

## 식이중의 Methionine 첨가수준이 흰쥐의 체내 지질 과산화와 간조직 형태에 미치는 영향

양경미 · 조수열 · 서정숙

영남대학교 식품영양학과

## Effects of Dietary Methionine Level on Lipid Peroxidation and Hepatic Morphology in Rat

Kyung-Mi Yang, Soo-Yeul Cho, and Jung-Sook Seo

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan, 713-800, Korea

### Abstract

The effect of dietary methionine level on lipid peroxidation of rats was studied. Rats were fed vitamin E-selenium-deficient diet or diet supplemented with various levels (0.3, 0.6, 0.9%) of methionine. In rat fed MF diet, body weight gain and feed efficiency ratio were decreased compared with those of control rats, but reversed by supplementation with 0.3 and 0.6% methionine. Lipid peroxide levels in plasma and hepatic mitochondrial fraction of MF group rats were significantly higher than those of control rats. However, supplementation with 0.6% methionine modified this increment. GSH-Px activity was decreased to varying degrees in erythrocyte and hepatic mitochondrial fraction from rats fed MF diet. Methionine supplementation did not affect induction of this enzyme activity. Examination of hepatocytes by electronmicroscopy showed that influence of vitamin E, selenium, and methionine deficiency was mainly characterized by lipid droplets, swollen mitochondria and microvilli destruction. Supplementation with various levels of dietary methionine modified these changes to some extent. The results of this experiment indicated that MF diet causes significant change in lipid peroxide level, GSH-Px activity and morphology of rats which these changes may lessen by supplementation with 0.6% methionine.

### 서 론

생체조직중의 지질과산화는 생화학적 및 조직학적 변화와 관련되어 노화, 암, 동맥경화증을 비롯하여 호흡기 질환, 그리고 각종 퇴행성 질병의 원인으로 지적되면서 많은 관심을 불러 일으키고 있다.<sup>1,2)</sup> Chow<sup>4)</sup>는 지질과산화 반응이 생체내 반응성이 강한 free radical에 의해 일어난다고 보고했으며, 이 free radical은 여러가지 내적·외적요인에 의해 생체내에서 형성될 수 있다.<sup>3,5)</sup> 이렇게 형성된 free radical은 주로

생체막에 존재하고 있는 불포화지방산과 반응하고 지질과산화물을 생성하는 것으로 보고되고 있다.<sup>4,5)</sup> 일단 생성된 free radical과 지질과산화물들은 세포의 구성성분과 세포의 기질에 심한 손상을 초래하여 정상적인 세포기능을 상실시키는 인자로 작용한다고 알려져 있다.<sup>6,7)</sup> 그러나 생체는 free radical제거 및 과산화물의 분해 그리고 손상받은 세포성분을 처리하는 효소적, 비효소적 방어체계를 함유하고 있다.<sup>4)</sup> 효소적 체계중에서 superoxide dismutase(SOD)는 superoxide radical을 환원시켜 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 바꾸며,

생성된  $H_2O_2$ 와 유기과산화물은 catalase와 glutathione peroxidase (GSH-Px)의 작용에 의해  $H_2O$ 로 환원되므로 free radical로부터 생체를 보호할 수 있다.<sup>48)</sup> 또한 생체는 이러한 효소계 반응이에도 vitamin E, Se, glutathione, 그리고 합황아미노산인 methionine 과 cysteine등의 작용이 보고되고 있다.<sup>9)</sup> Vitamin E는 불포화지방산과 더불어 주로 생체막에 분포되어<sup>10)</sup> free radical의 제거 및 막 안정화에 기여하며,<sup>11,12)</sup> Se는 지질과산화물을 분해시키는 GSH-Px의 구성성분으로 작용하여 지질과산화반응에 대해 보호작용을 나타낸다고 한다.<sup>13)</sup> 또한 Mitchell<sup>14)</sup> 등은 methionine 이 cysteine이나 glutathione의 구성성분으로 작용하여, 지질과산화물의 형성을 저하시켜 생체내 과산화에 대해 보호작용을 나타낸다고 보고했으며 Reed<sup>15)</sup>는 methionine에 의해 형성된 glutathione 이 생체내 산화·환원 반응과 지질과산화 방어효소 중 GSH-Px에 기질을 제공해 줌으로써 지질과산화와 관련된다고 보고했다. 그리고 Tappel 등<sup>12)</sup>은 methionine 대사산물의 -SH기가 free radical 제거 및 지질과산화물을 분해하여 지질과산화반응에 대하여 보호작용을 나타낸다고 했다. 그러나 그 작용기전과 효과에 대해서는 일치된 견해를 보이지 않고 있다.

