

자동산화 Methyl Linoleate가 Mouse간장의 효소활성에 미치는 영향

白台鴻 *韓海旭 **李圭植 **鄭鎬三
襄陽大學校 化學科 *食品營養學科, **解訓學教室
(1983년 5월 28일 수리)

The Effect of Autoxidized Methyl Linoleate on the Enzyme Activity in the Mouse Liver

Tai Hong Paik,*Hae Wook Han,**Kyu Sik Lee, Ho Sam Chung

*Dept. of Chemistry,*Dept. of Food and Nutrition and
**Dept. of Anatomy Hanyang University*

Abstract

In order to investigate the effect of autoxidized oil on the enzyme activity in the mouse liver, we administered the fixed dosage of autoxidized methyl linoleate(AOML) to mice once per day for 20 days by using stomach tube and investigated the enzyme activity with the histochemical staining method and biochemical analysis.

The following results were obtained:

The POV, COV and TBA value in the liver of AOML group were significantly increased than those of normal group. The phospholipid, triglyceride and total cholesterol in the liver of AOML group were slightly increased than those of normal group. The activities of acid phosphatase and alkaline phosphatase in the liver of AOML group were increased than those of normal group but ATPase activity was decreased in the AOML group. The decrease of RNA, accumulation of fat and damage of liver cells were observed as the morphological changes in the liver of AOML group.

From the results obtained we conclude that the autoxidized methyl linoleate influenced upon the various enzyme activity and the morphological changes in the mouse liver.

서 론

최근 UN식량 농업기구에서는 linoleic acid를 인간의 식생활에 있어 필수 지방산으로 권장하고 있으며, 이 linoleic acid의 공급원으로는 식용유가 매우 중요하다. 그러나 식용유는 불포화 지방산을 다량 함유하고 있어서 저장, 가공중에 자동 산화되기 쉬우며, 자동 산화된 식용유는 냄새나 맛이 좋지 않을 뿐 아니라 독성을 나타낸다.

자동 산화유의 독성물질이 불포화 지방산의 과산화물과 그의 2차 산화 생성물이라는 것은 金III등¹⁾에 의하여 밝혀져 있으며, 자동 산화유의 독성

발현에 관한 연구도 과산화물을 중심으로 생화학적 인면에서 많은 연구가 진행되고 있으나, 자동 산화유를 동물에 투여했을 때 동물 조직이나 효소 활성에 미치는 영향에 대한 보고는 그리 많지 않다.

白등²⁾은 자동 산화 methyl linoleate를 mouse에 투여하였을 때 간, 소장, 폐 및 신장에 미치는 영향을 조직화학적 방법으로 검토한 바 있으며, Hanson³⁾ 등은 과산화 지질은 조직 내에서 많은 효소 활성에 영향을 끼쳐 세포막에 손상을 준다고 보고하고 있다. 또한 O'Brien 등은 linoleic acid hydroperoxide는 mitochondria의 swelling과 ATPase의 활성을 저하시켜 mitochondria의 호흡작용을 저해

한다고 하였으며, 吉岡⁶⁾은 자동 산화유를 투여하였을 때 흰쥐의 간장 내의 succinic dehydrogenase와 thiokinase의 효소 활성이 저해된다고 하였다. Wills⁷⁾ 등은 간장에서의 과산화 지질이 세포 구조에 영향을 주어 glucose-6-phosphatase의 활성이 저해한다고 하고 있으며, Tappel⁸⁾도 glucose-6-phosphatase 및 cytochrome C reductase 등의 활성을 저해 시킨다고 보고하고 있다.

이와 같이 자동 산화유는 각종 효소 활성에 크게 영향을 주고 있음이 생화학적으로 밝혀져 있으나, 자동 산화유를 투여하였을 때 효소 활성에 미치는 영향을 효소 조직화학적인 방법으로 검토된 보고는 없다.

본 연구에서는 자동 산화유가 간장에서의 각종 효소 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 자동 산화 methyl linoleate를 mouse에 경구 투여하여 간장에서의 acid phosphatase, alkaline phosphatase 및 ATPase 등의 효소 활성을 효소 조직화학적 및 생화학적인 방법으로 검토하였다.

1. 재 료

1) 시료의 조제

autoxidized methyl linoleate(AOML)는 순수한 methyl linoleate(TOKYO Chemical Ind. Co제)를 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 공기 공급 모터를 사용하여 공기(7.84ml/sec)를 불어 넣어 주면서 60±1℃에서 35시간 동안 자동 산화시켜 얻었다. 이때 시료중에 methyl linoleate hydroperoxide가 많이 들어 있는 것을 얻기 위하여 5시간 간격으로 시료를 채취하여 POV⁹⁾, COV¹⁰⁾, 및 TBA¹¹⁾값을 측정하면서 자동 산화시켰다.

