

花粉粒의 營養生化學的 研究

2. 해바라기 花粉粒의 아미노酸組成과 Rat 肝 Alcoholdehydrogenase 活性에 미치는 影響

尹 水 弘·安 貞 姦*·權 貞 淑**

曉星女子大學校 藥學科 *嶺南工業專門大學 食品營養學科 **安東大學 家政學科
(1984년 9월 7일 접수)

Nutritional and Biochemical Studies on the Pollen Loads

2. Amino Acid Composition of Sunflower Pollen Load and Its Effects on the Hepatic Alcohol Dehydrogenase(ADH) Activity in Rat.

(Received September 7, 1984)

Soo-Hong Yoon, *Jyung-Im Ahn, **Jung-Sook Kwon

Dept. of Pharmacy, Hyosung Women's University

*Dept. of Food Science and Nutrition, Yeungnam Junior College of Technology.

**Dept. of Home Economics, Andong National College

ABSTRACT

For the purpose of investigating the influence of pollen load on alcohol metabolism in rat, we analyzed quantitatively amino acids of pollen load, and investigated the changes of hepatic alcohol dehydrogenase(ADH) activity and hepatocyte morphology in rat administrated various concentrations of alcohol and various amounts of pollen load. 18 species of amino acids including phenylalanine in the sunflower pollen load were quantitatively analyzed, and it was found that the amount of phenylalanine, leucine, threonine, lysine are especially higher than that of the other amino acids. The liver ADH acitivity of experimental animals decreased with the proportion of ethanol concentration much more in ethanol administrated group than in control group, while increased in pollen load mixed with ethanol administrated group, but didn't increased as much as that in control group. In any case the less the degree of ethanol concentration was administrated, the higher the liver ADH activity increased. There was fat infiltration in the hepatocyte of ethanol administrated animals, and remarkably little fat infiltration in that of animals administrated pollen load mixed with ethanol.

序 論

花粉(pollen)은 蜂兒의 먹이로 주어지는 유일한 단
백源으로 이의 영양효과, 정장효과 및 신경장해, 동

맥경화증, 빈혈, 노인병, 급만성 전립선염등에 효과
가 있는 것으로 알려지면서¹⁾ 그 일반성분과^{2~7)} 임
상학적 약리효과에^{8,9)} 대한 많은 연구가 행해졌다.

alcohol의 섭취가 alcohol대사율의 변화와^{10~13)} 함
께 肝기능장애 및 肝질환을 일으킨다는 것은 잘 알

려져 있으나, 이들 장해가 alcohol의 직접 작용에 의한 것인지, 또는 식이인자의 변화에 따른 이차적 요인에^{14~17)} 의한 것인지는 아직 밝혀지지 않고 있다. 그러나 alcohol대사율이 고지방식이로는 저하하며,^{10,18)} 고단백식이로는 현저히 상승한다는 보고^{18,19)}와 함께 고단백식이가 肝기능장해의 치료에 효과적인 것으로 알려지고 있으며, 또 섭취한 alcohol의 대부분을 肝에서 acetaldehyde로 산화시키는 효소인 alcoholhydrogenase(ADH, EC 1.1.1.1)의 활성이 肝기능장해時나 alcohol섭취 후에 변화함을 보고한 많은 연구들이^{20~25)} 있는 바, 이에 본실험은 前報에²⁶⁾ 이어 花粉의 아미노산조성 및 함량을 검토하고, 이들 의 alcohol대사에 미치는 영향을 찾아보기 위하여 행하였다.

材料 및 方法

1. 材 料

(1) 實驗動物

120±10 g의 male Sprague-Dawley rat를 6마리

씩 1개 실험군으로 하여 7개군으로 구분하고(Table 1), Table 1의 食餌를 食前 공복시, 각 실험군에 Stomach tube feeding method로 투여하여, 10일간 사육한 후, 切迫屠殺하여 肝을 摘出하였으며, 이를 실험재료로 하였다.

(2) 해바라기 花粉粒

본실험에 사용한 해바라기 花粉粒은 대구 시중 전재한 약방에서 구입하였으며, 실험동물의 체중 kg 당 2g을²⁶⁾ 투여하였다.

(3) Alcohol 농도

10%, 20%, 30% alcohol을 經口투여하였다.

2. 方 法

(1) 花粉粒의 아미노酸 分析

花粉粒을 脱脂하고 미세분말로 粉碎한 후 아미노酸分析試料로 하였다.

