

## Cholesterol과 MLHP로 유발한 지방간에 대한 Riboflavin의 치료 효과

박      란      숙

송의여자전문대학교 식품영양학과

채      규      태

가톨릭의과대학 병리학교실

### Prevention of Cholesterol and MLHP-induced Fatty Liver by Riboflavin

Ran-Sook Park

Dept. of Food and Nutrition, Soong Eui Women's College

Gue-Tae Chae

Dept. of Pathology, Catholic Medical College

#### = ABSTRACT =

In order to investigate the effect of riboflavin on cholesterol and MLHP (methyl linoleate hydroperoxide) - induced fatty liver electron microscopically, riboflavin was given to rats receiving high cholesterol and MLHP diet for 4 weeks. 8week old male Sprague-Dawley rats were administrated diets daily, as following group: usual diet (control), riboflavin(10ug/20gm BW), cholesterol (50mg/gm BW), MLHP (0.1ml/20gm BW), cholesterol plus MLHP, cholesterol plus riboflavin, cholesterol plus MLHP plus riboflavin, by means of intubation into the stomach for 4 weeks. Each group consisted of 10 rats. The liver of the animals were examined ultrastructurally by transmission electronmicroscope.

The results were as follows :

1) The three group including cholesterol, MLHP, cholesterol plus MLHP feedings resulted in fatty liver.

2) The main findings of the fatty liver were swelling and vacuolation of mitochondria, a lot of lipid droplets, disarrangements and loss of rough endoplasmic reticulum.

3) The most striking features in the group of cholesterol plus riboflavin, cholesterol plus MLHP plus riboflavin feeding were decrease of size and number of lipid droplets, mitochondrial swelling and vesiculation, with restoration of rough endoplasmic reticulum.

It is postulated with above findings that riboflavin was effective in prevention of cholesterol and MLHP-induced fatty liver.

## 서 론

식생활이 향상됨에 따라 지방섭취량이 증가하고 이와 비례하여 임상영양학적으로 중요한 질환의 하나인 지질 대사와 관련된 간의 지방변화 또는 지방간 환자가 늘어 날 것은 자명한 일이다. 간의 지방변화는 실험적으로는 CCl<sub>4</sub> 중독 등 여러 가지 약제에 의하여 생길 수 있으나, 사람에서 흔히 관찰되는 간의 지방변화는 알콜성 및 지방의 과다 섭취가 주 원인이다.<sup>1,2)</sup>

한편 식생활 양상이 서구화되면서 나타난 두드러진 변화의 하나는 여러 가지 인스탄트 식품의 수요가 급격히 증가되었다. 이러한 인스탄트 식품의 제조과정에 필수불가결한 불포화 지방산이 가공후 섭취하기까지 산폐(자동산화, 과산화) 되므로써 모르는 사이에 과산화 지질을 섭취하게 된다. 인스탄트 식품에 많이 쓰이는 불포화 지방산의 하나인 linoleic acid의 과산화물인 methyl linoleate를 다량 투여하게 되면 간의 지방변화가 생김이 보고된 바 있다.<sup>3)</sup>

그러나 고콜레스테롤식이<sup>4)</sup> 및 고과산화지질 식이로 유발한 지방간 세포의 전자현미경적 연구는 그리 많지 않았으며, 이에 대한 riboflavin의 치료효과는 저자들이 알기로는 국내, 외에 발표된 바 없었다. 따라서 저자들은 rat에 고콜레스테롤식이 단독군과 고 methyl linoleate hydroperoxide(MLHP)식이를 병합 투여하여 유발한 지방간 세포의 미세구조를 관찰하여 지방대사의 증추인 미토콘드리아 등의 미세 구조들의 변화를 관찰하는 한편 미토콘드리아내에서 지방대사에 관여하는 flavoprotein의 공급원인 riboflavin 투여가 지방간 세포의 미세구조에 미치는 영향을 추구하고자 본 실험을 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 가. 동물 및 재료

