

## 加熱油와 Vitamin E가 흰쥐 肝臟內의 過酸化的 損傷에 미치는 영향

이순재<sup>†</sup> · 최원경

효성여자대학교 식품영양학과

### Effects of Heated Oil and Vitamin E on Lipid Peroxidative Liver Damage in Rat

Soon-Jae Rhee<sup>†</sup> and Won-Kyung Choi

Dept. of Food Science and Nutrition, Hyosung Women's University, Kyungsan, Kyungbuk 713-702, Korea

#### Abstract

In order to investigate the cellular peroxidative damage due to heated oil intake and the preventive effect of vitamin E on it, rats were fed heated corn oil with acid value of 4.02 at the level of 10 Cal% and three different levels of vitamin E that were 0, 40 and 200 mg/kg diet. Control group was fed fresh corn oil and 40mg/kg diet of vitamin E. After each feeding period of 0, 3 and 6 weeks, liver superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX) activities and microsomal content of vitamin E and lipid peroxide(LPO) were measured as well as cellular morphology was examined. SOD activities and LPO contents were higher, while GPX activities and vitamin E contents were lower in heated oil groups than control group. Electromicroscopic observation revealed the loss of inner mitochondrial membrane and cristae and irregular arrangement of nuclear membrane and chromatin in heated oil groups. As dietary vitamin E level was increased, SOD activity and LPO content were decreased, but GPX activity and vitamin E content in the liver increased and cellular peroxidative damage reduced progressively. This phenomena was more remarkable in 6 weeks of feeding than 3 weeks.

**Key words :** heated oil, peroxidative damage, lipid peroxidation, vitamin E, antioxidative defense enzyme

#### 서 론

유지를 가열할때 생성되는 독성물질에 대한 연구는 지금까지 많이 보고되어 왔으며<sup>1-6</sup> 가열에 의해 산패된 유지를 동물에게 투여했을때 동물 체내에 미치는

영향에 대한 연구보고로 Reporter등<sup>7</sup>은 가열유를 동물에게 투여 했을때 체조직내의 vitamin A가 파괴되고 폐와 간에 변성이 온다고 보고하였으며, Vergroessen등<sup>8</sup>은 가열유의 분해생성물은 생체내에서 쉽게 산화하여 free radical을 생성하므로 DNA손상과 돌연변이와 퇴행성과정을 일으켜 암, 심장병과 노화에 영향

<sup>†</sup> To whom all correspondence should be addressed

<sup>1</sup>본 연구는 1990년도 한국과학재단 연구비지원으로 수행되었음.

을 미친다고 하였고 또한 식욕부진, 설사, 신장 및 간의 비대, 그밖의 여러조직에서 조직학적 변화가 일어난다<sup>20</sup>고 보고 되고있다. 더구나 고도의 불포화지방산을 가진 식물성 유지는 필수지방산의 공급원으로 서 영양학적으로 우수하지만 생체의외뿐만 아니라 생체내에서도 쉽게 산화가 일어나므로, 지방축적 및 노화와 암의 원인이 되는 지질과산화 물질을 생성할 수도 있다. 따라서 이러한 지질과산화 생성을 방지하기 위해서 selenium이나 tocopherol같은 항산화제의 역할이 중요함을 강조하는 많은연구<sup>21-23</sup>가 보고 되고 있다. 생체내 vitamin E(VE)는 쥐의 간세포나 뇌세포 등의 분획중 microsome과 mitochondria에 가장 많이 분포되어있어 microsome과 mitochondria의 membrane에 많이 함유되어 있는 PUFA가 산화 분해될때 생성되는 free radical의 scavenger로 작용하여 세포의 기능을 정상적으로 유지시키는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있다<sup>24-28</sup>. Zalkin등<sup>29</sup>은 vitamin E가 결핍된 토끼의 간조직 mitochondria가 정상토끼의 간조직 mitochondria보다 lipid peroxidation이 증가되었다고 한 보고에서 VE는 lipid peroxidation에 강력한 항산화작용을 한다고 볼 수 있고 여러 연구에 의해 지방의 항산화제로서 각종 물질대사에 관여하는 필수영양소임이 밝혀졌다.