Tryptophane, Cysteine을 제외한 16種의 아미노산을 Moore & Stein System²⁷⁾으로 酸加水分解하였고, Tryptophane은 Lombard & Lange Method로²⁸⁾ 알카

Table 1. Stomach tube feeding formula of experimental groups for 10 days.

Group	Feeding formula (ml)	Ethanol (conc.)	50% Pollen	5% Glucose	50% Sucrose	Total Amounts
Control	*	*		0.5	0.5	1.0
Group 1	A	0.5(10%)	*	0.5	*	1.0
	B	0.5(10%)	0.5	*	*	1.0
Group 2	A	0.5(20%)	*	0.5	*	1.0
	B	0.5(20%)	0.5	*	*	1.0
Group 3	A	0.5(30%)	*	0.5	*	1.0
	B	0.5(30%)	0.5	*	*	1.0

(pollen load: 2g/kg of body weight.)

Table 2. Conditions of amino acid analysis.

Operation condition required	Analysis of basics	Analysis acidics and neutrals
Column	23×0.9 cm (short column)	69×0.9 cm (long column)
Resin type	PA-35	AA-15
Height of resin	5.5 cm	56 cm
Duration of run	50 min.	175 min.
First buffer	pH 5.28	pH 3.28
Second buffer	Not applicable	pH 4.25
Buffer change (min. after start)	Not applicable	85 min.
Buffer flow rate	68 ml/hr.	68 ml/hr.
Ninhydrin flow rate	34 ml/hr.	34 ml/hr.
Operating temperature bath tank	55.3°C	55.3°C
Chart speed	1 inch/10 min.	1 inch/10 min.

리 가수분해시킨후, Table 2의 조건하에서 Beckman Model 116 Amino Acid Analyzer로 분석하였다.

(2) 酶活性測定

摘出한 rat 肝 1g을 Triton X-100 으로 10 배 회색 homogenize하고, 원심분리(10,000 rpm, 20 min., 4°C)한 후, 그 상등액을 시료로 하여 단백질은 Lowry Method²⁹⁾에 의해 비색정량(540 nm) 하였으며 ADH 활성은 Bonnischen & Brink Method로³⁰⁾ 비색측정(Shimadzu 210A UV spectrophotometer, 340 nm)하고, Lad³¹⁾등의 방법에 의해 $\mu\text{M NADH}/\text{min.}/\text{mg}$ of soluble protein ($\mu\text{M}/\text{min.}/\text{mg}$)으로 환산, 효소 활성단위로 하였다.

(3) 肝組織検査³²⁾

摘出한 肝을 Bouin液으로 fixing하고, 脱水, paraffin embedding한 것을 microtome으로 切薄(5 μm)하여 hematoxylin-eosin으로 染色, 檢鏡하였다(Olympus, $\times 1,000$)

3. 統計處理

실험결과는 각각의 평균치와 표준편차를 구하였으며, 또한 t-test로써 유의성 검정을 행하였다.

Table 3. Essential amino acids composition of sunflower pollen load

E. A. A.	mg/100 mg	mg/g N.	FAO mg/g N.	E. A. A.	mg/100 mg	mg/g N.	FAO mg/g N.
Phenylalanine	1.10	297	180	Valine	1.24	335	270
Leucine	1.72	465	306	Tryptophan	0.41	111	90
Threonine	1.01	273	180	Isoleucine	0.96	259	27
Lysine	1.24	335	270	Methionine	0.37	100	144

Table 4. Nonessential amino acids composition of sunflower pollen load

N. E. A. A.	mg/100 mg	mg/g N.	N. E. A. A.	mg/100 mg	mg/g N.
Tyrosine	0.77	208	Cystine	0.39	105
Histidine	0.50	135	Arginine	1.21	327
Aspartic acid	2.74	741	Serine	1.09	295
Glutamic acid	2.90	784	Proline	2.79	754
Glycine	1.17	316	Alanine	1.45	392

Table 5. Body weight gain relative liver size (RLS) during experimental period

Control	Group 1		Group 2		Group 3	
	A	B	A	B	A	B
Body weight gain (gm)	12.4*	5.7	10.1	8.7	13.0	7.4
	± 2.2	± 0.7	± 1.3	± 0.9	± 2.7	± 0.8
RLS**(%)	3.43*	3.88	3.46	3.59	3.34	3.54
	± 0.41	± 0.35	± 0.33	± 0.40	± 0.31	± 0.31