생체내 지질과산화에 의한 손상은 free radical 생성과 방어체계가 균형을 이루어 존재하여 한 쉽게 일어나지 않는 것으로 보고되고 있으나 이 균형이 깨어질 경우 세포손상이 초래된다.<sup>5,16)</sup>

따라서 본 실험에서는 항상화제로 알려진 vitamin E와 Se이 부족된 상태에서 과산화반응의 원인물질인 고도불포화지방산을 공급시켰을 때 여러수준의 methionine 이 생체내 지질과산화반응에 미치는 영향을 살펴보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 식이

본 실험에 사용한 실험동물은 이유한지 3일 된 평균체중이  $87.3 \pm 12.1$  g 인 Sprague-Dawley 중 수컷 40마리를 1주일 동안 기본식으로 적응시킨 후 체중에 따라 8마리씩 5군으로 나누었다. 각 실험군 식이의 구성성분은 Table 1에 나타나 있다. 단백질

급원으로는 methionine이 제한된(전체 아미노산의 1.48%) 대두 단백질을 이용하였고, 지방급원으로는 버터와 불포화도가 높은 들깨기름을 이용하였다. 또한 vitamin E와 Se은 대조군을 제외한 나머지 4 methionine은 각 실험식이에 수준별(0, 0.3, 0.6, 0.9%)로 공급시켰다.

### 시료의 채취

실험식으로 12주간 사육한 흰쥐를 12시간 동안 절식시킨 후, ether로 가볍게 마취시켜 복부를 개복하고 즉시 복부대 동맥에서 채혈하여 heparin 절한 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장과 적혈구를 분리하였다.<sup>17)</sup>

한편, 간조직은 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.4)로 perfusion시켜 간을 적출한 후 buffer로 여러 번 세척하였고, 여과지로 수분을 제거한 다음 생조직 무게를 평량하였다. 간 mitochondria의 분획은 Iritani<sup>18)</sup> 등의 방법으로 분리 하였으며, 얻어진 모든 시료들은 분석시까지  $-70^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다.

### 성장률 및 사료효율

매주 한번씩 일정한 시각에 체중과 식이섭취량을 측정하였고, 그 결과를 이용하여 식이효율을 계산하였다.

### 과산화지질의 정량

혈장과 간mitochondria분획의 지질과산화물 함량은 Ohkawa 등<sup>19)</sup>의 TBA 법에 의하여 측정 하였고, 표준용액으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하여 표준 검량선을 구하였다.

### Glutathione peroxidase 활성도 측정

적혈구와 간mitochondria 분획의 GSH-Px 활성도는 Paglia와 Valentine<sup>20)</sup> 그리고 Lawrence와 Burk<sup>21)</sup>의 방법을 이용하여, 340nm에서 NADPH흡광도의 감소로써 측정하였다. 이때 GSH-Px 활성도 단위는 1분동안 산화되는 NADPH nmole 수로 정의하였다.

### 단백질 정량

적혈구 및 간mitochondria 분획의 단백질함량은

Sigma 제 표준단백질용액을 사용하여 Lowry 등<sup>22)</sup>의 방법으로 측정하였다.

#### 전자현미경조사

간조직을 2.5% glutaraldehyde 용액과 Cacodylate buffer로 조성된 Osmium tetroxide(O<sub>8</sub>O<sub>4</sub>)에 이중 고정한 후 ethanol로 탈수하고 최종적으로 proylene oxide를 사용하여 침투시키고 Epon 812로 포매하였다.<sup>23)</sup> 경화된 조직은 Ultramicrotome으로 박절하여 Uranyl acetate와 Lead Citrate로 이중염색한 후 Hitachi H-600투과 현미경으로 12,000배의 배율에서 관찰하였다.

