

식이성 비타민 E가 카페인 투여 흰쥐의 체내 지질과산화에 미치는 영향

조수열 · 박미리 · 박종민*

영남대학교 식품영양학과

*영남대학교 약학과

Effects of Dietary Vitamin E on the Lipid Peroxidation in Rats Fed Caffeine

Soo-Yeul Cho, Mi-Lee Park and Jong-Min Park*

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyungsan, 713-749, Korea.

*Dept. of Pharmacy, Yeungnam University, Kyungsan, 713-749, Korea.

Abstract

This experiment was undertaken to investigate the effect of dietary vitamin E on the lipid peroxidation in the caffeine-fed rats. Male Sprague-Dawley rats were fed for 6 weeks diets containing one of three levels of dietary vitamin E (30, 500 or 1,000mg/kg diet) with 1,000mg caffeine per liter in drinking water, but control group was only given without caffeine. Net weight gain, food intake, caffeine intake and hematocrit were not significantly different. In rats fed caffeine, liver lipid peroxidation level was slightly increased, but significantly lower in rats fed 1,000mg vitamin E/kg diet than in those fed 500mg vitamin E/kg diet. Glutathione peroxidase activity in rats fed caffeine was higher than in the control. And the higher dietary vitamin E level, the lower glutathione peroxidase activity. Catalase activity was significantly increased in the caffeine-fed rats. However xanthine oxidase activity was not affected in all experimental groups.

서 론

카페인은 1,3,7-trimethylxanthine으로 코오피는 물론 차, 콜라, 초코렛 뿐 아니라, 진통제, 감기약 등의 의약품에도 함유되어 있는 alkaloid계 화합물이다¹⁾. 이는 다양한 약리·독성학적 특성을 지니는 바, 수면, 감각작용 등의 변화를 유발하고^{2,3)}, 위액분비의 증가⁴⁾, 이뇨작용⁵⁾뿐 아니라 심근경색의 발병율을 높이며⁶⁾, 특히 lipolysis를 자극함으로써 혈청 콜레스테롤 및 유리 지방산을 증가시킨다^{7,8)}. 또 caffeine을 포함한 xenobiotic은 hepatic microsomal mixed function oxi-

dase의 활성을 증가시키는 데^{9,10)}, 이 때 생성된 free radical은 지질과산화를 유발하며, 이는 xenobiotic에 의한 독성기전과 밀접한 관계가 있다¹¹⁾.

한편 비타민 E는 항산화제로서^{12,13)}, 지질과산화물의 형성 및 축적을 억제할 뿐 아니라^{14,15)}, 약물대사효소의 활성에 영향을 미치는 바, 비타민 E 결핍식으로 사육한 실험동물의 microsome내 약물대사 기능이 저하하였다¹⁶⁾. 이상과 같이 지질대사 및 지질과산화에 대한 카페인 및 비타민 E의 영향이 각각 보고된 바 있지만 이 두 물질의 상호관련성에 대한 연구는 거의 없다. 본 연구는

카페인 투여 흰쥐의 체내 지질과산화에 미치는 식이성 비타민 E의 효과에 대해 검토코저 한다.

재료 및 방법

실험동물은 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 10 일간 표준식으로 적응시킨 후, 체중이 117 ± 109 인 것을 5마리씩 각각 4군으로 나누어 6주간 일정 조건하에서 사육하였다. 실험식이(Table 1)는 기본 비타민 E 결핍식이에, 대조군은 식이 kg당 30mg의 비타민 E를 첨가하고 증류수를 급여한 반면 실험군은 비타민 E 첨가수준을 달리하고 0당 1,000mg의 카페인 수용액을 식수로 공급하였다.

6주간 사육한 흰쥐를 에테르 마취하에서 개복한 후 복부의 대동맥으로부터 채혈하고 곧바로 간장을 적출하였다. Hematocrit치는 micro-hematocrit법¹⁸⁾으로 측정하였으며, 간조직 중 과산화지질의 함량은 Ohkawa등¹⁹⁾의 방법에 준해 측정하

였다. 적출한 간조직 1g당 4배량의 0.25M sucrose용액을 가해 병냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄했다. 이 균질액(20W/V%)을 $600 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상정액을 얻고 다시 $10,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 mitochondria분획을 분리한 상정액을 얻어 $105,000 \times g$ 에서 1시간 초원심분리하여 가용성분획을 얻었다. 가용성분획은 glutathione peroxidase, xanthine oxidase활성측정에, mitochondria분획은 catalase활성측정의 효소원으로 사용하였다. Glutathione peroxidase활성은 Paglia와 Valentine²⁰⁾의 방법, catalase활성은 Aebi²¹⁾의 방법, xanthine oxidase활성은 Stirpe와 Della Corte²²⁾의 방법에 준해 측정하였다. 통계처리는 완전 임의배치법에 의한 분산분석을 하였고, 유의성 검정은 Duncan's multiple range test²³⁾를 행하였다.

