + 0.02% β -carotene diet

1) SOD: superoxide dismutase

2) GSH-Px: glutathione peroxidase

3) Values are mean \pm SD4) Means with different superscripts within a given column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

NS: not significant

간의 lipofuscin 함량은 각 군간 유의한 차이를 나타내지 않았으나, 에탄올식이군 (ED군)이 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)과 정상식이군보다 간에서의 lipofuscin 함량이 다소 높은 경향을 나타내었다.

Conjugated diene은 불포화지방산의 과산화반응 초기에 자유 라디칼이 methylene기의 수소를 공격하여 이중결합이 이동됨으로 생성된다. 또한 이 반응은 산소분자가 없는 조건에서도 가능하여 과산화지질 형성과 직접적으로 연결된 것은 아니지만, 산소분자가 존재 시 지질과산화반응이 빠르게 일어나므로 conjugated diene은 지질과산화 반응의 지표로 이용된다.⁴³⁾

Conjugated diene 함량도 각 군간 유의한 차이를 나타내지 않았으나, 에탄올식이군 (ED군)이 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)과 정상식이군보다 간에서의 conjugated diene 함량이 다소 높은 경향을 나타내었다.

5. 항산화효소 활성도

항산화효소인 SOD, catalase 및 GSH-Px의 간 조직내 활성도를 측정된 결과는 Table 6에 나타내었다. SOD 활성도는 에탄올식이군 (ED군)이 정상식이군보다 유의적으로 낮았으며 에탄올 + 0.02% β -carotene 첨가군 (E β D군)은 에탄올식이군 (ED군)보다 SOD활성이 유의적으로 높게 나타나 ($p < 0.05$) β -carotene이 SOD 활성을 증가시킬 수 있다. β -carotene은 다른 항산화 물질에 비해 활성산소에 대한 포획효과가 크다는 Packer 등⁴⁴⁾의 보고와 관련지어 생각해 볼 때 SOD에 의해 분해 될 활성산소가 β -carotene의 작용으로 감소되어 SOD 활성도를 높인 것으로 사료된다. 또한 이러한 사실은 과산화지질의 함량 변화와 관련 시켜 볼 때 에탄올 첨가 시 SOD의 활성이 감소됨에도 불구하고 β -carotene을 같이 첨가 하면 에탄올을 첨가군에서도 과산화 지질의 함량이 감소되는 결과를 뒷받침하고 있다. 따라서, 항산화 기능을 가진 β -carotene은 활성산소를 제거하여 SOD의 절약작용에 기여할 것으로 사료

된다.

Catalase와 SOD는 자유기에 대해 초기 보호 작용을 하는 효소로서 O₂⁻는 SOD에 의해 보다 반응성이 약한 H₂O₂로 전환된 다음 catalase에 의해 H₂O와 OH⁻로 무독화되어 배설 된다.^{45,46)} 간 조직의 catalase 활성도는 각 군간 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 에탄올식이군 (ED군)은 정상식이군보다 활성도가 낮은 경향이였으며, 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)은 에탄올식이군 (ED군)에 비하여 높은 경향이였다. 이는 비타민 A 보충 식이 및 에탄올의 만성적 급여가 흰쥐의 체내 산화적 손상과 항산화 체계에 미치는 영향에 대하여 연구한 Yang⁴⁷⁾의 보고와 일치하여 본 실험에서도 에탄올의 급여로 catalase 활성도에 큰 영향을 주지 않은 것으로 나타났다.

GSH-Px 활성도도 각 군간 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 에탄올식이군 (ED군)이 정상식이군에 비해 활성이 낮은 경향이였으며 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)이 에탄올식이군 (ED군)에 비하여 유의적인 차이는 아니었으나 간에서의 GSH-Px 활성이 높은 경향이였다. 이는 간 사이토졸내 GSH-Px 활성도는 에탄올 급여군과 pair-fed군 사이에 일정한 경향이 없었다고한 Yang⁴⁷⁾와 Jang 등⁴⁸⁾의 보고와도 같은 결과를 나타내었다.

요약 및 결론

본 연구는 항산화영양소인 β -carotene의 식이 보충이 알코올성지방간 쥐에서 지질과산화물의 수준 및 간 조직 내의 항산화 효소 활성에 미치는 영향을 알아보았다.

실험동물로는 생후 8주 된 Sprague-Dawley계 숫쥐 45마리를 사용하여 정상식이군과 에탄올식이군 (ED군) 그리고 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)으로 15마리씩 나누어 5주간 동안 실험시료를 제공하였다.

실험 5주 경과 후에 쥐의 혈액과 간을 수집하여 혈청 지질의 농도, 혈장과 간의 지질과산화물, 간의 항산화효소 활

성도를 측정하였다.

본 연구를 통하여 나타난 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 식이섭취량과 체중증가량 모두 정상식이군이 알코올을 공급한군 (ED군 + E β D군)에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 알코올을 공급한군 (ED군 + E β D군)에서는 에탄올식이군 (ED군)이 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)보다 유의적으로 낮게 나타났다. Liver index는 알코올을 공급한군 (ED군 + E β D군)이 정상식이군에 비해 유의적으로 높게 나타났고, 알코올을 공급한군 (ED군 + E β D군)에서는 에탄올식이군 (ED군)에 비해 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)이 유의적으로 낮게 나타났다.

