

과량의 비타민 E 및 Cholesterol 첨가식이 흰쥐의 혈청과 간의 비타민 E 및 Cholesterol 농도에 미치는 영향

황금단 · 김형미 · 김정미 · 이양자

연세대학교 가정대학 식생활학과

Effects of Excess Vitamin E and Cholesterol Supplements on Levels of Vitamin E and Cholesterol in Rat Serum and Liver

K.D. Hwang, H.M. Kim, J.M. Kim, and Y.C. Lee (Kim)

*Dept. of Food & Nutrition, College of Home Economics Yonsei University,
Seoul, Korea*

= ABSTRACT =

The present study was undertaken to investigate the effects of excess vitamin E supplementation (0.5%) and cholesterol (0.5%) on levels of serum and liver vitamin E and cholesterol in two categories of rats, group A and group B. Rats in group A (45-65g) were fed experimental diets for 3 weeks (I-C, II-E, III-Ch, IV-ECh). On the other hand rats in group B (45g-65g) were first fed control diet for 3 weeks and then fed experimental diets when they were 100-120g for the subsequent 3 weeks (I'-C, II'-E, III'-Ch, & IV'-ECh).

The levels of serum vitamin E were higher in vitamin supplemented groups as expected. Dietary cholesterol showed a tendency to lower serum vitamin E levels of vitamin E supplemented groups. Serum cholesterol levels tended to stay in a narrow range showing resistancy to dietary cholesterol and were not affected by vitamin E status. Whereas vitamin E supplementation seemed to lower the levels of hepatic cholesterol in both groups A & B (I-C, I'-C vs II-E, II'-E), simultaneous supplementation of vitamin E with 0.5% cholesterol appeared to increase further the hepatic cholesterol levels which were already increased by cholesterol feeding (IV-ECh, IV'-ECh, vs III-Ch, III'-Ch).

Hepatic vitamin A levels decreased as rats grew older during the experimental period. Even though vitamin A levels did not differ from each other significantly, excess amount of vitamin E supplementation in group B seemed to show a tendency to decrease the vitamin A storage in liver.

%로서 옥수수기름과 쇠기름의 비율을 1:1로 하고 P/S (polyunsaturated fatty acids/saturated fatty acids) 비율을 1로 조절하였으며, II-E군과 IV-ECh군에는

식이 1kg당 5,000 I.U.의 vitamin E (DL- α -tocopheryl acetate)를 더 첨가하였고, III-Ch군과 IV-ECh군에는 식이 1kg당 5,000mg의 cholesterol을 더 첨가하였다.

Table 1. Composition of experimental diets (weight %)

| Ingredients | Experimental group | | | |
|------------------------|--------------------|------|--------|--------|
| | I-C | II-E | III-Ch | IV-ECh |
| Carbohydrate | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Protein: Casein | 18 | 18 | 18 | 18 |
| DL-Met. | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Fat: Corn | 7.5 | 7.5 | 7.5 | 7.5 |
| Tallow | 7.5 | 7.5 | 7.5 | 7.5 |
| Salt Mixture | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Vitamin Mixture | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Cellulflour | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Additional vitamin E | - | 0.5 | - | 0.5 |
| Additional cholesterol | - | - | 0.5 | 0.5 |

1: Starch: Glucose: Sucrose = 70:20:10
 2: Salt mixture (g per 100g salt mixture): CaCO₃ 29.29; CaHPO₄ · 2H₂O 0.43; KH₂PO₄ 34.31; NaCl 25.06; MgSO₄ · 7H₂O 9.98; Fe (C₆H₅O₇) · 6H₂O 0.623; CuSO₄ · 5H₂O 0.156; MnSO₄ · H₂O 0.121; ZnCl₂ 0.020; KI 0.0005; Na₂ SeO₃ · H₂O 0.0015; (NH₄)₂ Mo₇O₂₄ · 4H₂O 0.0025
 3: Vitamin mixture¹⁸⁾ (mg per Kg diet); Thimin · HCl 5; Riboflavin 5; Niacinamide 25; Ca-pantothenate 20; Pyridoxine · HCl 5; Folic acid 0.5; Biotin 0.2; Vitamin B₁₂ 0.03; DL- α -tocopheryl acetate 100; Retinyl palmitate (in I.U.) 4,000; Cholecalciferol (in I.U.) 400; Choline chloride 2,000; Ascorbic acid 50; Menadione 0.5; Inositol 100.