Sprague-Dawley 계 흰쥐로 생후 8주된 체중 200gm 내외의 숫컷 70마리를 사용하였다. 사료는 제일사료사 제품의 일반사료를 사용하였다. 고 cholesterol 식이는 화광순약(일본)제를 사용하여 체중 20gm당 cholesterol 50mg, sodium cholate 10mg을 corn oil 0.1ml에 부유시켜 폴리에칠렌관으로 위장내에 매일 1회 4주동안 투여하였다. 고과산화지질 식이는 methyl linoleate(Sigma 제)를 기포발생 장치로 24시간 동안 기포로 자동 산화시켜 methyl linoleate hydroperoxide(ML-

HP)로 만든 다음 동물 체중 20gm당 0.1ml를 폴리에칠렌관으로 위내에 매일 1회 4주동안 투여하였다. riboflavin은 화광순약제로 체중 100gm당 6mg 씩 corn oil 0.1ml와 함께 위내에 투여하였다.

### 나. 실험군

실험군은 1) 대조군, 2) riboflavin 투여군, 3) cholesterol 투여군, 4) MLHP 투여군, 5) cholesterol과 MLHP 투여군, 6) cholesterol과 riboflavin 투여군, 7) cholesterol + MLHP + riboflavin 투여군 등으로 각군 모두 10마리씩으로 실험하였다.

### 다. 방법

ether 마취하여 복부 절개하고 간을 적출하는 즉시 지방변화가 나타난 부위를 세절하여 2% glutaraldehyde 2.5% paraformaldehyde(PBS, pH 7.2) 용액에 4시간 전고정한 후 1% osmic acid에 2시간 후고정하고 무수알콜로 탈수한 다음 Epon에 포매하였다. Ultratome LKB III로 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate에 중복염색하여 전자현미경 JEOL 100B로 관찰하였다.

## 성 적

### 1) 정상대조군 :

간세포는 다각형을 취하고 있고, 핵은 크고 둥글며 세포의 중앙에 위치해 있으며 조면 내형질망(rough endoplasmic reticulum, RER)이 핵막에 평행한 층상으로 발달되어 있고, 난원형의 미토콘드리아가 세포질 전체에 고르게 분포되어 있었다.

전자밀도가 큰 국화꽃 모양의 당원파립이 보였다.(그림 CON.).

### 2) Riboflavin 투여군 :

정상대조군과 대등소이하였으나 당원파립이 다소 증가하였다.(그림 1).

### 3) Cholesterol 투여군 :

조면내형질망의 숫적 감소를 보였고 미토콘드리아에 공포(vacuole)이 보이는 곳도 있었다. Myelin figures를 보이는 미토콘드리아도 소수 관찰되었으며 세포질에 다수의 크고 작은 지방공포가 있었다. (그림 2)

### 4) MLHP 투여군 :

조면내형질망이 위축되면서 숫적 감소가 매우 심하였고 미토콘드리아가 종창(swelling) 내지는 소실되었다. 즉 심한 퇴행성 변화(degenerative changes)를 보였다.(그림 3)

## - Cholesterol과 MLHP로 유발한 지방간에 대한 Riboflavin의 치료 효과 -

### 5) cholesterol과 MLHP 병합 투여군 :

세포질내에는 큰지방 공포들이 다수 나타났다.

조면내형질망의 위축 및 감소가 심하였고 미토콘드리아의 종창 및 심한 솟적 감소, 즉 소실 및 공포가 관찰되었다. (그림 4)

### 6) Cholesterol과 riboflavin 투여군 :

당원파리이 다소 증가한 외에는 정상대조군과 유사한 소견이나 소수의 지방 공포가 가끔 관찰되었다.

(그림 5)

### 7) Cholesterol, MLHP 및 riboflavin 투여군 :

Cholsterol과 MLHP 투여군에 비하여 조면내형질망의 수, 위치등은 정상대조군과 같았으나 아직까지 소수의 작은 지방공포가 잔존하였다며 미토콘드리아의 일부는 공포를 가지고 있었다. (그림 6)

이상의 성격을 종합하면 cholesterol 투여군과 MLHP 투여군 및 병합 투여군에서는 대조군에 비하여 많은 수의 크고 작은 지방공포가 나타나고 미토콘드리아 솟적 감소 및 공포화 및 myelin figures 그리고 조면내형질망의 솟적 감소가 관찰되는 간의 퇴행성 변화 즉 지방간의 전자현미경적 소견을 보았다.