#### 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균±표준편차로 표시하였고, 각 군간의 평균치의 통계적 유의성은 Duncan's new multiple range test<sup>24)</sup>을 이용하여 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 체중, 사료효율 및 간무게변화

체중, 사료효율 및 간무게변화는 Table 2와 같다. 체중증가량과 사료효율에 있어서 대조군이 비교했을 때, 3M군과 6M군은 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 MF군과 9M군은 유의적인 감소를 나타냈다. 이는 vitamin E와 Se를 결핍시켰을 때 체중 및 사료효율 저하를 나타낸다는 Combs<sup>8)</sup>의 보고와 필수아미노산인 methionine을 적정량 공급하면 체중과 사료효율이 증가되나 과잉은 오히려 역작용을 유발한다는 Stockland<sup>25)</sup>의 보고와 유사한 경향을 나타내었다.

체중에 대한 상대적인 간무게에 있어서는 대조군과 비교했을 때, MF군이 유의적으로 높게 나타났다. 간조직학적 연구결과로 미루어 볼 때, lipotropic factor로 작용할 수 있는 세 영양소의 결핍에 의한 간의 손상과 triacylglycerol의 축적에 기인된 것으로 사료된다. 그러나 methionine을 공급시킨 군들은 대조군

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient(%)	Dietary treatment				
	C	MF	3M	6M	9M
Isolated soyprotein	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Carbohydrate <sup>1)</sup>	62.2	62.5	62.2	1.9	61.6
Butter	4.0	4.0	0.0	0.0	0.0
Perilla oil	4.0	8.0	8.0	8.0	8.0
$\alpha$ -Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixtur <sup>2)</sup>	3.5	3.5 (-Se)	3.5 (-Se)	3.5 (-Se)	3.5 (-Se)
Vitamin mixture <sup>3)</sup>	1.0	1.0 (-Vit E)	1.0 (-Vit E)	1.0 (-Vit E)	1.0 (-Vit E)
DL-methionine	0.3	0.0	0.3	0.3	0.9

1) Corn Starch : Glucose : Sucrose=70 : 20 : 10

2) The mineral mixture based on the pattern of Rogers and Harper (195) contained the following (g / 100 g mineral mixture) : CaCO<sub>3</sub> 29.29, CaHPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.43, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 34.31, NaCl 25.06, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 9.98, Fe(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.623, CuSO<sub>4</sub> 0.156, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.1, ZnCl<sub>2</sub> 0.02, KI 0.0005, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.0025, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.0015

3) 100 g of vitamin mixture contained the following : Vitamin A acetate 50,000 IU, Vitamin D 10,000 IU, Vitamin E acetate 500mg, Vitamin K 500mg, Thiamin HCl 120mg, Pyridoxine HCl 800mg, Cyanocobalamin 0.05mg, Ascorbic acid 3,000mg, Folic acid 20mg, Calcium pantothenate 500mg, PABA 500mg, Niacin 600mg, Inositol 600mg, Choline chloride 20,000mg, Riboflavin 400mg.

**Table 2. Effect of dietary methionine on growth performance of rats during the experimental period**

Group	F.B.W	Weight gain (g / day)	FER	Liver weight (g / 100 g body wt.)
C	375.4±42.1 <sup>a</sup>	3.790±0.439 <sup>a</sup>	0.230±0.013 <sup>a</sup>	2.798±0.279 <sup>a</sup>
MF	328.8±33.4 <sup>b</sup>	3.179±0.372 <sup>b</sup>	0.198±0.020 <sup>b</sup>	3.168±0.380 <sup>b</sup>
3M	356.1±57.9 <sup>ab</sup>	3.537±0.606 <sup>ab</sup>	0.213±0.023 <sup>ab</sup>	2.746±0.199 <sup>a</sup>
6M	352.8±14.0 <sup>ab</sup>	3.497±0.256 <sup>ab</sup>	0.218±0.010 <sup>ac</sup>	2.812±0.203 <sup>a</sup>
9M	331.5±34.8 <sup>b</sup>	3.216±0.337 <sup>b</sup>	0.204±0.012 <sup>bc</sup>	2.949±0.268 <sup>ab</sup>

- 1) Values shown are mean ± S.D.
- 2) Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different (p<0.05)
- 3) F. B. W. : Final Body Weight
- 4) FER : Feed Efficiency Ratio

과 비교해서 볼 때, 유의적인 차이를 나타내지 않고 있어 Schwarz<sup>26)</sup>의 보고처럼 methionine의 환원력에 의한 간의 손상 보호로 생각된다.