탄수화물원으로는 starch: glucose: sucrose를 70:20:10의 비율로 배합하였고, 단백질원으로는 casein을 18% 수준으로 배합하였으며, DL-methionine을 0.1% 첨가해 주었다.

3) 측 정

(1) 성장을 및 사료효율

매주 한번씩 같은 요일 같은 시각에 쥐의 체중을 측정하였고, 사료효율도 산출해냈다.

(2) 생화학적 분석

① 혈청과 간에서의 vitamin E농도 측정: 전 연구에서와 동일한 방법으로¹⁹⁾ vitamin E를 추출하여 ferric chloride-dipyridyl법(Emmerie-Engel reaction)에 의하여 vitamin E 농도를 측정하였다²⁰⁾. 표준 vitamin E로는 Merck 제품의 dl- α -tocopherol을 사용하였다.

② 혈청에서의 Cholesterol 추출²¹⁾

③ 혈청을 0.1ml 취하여, 여기에 KOH (33% in ethanol) 5ml을 가하고 잘 섞은 후 60°C water bath에서 정확히 45분간 가온한다. 실온에서 방냉한 후 5ml의 petroleum ether와 5ml의 증류수를 넣고 정확히 1분간 거세게 흔든 후, 원심분리(1,500 rpm에서 5분간)한다. 상층액 1ml을 취하여 60°C water bath에서 N₂ gas로 건

Table 2. Body weight during experimental period¹⁾(unit: g)

| | Experimental period | | | |
|-----------|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Initial | 1 | 2 | 3 |
| I - C | 53.7 ± 3.8 | 59.5 ± 5.2 | 78.5 ± 12.3 | 103.5 ± 19.6 |
| II - E | 57.6 ± 5.6 | 67.8 ± 5.8 | 92.4 ± 11.5 | 104.6 ± 13.7 |
| III - Ch | 65.7 ± 2.3 | 94.3 ± 7.0 | 140.7 ± 6.1 | 152.3 ± 6.5 |
| IV - ECh | 58.3 ± 1.4 | 88.7 ± 3.5 | 132.0 ± 4.0 | 143.3 ± 4.7 |
| I' - C | 113.3 ± 21.7 | 132.2 ± 18.9 | 170.0 ± 28.5 | 184.3 ± 26.4 |
| II' - E | 110.0 ± 8.5 | 142.0 ± 9.5 | 166.0 ± 14.7 | 189.5 ± 10.6 |
| III' - Ch | 109.4 ± 10.2 | 152.2 ± 10.2 | 170.6 ± 7.4 | 221.2 ± 10.6 |
| IV' - ECh | 107.8 ± 13.4 | 155.0 ± 14.0 | 182.0 ± 9.7 | 205.0 ± 4.4 |

1) : Mean ± S.E.M.

Group A: Experimental diets were given for the first 3 weeks.

Group B: Control diet was given for the first 3 weeks and the experimental diets for the next 3 weeks

- 과량의 비타민 E 및 Cholesterol 첨가식이 과량의 혈청과 간의 비타민 E 및 Cholesterol 농도에 미치는 영향 -

조시커 cholesterol 정량 시료로 사용하였다.

③ 위에서 건조시켜 얻은 시료에 glacial acetic acid 2ml을 가하고 vortex mixer로 잘 섞은 후, 2ml의 발색 시약을 넣고 다시 잘 섞는다. 약 10~20분 후에 560nm에서 optical density를 측정하였다. 표준 cholesterol 용액으로는 Junsei사 제품의 cholesterol을 glacial acetic acid에 희석하여 사용하였다.

③ 간 조직에서의 cholesterol 농도 측정: 간 조직에서는 Folch법에 의해 지방을 추출해 낸 후²³⁾, 혈청에서와 같은 방법으로 cholesterol을 추출, 정량하였다.

④ 간 조직에서의 vitamin A 농도 측정²⁴⁾: 1g의 간 조직에 2.5g의 anhydrosodium sulfate를 첨가하여 잘 섞은 후 0~4℃ 되는 냉장고에서 12시간 방치한다. 그리고 이 시료중 0.8ml의 30% trichloroacetic acid(30% in chloroform)를 가한 후, 10초내에 620nm에서 optical을 측정하였다. 표준 vitamin A 용액으로는 Sigma 제품의 retinol을 chloroform에 희석하여 사용하였다.