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient(%)	Dietary treatment			
	B	CB	CV1	CV2
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0
Sucrose	15.0	15.0	15.0	15.0
Corn starch	47.0	47.0	47.0	47.0
Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Soybean oil	5.0	5.0	5.0	5.0
Lard	5.0	5.0	5.0	5.0
Cellulose	3.0	3.0	3.0	3.0
Vit. mix. ¹⁾ (-vit. E)	1.0	1.0	1.0	1.0
Mineral mix. ²⁾	3.5	3.5	3.5	3.5
Choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

B : + vitamin E(30mg/kg diet)

CB : + vitamin E(30mg/kg diet) + caffeine(1,000mg/1)

CV1 : + vitamin E(500mg/kg diet) + caffeine(1,000mg/1)

CV2 : + vitamin E(1,000mg/kg diet) + caffeine(1,000mg/1)

¹⁾Vitamin mixture(g/kg mix.)

thiamin-HCl 0.6, riboflavin 0.6, pyridoxin-HCl 0.7, nicotinic acid 3.0, Ca-pantothenate 1.6, folic acid 0.2, biotin 0.02, cyanocobalamin 0.001, retinyl acetate 0.8, 7-dehydrocholesterol 0.0025, menadione 0.005.

²⁾Mineral mixture(g/kg mix.) according to AIN-76 mineral mix.¹⁷⁾

Table 2. Net weight gain, food intake and caffeine intake

Group	Weight gain (g)	Food intake (g/day)	Caffeine intake (mg/day)
B	135.00±23.67*	13.24±1.77	—
CB	122.80±11.57	14.50±1.37	19.85±4.22
CV1	127.43±11.42	14.32±2.60	19.57±2.51
CV2	141.90±21.45	15.49±1.56	18.17±2.44

*Mean±S.D.

결과 및 고찰

체중증가량, 사료 및 카페인섭취량

Table 2에서와 같이 체중증가량은 카페인 급여군의 경우 대조군에 비해 유의적인 차이는 없었으나, 비타민 E 급여수준이 높을수록 증가하는 경향이었으며 특히 식이 kg당 1,000mg의 비타민 E 급여군인 CV2에서 카페인에 의한 성장억제가 호전되었다. 한편 사료 및 카페인섭취량은 전 실험군에서 유의적인 차이가 없었다.

Hematocrit치 측정

Table 3과 같이 대조군 및 실험군 상호간에 유의적인 차이가 없었다. Levander 등²⁴⁾에 따르면 비타민 E 결핍자체는 hematocrit치, 적혈구 수 등에 영향을 미치지 않으나 납중독시 hematocrit치의 격감, 적혈구 수의 증가, 비장의 비대 등이 밝혀졌다. 이는 산화적 손상시 적혈구막의 파괴로 인한 용혈현상에 대해 감수성이 증진된 결과로, 본 실험결과와는 차이가 있다.

간조직 중 과산화지질의 함량

Table 4와 같이 대조군에 대한 유의차는 없었

Table 3. Values of hematocrit (%)

Group	Hematocrit
B	50.11±1.19*
CB	52.90±4.44
CV1	49.70±2.96
CV2	49.70±1.56

*Mean±S.D.

Table 4. Effect of caffeine and vitamin E on lipid peroxidation of hepatic tissue in rat

Group	Lipid peroxide as MDA* (n moles/g liver)
B	29.26±5.10 ^{ab.1)} **
CB	30.35±2.59 ^b
CV1	30.82±1.57 ^b
CV2	24.30±2.19 ^a

*MDA : malondialdehyde

**Mean±S.D.

¹⁾Values with different superscripts are significantly different(p<0.05).