2) 총 지질과 중성지방 함량은 에탄올식이군 (ED군)이 정상식이군보다 유의적으로 높았으며 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)은 에탄올식이군 (ED군)보다 유의하게 낮게 나타났다. 총 콜레스테롤 함량은 각 군간 유의한 차이를 나타내지 않았다. HDL-콜레스테롤 함량은 에탄올식이군 (ED군)이 정상식이군과 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)보다 유의적으로 낮게 나타났다.

3) 혈장 TBARS 함량은 에탄올식이군 (ED군)이 정상식이군보다 유의적으로 높게 나타났으나 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)과는 유의한 차이를 나타내지 않았다. 간 TBARS 함량은 에탄올을 공급한군 (ED군 + E β D군)이 정상식이군보다 유의하게 높게 나타났고, 에탄올을 공급한군 (ED군 + E β D군)에서는 에탄올 + 0.02% β -carotene첨가군 (E β D군)이 에탄올식이군 (ED군)보다 유의적으로 낮게 나타났다.

Lipofuscin과 conjugated diene 함량은 정상식이군과 알코올을 공급한군 (ED군 + E β D군) 모두에게서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

4) SOD 활성은 에탄올식이군 (ED군)이 정상식이군보다 유의적으로 낮았으며 에탄올 + 0.02% β -carotene 첨가군 (E β D군)은 에탄올식이군 (ED군)보다 유의적으로 높게 나타났다.

간 Catalase와 GSH-Px 활성도는 각 군간 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

이상의 결과 알코올의 섭취는 혈중 총 지질과 중성지방을 상승시키고, 혈장과 간의 TBARS를 증가시키며 SOD 효소 활성도를 감소시킴을 알 수 있었다. 또한, 알코올과 함께 β -carotene을 첨가하면 혈청의 총 지질과 중성지방의 함량을 감소시키고, HDL-콜레스테롤을 상승시키며 간의 TBARS 함량을 감소시키고, SOD 활성도를 증가시킴을 알 수 있었다. 따라서 알코올성지방간 쥐의 식이에 β -carotene을 첨가하면 알코올로 인한 지질 및 산화적 스트레스와 관련된

질환의 발생을 지연시키는데 유용할 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Cho SH, Kim JC, Kim SW. Effect of plant extracts on the activity of alcohol dehydrogenase and the antioxidation in alcohol-treated rat hepatocyte. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30(4) : 679-683, 2001
- 2) Seo JS, Bae MJ, Kim JM, Bae BS. Effect of different levels of ethanol ingestion and ethanol withdrawal on vitamin A and E contents in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29(6) : 1083-1089, 2000
- 3) Lieber CS, Leo MA. Alcohol and liver. In "Medical and nutritional complications of alcoholism: Mechanisms and management". *Lieber, C.S (ed), Plenum Medical Book Company, p.185, 1992*
- 4) Tsukamoto H, Towner SJ. Ethanol induced liver fibrosis in rats fed high fat diets. *Hepatology* 6: 814, 1984
- 5) Lieber CS. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* 106: 1085-1105, 1994
- 6) Iseri OA, Liber CS, Gottlieb LS. The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Am J Pathol* 48: 535, 1966
- 7) Cederbaum AI, Liber CS, Rubin E. The effect of acetaldehyde on mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* 161: 26, 1974
- 8) Irlle C, Kocher O, Gabbiani G. Contractility of myofibroblasts during experimental liver cirrhosis. *J Submicrosc Cytol* 12: 209, 1980
- 9) Linder MC. Nutrition and metabolism of fats. In "nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications" Linder, M.C. (ed), 2nd ed., Elsevier, New York, Amsterdam, Oxford, p.79, 1991
- 10) Koo BK, Chung JM, Lee HS. Biochemical evaluation of nutritional status of protein and lipid in patients with alcoholic liver disease. *J Korean Soc Food Nutr* 27(6) : 1236-1243, 1998
- 11) Park HS, Jang YJ, Choi DS, Namgung MA, Lee YJ, Kang SA. Increased oxydative stress in sciatic nerves of streptozotocin-induced diabetic rat: Lack of vitamin C effect. *Diabetes* 19(3) : 279-286, 1995
- 12) Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus. *Free Radical Biology Med* 10: 339-352, 1988
- 13) Lawrence JC, Jill SG, Eric PD, Joyce AD, Donald DL, Mark AY. Effects of antiooxidant treatment of streptozotocin induced diabetic rats in endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *Diabetes* 50(8) : 1927-1937, 2001
- 14) Packer L. Protective role of Vitamin E in biological system. *Am J Clin Nutr* 53: 1050s-1055s, 1991
- 15) Harris ED. Regulation of antioxidant enzyme. *J Nur* 122: 625-626, 1992
- 16) Bendich A. Symposium conclusion: Biological actions of carotenoids. *J Nutr* 119: 135-136, 1989
- 17) Chung JY. Assessment and analysis of related factors to β -carotene nutritional status in diabetics and controls. *Master's Thesis, Seoul National University, 1996*
- 18) Helmut S, Wilhelm S. Vitamins E and C, β -carotene and other carotenoids as antiooxidants. *Am J Clin Nutr* 62(suppl) : 1315s-