실험결과 및 고찰

1) 성장을 및 사료효율

실험 기간동안 각 그룹의 체중 변화는 A그룹과 B그룹에서 모든 군의 체중이 비슷한 경향으로 증가하

였으며, A그룹의 cholesterol 첨가군이 III-Ch 군과 IV-ECh 군에서만 실험 2, 3주에 체중 증가가 I-C 군과 II-E 군에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 사료효율에 있어서는 각 군간에 유의적인 차이가 없었다.

2) 혈청과 간에서의 Vitamin E 농도

3주간 실험식으로 사육한 흰 쥐의 혈청 vitamin E 농도 변화를 그림 2에 나타냈다. A그룹의 경우, vitamin E를 첨가한 II-E군과 IV-ECh군의 혈청 vitamin E 농도는 I-C군과 III-Ch군에 비해 각각 높게 나타났다. 또한 B그룹의 경우에도 II-C군에 비해 유의적으로 높았으며(P<0.05), IV-ECh군도 III-Ch군보다 높은 수준의 혈청 vitamin E 농도를 보였다.

이와같은 결과는 이전에 실시된 본 연구팀의 vitamin E(200~300 I.U. vitamin E/kg diet) 첨가 실험의 결과²⁵⁾와 일치하고 있으며, Yang과 Desai도 16개월간 과량의 vitamin E(2,500~10,000 I.U./kg diet)를 첨가했을때, 혈청 vitamin E 농도가 첨가한 vitamin E의 수준에 따라 증가한다고 보고한바 있으므로, 이상에서 vitamin E 농도가 혈청 vitamin E 농도에 영향을 미치는 있음을 알 수 있다. 한편 cholesterol을 첨가한 III-Ch군과 IV-ECh군의 혈청 vitamin E 농도는 I-C군과 II-E군에 비해, 그리고 III-Ch군과 IV-ECh군도 I-C군과 II-E군에 비해 각각 낮은 경향으로 나타나

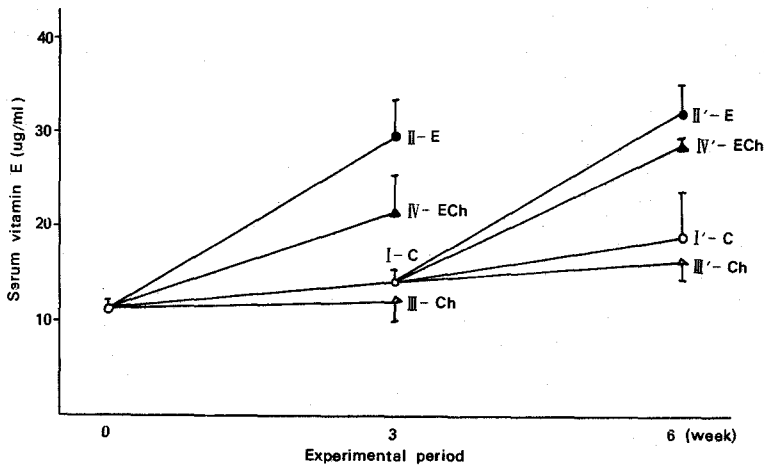


Fig. 2. Vitamin E concentrations in the serum.

I-C, I'-C: Control
 II-E, II'-E: +Vit E
 III-Ch, III'-Ch: V + Chol
 IV-ECh, IV'-ECh: VitE + Chol.

식이 cholesterol이 혈청 vitamin E 농도를 낮추어주는 경향을 일률적으로 보여주고 있는데, 식이 cholesterol이 vitamin E 농도를 감소시키는 정확한 원인은 아직 명확히 규명되고 있지 않다.

3주간의 실험기간동안 나타난 간의 vitamin E 농도를 단위 DNA 무게로 나누어준 것을 그림 3에 나타내었다. A그룹에서는 과량의 vitamin E를 첨가한 II-E 군과 IV-ECh 군이 I-C군과 III-Ch 군에 비해 각각 유의적으로 높게 나타나 ($P < 0.05$) 혈청의 경우와 비

슷한 결과였고, 다른 연구팀들도 과량의 vitamin E 식이가 조직 vitamin E 수준을 증가시켜 준다고 보고한 바 있다⁶⁾⁷⁾. 그런데 B그룹에서는 같은 경향이 나타나지 않아 재검토되어야 할 점이라고 판단된다.