따라서 본 실험에서는 vitamin E와 Se 그리고 methionine 부족에 의한 체중과 사료효율의 저하 및 간의 중량 비대현상은 0.3%~0.6% methionine 공급에 의해서 억제될 수 있으리라고 생각된다.

**지질과산화물 함량 변화**

혈장과 간 mitochondria 분획에서의 지질과산화물 함량은 Table 3와 같다. 혈장에서는 대조군과 비교해서 볼 때 3M군과 6M군은 유의적인 차이가 없었은, MF군과 9M군은 유의적으로 높게 나타난다. 간 mitochondria분획에서는, 대조군에 비해서 MF군이 유의적으로 높은 반면 6M군은 높은 수치를 나타내고 있으나 유의적인 차이는 나타내지 않고 있다. 따라서 혈장과 간mitochondria분획에서 지질과산화물 함량은 MF군에서 유의적으로 높게 나타났다. 이는 methionine을 공급시킨 군과 비교해서 볼 때, Green 등<sup>27)</sup>의 보고처럼 vitamin E와 Se부족에 methionine 부족이 가중됨으로써 일어난 현상으로 여겨진다. 이렇게 형성된 지질과산화물은 세포막의 파괴와 DNA의 돌연변이를 일으키고 퇴행성 질환을 유발시키는 등 유독성이 있는 것으로 알려졌다.<sup>2)</sup> 그러나 Schwarz<sup>26)</sup>는 환원력을 나타내는 methionine의 공급에 의해서 지질과산화물의 함량을 저하시킬 수 있다고 보고했으며 본 실험에서는 0.6%수준의 methionine 공급에 의해서 과산화물 함량이 저하되었다. 또한 3M군과

9M군이 6M군에 비하여 지질과산화물 함량이 저하되지 않은 것이 첨가된 수준이 6M군보다 적절하지 못하다는 사실을 시사해 주고 있다.

**Glutathione peroxidase 활성도 변화**

적혈구와 간mitochondria 분획에서 GSH-Px활성도는 Table 4과 같다. 이 효소는 체내 혈액과 간에 주로 존재하며 간에 있어서는 거의 cytosol과 mitochondria 에 분포되어서 catalase와 더불어 hydrogen peroxide와 생성된 lipid peroxide의 분해를 촉진하여 산화적 손상으로 부터 세포구성성분을 보호해준다.<sup>28,29,30)</sup>

**Table 3. Effect of dietary methionine level on lipid peroxidation of rats**

Group	L P O	
	Plasma (MDA nmol / ml)	Liver mitochondrial fraction (MDA nmol / mg protein)
C	2.438±0.552 <sup>a</sup>	0.698±0.058 <sup>a</sup>
MF	4.453±0.977 <sup>b</sup>	2.516±0.473 <sup>b</sup>
3M	2.548±0.737 <sup>a</sup>	0.993±0.214 <sup>c</sup>
6M	2.655±0.372 <sup>a</sup>	0.837±0.100 <sup>ac</sup>
9M	3.895±1.318 <sup>b</sup>	0.935±0.145 <sup>c</sup>

- 1) Values shown are mean ± S.D.
- 2) Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different. (p<0.05)
- 3) LPO : TBA-reacting substances.