그러나 가열유 섭취로 인해 올 수 있는 과산화적 손상과 이에대한 식이내의 VE의 함량에 따른 생체내에서의 항산화적 방어기전에 대한 보고는 없었다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐에 VE수준을 달리한 식이군으로 나누어 3주 및 6주간 가열유를 부여하면서 사육한후, 간장중의 과산화지질량을 측정하고 또한 과산화적 손상으로부터 조직을 보호하는 항산화적 방어 효소계인 superoxide dismutase와 glutathione peroxidase 활성측정과 비효소적 반응을 통하여 조직을 보호하는 물질인 간장내 VE함량을 측정함과 동시에 병리조직학적 변화를 전자현미경으로 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 식이

실험동물은 체중이 100g 내외가 되는 Sprague-Dawley종의 흰쥐수컷을 사용하여, 1주간 일정한 조건하에서 사육한 후, 본 실험에 사용하였다. 예비사

육한 동물을 기본식이로 사육하면서 신선한 옥수수 기름을 첨가한 정상식이군인 대조군과 하루전체 Cal의 10%에 해당되는 가열유와 VE함량을 달리하여 dl- $\alpha$ -tocopherylacetate를 첨가하지 않은 식이군(HOF군), 40mg/kg diet 첨가한식이군(HO군), 200mg/kg diet를 첨가한식이군(HOE군)으로 나누어 VE는 식이중에 첨가하였으며 가열유는 tube feeding 하였고, 기본식이와 물은 자유섭취 하도록 하면서 3 및 6주간 사육하였다. 실험기간중 3일간격으로 같은 시간에 체중을 달았다. 식이유 조제는 1200g의 신선한 고등어를 6등분하여 밀가루로 튀김옷을 입힌후 2000L의 튀김기름을 180°C로 해서 튀김물 1회분에 10분간씩, 총6회분 1시간씩 24시간 튀김하여 산가가 4.02인 식이유를 얻었다(Table 2). 기본 실험식이의 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of experimental diets

Group	(g/1000g diet)			
	Control	HOF	HO	HOE
Basal diet				
Corn Starch(g) <sup>1)</sup>	740	740	740	740
Casein(g) <sup>2)</sup>	190	190	190	190
Salt Mix(g) <sup>3)</sup>	40	40	40	40
Vitamin Mix(g) <sup>4)</sup>	5	5	5	5
Cellulose(g) <sup>5)</sup>	25	25	25	25
Kcal/g				3.72
Vitamin E(mg) <sup>6)</sup>	40	0	40	200
Dietary fat	*1	*2	*2	*2
	10% Cal of total energy/day			

<sup>1)</sup> Pung Jin Chem. Co.

<sup>2)</sup> Lactic Casein, 30mesh, New Zealand

<sup>3)</sup> Salt Mixture : g per/100g of Salt Mixture ; CaHPO<sub>4</sub>, 7.5g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 32.2g ; NaCl 16.7g ; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10.2g ; ferric citrate, 2.75g ; MnSO<sub>4</sub>, 0.51g ; KI, 70mg ; CuCl<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O, 35mg ; ZnCl<sub>2</sub>, 25mg ; CoCl<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5mg ; (SO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>CrO<sub>4</sub>·O<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 5mg

<sup>4)</sup> Vitamin Mixture : per 1kg of diet ; thiamine - HCl, 20mg ; riboflavin, 20mg, pyridoxine, 20mg ; nicotinic acid, 90mg ; d-calcium pantothenate, 60mg ; folic acid, 10mg ; biotin, 1mg ; menadione, 45mg ; vitamin B<sub>12</sub> (0.1% triturate in mannitol), 20mg ; retinyl acetate, 2,000IU ; cholecalciferol, 1,000IU ; dl-tocopheryl acetate, 0.1g ; choline, 1.5g ; inositol, 0.1g ; vitamin C, 0.9g ; p-aminobenzoic acid, 0.1g

<sup>5)</sup> CMC(Sodium carboxyl methyl cellulose, non-nutritive fiber)

<sup>6)</sup> DL- $\alpha$ -tocopherol acetate

\*1 Fresh corn oil

\*2 Heated oil : The corn oil was heated with mackerel for 24hrs at 180°C

**식이유의 물리화학적 분석**

식이유의 산가<sup>15)</sup>, carbonyl가<sup>16)</sup> 및 색도<sup>17)</sup>는 일반법에 준하였으며 점도<sup>18)</sup>는 Ubbelohde형 점도계를 사용하여 상대점도를 측정하였고, peroxide가는 ICU법<sup>19)</sup> (Method of International Chemical Union), 요오드가는 Wijs법<sup>15)</sup>에 의해 측정하였다. 지방산 조성분석은 실험에 사용한 식이유를 각각 saponification시켜 이를 질소가스하에 건조시킨후 gas chromatography를 이용하여 분석<sup>20)</sup>하였다.