3) 혈청의 간에서의 Cholesterol 농도

혈청에서의 cholesterol 농도의 변화는 A 그룹과 B 그룹에서 모두 유의적인 차이를 보이지 않았는데 (Fig. 4) 설치류 (rodents) 동물중 쥐와 생쥐의 경우는 혈청

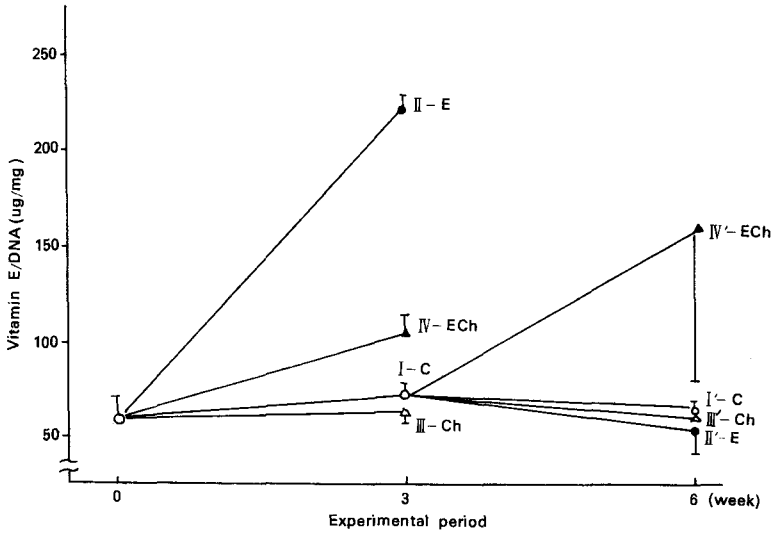


Fig. 3. Vitamin E concentrations/DNA in the liver.

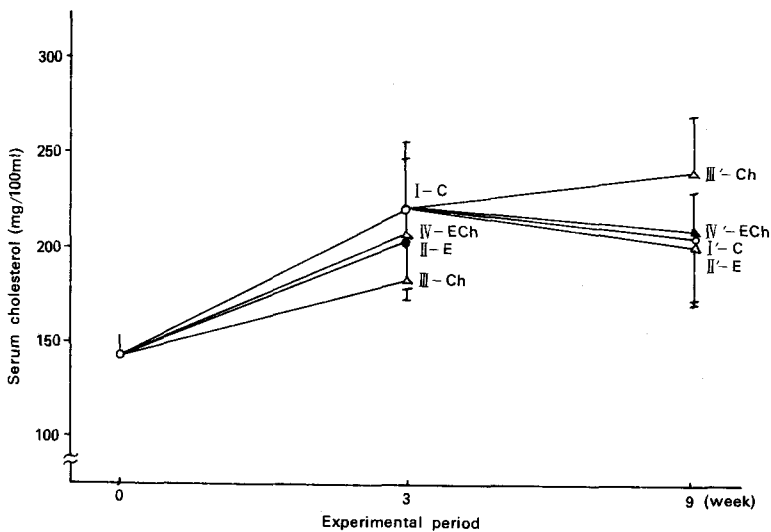


Fig. 4. Cholesterol concentrations in the serum.

- 과량의 비타민 E 및 Cholesterol 첨가식이 쥐의 혈청과 간의 비타민 E 및 Cholesterol 농도에 미치는 영향 -

cholesterol 수준이 cholesterol 첨가식에 크게 영향을 받지 않는 것으로 알려진바 있다²⁶⁾²⁷⁾.

간에서의 cholesterol 농도 변화를 Fig. 5에서 나타내었다. A 그룹에서 cholesterol을 첨가한 III-Ch군과 IV-ECh군이 I-C군과 II-E군에 비해 유의적으로 높은 수치를 나타냈으며 ($P < 0.05$), 또 B 그룹에서도 같은 경향으로 나타나 식이의 cholesterol이 실험기간에 관계없이 간에 축적되는 것으로 간주된다. Dam은¹⁴⁾ 2% 과량 cholesterol을 닭에게 투여하였을때, 뇌와 근육의

총 cholesterol 농도에는 영향을 미치지 않았으나, 간의 총 cholesterol 농도가 상당히 증가하였음을 보고한 바 있다.