적혈구와 간 mitochondria 분획에서의 GSH-Px는 대조군과 비교해서 볼 때 MF군은 유의적으로 낮았으나 3M군과 MF군 보다는 높게 나타났다. Vitamin E와 Se를 동시에 결핍시켰을 때 Reddy와 Tappel<sup>31)</sup>과 Menken<sup>32)</sup> 등은 생체내 지질과산화 반응이 촉진됨에 따라 새에체는 이에 대해 방어와 적응 수단으로서 방어효소의 활성력을 높인다고 보고하였고, Yoshida 등<sup>33)</sup>과 Hill과 Burk<sup>34)</sup>는 glutathione의 합성능력을 높여 방어력을 높인다고 보고했다. 또한 Chow<sup>29)</sup>는 vitamin E와 Se를 결핍시켰을 때 GSH-Px활성도가 낮아졌으며 이때 Se의 공급에 의해서 그 활성도가 증가되었다고 보고했다.

따라서 본 실험에서도 GSH-Px가 Se-dependent 효소<sup>35)</sup>로서 Se를 공급시킨 대조군이 다른 실험군들에 비해 이 효소의 활성도가 현저히 높아진 것으로 생각된다. 그러나 대조군을 제외한 실험군들중에서는 MF군이 3M, 6M, 9M군에 비해 methionine부족으로 증가된 지질과산화반응에 대한 보호와 적응수단으로 방어효소의 활성도가 높아진 것으로 사료된다.

### 조직학적 연구

12주동안 실험식이틀 사육한 흰쥐의 간세포 조직학적변화는 전자현미경을 통해 관찰하였으며, 그 결과는 Fig 1과 같다. 대조군의 간세포는 정상적인 모

습 즉 세포소기관들이 잘 보존되어 평행선 모습으로 잘 형성된 rough endoplasmic reticulum (RER)이 관찰되었고, 특히 mitochondria의 cristae와 disse강내 microvilli들이 완전한 모습을 나타내었다(Fig. A). 그러나 MF군 간세포는 mitochondria의 융합과 swelling, 그리고 지방소적이 많이 관찰되었으며(Fig. Ba) 또한 일부 간세포에서는 disse강내 microvilli의 파괴로 세포기관의 내용물들이 유출되어 동양혈관에서 mitochondria와 지방소적들이 관찰되기도 하였다(Fig. Bb). 이러한 거로가는 Tappel<sup>36)</sup>와 Di Luzio<sup>37)</sup>의, vitamin E와 Se의 결핍에 의해 증가된 free radical과 지질과산화물이 세포내 구성성분 및 막성분들과 작용함에 따라 세포내 구조물을 손상시킨다는 보고와 유사한 결과를 나타내고 있다. 그러나 methionine을 공급시킨 군에 있어서는, 3M군과 9M군에서 지방소적과 mitochondria의 부분적인 swelling이 관찰되기는 하였으나(Fig. C,E) MF군에 비해서 microvilli들이 다소 호전된 양상을 나타내었다. 또한 6M군은 대조군과 유사한 간세포 모습을 나타내고 있었으나 완전한 정상 모습은 아니었다(Fig. D).

따라서, methionine만을 투여한 실험군은 MF군에 비해서 다소 호전된 양상을 나타내기는 하나, 정상 간세포 형태는 나타내지 않고 있다.

### 요 약

본 실험에서는 항산화제로 보고된 vitamin E와 Se이 부족된 상태에서 과산화반응의 원인물질이 되는 고도불포화지방산을 섭취시켰을 때 여러수준의 methionine 이 생체내 지질과산화 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 85 g 내외의 Sprague-Dawley 종 숫쥐 40마리를 5군으로 나누어 12주간 사육한 후 지질과산화물 함량, glutathione peroxidase활성도 및 전자현미경학적 조사를 하였으며, 그 결과 체중증가, 사료효율은 대조군과 비교했을 때 MF군이 유의적으로 낮았고, 간의 중량 비대현상이 나타났다. 그란 0.3%–0.6%수준의 methionine공급에 의해서 호전될 수 있었다. 혈장과 간mitochondria 분획에서의 지질과산화물 함량은 대조군과 비교했을 때 MF군이 유의적으로 높았는데, 0.6% methionine 공급

**Table 4. Effect of dietary methionine level on erythrocyte and liver mitochondrial glutathione peroxidase activity of rats**