* Mean ± standard deviation

** Relative liver size(RLS)=liver weight×100/final body weight p<0.05

結果 및 考察

1. 花粉粒의 아미노酸組成

해바라기 花분립의 아미노산 분석 결과는 Table 3, 4와 같다. phenylalanine을 비롯한 18種의 아미노산이 정량되었고, methionine과 isoleucine을 제외한 모든 필수 아미노산이 FAO의 provisional pattern 보다 많이 함유되어 있었으며, 비필수 아미노산은 glutamic acid가 가장 많고, 다음이 proline, aspartic acid順으로 함유되어 있음이 나타났으며, 총 아미노산의 양이 23.06 mg/100g 으로 良質의 단백 細胞임을 알 수 있다.

Harper¹⁶⁾등은 lysine과 threonine이 적은 식이로는 肝의 지방침윤이 발생한다고 하였는데 화분에는 이 두 필수 아미노산의 함량이 높은 것으로 抗脂肝의 효과를 기대할 수 있다고 사료된다.

2. 成長率

실험동물의 체중 및 체중에 대한 肝중량비는 Table 5에 나타난 바와 같다. 체중증가는 실험기간에 유의

적 차이가 없었고, 체중에 대한 肝 중량비는 alcohol 만을 투여한 군이 대조군에 비해 유의적으로 높았고, alcohol과 화분을 복합 투여한 군은 대조군보다 낮거나 비슷한 수치를 나타내었으며, 각 실험군에서는 alcohol만 투여한 군이 alcohol과 화분을 복합 투여한 군보다 유의적으로 높게 나타났다.

3. 肝 ADH 活性

rat 肝 ADH 활성을 측정한 결과는 Table 6 과 같다. alcohol을 투여한 군의 ADH 활성은 현저히 저하하여, 3-A 군은 대조군의 20% 활성만을 나타내었으며, alcohol과 화분 복합 투여군에서는 대조군에는 미치지 못했으나, ADH 활성이 증가되어 1-B군의 활성은 대조군의 58% 까지 증가됨이 나타났으며, alcohol만 투여한 A군보다 각자 그 활성의 증가가 현저함을 나타내고 있는데(Fig. 1), 이는 肝 ADH 활성은 肝질환시나 alcohol 투여 후에 변화하며, 肝疾患者에서는 그 활성이 저하한다고 한 Figueroa³³⁾, Asada³⁴⁾등의 보고와, 단백질이 alcohol 대사율을 효과적으로 상승시킨다고 한 Westerfeld¹⁹⁾등의 보고와 일치한다.

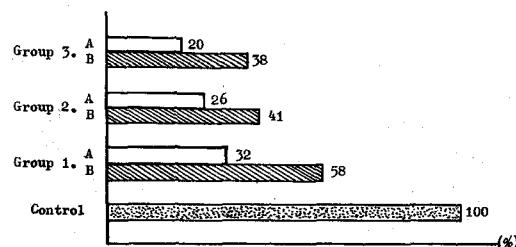


Fig. 1. Changes of ADH activities in liver of rats.

4. 肝의 紹織學的 變化

Leevy³⁵⁾등은 alcohol로 인한 肝 지방침윤은 단백질 섭취로 없어진다고 하였으며, 장기간 단백질 결핍은 alcohol을 섭취하지 않아도 간경화증을 유발하며, 고

단백식이가 효과적이라는 보고^{14, 36~38)}가 있는 바, 우수한 단백원인 화분이 肝에서 alcohol 대사에 미치는 영향을 肝 조직 검사를 통해 알아본 결과, Fig. 2~5 와 같았다.

10%, 20%, 30% alcohol을 각각 10일간 투여한 실험동물의 肝 조직에는 지방침윤이 현저하게 나타났으며, 더우기 3-A군에서는 지방침윤이 길게 확산되어 파진것을 볼 수 있는데, 이는 alcohol을 투여한 rat 肝의 총 지질량이 증가하여, 아울러 alcohol이

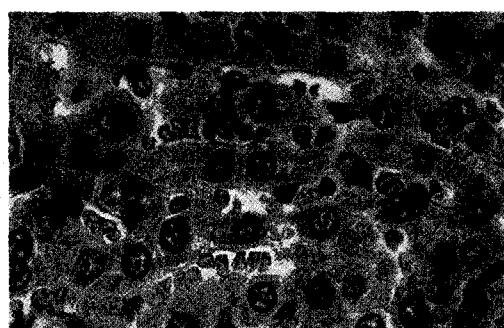


Fig. 2. Rat hepatocytes from the control group and group 1-B are in a normal state.
Hematoxylin-eosin stain. $\times 1,000$