한편 과량의 vitamin E를 투여한 II-E군은 I-C군에 비해 총 cholesterol 농도가 유의적으로 낮았으며 또한 II-E군도 I-C군에 비해 낮은 수치를 나타냈다. 따라서 vitamin E의 과량 첨가는 cholesterol 농도를 감소시키는 효과를 보이고 있으나 vitamin E 첨가에 cholesterol을 더 첨가한 IV-ECh군과 IV-ECh군

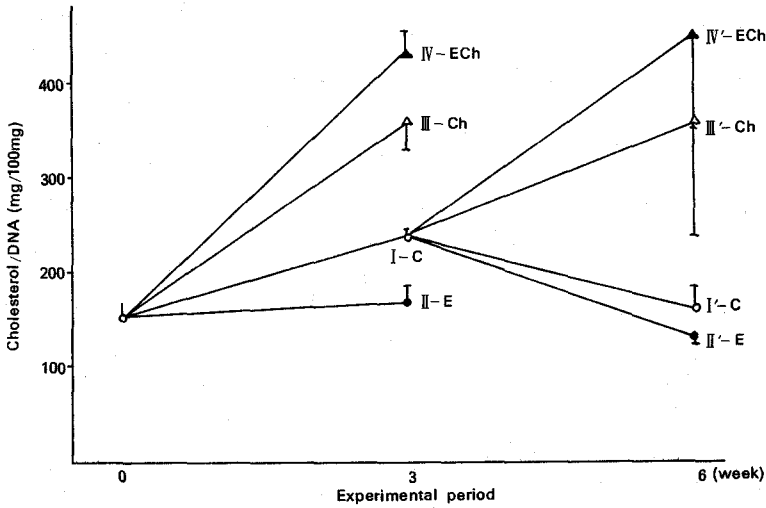


Fig. 5. Cholesterol concentration/DNA in the liver.

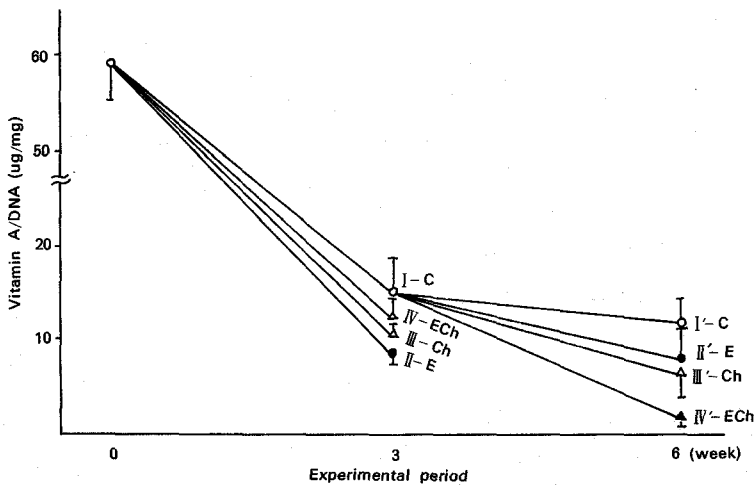


Fig. 6. Vitamin A concentrations/DNA in the liver.

에서는 III-Ch 군이나 III⁴-Ch 군 보다 각각 더 높게 나타나 cholesterol 첨가가 vitamin E의 cholesterol 저하 효과를 없애준 것으로 풀이된다. Harrill 등²⁸⁾은 흰 쥐에게 6~12주 동안 9~10 I.U.의 vitamin E를 매주 구강 투여하였을 때 간의 cholesterol 농도가 낮아졌다고 보고한 바 있다.