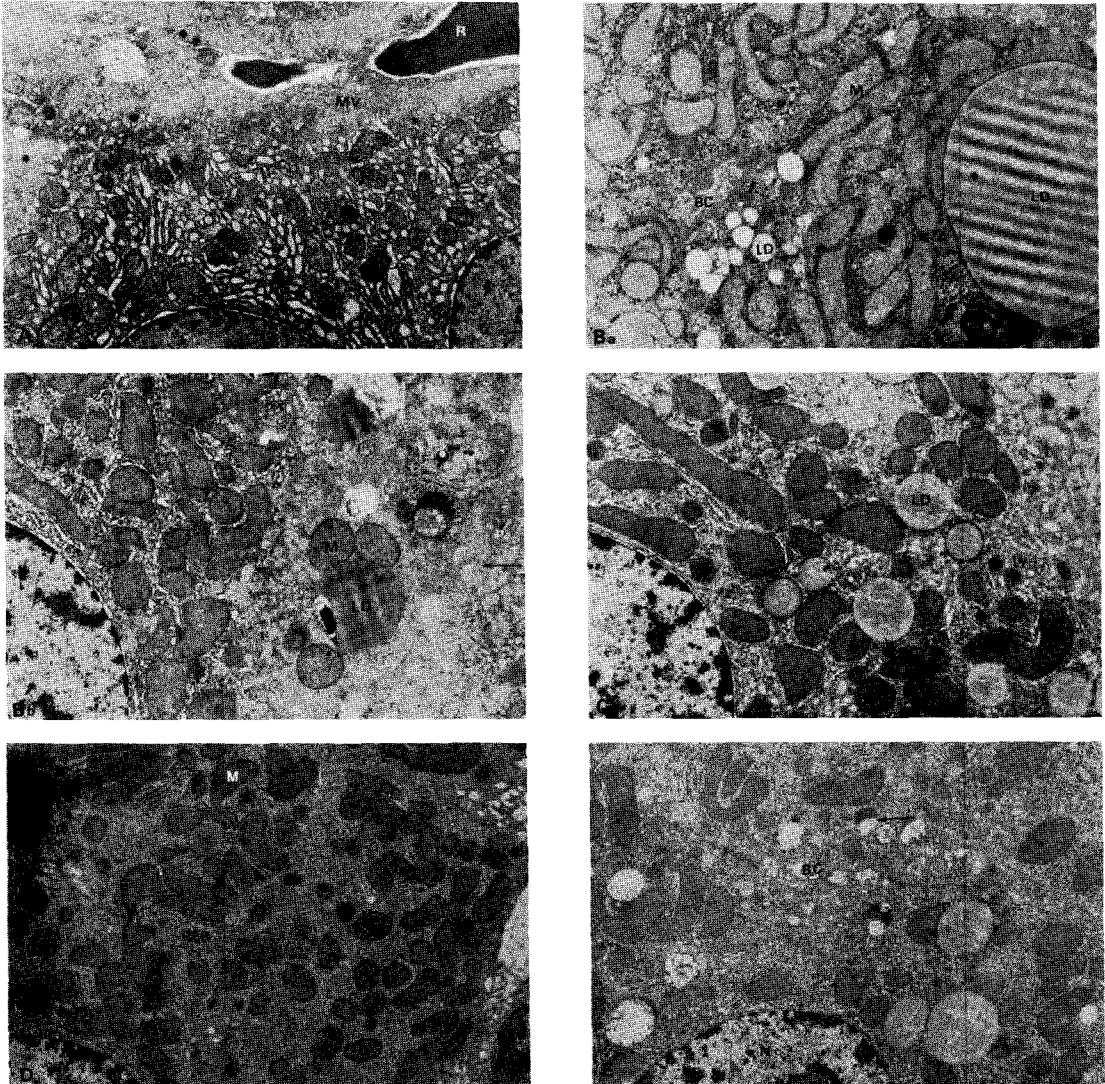
Group	GSH-Px (unit / mg protein)	
	Erythrocyte	Liver mitochondrial fraction
C	119.16±18.22 <sup>a</sup>	127.32±12.23 <sup>a</sup>
MF	72.28± 8.92 <sup>b</sup>	91.96±14.75 <sup>b</sup>
3M	52.7 ± 6.19 <sup>c</sup>	57.61± 5.54 <sup>c</sup>
6M	66.95± 8.14 <sup>b</sup>	37.27± 5.22 <sup>b</sup>
9M	85.38± 2.93 <sup>d</sup>	51.55± 3.34 <sup>c</sup>

1) Values shown are mean ± S.D.

2) Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different. (p<0.05)

에 의해서 저하시킬 수 있었다. 적혈구와 간mitochondria 분획에서의 GSH-Px 활성도는 MF군이 대조군에 비해서 유의적으로 낮았으나 3M군과 6M군에 비해서 높은 경향을 나타내었다. 간세포의 전자현미경조사에서는 MF군이 정상군에 비해서 지방소적, mitochondria의 swelling 및 융합, 그리고 dissegang내 microvilli의 파괴가 관찰되었으나 methionine의 공급에 의해 다소 호전되었다. 그러나 정상적인

간세포 형태를 나타내지는 못하였다. 본 연구결과는 vitamin E와 Se의 부족 및 고도 불포화지방산을 섭취시켰을때 지질과산화물형성이 증가되며, 조직학적 변화를 유발하였다. 그러나 methionine에 의해서 이들 다소 억제시킬 수가 있었으며, 본 실험에서는 0.6%수준에서 비교적 양호하게 나타났다. 또한 methionine 단독으로서의 항산화력 증진 보다는 항산화제로서 관련된 영양소와의 상호작용에 의해 그 효



**Fig. 1. Electron micrograph of hepatocytes of rats fed (A) Control diet, (B) vitamin E-, Se-, and methionine deficient diet, (C) vitamin E- and Se-deficient diet with 0.3% methionine, (D) vitamin E- and Se- deficient diet with 0.6% methionine (E) vitamin E- and Se- deficient diet with 0.9% methionine.**

N : nucleus, M : mitochondria, R : RBC, LD : lipid droplets, BC : bile canaliculi, MV : microvilli, LY : lysosome. (X 12,000)

과가 더욱 더 증대 될 수 있다고 볼 수 있으며, 따라서 보다 균형적인 영양소 섭취에 의해서 지질과 산화의 유해한 반응으로부터 보호작용을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

## 문 헌

- Black, H.S., Lenger, W.A., Gerguis, J. and Thornby, J.J. : Relation of antioxidants and level of dietary lipid to epidermal lipid peroxidation and ultraviolet carcinogenesis. *Cancer Research*, **45**, 6254(1985).
- Summerfield, F.W. and Tappel, A.L. : Effects of dietary polyunsaturated fats and vitamin E on aging and peroxidative damage to DNA. *Ar. Biochem. Biophys.*, **233**, 408(1984).
- Dormandy, T.L. : Free-radical oxidation and antioxidants. *Lancet*, **1**, 647(1978).
- Chow, C.K. : Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 1066(1979).
- Leibovitz, B.E. and Siegel, B.V. : Aspects of free radical reactions in biological systems : Aging. *J. Gerontol.*, **35**, 45(1980).
- Curtis, M.T., Gilfor, D. and Farber, J.L. : Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes. *Ar. Biochem. Biophys.*, **235**, 644(1984).
- Grinna, L.S. : Effect of dietary  $\alpha$ -tocopherol on liver microsomes and mitochondria of aging rats. *J. Nutr.*, **106**, 918(1976).
- Combs, G.F. : Metabolism and nutrition. Influences of dietary vitamin E and selenium on the oxidant defense system of the chick. *Poultry Science*, **60**, 2098(1981).
- Tappel, A.L. : biological antioxidant protection against lipid peroxidation damage. *Am. J. Clin. Nutr.*, **23**, 1137(1970).
- Ogihara, T., Nishida, Y., Miki, M. and Mino, M. : Comparative changes in plasma and RBC  $\alpha$ -tocopherol after administration of dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate and d- $\alpha$ -tocopherol. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **31**, 169(1985).
- Diplock, A.T., Caygill, C.P.J. and Giasuddin, A.S.M. : Vitamin E-selenium interactions. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, **46**, 254(1976).
- Tappel, A.L., Fletcher, b. and Deamer, D. : Effect of antioxidants and nutrients on lipid peroxidation fluorescent products and aging parameters in the mouse. *J. Gerontol.*, **28**, 415(1973).
- McCay, P.B., Gibson, D.D., Fong, K.L. and Hornbrook K.R. : Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. *Biochem. Biophys. Acta.*, **431**, 459(1976).
- Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R. and Brodie, B.B. : Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **187**, 211(1973).
- Reed, D.J. : Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem. Pharmacol.*, **1**, 7(1986).
- Freeman, B.A. and Crapo, J.D. : Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, **47**, 412(1982).
- Testolin, G., Ciappellano, S., Lanzola, E. and Allegraini, M. : Effects of various dietary selenium intakes on the levels of blood glutathione-peroxidase and selenium in long-term fed rats. *Ann. Nutr. Metab.*, **31**, 304(1987).
- Iritani, N.E., Fukuda, E. and Kitamura, Y. : Effect of corn oil feeding on lipid peroxidation in rats. *J. Nutr.*, **110**, 924(1980).
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351(1979).
- Paglia, De.E. and Valentine, W.N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab & Clin. Med.*, **70**, 158(1967).
- Lawrence, R.A. and Burk, R.F. : Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952(1976).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
- Luft, J.H. : Improvement in epoxy resin embedding method. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 409(1961).
- Ott, L. : An introduction to statistical methods and data analysis. PWA publishers, Boston., 376(1984).
- Stockland, W.L., Meade, R.J., Wass, D.F. and Sowers J.E. : Influence of levels of methionine and cystine on the total sulfur amino acid requirement of the growing rat. *J. Animal Science*, **36**, 526(1973).