한편 riboflaivn을 병합 투여한 군 즉 cholesterol과 riboflavin 투여군에서는 작은 지방 공포의 수와 크기가 감소하였으며 미토콘드리아의 수나 모양 그리고 조면내형질망의 배열 및 수는 대조군과 유사한 소견이었다. Cholesterol, MLHP 및 riboflavin 투여군에서는 cholesterol과 riboflavin 투여군 보다는 다소 퇴행성 변화가 잔존하여 미토콘드리아내에 작은 공포와 소수의 세포질내 지방 공포가 관찰되나 cholesterol과 MLHP 투여군에 비하면 지방간의 소견이 많이 감소됨이 확실히 보였다.

## 고 찰

간손상 즉 간 세포의 퇴행성 변화가 생길 때는 비타민 B 복합군이 감소됨이 알려졌으며<sup>5)</sup> cholesterol과 MLHP 단독 및 병합 투여로 유발한 지방간은 육안적으로는 에탄올에 의한 지방간과 같이 회백색 내지 담황색의 모양을 보였으나 간세포의 미세구조 변화에 있어서는 간세포 질내 지방공포와 미토콘드리아의 솟적 감소, 종창 그리고 공포화가 주로 관찰되며 조면내형질망의 배열 및 솟적 감소가 주된 변화이었다. 알콜성 지방간에서 보는 것과 같은 세포 주위에 교원섬유증식에 의한 간질의 섬유화 반응은 볼 수 없었다.  
<sup>6),7)</sup> 그러나 알콜성 지방간 세포에서 관찰된 여러 크

기의 지방공포와 거대 미토콘드리아는 cholesterol, MLHP 투여로 유발된 지방간에서도 볼 수 있었다.<sup>8)</sup>

지방간의 경우 간조직내에 pantothenic acid와 folinic acid를 제외한 모든 비타민 B군의 함량이 감소 된다는 사실을 감안하면 cholesterol과 MLHP 단독 또는 병합 투여군의 동물에서 riboflavin의 감소 또는 결핍 상태가 초래된다고 추측된다. Sugioka 등<sup>9</sup>과 Hoppel 등<sup>10)</sup> riboflavin 결핍 환경 간세포의 특징적 소견은 미토콘드리아의 종창이라 하였으며 Tandler 등<sup>11)</sup>은 생쥐에서 riboflavin을 결핍시켜 간세포를 관찰하였던 바 미토콘드리아의 종창과 지방공포 등이 주소견이라고 하였다.

주지하는 바와 같이 미토콘드리아는 지방산 산화의 dehydrogenation step에 관여하는 4개의 acyl coA dehydrogenases가 있으며 riboflavin 감소 및 결핍으로 인하여 지방산이 산화되지 못하며 미토콘드리아 내에 축적되면 종창 및 공포화가 생기게 된다.<sup>10)</sup>

본 실험에서 cholesterol, MLHP 투여시 riboflavin을 함께 투여한 군에서는 지방공포의 수 및 크기가 감소되고 미토콘드리아의 종창이나 공포가 소실되는 점으로 볼 때 cholesterol 단독이나 MLHP 병합 투여로 생긴 지방간에 riboflavin 이 치료효과가 있으며 주작용부위는 미토콘드리아라고 생각된다.

이는 Stanko 등<sup>8)</sup>이 쥐에서 알콜로 유발한 지방간에 대하여 riboflavin로 치료하면 지방공포의 감소, 조면내형질망의 핵주위 충판 구조의 회복과 미토콘드리아의 종창이 감소되는 효과가 있다는 보고와 일치하는 형태학적 소견이다.

## 결 론

임상영양학적으로 중요한 지질대사 질환인 지방간과 이에 대한 riboflavin의 효과를 관찰하기 위하여 Sprague-Dawley 계의 숫 환경에 cholesterol, MLHP 를 4주동안 단독 또는 병합 투여한 군과 riboflavin 을 4주간 병합 투여한 군의 간세포를 전자현미경적으로 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Cholesterol과 MLHP 단독 투여군, cholesterol과 MLHP 병합 투여군에서 지방간이 유발되었다.