2) 동물 실험

실험 동물은 생후 4주된 체중이 20g 정도인 ICR계 mouse를 성의 구별없이 한 군을 8마리로 하여 사용하였다. AOML군(실험군)에는 AOML 시료 0.15ml(4일), 0.2ml(2일), 0.25ml(4일), 0.3ml(2일), 0.35ml(2일), 0.4ml(6일)를 stomach tube를 사용하여 일정한 시간에 1일 1회씩 20일 동안 경구 투여하였다. 시료 투여 후에는 시판 고형 사료를 자유롭게 섭취하도록 하였다. N군(정상군)에서는 시판 고형 사료만을 먹이면서 사육하였다. 20일 후 AOML군은 시료 투여 6시간 후에 N군과 동시에 ethyl ether로 마취시킨 다음 개복하여 심장 채혈로 혈액을 얻은 다음 심장, 폐, 신장, 간

장, 비장, 위 및 소장의 각 기관을 떼내어 즉시 무게를 달았다. 그리고 간 조직은 조직 표본을 만드는데 사용하였다.

활성은 Lowry법²⁰⁾에 의하여 측정하였다. 즉 acid phosphatase의 활성은 acid-phospha-B Test(Wako 274-04401 Paranitrophosphate, pH 4.8)

2. 방 법

1) 간 조직표본의 제작

간장의 좌측 전엽에서 떼낸 간 조직의 일부는 4℃에서 10% 중성 포르말린 용액으로 고정하고, 간 조직의 일부는 Lillie 용액으로 고정하였다.

10% 중성 포르말린 용액에 고정한 간 조직의 일부와 Lillie 용액에 고정한 간 조직은 고정 후 상법에 의하여 파라핀으로 포매하여 microtome으로 6μ의 절편으로 잘라서 hematoxylin-eosin 이중염색 및 methyl green pyronin 염색에 사용하였다.

또한, 10% 중성 포르말린에 고정한 간 조직의 일부는 고정후 cryostat로 8μ의 동결 절편으로 잘라 효소 활성 및 지질 검출용으로 사용하였다.

(1) Hematoxylin-Eosin(H·E) 이중염색 및 Methyl Green Pyronin(M.G.P.) 염색

간에서의 일반적인 형태적인 변화와 핵산의 변화를 관찰하기 위하여 H·E 염색¹²⁾과 M.G.P. 염색¹³⁾을 하였다.

(2) Oil red-O 염색

간에서의 지질 변동을 관찰하기 위하여 Oil red-O 염색¹²⁾을 하였다.

(3) 효소 활성도 염색

acid phosphatase와 alkaline phosphatase의 활성도는 Gomori법¹⁴⁾에 의하여 염색하였다. 즉, 8μ의 동결 절편을 물로 씻고 acid phosphatase의 기질용액 및 alkaline phosphatase의 기질 용액에 각각 담가 37℃에서 10~20분간 항온 처리한 후 냉각 증류수에 2~3번 수세하여 acid phosphatase는 2% yellow ammonium sulfide 용액에서 염색하였고, alkaline phosphatase는 2% cobalt acetate 용액 및 2% yellow ammonium sulfide 용액에 염색하여 glycerin-jelly로 슬라이드에 접착 시킨 후 파라핀으로 봉입하였다.

ATPase의 활성도는 Wach Stein 및 Meisel 법¹⁵⁾으로 염색하였다. 즉 8μ의 동결 절편을 ATPase 기질 용액에 담가 37℃에서 1시간 항온 처리하고 acid phosphatase의 활성도와 동일하게 염색하였다.

2) 간에서의 지질의 정량

(1) 간 total lipid의 추출

간에서의 total lipid는 Bligh-Dyer 법¹⁶⁾으로 다음과 같이 추출하였다. 즉 일정량의 간을 glass homogenizer에 넣고 0.9% NaCl수용액을 가하여 10% 간 homogenate를 만들었다. 이 간 homogenate에 chloroform과 methanol을 가하여 chloroform:methanol:water의 부피의 비가 1:2:0.8이 되도록 한 후, 여기에 chloroform:methanol:water의 부피비가 1:1:0.9가 되도록 chloroform과 물을 가한 후 원심분리하여 두 층으로 분리시켜 chloroform층을 취하여 glass filter로 여과해서 잔유물을 제거하고 40~50°C의 물중탕에서 N₂기체를 통과시키면서 chloroform을 증발시켜 간의 total lipid를 얻었다.