**시료처리**

사육한 쥐를 12시간 절식시킨후, 마취시켜 간장을 적출한 후 그 일부를 취하여 세포의 병리조직학적 검사를 위해 고정시키고, 나머지 일정량을 취해서 0.25M sucrose/0.5mM N-2-hydroethyl-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid(HEPES) 용액으로써 10% (w/v) 마쇄액을 만들었다.

마쇄액의 일부를 8,000×g에서 20분간 원심분리하여 그 상층액을 과산화지질정량에 사용하였고, 나머지는 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 그 상층액 일정량을 취해 0.4배량의 ethanol : chloroform 혼합액 (5 : 3)을 가하고 진탕한 다음 superoxide dismutase는 10,000×g에서 30분간, glutathione peroxidase는 105,000×g에서 30분간 원심분리하여 사용하였으며, 그 침전물에 0.25M sucrose/0.5mM EDTA/5mM HEPES 용액 2.0ml를 넣어 glass homogenizer로 균질화시켜 microsome내의 과산화지질정량에 사용하였다. VE함량측정은 간장조직 일정량을 취해 0.9% NaCl로써 10% (w/v) 마쇄액을 만들어 사용하였다.

**Superoxide dismutase 활성측정**

Superoxide dismutase의 정량은 알칼리상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund등<sup>21)</sup>의 방법을 이용하였다.

**Glutathione peroxidase 활성측정**

Glutathione peroxidase의 정량은 산화형 glutathione이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원될때 NADPH의 흡광도가 340nm에서 감소하는것을 이용한 Lawrence 및 Back<sup>22)</sup>의 방법에 따라 측정하였다.

**과산화지질의 정량**

과산화지질의 정량은 thiobarbituric acid (TBA) 와 반응하여 생성되는 malondialdehyde를 측정하는 Satoh 방법<sup>23)</sup>을 이용하였다.

**Vitamin E 함량측정**

간장 조직중의 VE함량은 시료를 Kayden등<sup>24)</sup>과 Taylor의 방법<sup>25)</sup>으로 전처리하여 ferric-chloride dipyridyl법 (Emmerie Engel reaction)<sup>26)</sup>에 의하여 측정하였다.

**단백질 정량**

각 시료의 단백질량은 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하여 Biuret법<sup>27)</sup>과 Lowry<sup>28)</sup>방법을 이용하여 정량하였다.

**간 세포의 구조검사**

간을 절취한 즉시 1mm<sup>3</sup> 크기로 잘라 4℃의 2.5% glutaraldehyde 용액에 2시간동안 전고정을 한후, 실온에서 후고정을 하였다. 고정된 조직은 ethanol 50%, 70%, 80%액에 각각 20분씩, 95%ethanol액에 30분, 그리고 무수ethanol에 60분씩 처리하여 탈수하였다. 이것을 propylene oxide에 10분간씩 3회 반복하여 침투시키고, Luft법<sup>29)</sup>에 의해 epone 812로써 포매하여 gelatin capsule에 넣어서 35℃에서 12시간, 60℃에서 48시간 가온하여 경화시켰다. 경화된 조직은 ultramicrotome으로 400~600 Å 되게 박절하여 Reynolds 방법<sup>30)</sup>에 따라 lead citrate와 uranyl acetate로써 이중 전자염색을 하여 JEM형 (100-CX) 전자현미경으로써 관찰하였다.

**유의도 검정**

각 군사이의 성적은 Student's t-검정법<sup>31)</sup>에 따라 유의도를 검정하였다.

**결 과**

**식이유의 물리화학적 특성**

본 실험에서 사용한 식이유의 물리화학적 특성과 지방산조성을 분석한 결과는 Table 2 및 Table 3과 같다.