- 1321s, 1995
- 19) Di Luzio NR. The role of lipid peroxidation and antioxidants in ethanolinduced lipid alterations. *Exp Mol Patho* 8: 394, 1968
 - 20) De Carli LM, Lieber CS. Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet. *J Nutr* 91: 331-336, 1967
 - 21) Yamada S, Wilson JS, Lieber CS. The effects of ethanol and diet on hepatic and serum γ -glutamyl transpeptidase activities in rats. *J Nutr* 115: 1285-1290, 1985
 - 22) John DB. Clinical laboratory methods 9th ed. 552-553 Mosby, 1982
 - 23) Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical system. *Analytical Biochem* 16: 359-364, 1966
 - 24) Choi EJ. A study in lipid peroxides and glycosylated serum proteins in KK mice fed vitamin E supplemented diet. *Master's Thesis, Seoul National University*, 1994
 - 25) Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide an ion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247: 3170-3175, 1972
 - 26) Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105: 121-126, 1984
 - 27) Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Meth Enzymol* 52: 506-513, 1970
 - 28) Gary L, Deterson. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochem* 100: 201-220, 1979
 - 29) Rothwell NJ, Stock MJ. Influence of alcohol and sucrose consumption on energy balance and brown fat activity in the rat. *Metabolism* 33: 768-771, 1984
 - 30) Lieber CS, Decarli LM. The feeding of alcohol in liquid diets: two decade of applications and 1982 up date. *Alcoholism Clin Exp Res* 6: 523, 1982
 - 31) Rya SY, Kim JH. Effect pf chronic alcohol feeding and 20-Acetylaminofluorene treatment on hepatic mitochondrial ATPase activity and membrane lipid composition in rats. *J Korean Soc Food Nutr* 24(6): 867-873, 1995
 - 32) www. liver. co. kr
 - 33) Choi YS, Chung KH, Cho SH. Effects of alcohol consumption and fat content in diet on growth, hepatic function and biochemical indices of blood in rat. *Kor J Nutr* 20(6): 432-441, 1987
 - 34) Schapiro R, Scheig RL, Drummey GD, Mendelson JH, Isselbacher MD. Effects of prolonged ethanol ingestion on the transport and metabolism of lipid in man. *New Engl J Med* 25: 610-615, 1965
 - 35) Kim MH, Choi MK. A comparative study in serum lipid levels in normals and chronic alcoholics. *Kor J Nutr* 27(1): 53-58, 1994
 - 36) Diluzio NR. The effect of acute ethanol intoxication on liver and plasma lipid fraction in the rat. *Am J Physiol* 194: 453, 1968
 - 37) Comporti M, Beneditle A, Chieli E. Studies on in vitro peroxidation of liver lipids in ethanol treated rats. *Lipids* 8: 498, 1973
 - 38) MacDonald CM. The effects of ethanol hepatic lipid peroxidation and on the activities of glutathione reductase and peroxidase. *FEBS Letter* 35: 227, 1973
 - 39) Sinaceur J, Ribiere C, Sabourau D, Nordmann R. Superoxide formation in liver mitochondria during ethanol intoxication: possible role in alcohol hepatotoxicity. *Free Radicals Liver Inj., Proc Int Meet* 1st p.175, 1985
 - 40) Jang JH, Yang KM, Seo JS. Effect of dietary supplementation of vitamin A or β -carotene on oxidative damage induced by acute ethanol administration in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31(1): 81-86, 2002
 - 41) Chow CK. Nutritional influence on cellular antioxidant defense system. *Am J Clin Nutr* 32: 1066-1081, 1979
 - 42) Hong ML. Effects of vitamin E supplementation on lipid peroxidation and glutathione-related antioxidative enzyme in liver and kidney of diabetic KK mice. *Master's Thesis, Seoul National University*, 1995
 - 43) Dillard CJ, Tappel AL. Fluorescent products of lipid peroxidation od lipid peroxidation of mitochondria and microsomes. *Lipid* 6: 715-717, 1971
 - 44) Packer JE, Mahood JS, Mora-Arellano VO, Salter TF, Wolfenden BS. Free radical and singlet oxygen scavengers: reaction of a peroxy-radical with β -carotene, diphenyl furan and 1, 4-diazobicyclo (2, 2, 2)-octane. *Biochem Biophys Res Commun* 98: 901, 1982
 - 45) Aebi H. Catalase. In methods of enzymatic analysis. *Vergmeyer, M. U. (ed.), Academic press, New York*, vol 2, pp.673-684, 1974
 - 46) Halliwell B. Free radical, antioxidant and human disease: Curiosity cause, or consequence? *Lancet* 344: 721-728, 1994
 - 47) Yang KM. Effect of dietary supplementation of vitamin A and chronic consumption of ethanol on oxidative damage and antioxidant system in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32(2): 278-286, 2003