(2) Triglyceride 양 측정

triglyceride 양은 Cleantch TG-S (RM 157S-K) 시약을 사용하여 측정하였다. 즉 시료 간 homogenate 0.02ml를 소미량 피펫으로 정확히 취하여 시험관에 넣고 발색 시약 3.0ml를 가하여 잘 흔들어 배합한 후 37°C의 물중탕에서 10분간 항온 처리하여 Colemann Jr. III Spectrophotometer로 550nm에서 흡광도를 측정하여 아래 식으로 계산하였다. 표준 간 homogenate 흡광도는 표준 혈청 0.02ml를 시험관에 넣고 시료 간 homogenate와 동일한 방법으로 측정하였고 바탕실험으로는 발색 시약 3.0ml만 넣고 동일하게 처리하였다.

(계산)

$$\text{간 Triglyceride 양 (mg/dl)} = \frac{Es(550)}{Estd(550)} \times 300 \text{ (mg/dl)}$$

Es(550) : 550nm에서 시료 간 homogenate의 흡광도
Estd(550) : 550nm에서 표준 혈청의 흡광도

(3) Phospholipid 양 측정

phospholipid의 양은 phospholipid B-Test Wako (code 275-54001) 시약을 사용하여, 간 triglyceride 양 측정과 동일하게 측정하고 505nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{간 Phospholipid 양 (mg/dl)} = \frac{Es(505)}{Estd(505)} \times 300 \text{ (mg/dl)}$$

Es(505) : 505nm에서 시료 간 homogenate의 흡광도

Estd(505) : 505nm에서 표준 혈청의 흡광도

(4) Total cholesterol 양 측정

total cholesterol 양은 Cholesterol C-Test Wako (Code 274-4601) 시약을 사용하여, phospholipid 양의 측정법 및 계산과 동일한 방법으로 측정하였다.

3) 간에서의 POV, COV, TBA 값 측정

간에서의 POV는 앞에서 추출한 total lipid를 Stamm법¹⁷⁾으로 측정하였다. 즉 시료 1~2mg을 정확

히 달아서 시험관에 넣고 1, 1, 2, 2-tetra chloro ethane 3ml를 가하여 잘 녹인 후 POV 시약 2ml를 가하고 즉시 공기를 붙어 넣어 주면서 잘 혼합하여 80°C 물중탕에서 3분간 가열하였다. 이것을 25°C에서 3분간 잘 흔들어 냉각시킨 후 Spectronic 20을 사용하여 565nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 COV는 간에서 추출한 total lipid에서 熊沢恒법¹⁸⁾에 의하여 측정하였다.

간에서의 TBA 값은 Yagi 법¹⁹⁾으로 측정하였다. 즉, 10% 간 homogenate 0.2ml를 정확히 취하여 마개있는 시험관에 넣고 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2ml와 20% acetate buffer (pH 3.5) 1.5ml를 가하여 혼합한 후, 0.8% TBA 시약 1.5ml를 가하고 증류수를 넣어 전체 부피가 4ml가 되도록 한 후, 95°C 물중탕에서 1시간 가열하였다. 시험관은 즉시 흐르는 물로 냉각시킨 후 증류수 1ml와 n-butanol pyridine 용액 (15:1v/v) 5.0ml를 가하고 30초간 심하게 흔들어 섞은 후, 3000rpm에서 15분간 원심분리시켜 n-butanol pyridine 층을 취하여 Spectronic 20으로 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 바탕실험으로는 시료 대신 증류수 0.2ml를 가한 후 시료와 동일한 방법으로 처리하여 측정하였다. 이때 흡광도는 n-butanol pyridine (15:1v/v) 용액의 흡광도를 0으로 조정한 후 측정하였다.

4) 간에서의 효소 활성 측정

acid phosphatase와 alkaline phosphatase의 활성은 Lowry 법²⁰⁾에 의하여 측정하였다. 즉 acid phosphatase의 활성은 1ml의 기질 acid phosphatase B Test (Wako 274-04401 paranitrophosphate, pH. 4.8)용액, 그리고 alkaline phosphatase의 활성은 1ml의 기질 alkaline-phosphatase B Test (Wako 274-04401 paranitrophenylene pH. 10.0)용액을 각각 시험관에 넣고 37°C에서 5분간 항온 처리한 후, 미량 피펫으로 정확히 0.1ml의 간 homogenate를 넣고 37°C의 물중탕에서 30분간 항온 처리한 다음 10ml의 0.02N NaOH를 가하여 심하게 흔들어 섞은 후 진한 HCl을 두방울 떨어뜨려 반응을 중지시키고 415nm에서 Colemann Jr. III Spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 시료의 POV, COV 및 TBA 값 측정

본 실험에 사용한 시료는 순수한 methyl linoleate를 60±1°C에서 자동 산화시켜 5시간 간격으로 시료를 채취하여 POV, COV 및 TBA 값을 측정한 결과는 Fig. 1과 같으며, 최종 시료의 POV, COV 및 TBA 값은 Table 1과 같이 POV 1984.13mg/kg, C

OV 2224.82meq/kg, TBA 값이 220 O.D 인 hydroperoxide와 그의 2차 생성물이 함유되어 있는 것으로 이것을 독성실험에 사용하였다.