2) 이 지방간 세포에서는 미토콘드리아의 종창, 공포화 및 myelin figures 그리고 크고 작은 지방공포가 다수 보였고 조면내형질망의 소실 및 배열이상이 관찰되었다.

3) Cholesterol과 riboflavin 투여군, cholesterol,

MLHP, riboflavin 투여군에서는 지방공포의 크기와 수가 감소되었고, 미토콘드리아의 종창과 공포가 감소되었으며 조면내형질망의 위치 및 수가 정상 간세포에서와 같은 모양으로 회복되었다.

이상의 성적으로 riboflavin은 cholesterol과 MLHP로 유발한 지방간에 대하여 치료효과가 있으며 부작용 부위는 미토콘드리아로 생각된다.

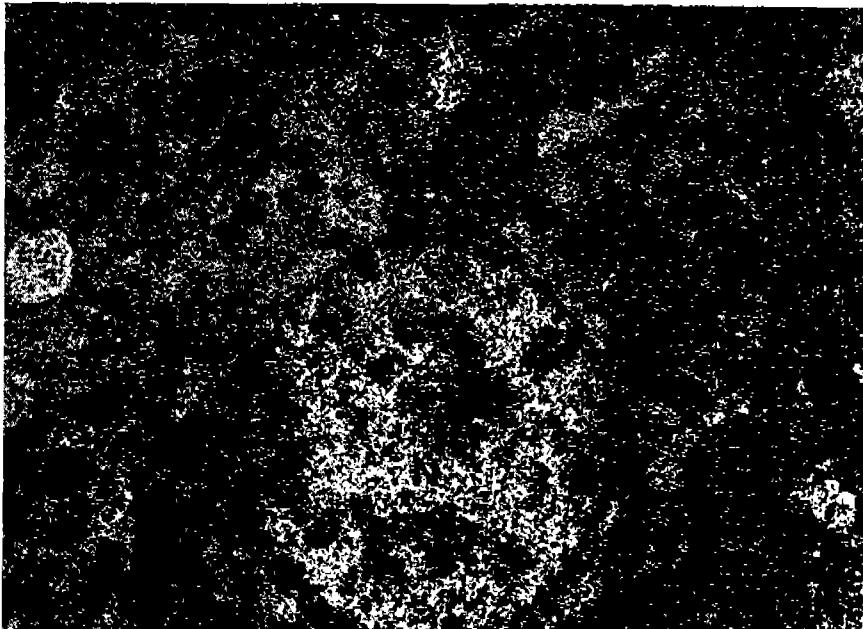
#### REFERENCES

- 1) Rogers, A.E. & Newberne, P.M. : *Alcoholic or nutritional fatty liver and cirrhosis. Animal model of human disease.* Am.J. pathol. 73: 817-820, 1973
- 2) 차상복 · 정환국 : 한국의 alcohol 성 간질환. 가톨릭대학 의학부 논문집 31: 85-96, 1978.
- 3) 백태홍 · 한해옥 · 이규식 · 정호삼 : 자동산화 methyl linoleate가 mouse 간장의 효소 활성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 12: 84-92, 1983.
- 4) Novikoff, P.M. : *Intracellular organelles and lipoprotein metabolism in normal and fatty liver.* In: *The Liver biology and pathobiology*, ed. Arias Popper, Schachter & Shafritz. pp 143-167, Raven Press, New York, 1982.
- 5) Baker, H., Frank, O., Ziffer, H., Goldfarb, S., Levy, C.M. & Sobotka, H. : *Effect of hepatic disease on liver B complex vitamin titers.* Am.J. Clin. Nutr. 14: 1-6, 1964.
- 6) Orrego, H., Blendies, L.M., Crossley, L.R., Macdonald, A., Ritchie, S. & Israel, Y. : *Correlation of intrahepatic pressure with collagen in the Disse space and hepatomegaly in humans and the rat.* Gastroenterology 80: 546-556, 1981.
- 7) 한남익 · 정규원 : 알코올 지방간에서 Disse강내 Fat-storing cell의 미세구조 변화. 가톨릭 의학부 논문집 38: 269-288, 1985.
- 8) Stanko, R.T., Mendelow, H., Shinozuka, H. & Adibi, S.A. : *Prevention of alcohol-induced fatty liver by natural metabolites and riboflavin.* J. Lab. Clin. Med. 91: 228-235, 1978.
- 9) Sugioka, G., Porta Eduardo A., Corey, Paul N & Hartroft, W. Stanley : *The liver of rats fed Riboflavin-deficient diets at two levels of protein.* Am.J. Pathol. 54: 1-15, 1969.
- 10) Hoppel, C., DiMarso, John P. & Tandler, B. : *Riboflavin and rat hepatic cell structure and function.* J. Biol. Chem. 254: 4164-4170, 1979.
- 11) Tander, B., Erlandson, Robert A. & Wynder, Ernest L. : *Riboflavin and mouse hepatic cell structure and function. I. Ultrastructural alterations in simple deficiency.* Am.J. Pathol. 52: 69-77, 1968.