으나, Wendei과 Feuerstein²⁵⁾은 카페인같은 xenobiotic의 대사시 약물대사효소계로부터 생성된 free radical이 지질과산화의 증가와 관련있다고 보고하였다. 한편 CV2의 경우, 식이 kg당 각각 30mg, 500mg의 비타민 E 급여군인 CB, CV1에 비해 유의하게 감소한 바, 이는 항산화제인 비타민 E가 free radical을 scavenging함으로써 세포막을 안정화한다는 데 기인하며, 비타민 E 결핍군에 비해 비타민 E 급여군에서의 지질과산화물 함량이 감소되었다는 Masugi와 Nakamura²⁶⁾의 보고와 유사하다. 또 비타민 E 급여수준이 높을수록 lipid hydroperoxide의 독성에 대한 보호효과가 큼이 확인되었으나, CB와 CV1간에는 유의적인 차이가 없어 더욱 연구해 볼 필요가 있다고 사료된다.

Glutathione peroxidase 및 catalase활성

식이성 비타민 E 수준과 카페인 투여에 따른 glutathione peroxidase(GSH-PX) 활성은 Table 5와 같이, 대조군에 비해 CV2를 제외한 CB 및 CV1에서 유의하게 증가하였다. 이는 지질과산화

Table 5. Effect of caffeine and vitamin E on the activities of glutathione peroxidase and catalase of hepatic tissue in rat

Group	Glutathione peroxidase (NADPH oxidized n moles/min/mg protein)	Catalase (n moles/min/mg protein)
B	2.657±0.35 ^{a,1)} *	50.67±5.17 ^{a,2)} *
CB	5.921±1.58 ^a	63.83±10.36 ^b
CV1	5.223±0.45 ^{bc}	62.54±4.16 ^b
CV2	3.471±0.65 ^{ab}	63.39±0.49 ^b

*Mean±S.D.

^{1,2)}Values with different subscripts in the same column are significantly different ($p < 0.01$, < 0.05).

물의 축적량이 증가하는 동시에 산화적 손상에 대해 GSH-PX와 같은 protective enzyme의 활성이 높아진 것으로 생각된다. 반면 Chow 등²⁷⁾은 비타민 E 결핍시 GSH-PX활성이 perirenal adipose tissue 및 근육에서는 현저히 증가하였으나, 간에서는 유의적인 차이가 없다고 하였다.

Catalase활성은 대조군에 비해 전 실험군에서 유의하게 증가하였다. 이는 카페인의 급여로 인해 지질과산화가 촉진된 결과, peroxide scavenging enzyme으로서의 활성이 증진됨에 기인한다고 보여진다. 한편 Murty 등²⁸⁾은 비타민 E 결핍시 catalase의 활성이 감소되었다고 보고한 바 있다.

Xanthine oxidase활성

카페인과 식이성 비타민 E가 간 xanthine oxidase활성에 미치는 영향은 Table 6과 같다. 대

조군에 비해 전 실험군에서 유의적인 차이는 없었으나 증가하는 경향을 보인 바, xanthine oxidase는 카페인 대사과정 중 methylxanthine을 uric acid로 전환시키는 역할을 함으로써 카페인 급여시 그 활성이 증가된 것으로 생각된다. 한편 xanthine oxidase는 superoxide anion을 생성시키는 효소로, 비타민 E 결핍시 그 활성이 증가되며 비타민 E에 의해 조절된다하나 본 실험결과와는 차이가 있다.

요 약

카페인 투여 흰쥐의 체내 지질과산화에 미치는 식이성 비타민 E의 영향을 검토하고자, 흰쥐에게 카페인 수용액(0, 1,000mg/l)을 식수로 공급하고 식이 kg당 비타민 E함량(30mg, 500mg 및 1,000mg)을 달리하여 6주간 사육했을 때 관찰한 결과는 다음과 같다.

증체량은 카페인 급여군의 경우, 대조군에 비해 유의차는 없으나 비타민 E 급여수준이 높을수록 증가하는 경향이었으며, 사료섭취량, 카페인섭취량 및 hematocrit치는 유의적인 차이가 없었다. 간조직 과산화지질의 함량은 대조군에 대한 유의차는 없었으나, 식이 kg당 1,000mg의 비타민 E 급여군의 경우, 500mg 급여군보다 유의하게 감소하였다. Glutathione peroxidase활성은 대조군에 비해 카페인 투여군에서 유의하게 증가된 한편 비타민 E 급여수준이 높을수록 감소하였으며, catalase활성은 전 실험군에서 유의하게 높았다. Xanthine oxidase활성은 대조군 및 실험군 상호간에 유의적인 차이가 없었다.

문 헌

Table 6. Effect of caffeine and vitamin E on the activities of hepatic xanthine oxidase in rat

Group	Xanthine oxidase (n moles/min/mg protein)
B	0.719±0.21*
CB	1.091±0.22
CV1	1.223±0.21
CV2	1.189±0.49

*Mean±S.D.