은 색을 띠고 있었다.

3. 각 장기의 무게

N군과 AOML군의 각 장기의 무게를 측정된 결과는 Table 2와 같이 AOML군에서의 폐, 간, 위, 신장, 소장, 비장의 무게는 N군에 비하여 증가하였으나, 심장, 비장의 무게는 감소하고 있었다. 이와 같은 결과는 Nakamura²⁰가 자동 산화 safflower oil을 투여하였을 때의 결과와 일치하고 있었다. AOML군에서 심장채혈할 때 혈액량이 적은 것과 비장의 위축현상과 어떤 관련성이 있는 것 같이 생각되었다. 이 결과로부터 자동 산화유는 mouse의 각 장기에 영향을 끼치고 있음을 알 수 있었다.

Table 2. Organ weights ratio (percentage per body weight)

Organs	Normal (N group)	Autoxidized methyl linoleate (AOML group)
Liver	5.08±0.16a)	6.33±0.68
Kidney	1.33±0.06	1.41±0.12
Heart	0.43±0.05	0.34±0.02
Stomach	1.43±0.42	5.15±0.65
Lung	0.58±0.06	0.61±0.07
Small Intestine	7.39±0.75	16.61±0.81
Spleen	0.51±0.09	0.20±0.07

a) Mean ± SE for five mice.

Organ was measured as wet weight.

Organ weight ratio was expressed as percentage per body weight.

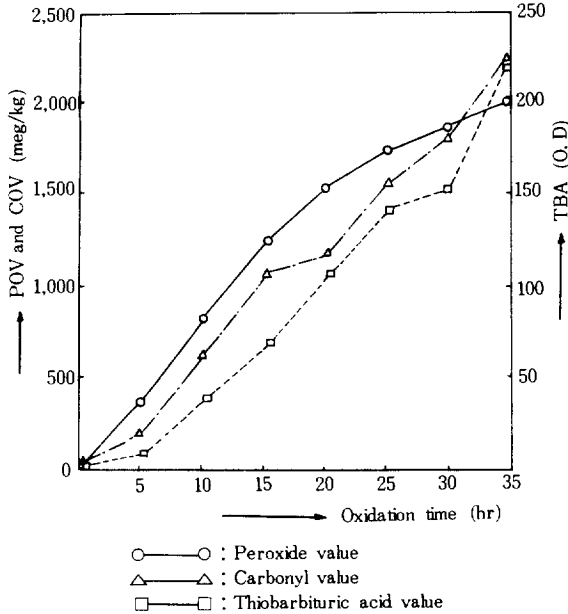


Fig. 1. Autoxidation of Methyl Linoleate Relationship between Autoxidation Time and-POV, COV, TOA Value.

Table 1. The characteristics of autoxidized methyl linoleate.

Sample	POV ^{a)} (meq/kg)	COV ^{b)} (meq/kg)	TBA ^{c)} (O.D)
AOML ^{d)}	1984.13	2224.82	220

a) POV : Peroxide value

b) COV : Carbonyl value

c) TBA (OD) : Thiobarbituric acid (Optical density)

d) AOML : Autoxidized methyl linoleate

2. 육안으로 본 독성의 출현 증상

AOML군에서 처음에는 N군과 거의 비슷한 체중 증가와 행동을 나타냈으나, 시료 투여 2주일 후 부터는 털이 거칠어지고, 행동이 둔화되었으며 체중도 점차로 감소하기 시작하였다. 독성이 심하게 나타남에 따라 호흡이 곤란해지고 설사의 증세를 나타내었다. 해부한 후 육안으로 본 소견으로는 AOML군에서는 N군과는 달리 위와 소장이 확장되어 투명하게 보였으며, 비장은 크게 위축되어 있었고, 간은 비대되어 있었으며, N군의 간보다는 붉