4) 간 조직에서의 Vitamin A 농도

실험식으로 3주간 사육한 흰 쥐의 간 vitamin A 농도는 Fig. 6에 나타난 바와 같다. A 그룹과 B 그룹의 간 조직내 vitamin A 농도는 전체적으로 기간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 보이며, B군의 경우 vitamin E 첨가가 간 조직내의 vitamin A 농도를 감소시키는 경향을 보여주나 유의적인 변화는 아니었다. 연구 보고에 따르면²⁹⁾, vitamin E를 공급하였을 때 vitamin A와 β -carotene에 기인된 성장이 감소되었다고 하며, 또 다른 보고³⁰⁾에서는 과량의 vitamin E가 β -carotene이 체내에서 vitamin A로 전환되는 것을 방해함이 지적되기도 하였다. Vitamin E와 vitamin A의 상호관계에 관한 연구³¹⁾는 여러 측면에서 많은 연구자들에 의해 진행되고 있다.

요 약

본 실험을 통해 뚜렷한 경향을 보여주는 몇 가지 결과를 요약하면 다음과 같다.

- 식이 vitamin E의 과량 첨가는 쥐의 혈청에 반영되어 나타났으며, 식이중의 cholesterol은 이 증가 효과를 감소시키는 경향을 보여주었다.
- 식이 cholesterol 첨가로 인해 쥐의 혈청 cholesterol 농도는 영향을 받지 않은 반면, 간의 cholesterol 농도는 증가되었다. 과량 vitamin E와 cholesterol 두가지를 식이에 첨가하였을 경우 (IV-ECh, IV⁴-ECh) 간의 cholesterol 농도는 식이에 cholesterol만을 첨가한 경우 (III-Ch, III⁴-Ch)보다 더욱 높게 나타났다. 그리고 vitamin E만을 첨가한 II-E와 II⁴-E군에서는 간의 cholesterol 농도를 낮추어주는 경향을 보였다.
- 간의 vitamin A 농도는 쥐가 성장함에 따라 감소하였으며 각 실험군 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, B군의 경우 과량 vitamin E 식이는 간 vitamin A 농도를 감소시키는 경향으로 나타났다.
- Vitamin E, vitamin A, cholesterol 및 다른 여러 요소들간의 복잡한 상호관계를 알아내기 위해, age가 다른 그리고 여러 species의 동물을 이용한, 장기간의

단제적이고도 체계적인 많은 연구가 요구되어진다.

REFERENCES

- 1) Scott, M.L.: *Advance in our understanding of vitamin E. Fed. Proc.*, 39: 2736-2739, 1980.
- 2) Horwitt, M.K.: *Vitamin E: A reexamination. Am. J. Clin. Nutr.*, 29: 569-578, 1976.
- 3) Lubin, B.X. & Machlin, L.J. (Editors): *Vitamin E: Biochemical, Hematological and clinical Aspects, Annals New York Acad. Sci. Vol. 393*, 1982.
- 4) Levander, O.A. & Cheng, L.C. (Editors): *Micronutrient Interactions: vitamin minerals and Hazardous Elements. Annals New York Acad. Sci. Vol. 355*, 1980.
- 5) Lai, M.Z., Düzgunes, N. and Szoka, F.C.: *Effects of replacement of the hydroxyl group of cholesterol and tocopherol on the thermotropic behavior of phospholipid membranes. Biochemistry* 24: 1646-1653, 1985.
- 6) Yang, N.Y.J. and Desai, I.D.: *Effect of high levels of dietary vitamin E on liver and plasma lipids and fat soluble vitamins in rats. J. Nutr.* 107: 1418-1426, 1977.
- 7) Machlin, L.J. and Gabrieli, E.: *Kinetics of tissue α -tocopherol uptake and depletion following administration of high levels of vitamin E. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 393: 48-60, 1982.
- 8) Losowsky, M.S., Kelleher, J., Walker, B.E., Davies, T. and Smith, C.L.: *In take and absorption of tocopherol. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 203: 212-222, 1972.
- 9) Hermann, W.J., Ward, K. and Faucett, J.: *The effect of tocopherol on high density lipoprotein cholesterol. Am. J. Clin. Pathol.*, 72: 848-852, 1979.
- 10) Barboriak, J.J., Shetty, K.R. and Kalbfleish, J.H.: *Vitamin E supplements and plasma high density lipoprotein cholesterol. Am. J. Clin. Pathol.* 77: 371-372, 1982.
- 11) Hermann, W.J.: *The effect of vitamin E on lipoprotein cholesterol distribution. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 393: 467-472, 1982.
- 12) Stampfer, M.T., Willett, W., Castelli, W.P., Taylor,