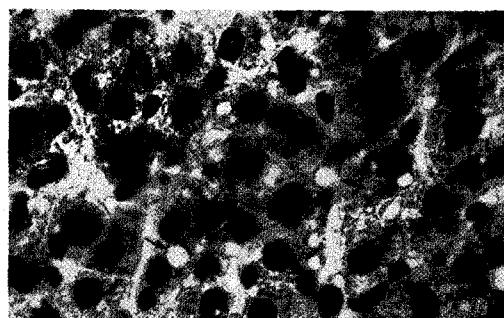


Fig. 3. Rat hepatocytes from the group 1-A contain a few intracytoplasmic fat vacuoles (arrow).
Hematoxylin-eosin stain. $\times 1,000$

Table 6. Activities of ADH in liver of rats

	Control	Group 1		Group 2		Group 3	
		A	B	A	B	A	B
ADH activity	16.4*	5.3 \pm 1.2	9.5 \pm 0.7	4.2 \pm 0.6	6.8 \pm 0.7	3.4 \pm 0.4	6.3 \pm 0.5

* Mean \pm standard deviation, $p < 0.05$

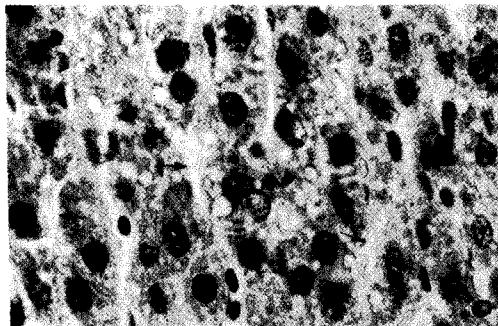


Fig. 4 Rat hepatocytes from the group 3-A show more enlarged and lengthened fat vacuoles (arrow) than those in Fig. 3(group 1-A).
Hematoxylin-eosin stain. $\times 1,000$

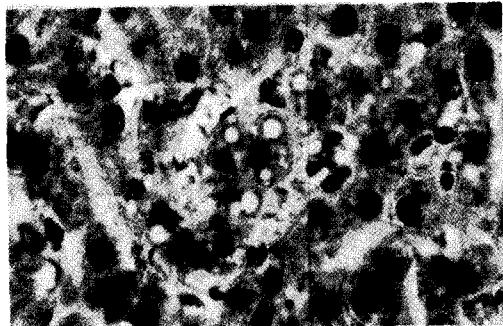


Fig. 5. Rat hepatocytes from the group 3-B show also fat vacuoles, but less in number, smaller in size than those in Fig. 4(group 3-A).
Hematoxylin-eosin stain. $\times 1,000$

뇌하수체와 부신피질을 자극하고,¹⁹⁾ 지방산 합성을 유도함으로써 肝 지방침윤을 촉진시킨다는 Lieber^{39~41)}등의 보고와도 일치하였다. alcohol과 화분 복합투여 군에서는 肝에서의 지방침윤이 alcohol만을 투여한 군보다 현저히 감소됨을 볼 수 있었는데, 특히 1-B군의 肝조직은 대조군과 같이 지방침윤이 전혀 나타나지 않았으며, 2-B군과 3-B군에서는 각각 지방침윤이 나타났으나, 같은 농도의 alcohol만을 투여한 2-A군, 3-A군에서 보다는 지방침윤이 현저히 적게 나타난 것을 관찰할 수 있었다.

要 約

화분립이 alcohol대사에 미치는 영향을 알기 위하여 아미노산을 분석하고, rat에 alcohol과 화분립을 각각 농도별로 투여하여 rat肝 alcoholdehydrogenase (ADH) 활성과 肝조직 변화를 실험하였다.

1. 해바라기 화분립의 아미노산 조성을 분석하여 phenylalanine을 비롯한 18종의 아미노산을 정량하였으며, 필수 아미노산 중 특히 phenylalanine, leucine, threonine, lysine의 함량이 많았다.

2. 실험동물의 肝 ADH 활성은 alcohol 투여군이 alcohol농도에 비례하여 대조군 보다 현저히 저하하였으며, 화분립을 alcohol과 함께 투여함으로써, 대조군에는 미치지 않았지만 ADH 활성이 증가하였고, alcohol의 농도가 낮을수록 그 증가율이 높았다.