4. 간에서의 지질의 분석

간에서의 TBA 값과 간 total lipid에서의 POV, COV를 측정된 결과는 Table 3과 같이 AOML군에서는 POV, COV 및 TBA값이 N군에 비해 모두 현저히 증가하였으며 특히 COV에서는 4배 정도나 증가하였다. 이것으로부터 시료의 hydroperoxide 및 2차 생성물은 소장에서 흡수되어 간 조직에 운반, 축적된 결과라고 생각되며 이것은 白¹¹등의 실험 결과와 잘 일치하고 있었고, POV값이 증가됨에 따라 TBA 값이 증가됨을 알 수 있었는데, 이것은 흡수된 hydroperoxide가 malonaldehyde로 분해된 것으로 생각되었다. COV값이 N군에 비하여 4배로 증가된 것은 2차 생성물이 hydroperoxide보다 많이 흡수된 결과인지, hydroperoxide가 간에서 2차

생성물로 분해된 결과인지는 확실히 알 수 없었다. 이 때의 간에서의 TG, PL 및 TC의 값을 측정한 결과는 Table 3에서와 같이 AOML군에 있어서는 N군에 비해 모두 약간씩 증가되고 있었다. 이 결과로부터 자동 산화 methyl linoleate는 간 지질대사에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었으나, 그 원인에 대하여는 확인할 수 없었다. 이것은 Nakamura²⁰⁾등이 POV 465인 자동 산화 safflower oil을 3주간 투여하였을 때 결과와는 일치하지 않았다.

Table 3. Effect of autoxidized methyl linoleate on the lipid composition in liver of mice

	Normal (N group)	Autoxidized methyl linoleate (AOML group)
TBA(OD) a)	0.318 ± 0.082g)	1.245 ± 0.093
POV(meg/kg) b)	62.89 ± 12.49	127.74 ± 10.90
COV(meg/kg) c)	152.22 ± 29.35	532.79 ± 62.51
PL(mg/dl) d)	104.73 ± 5.51	155.47 ± 6.31
TG(mg/dl) e)	158.53 ± 35.33	170.37 ± 24.99
TC(mg/dl) f)	21.08 ± 6.25	26.15 ± 4.00

- a) TBA(OD) : Thiobarbituric acid(Optical density)
- b) POV : Peroxide value
- c) COV : Carbonyl value
- d) PL : Phospholipid
- e) TG : Triglyceride
- f) TC : Total cholesterol
- g) Mean ± SE for five mice.

5. 간에서의 효소 활성

간에서의 acid phosphatase 및 alkaline phosphatase의 활성을 생화학적으로 측정된 결과는 Table 4와 같이 간에서의 POV, COV 및 TBA 값이 큰 A-

Table 4. Effect of autoxidized methyl linoleate on the enzyme activity in liver of mice.

	Normal (N group)	Autoxidized methyl linoleate (AOML group)
TBA(OD) a)	0.318 ± 0.072 e)	1.245 ± 0.093
POV(meg/kg) b)	62.89 ± 12.49	127.74 ± 10.90
COV(meg/kg) c)	152.22 ± 29.85	532.79 ± 62.51
Acid Phosphatase(BLU) d)	30.00 ± 6.78	38.69 ± 4.06
Alkaline Phosphatase(BLU)	3.10 ± 0.92	7.47 ± 1.97

- a) TBA(OD) : Thiobarbituric acid(Optical density)
- b) POV : Peroxide value
- c) COV : Carbonyl value
- d) BLU : Bessey-Lowery unit
- e) Mean ± SE for five mice.

OML군에서는 acid phosphatase나 alkaline phosphatase 활성이 N군에 비해 모두 증가하였다. Yoshioka⁶⁾등은 자동 산화 methyl linoleate가 succinic dehydrogenase, thiokinase와 같은 효소의 활성을 크게 저하시킨다고 보고하고 있어 자동 산화 methyl linoleate는 여러 가지 효소 활성에 크게 영향을 주고 있음을 알 수 있었다.

간에서의 acid phosphatase, alkaline phosphatase 및 ATPase의 활성을 효소 조직화학적으로 검토한 결과 acid phosphatase의 활성에 있어서는 Fig. 2와 같이 N군에서는 전반적으로 약한 활성을 나타내고 있었으나 AOML군에서는 Fig. 3와 같이 N군에 비해 그 활성이 증가하고 있었으며, 특히 문맥 주위에서 그 활성이 현저하였다. 이것은 Hirata²¹⁾등이 주장하고 있는 바와 같이 자동 산화 methyl linoleate의 독성물질의 해독작용에 기인하는 것으로 생각되었다.

alkaline phosphatase의 활성에 있어서는 Fig. 4와 같이 N군에서는 약간의 alkaline phosphatase의 활성을 볼 수 있었으나, AOML군에서는 Fig. 5와 같이 N군에 비해 그 활성이 증가하고 있었으며, 특히 문맥 주위에서 현저하였다. 이것은 자동 산화 methyl linoleate에 의한 간 장애에 따르는 간 세포 재생이 활발히 진행되는 결과로 생각되어지며, 간에서의 phospholipid의 증가와 사트포계가 있음을 나타내었다. 이 결과는 앞의 생화학적 분석에서 얻어진 acid phosphatase 및 alkaline phosphatase의 활성의 증가와 잘 일치하고 있었다.