Table 2. Characteristics of dietary fat

	Fresh Oil <sup>1</sup>	Heated Oil <sup>2</sup>
Acid Value	0.43	4.02
Iodine Value	138.00	91.00
Peroxide Value <sup>b)</sup>	5.50	52.70
Carbonyl Value <sup>b)</sup>	6.20	27.90
Viscosity	4.05	7.20
Color density	0.05	15.35

<sup>1</sup>Fresh corn oil<sup>2</sup>The corn oil was heated with mackerel for 24hrs at 180°C<sup>b), 2)</sup> meq/kg

Table 3. Fatty acid composition of dietary fat

Fatty acid	Fresh Oil <sup>1</sup>	Heated Oil <sup>2</sup>
16 : 0	8.66	12.66
18 : 0	5.92	8.88
18 : 1	31.23	40.84
18 : 2	48.27	36.13
18 : 3	5.92	-

<sup>1</sup>Fresh corn oil<sup>2</sup>The corn oil was heated with mackerel for 24hrs at 180°C

산가는 신선한 옥수수기름인 대조군이 0.43 인데 비해 24시간 튀김한 기름은 4.02로서 유리지방산의 생성이 많아짐을 알 수 있었고, 요오드가는 대조군이 138인데 비해 24시간 튀김한 기름은 91로 가열하므로써 유지내 불포화지방산이 감소함을 알 수 있었다. 또한 peroxide가, carbonyl가, 점도, 색도도 대조군에 비해 상당히 높은 수치를 나타냈다. 지방산조성은 신선한 옥수수기름인 대조군은 linoleic acid(C<sub>18:2</sub>)가 주된 지방산이었고, 산패도가 심한 튀김한 기름은 산화에 불안정한 linoleic acid(C<sub>18:2</sub>)가 많이 감소되었으며, linoenic acid(C<sub>18:3</sub>)는 거의 찾아 볼 수 없었고, oleic acid(C<sub>18:1</sub>)가 주된 지방산을 이루고 있다.

#### 체중증가 및 장기의 무게

본 실험에 사용한 쥐는 단위체중당 간장의 무게와 체중의 증가율은 Table 4에 나타난 바와 같다.

간장의 무게는 3주, 6주 모두 대조군에 비해 산패도가 심한 기름을 투여한 군에서 증가를 보였고, 체중증가량은 실험기간동안 계속적인 증가는 보였으나 실험군간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

#### 간조직중의 효소활성

##### Superoxide dismutase

가열유 투여후 간장에서 superoxide dismutase 활성

Table 4. Liver weight and percent increase of body weight of rats administrated heated oils (%w/w)

Group	Liver wt. (g/100g body wt.)	% Increase of body wt.
0WK	2.90±0.05	100
3WK		
Control	2.77±0.067	145.14±1.20
HOF	3.19±0.15*	142.10±1.30
HO	3.29±0.22*	139.60±0.90
HOE	3.18±0.16*	141.23±2.10
6WK		
Control	2.65±0.08	171.63±1.60
HOF	3.30±0.06*	172.60±1.30
HO	3.24±0.04*	169.12±0.80
HOE	3.07±0.08*	169.33±0.90

All values are mean±SE

\*A significantly different from each control group (p&lt;0.05)

Control : basal diet+fresh corn oil + 40mg dl- $\alpha$  -tocopheryl acetateHOF : basal diet + heated oil + 0mg dl- $\alpha$  -tocopheryl acetateHO : basal diet + heated oil + 40mg dl- $\alpha$  -tocopheryl acetateHOE : basal diet + heated oil + 200mg dl- $\alpha$  -tocopheryl acetate

변화를 관찰한 결과는 Table 5에 나타난 바와 같이 3주에서는 대조군이 11.88에 비해 HO군은 13.59, HOF 15.0으로 유의적으로 증가하였고 (p<0.05), HOE군은 12.20으로 대조군에 비해 약간 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다. 6주에서는 대조군 12.11에 비해 HO군 14.23, HOF군 14.46으로 증가하였고 (p<0.05) HOE군은 12.87로 대조군과 차이를 보이지 않았다.

투여 기간별로 살펴보면 대조군은 거의 차이를 보이지 않았으나 HO군은 실험시작 때의 11.40에 비해 실험기간 3주, 6주동안 각각 13.59, 14.23으로 현저히 증가하였고 (p<0.001) HOF군은 실험군의 실험초의 11.40에 비해 3주, 6주 각각 15.00, 14.46으로 현저히 증가하였다 (p<0.001). HOE군은 별 변화가 없었다.