3. 실험동물의 肝조직은 alcohol투여군에서 지방침윤이 나타났으며, 화분립과 alcohol 복합투여군에서는 지방침윤이 현저히 적게 나타났다.

文 献

- 金丙鏞: 신양봉학(선진문화사, 서울), 242(1982)
- McIlwain, D. L. : *Biochem.*, 5(12), 4054(1966)
- Chung, H. K. : *The Seoul J. of Med.*, 18(2), June, 125(1977)
- Taich, O. : *Yakagaku zasshi*, 94(3), 362(1974)
- Taich, O. : *Yakagaku zasshi*, 94(3), 367(1974)
- Anelli, G. : *Agrochem.*, 15(6), 539(1971)
- Echigo, T. : *Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku*, 11, 37(1971)
- 古川敏議: G. 654. 東邦醫會誌, 15(2), 190 (1968)
- 古川敏議: G. 654. 東邦醫會誌, 15(2), 201 (1968)
- Westerfeld, W. W., Schulman, M. P. : *J. A. M. A.*, 170(2), 197(1959)
- Smith, M. E., Newman, H. W. : *J. Biol. Chem.*, 234, 1544(1954)
- Clark, W. C., Hulpieu, H. R. : *Quart. J. Stud. Alcohol*, 19, 47(1958)
- Newman, H. W., Smith, M. E. : *Quart. J. Stud. Alcohol*, 20, 213(1959)
- Patek, A. J., Ratnoff, O. D. : *J. A. M. A.*, 138, 543(1948)
- Glynn, I. E., Himsworth, H. P. : *Brit. J. Exp. Path.*, 29, 1(1948)
- Harper, A. E., Monson, W. J. : *J. Biol. Chem.*, 206, 151(1954)
- Koch-Weser, D. : *J. Nutr.*, 49, 443(1953)

18. Kerner, E., Westerfeld, W.W. : *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **83**(July), 530(1953)
19. Westerfeld, W.W., Schulman, M.P. : *J.A.M.A.*, **170**(2), 135(1959)
20. Otani, T. : *Med. J. Osaka Univ.*, **11**, 2529 (1959)
21. Lieber, C.S., Davidson, C.S. : *Amer. J. Med.*, **33**, 319(1962)
22. Greenberger, N.J., Cohen, R.B., Isselbacher, K.J. : *Lab. Invest.*, **14**, 264(1965)
23. Hawkins, R.D., Kalant, H. : *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, **44**, 241(1966)
24. Pagliaro, L., Norarbartolo, A. : *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **37**, 1127(1961)
25. Figueiroa, R.B., Klotz, A.P. : *Gastrpenterology*, **43**, 10(1962)
26. Chung, Y.G., Yoon, S.H. : *J. Korea Soc. Food Nutr.*, **13**(2), 169(1984)
27. Mason, V.C. : Amino acids in nutrition(Licentiate thesis), (1963)
28. Lombard, J.H., De Lange, D.J. : *Anal. Biochem.*, **10**, 260(1965)
29. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. : *J. Biol. Chem.* **193**, 265(1951)
30. Bonnichsen, R.K., Brink, N.G. : In "Methods in Enzymology", Vol. 1, Academic Press, 495 (1955)
31. Lad, P.J., Leffert, H.L. : *Anal. Biochem.*, **133**, 350(1983)
32. McGraw-Hill Book Co. : Manual of histologic and special staining technology. 2nd. ed., 32 (1960)
33. Figueiroa, R.B., Klotz, A.P. : *Gastro.*, **43**, 10 (1962)
34. Asada, M., Galambos, J.T. : *Gastro.*, **45**, 67 (1963)
35. Klatzkin, G. : *Gastro.*, **41**(5), 443(1961)
36. Leevy, C.m., Patrylo, I. : *Quart. J. Stud. Alcohol*, **14**, 568(1953)
37. Volwiler, W., Jones, C.M. : *Gastro.*, **11**, 164 (1948)
38. Davies, J.N.P. : *Lancet*, **1**, 317(1948)
39. Lieber, C.S., Jones, D.P. : *J. Clin. Invest.*, **44**, 1009(1965)
40. Mallov, s., Bloch, J.L. : *Amer. J. Physiol.*, **184**, 29(1956)
41. Di Luzio, N.R. : *Amer. J. Physiol.*, **194**, 453 (1958)