한편 ATPase의 활성을 보면 Fig. 6과 같이 N군에서는 뚜렷한 ATPase의 활성을 나타내었으며, 특히 문맥 주위에서 그 활성이 현저하였다. 그러나 AOML군에서는 Fig. 7과 같이 N군에 비하여 그 활성이 감소하였으며, 특히 중심 정맥 주위에는 활성이 거의 없었다. 이는 Kamiska²²⁾등이 간에 독성 물질을 투여할 때 ATPase의 활성을 저하시켜 막의 능동수송에 장애를 준다고 보고한 것과, Yoshioka⁶⁾등이 자동 산화 methyl linoleate가 TCA cycle에 관여하는 succinic dehydrogenase등의 활성을 크게 저하시킨다는 보고와 일치하였다. 이것은 자동 산화 methyl linoleate의 독성물질에 의하여 간

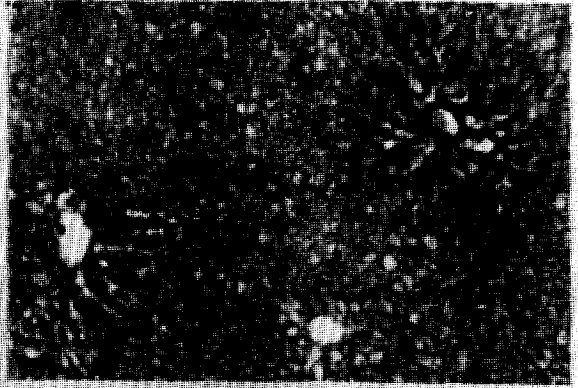
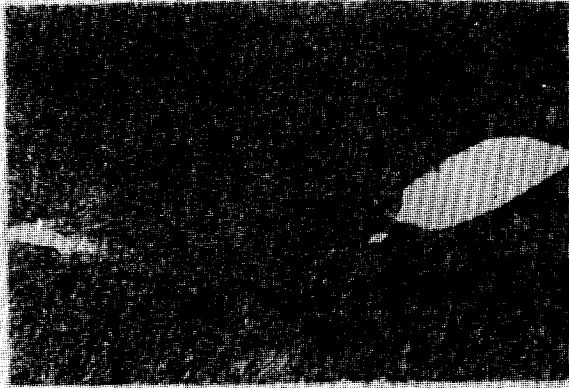


Fig. 2 The acid phosphatase activity was slightly appeared on the liver cells in the normal group. X100

Fig. 3. The acid phosphatase activity was markedly increased on the zone of liver lobe in the AOML group. X100

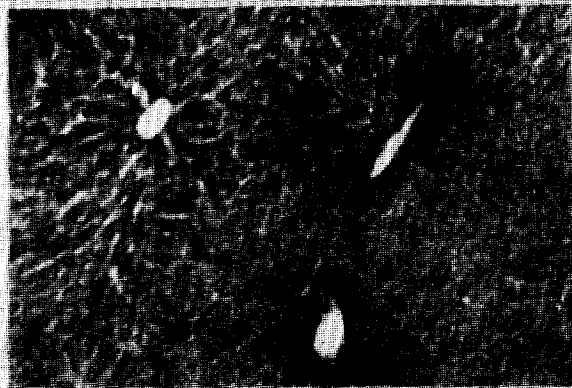


Fig. 4. The alkaline phosphatase activity was slightly appeared on the peripheral zone of liver lobule in the normal group. X100

Fig. 5. The alkaline phosphatase activity was significantly increased on the peripheral zone of liver lobule in the AOML group. X100