#### Glutathione peroxidase

가열유 투여후 간장에서의 glutathione peroxidase 활성변화는 Table 6에서 보는 바와 같다. 3주에서는 대조군 3.98에 비해 HO군 2.90, HOF군 2.60으로 현저히 감소되었으나 (p<0.05) HOE군은 HO, HOF

**Table 5. Effects of vitamin E on superoxide dismutase activity in rat liver administrated heated oils**

Group	(unit/mg protein)			
	Control	HOF	HO	HOE
0WK	11.40±0.21	11.40±0.21 <sup>1</sup>	11.40±0.21 <sup>**1</sup>	11.40±0.21 <sup>1</sup>
3WK	11.88±0.46 <sup>*a</sup>	15.00±0.21 <sup>c.2</sup>	13.59±0.21 <sup>b.2</sup>	12.20±0.21 <sup>a.2</sup>
6WK	12.11±0.31 <sup>a</sup>	14.46±0.28 <sup>c.2</sup>	14.23±0.21 <sup>b.2</sup>	12.87±0.62 <sup>a.2</sup>

All values are mean ± SE of eight rats.

\* Values in a row(diet group) with different superscript letters (a.b.c.) are significantly different from the other group (p<0.05)

\*\* Values in a column (feeding period of diet) with different superscript numbers (1,2) are significantly different from the other group (p<0.05). Experimental conditions are described in Materials and Methods

**Table 6. Effects of vitamin E on glutathione peroxidase in rat liver administrated heated oils**

Group	(mol NADPH/min/mg protein)			
	Control	HOF	HO	HOE
0WK	4.01±0.41	4.01±0.41 <sup>1</sup>	4.01±0.41 <sup>**1</sup>	4.01±0.41 <sup>1</sup>
3WK	3.98±0.03 <sup>*a</sup>	2.60±0.50 <sup>b.2</sup>	2.90±0.14 <sup>b.2</sup>	3.56±0.12 <sup>c.2</sup>
6WK	4.63±0.25 <sup>*a</sup>	1.99±0.22 <sup>a.2</sup>	2.58±0.12 <sup>b.2</sup>	3.42±0.10 <sup>c.2</sup>

All values are mean ± SE of eight rats.

\* Values in a row(diet group) with different superscript letters (a.b.c.d.) are significantly different from the other groups (p<0.05)

\*\* Values in a column (feeding period of diet) with different superscript numbers (1,2) are significantly different from the other group (p<0.05). Experimental conditions are described in Materials and Methods

**Table 7. Effects of vitamin E on lipid peroxide value in rat liver administrated heated oils**

Group	(n mol MDA/mg protein)			
	Control	HOF	HO	HOE
0WK				
8000 x g Sup	0.50±0.06	0.50±0.06 <sup>1</sup>	0.50±0.06 <sup>**1</sup>	0.50±0.06
Microsome	7.40±0.02	7.40±0.02 <sup>1</sup>	7.40±0.02 <sup>1</sup>	7.40±0.02
3WK				
8000 x g Sup	0.56±0.02 <sup>*a</sup>	1.39±0.09 <sup>b.2</sup>	0.89±0.12 <sup>b.2</sup>	0.63±0.07 <sup>a</sup>
Microsome	8.08±0.49 <sup>a</sup>	14.09±0.08 <sup>b.2</sup>	12.90±0.09 <sup>b.2</sup>	8.29±0.12 <sup>b.2</sup>
6WK				
8000 x g Sup	0.58±0.02 <sup>a</sup>	1.66±0.09 <sup>b.3</sup>	0.94±0.03 <sup>b.2</sup>	0.67±0.03 <sup>b</sup>
Microsome	7.59±0.60 <sup>a</sup>	19.90±1.09 <sup>b.3</sup>	11.41±0.87 <sup>b.2</sup>	7.90±0.21 <sup>a</sup>

All values are mean ± SE of eight rats.

\* Values in a row(diet group) with different superscript letters (a.b.c.d.) are significantly different from the other groups (p<0.05)

\*\* Values in a column (feeding period of diet) with different superscript numbers (1,2,3) are significantly different from the other groups (p<0.05). Experimental conditions are described in Materials and Methods

군 보다 증가한 것으로 보아 식이중 VE첨가 수준에 따라 GPX활성에 영향이 미칠을 알 수 있다.