— Cholesterol과 MLHP로 유발한 지방간에 대한 Riboflavin의 치료 효과 —

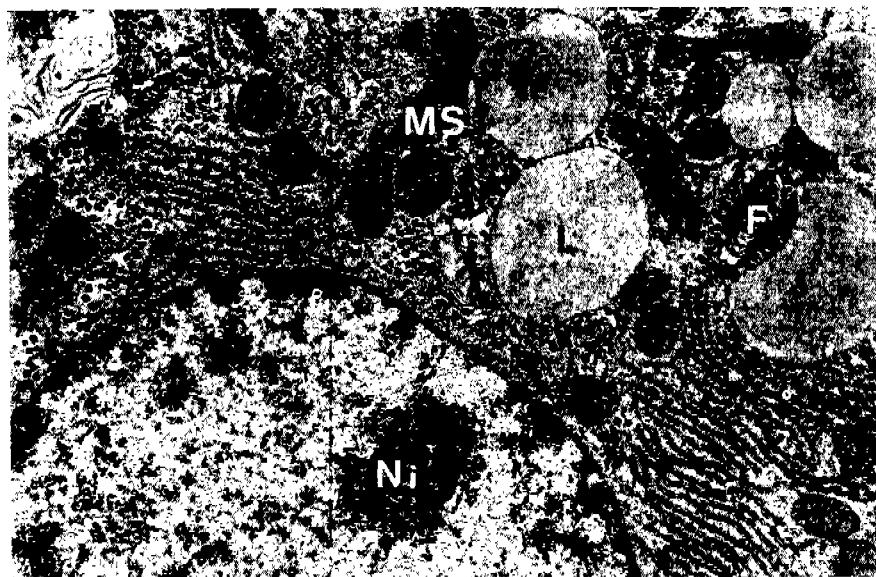
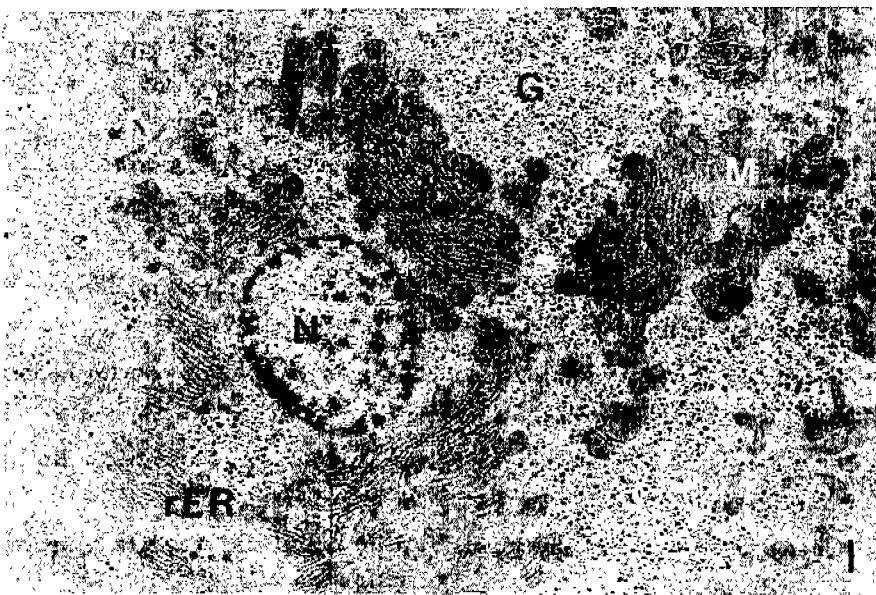
□ Explanation of Figures □