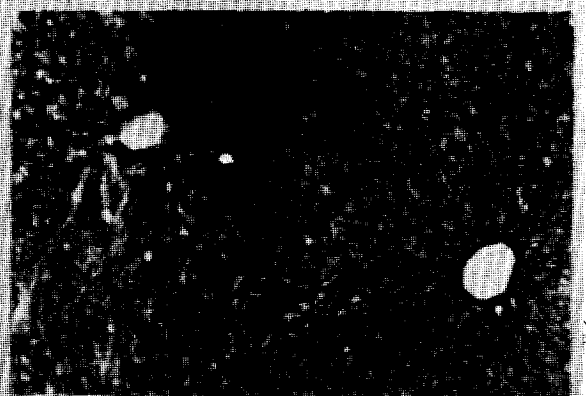
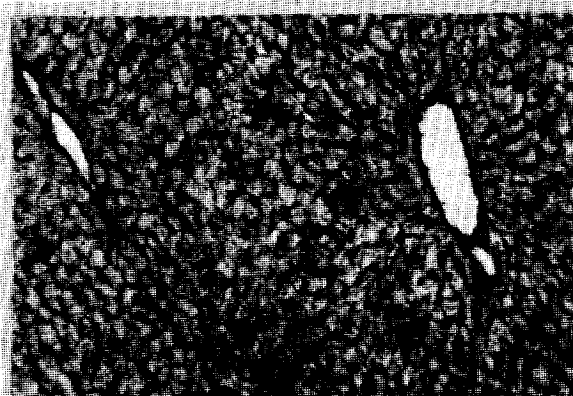


Fig. 6. The ATPase activity was markedly appeared on the peripheral zone of liver lobule in the normal group. X100

Fig. 7. The ATPase activity was significantly decreased on the central and intermediate zones of liver lobule in the AOML group. X100



Fig. 8. The trace fat deposit on the central and peripheral zones of liver lobule were observed in the normal group. Oil red-O stain, X100

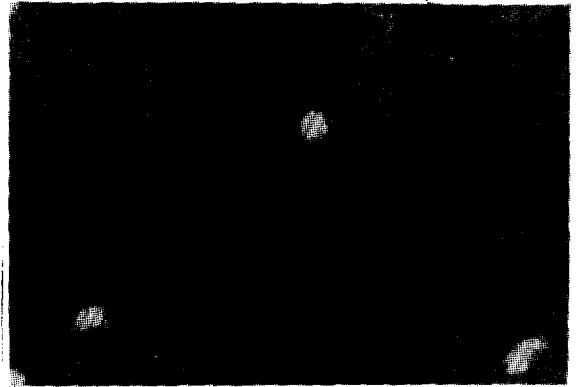


Fig. 9. The significant fat deposit on the intermediate and peripheral zones of liver lobule were observed in the AOML group. Oil red-O stain, X100



Fig. 10. The positive pyroninophilic granules on the liver cells were showed in the normal group. M.G.P. stain, X 450



Fig. 11. The pyroninophilic granules on the central zone of liver lobule were severely decreased in the AOML group. M.G.P. stain, X 450



Fig. 12. The liver cells showed normal appearance in the normal group. H-E stain, X100



Fig. 13. Disappearance of nuclei on the central zone of liver lobule were showed in the AOML group. H-E stain, X100

에서의 에너지 대사에 이상이 있음을 간접적으로 암시하고 있었다.

간 조직에서의 지질을 검출하기 위하여 Oil-red-O로 염색한 결과는 Fig. 8과 같이 N군에서는 지질의 침착을 별로 볼 수 없었으나, AOML군에서는 Fig. 9와 같이 지질의 침착이 심하였으며, 특히 간 소엽의 중간대와 주변대에 현저하게 나타났다. 이 결과는 앞의 생화학적 분석에서 얻어진 TG의 증가와 일치하고 있으며, 이것으로부터 간에서의 지질대사에 이상이 있음을 또 한번 확인할 수 있었다.

methyl green pyronin 염색 결과는 Fig. 10과 같이 N군에서는 pyronin 호성과립이 균등하게 분포되어 있었으며, 핵은 청자색으로 염색되어 있었다. 그러나 AOML군에서는 Fig. 11과 같이 pyronin 호성과립이 현저하게 감소되어 있었으며, 핵은 청자색으로 염색되어 있지 않았다. 이 결과로부터 자동 산

화 methyl linoleate는 RNA 및 DNA대사에도 영향을 끼치고 있음을 알 수 있었다.

한편 간 조직의 일반적인 형태 변화를 관찰하기 위하여 hematoxylin-eosin으로 염색한 결과는 Fig. 12와 같이 N군에 있어서는 간 세포가 정상적인데 반하여 AOML군에서는 Fig. 13과 같이 핵이 소실되는 등 간 세포에 손상을 일으키고 있음을 알 수 있었다. 이것은 白¹등의 보고와 잘 일치하고 있었다.

이상의 조직화학적 소견을 종합하여 보면 Table 5와 같이 AOML군에서는 투여된 자동 산화 methyl linoleate에 기인하여 간에서의 POV, COV 및 TBA값이 크게 증가할 때 acid phosphatase와 alkaline phosphatase의 활성은 증가하고 ATPase의 활성은 감소되었고, 간세포에 있어서는 핵의 소실 핵산의 감소 및 지질의 축적이 일어나는 등, 간 세포에 큰 손상이 일어남을 알 수 있었다.