6주에서는 HO군이 2.58, HOF군은 1.99로 대조군 4.63에 비해 감소되었으며 HOE군은 3.42로 HO군, HOF군에 비해 증가 되었다(p<0.05). 투여 기간별로 살펴보았을때 대조군과 HOE군은 거의 차이를 보이지 않았고 실험초에 비해 HO군, HOF군은 현저히

감소하였다(p<0.001). 따라서 VE결핍식이와 가열유의 투여기간이 길어질수록 그 영향이 더욱 뚜렷하게 나타남을 볼 수 있었다.

**간조직중의 과산화 지질**

간장조직중의 lipid peroxide함량을 측정한 결과는 Table 7과 같이 간장조직의 8,000×g 상층액의 경우

HO 군은 대조군에 비해 실험기간 3주 및 6주에 각각 1.6배정도 증가됨으로써 가열유 투여로 인한 지질과산화물을 볼수 있었고 HOF군은 대조군에 비해 3주, 6주 각각 2.5배, 2.8배로 현저히 증가하였으나 HOE군은 별차이를 보이지 않으므로써 VE의 첨가수준에 따라 간장조직중의 지질과산화의 정도에 크게 영향이 있음을 볼 수 있었다. Microsome에서의 경우는 8,000×g 상층액에서와 같이 HO군은 3주, 6주 모두 대

조군에 비해 각각 1.6배 정도 증가되었고 HOF군은 대조군에 비해 3주, 6주 각각 1.7배, 2.6배로 현저히 증가하였다( $p < 0.001$ ). 투여기간별로 살펴보면 HOF군에서 실험 시작때에 비해 3주 및 6주때 각각 2.0배, 2.7배씩 증가하므로써 가열유 투여시 VE가 결핍된 식이섭취는 그 기간이 길어질수록 간장조직중의 지질과산화에 미치는 영향이 더욱 뚜렷해짐을 알 수 있었다.

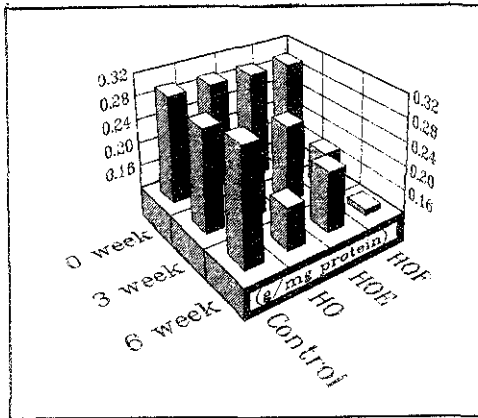


Fig. 1. Contents of vitamin E in rat liver in administrated heated oils. Experimental conditions are described in Materials and Methods.

간장조직중의 Vitamin E 함량

가열유 투여후 간장조직중의 VE함량변화는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 3주에서는 대조군 0.29에 비해 HO군 0.22, HOF군 0.18로 현저히 감소하였으나 ( $p < 0.05$ ), VE를 충분히 투여한 HOE군은 0.25로 HOF군에 비해 현저히 증가되었다( $p < 0.05$ ). 실험 6주에서는 대조군 0.31에 비해 HO 0.19, HOF군 0.13으로 더욱 현저하게 감소하였다. 투여 기간별로 비교하여 보면 실험초에 비해 HO 군, HOE군, HOF군 모두 감소 하였으나 HOF군은 특히 실험기간동안 계속적으로 현저히 감소하므로써 ( $p < 0.05$ ) 식이중의 VE결핍은 간장조직의 VE함량을 감소시킴을 알 수 있었다.