26. Schwarz, K. : Role of vitamine E, selenium, and related factors in experimental nutritional liver disease. *Federation Proceedings*, **24**, 58 (1965).
27. Green, J., Diplock, A.T., Bunyan, J., Muthy, I.R. and Mchale, D. : Vitamine E and stress. *Br. J. Nutr.*, **21**, 497(1967).
28. Timcenko-Youssef, L., Yamazaki, R.K. and Kimura, T. : Subcellular localization of adrenal cortical glutathione peroxidase and protective role of the mitochondrial enzyme against lipid peroxidative damage. *J. Biol. Chem.*, **260**, 13355 (1985).
29. Chow, C.K. : Effect of dietary selenium and vitamin E on the antioxidant defense systems of rat erythrocytes. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, **49**, 182(1979).
30. Chow, C.K. and Chen, C.J. : Dietary selenium and age-related susceptibility of rat erythrocytes to oxidative damage. *J. Nutr.*, **110**, 2460 (1980).
31. Reddy, K. and Tappel, A.L. : Effect of dietary selenium and autoxidized lipids on the glutathione peroxidase system of gastrointestinal tract and other tissues in the rat. *J. Nutr.*, **104**, 1069(1974).
32. Menken, B.Z., Su, L.C., Ayaz, K.L. and Casllany, A.S. : Organic solvent-soluble lipofuscin pigments and glutathione peroxidase in mouse brain and heart : Effects of age and vitamin E. *J. Nutr.*, **116**, 350(1986).
33. Yoshida, M., Fukunaga, T., Iwami, K. and Yasumoto, K. : Variation of glutathione level and synthesis activity in chick liver due to selenium and vitamine E deficiencies. *J. Biochem.*, **96**, 1391(1984).
34. Hill, K.E. and Burk, R.F. : Effect of selenium deficiency and vitamin E deficiency on glutathione metabolism in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **257**, 10668(1982).
35. Brandy, P.S., Brandy, L.J., Whetter, P.A., Ullrey, D.E. and Fay, L.D. : The effect of dietary selenium and vitamin E on biochemical parameters and survival of young amone white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Nutr.*, **108**, 1439(1978).
36. Tappel, A.L. : Lipid peroxidation damage to cell components. *Federation Proceedings*, **32**, 1870(1973).
37. Di Luzio, N.R. : Antioxidants, lipid peroxidation and chemical-induced liver injury. *Federation Proceedings.*, **32**, 1875(1973).

(Received November 16, 1988)