Table 5. Histochemical observation in liver cells of normal and autoxidized methyl linoleate administered Mice.

Group	HE stain			MGP stain			Oil red-O stain			Enzyme activity								
	Vesicles or Vacuoles			Pyroninophilic granules			Fat deposit			Acid phosphatase			Alkaline phosphatase			ATPase		
	Ca)	Mb)	Pc)	C	M	P	C	M	P	C	M	P	C	M	P	C	M	P
Normal (N group)	±	±	±	+	+	+	±	±	±	++	+	+	+	+	+	++	+++	+++
Autoxidized methyl linoleate (Aoill group)	++	+	±	±	±	±	±	+++	++	+	+	++	++	++	++	+	+	+

a) C: Central

b) M: Intermediate

c) P: Peripheral

-: negative

±: trace

+: slightly positive

++: moderately positive

+++ : markedly positive

要 約

자동 산화유가 mouse의 간장 효소에 미치는 영향을 구명하기 위하여 autoxidized methyl linoleate의 일정량을 mouse에게 1일 1회 20일 동안 경구 투여하여 간에서의 효소 활성을 조직화학적 및 생화학적 방법으로 검토한 결과는 다음과 같다.

실험군의 간에서의 POV, COV 및 TBA값은 정상군에 비해 크게 증가하여 AOML이 많이 흡수되어 있음을 알 수 있었다.

실험군의 간에서의 phospholipid, triglyceride 및 total cholesterol의 양은 정상군에 비해 증가하였다.

실험군의 간에서의 acid phosphatase, alkaline phosphatase의 활성은 정상군에 비해 증가하였으며, ATPase의 활성은 감소하였다.

실험군의 간에서의 형태학적 변화는 정상군에 비해 핵산의 감소, 지질의 축적 및 간 세포의 손상이 있었다.

이상의 결과로부터 mouse에 경구 투여한 자동 산화 methyl linoleate는 간에서의 효소 활성과 간의 형태학적 변화에 크게 영향을 주고 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. 金田尚志, 石井清之助, 酒井壽恵: 荒井君 技東
汚水研報, **12**, 1 (1955) 日水誌 **20**, 658 (1954)
2. 吉岡倭子, 金田尚志: 油化学, **21**, 316 (1972)
3. 白台鴻, 星野忠彦, 金田尚志: 栄養と食糧, **29**
(2), (1976)
4. 白台鴻, 金田尚志: 油化学, **27**(12), 851 (1978)
5. Hanson N. W.: Chemistry and Industry Sep.
1541 (1964)
6. 吉岡倭子, 立花邦子, 金田尚志: 油化学, **23**(5)
327 (1974)
7. Wills, E. D.: *J. Biochem.*, **123**, 983 (1971)
8. Tappel, A. L. L. and Bidlack, W. R.: *Lipid*, **8**
(4), 177 (1973)
9. International Union of Pure and Applied C-
hemistry: *Standard Method for the Analysis*
of Fat and Oils, (Paris) (1954)
10. 熊沢令 大山 保: 油化学, **14**, 167 (1965)
11. Asakawa T. and Matsushita S.: *Agric. Biol.*
Chem., **45**(2), 453 (1981)
12. Culling C. F. A.: *Handbook of Histopathologi-*
cal and Histochemical Tedhniqus. 3rd ed. Lon-
don (1973)
13. Rosa, A.: *Stain tech.*, **25**, 185 (1950)
14. Gomori, G.: *J. Lab. Clin. Med.*, **37**, 526 (1951)
15. Wachstein, M. and Meisel, E.: *Am. J. Clin.*
Path., **27**, 13 (1957)
16. Bligh, E. C. and Dyer, W.: *Can. J. Biochem.*
Physiol., **37**, 911 (1959)
17. Hamm, D. I., Hammond, E. G., Parvanah V. and
Snyder, H. E.: *J. Am. Oil. Chemists, Soc.*, **42**,
920 (1965)
18. 大石 誠子: 最新 医学, **33**(4), 660 (1978)
19. Lowry, O. H., Roberts, N. R., Wu, M. L., Hixon
W. S. and Crawford E. J.: *J. Biol. Chem.*, **207**,
19 (1954)
20. Nakamura, M.: *Lipid*, **8** (19), 566 (1973)
21. Hirata, K., Kaneko, A., Ogawa K., Hayasaka H.
and Onoe, T.: *Lab Invest.*, **43**(2), 165 (1980)
22. Kaninska, O.: *Acta Histochem. Bd.*, **62**(8), 209
(1978)