- Fig. CON. Hepatocyte from control group shows normal appearance. N(nucleus), rER(rough endoplasmic reticulum), M(mitochondria), CM(cell membrane).  $\times 8,300$ .
- Fig. 1. Hepatocyte from riboflavin group shows normal appearance except moderate increase of glycogen particles. N(nucleus), G(glycogen particles), rER(rough endoplasmic reticulum), M(mitochondria).  $\times 6,000$ .
- Fig. 2. Hepatocyte from cholesterol group shows lipid droplets(L), swelling of mitochondria(MS), and myelin figures(F), Ni(nucleoli).  $\times 12,000$ .
- Fig. 3. Hepatocyte from MLHP group shows distinct vacuolation of mitochondria(V), swelling of mitochondria(MS), disarray of rER and organelles loss.  $\times 6,000$ .
- Fig. 4. Hepatocyte from cholesterol plus MLHP group shows a number of lipid droplets, mitochondrial swelling and disarray of rER.  $\times 6,000$ .
- Fig. 5. Hepatocyte from cholesterol plus riboflavin group shows nearly normal appearance in comparison with Fig. CON. K(Kupffer cell).  $\times 6,000$ .
- Fig. 6. Hepatocyte from cholesterol plus riboflavin group restores mitochondrial shapes and rER arrangement, but a few lipid droplets and vesiculation in mitochondria are still present. b(bile canaliculi).  $\times 6,000$ .



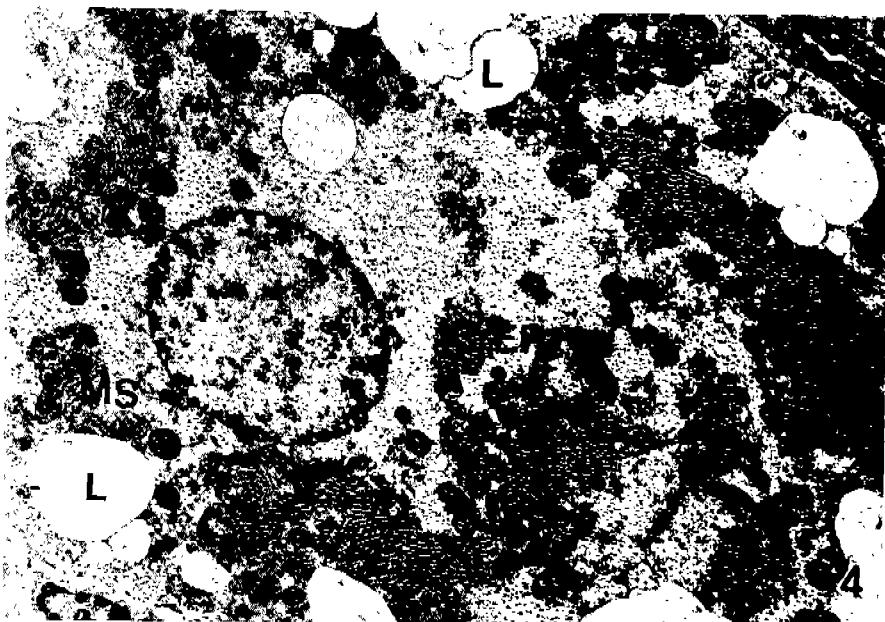
— 박란숙 · 채규태 —

□ 박란숙 · 채규태 논문사진부도 ① □



— Cholesterol과 MLHP로 유발한 지방간에 대한 Riboflavin의 치료 효과 —

□ 박란숙 · 채규태 논문사진부도 ② □



- 박란숙·채규태 -

□ 박란숙·채규태 논문사진부도 ③ □