- 과량의 비타민 E 및 Cholesterol 첨가식이 쥐의 혈청과 간의 비타민 E 및 Cholesterol 농도에 미치는 영향 -

- J.O., Fine, J. and Hennekens, C.H.: *Effect of vitamin E on lipids. Am. Soc. Clin. Pathol.* 79: 714-716, 1983.
- 13) Shull, R.L., Ershoff, B.H. and Alfin-Slater, R.B.: *Effect of antioxidants on muscle and plasma of vitamin E deficient Guinea pigs. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 98: 364-366, 1958.
- 14) Dan, H.: *Ineffectiveness of vitamin E in preventing cholesterol deposition in the aorta. J. Nutr.* 28: 289-295, 1944.
- 15) Prodouz, K.N. and Navari, R.M.: *Effect of vitamin A and E on Rat tissue lipids. Nutr. Rep. Int.* 11: 17-28, 1975.
- 16) Chen, L.H., Liao, S. Packett, L.V.: *Interaction of dietary vitamin E and protein level or lipid source with serum cholesterol in rats. J. Nutr.* 102: 729-732, 1972.
- 17) Harrill, I., Minarik, G. and Gifford, E.D.: *Effect of vitamin A and E on lipids of selected rat tissues. J. Nutr.* 87: 424-428, 1965.
- 18) Rogers, Q.R. and Happer, A.E.: *Aminoacid diets and maximal growth in the rat, Nutr.* 87: 267-273, 1965.
- 19) 이양자 · 조혜영 · 김정숙 · 한성수: *비타민 E의 기능 규명을 위한 영양생화학적 및 병리학적인 연구. 한국영양학회지* 15: 277-289, 1982.
- 20) Hawk, P.B., Oser, B.L. and Summerson, W.H.: *Ferric chloride-dipyridyl method (Emmerie-Engel reaction) Practical Physiological chemistry. 13th ed. J. LA. Churchill LTD.* 1272-1273, 1956.
- 21) Abell, L.L., Levy, B.B., Brodie, B.B. and Kendall, F.E.: *A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. J. Biol. Chem.* 195: 367-366, 1952.
- 22) Zak, B., Dickenman, R.C., White, E.G., Burnett, H. and Cherney, P.J.: *Rapid estimation of free and total cholesterol. Am. J. Clin. Pathol.* 24: 1307-1315, 1954.
- 23) Folch, J., Lees, M. and Sloanestanley, G.H.: *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem.* 226: 479-509, 1957.
- 24) Olson, J.A.: *Simple dual assay for vitamin A and carotenoids in human liver. Nutr. Rep. Int.* 19: 807-813, 1979.
- 25) 박연희: *과량의 PUFA 식이가 vitamin E 보충 및 selenium 제거시 쥐의 혈청과 조직 vitamin E 농도에 미치는 효과. 연세대학교 대학원 식생활학과 석사논문, 1982.*
- 26) Beher, W.T., Filus, A.M., Rao, B. and Beher, M.E.: *A comparative study of bile acid metabolism in the rat, mouse, hamster, and gerbil. Proc. Soc. Exptl. Biol. med.* 130: 1067-1074, 1969.
- 27) Grundy, S.M.: *Absorption and Metabolism of dietary cholesterol. Ann. Rev. Nutr.* 3: 71-96, 1983.
- 28) Harrill, I., and Gifford, E.D.: *Effect of vitamin E, arginine and methionine on free amino acids and lipids in selected rat tissues. J. Nutr.* 89: 247-250, 1966.
- 29) Harris, P.L., Kaley, M.W. and Hickman, K.C.D.: *II. The sparing action of natural tocopherol concentrates on carotene. J. Biol. Chem.* 152: 313-320, 1944.
- 30) Johnson, R.M., and Baumann, C.A.: *The effect of α -tocopherol on the utilization of carotene by the rat. J. Biol. Chem.* 175: 811-816, 1948.
- 31) Arnrich, L. Arthur, V.A.: *Interactions of fat-soluble vitamins in hypervitaminoses, In: Micro-nutrient Interactions, ed. Levander, O.A. & Cheng, L. pp. 109-118, Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 355, 1980.*