- Graham, D. M. : Caffeine its identity, dietary sources, intake and biological effects. *Nutr. Rev.*, **36**, 97(1978)
- Stephenson, P. E. : Physiologic and psychotropic effects of caffeine on man. *J. Am. Diet. Assoc.*, **71**, 240(1977)
- Lachance, M. P. : The pharmacology and toxicology of caffeine. *J. Food Safety*, **4**, 71(1982)
- Debas, H. T., Cohen, M. M., Holubitsky, I. B.

- and Harrison, R. C. : Caffeine-stimulated acid and pepsin secretion : Dose response studies. *Scand. J. Gastroenterol.*, **6**, 453(1971)
5. Robertson, D., Frolich, J. C., Carr, R. K., Watson, J. T., Hollifield, J. W., Shand, D. G. and Oates, J. A. : Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure. *N. Engl. J. Med.*, **298**, 181(1978)
 6. Mann, J. T. and Thorogood, M. : Coffee-drinking and myocardial infarction. *Lancet*, **II**, 1215(1975)
 7. Shirlow, M. J. and Mathers, C. D. : Caffeine consumption and serum cholesterol levels. *Intern. J. Epidemiol.*, **13**, 422(1984)
 8. Mathias, S., Garland, C. and Wingard, D. L. : Coffee, plasma cholesterol and lipoproteins. *Am. J. Epidemiol.*, **115**, 896(1985)
 9. Kato, N. and Yoshida, A. : Effects of some fat-soluble chemicals on plasma cholesterol and urinary ascorbic acid in rats. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 191(1979)
 10. Naismith, D. J., Akinyanju, P. A. and Yudkin, J. : Influence of caffeine-containing beverages on the growth, food utilization and plasma lipids of the rat. *J. Nutr.*, **97**, 375(1969)
 11. Diluzio, N. R. : Antioxidants, lipid peroxidation and chemical-induced liver injury. *Fed. Proc.*, **32**, 1875(1973)
 12. Combs, G. F. Jr. and Scott, M. L. : Antioxidant effects on selenium and vitamin E function in the chick. *J. Nutr.*, **104**, 1297(1974)
 13. Chen, L. H. and Barnes, K. J. : Nutritional relationship of vitamin E and vitamin C in guinea pigs. *Nutr. Rep. Int.*, **14**, 89(1976)
 14. Chen, L. H. : An increase in vitamin E requirement induced by high supplementation of vitamin C in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 1036(1981)
 15. Tinberg, H. M. and Barber, A. A. : Studies on vitamin E action : peroxidation inhibition in structural protein-lipid micelle complexes derived from rat liver microsomal membranes. *J. Nutr.*, **100**, 413(1970)
 16. Horn, L. R., Machlin, L. J., Barker, M. O. and Brin, M. : Drug metabolism and hepatic heme proteins in the vitamin E-deficient rat. *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 270(1976)
 17. Report of the American Institute of Nutrition : Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J. Nutr.*, **107**, 1340(1977)
 18. Bauer, J. D. : *Clinical Laboratory Methods*, 9th ed. The C. V. Mosby Company, 188(1982)
 19. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351(1979)
 20. Paglia, E. D. and Valentine, W. N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158(1967)
 21. Aebi, H. : *Catalase in "Methods of Enzymatic Analysis"* (H. U. Vergmeyer, eds.), Vol. 2. Academic Press. New York, 673(1974)
 22. Stirpe, F. and Della Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase : Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (Type D) to oxidase (Type O). *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855(1969)
 23. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. : *Principles and procedures of statistics*, McGraw-Hill Book Co., New York(1980)
 24. Levander, O. A., Morris, V. C., Higgs, D. J. and Ferretti, R. J. : Lead poisoning in vitamin E-deficient rats. *J. Nutr.*, **105**, 1481(1975)
 25. Wendel, A. and Feuerstein, S. : Drug-induced lipid peroxidation in mice I. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 2521(1981)
 26. Masugi, F. and Nakamura, T. : Effect of vitamin E deficiency on the level of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxide in rat liver. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, **46**, 187(1976)
 27. Chow, C. K., Reddy, K. and Tappel, AL. L. : Effect of dietary vitamin E on the activities of the glutathione peroxidase system in rat tissues. *J. Nutr.*, **103**, 618(1973)
 28. Murty, H. S., Caasi, P. I., Brooks, S. K. and Nair, P. P. : Biosynthesis of heme in the vitamin E-deficient rat. *J. Biol. Chem.*, **245**, 5498(1970)

(1990년 1월 24일 접수)