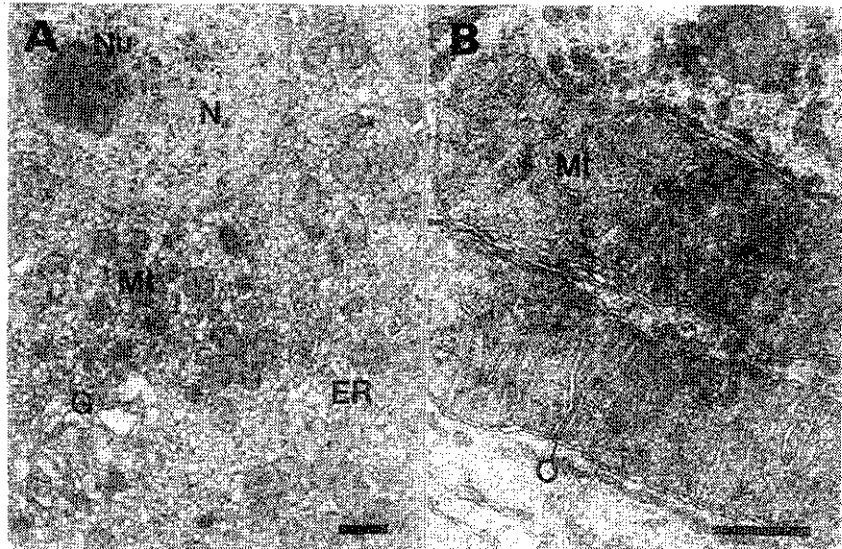
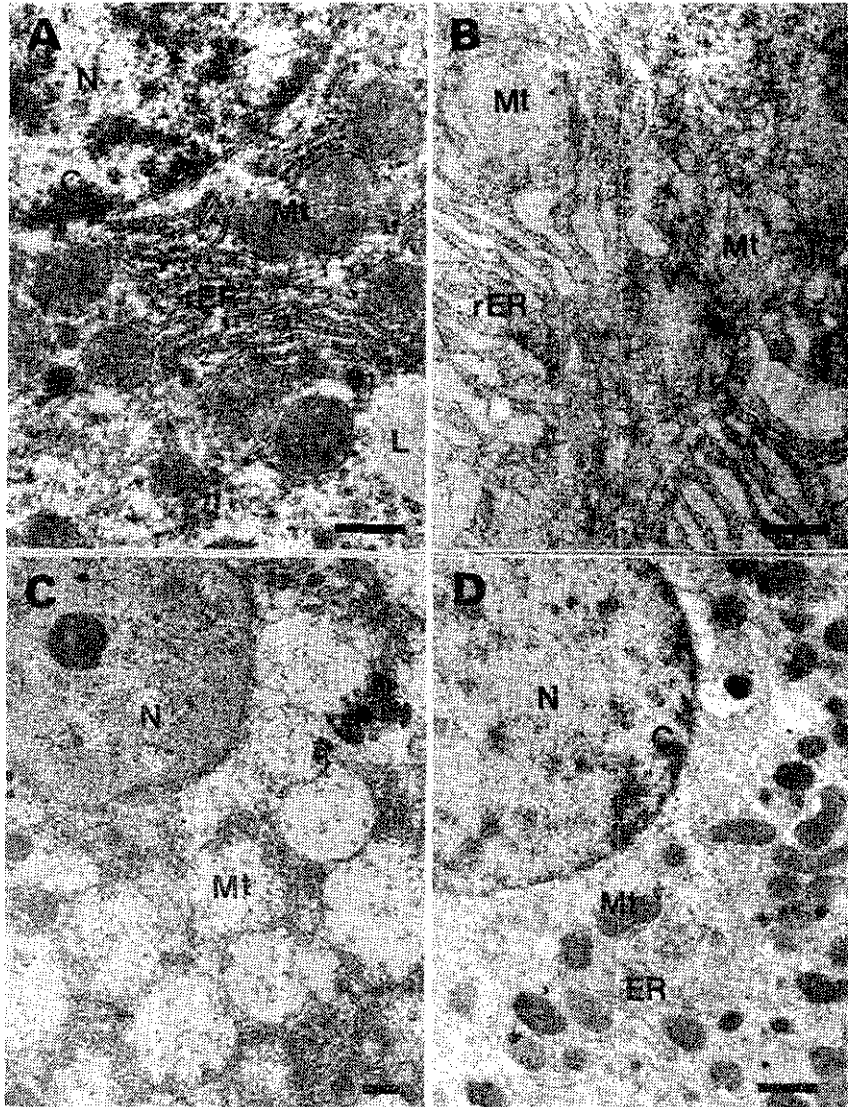


Fig. 2. A). Hepatocyte of a rat fed control diet for 6weeks. The hepatocyte shows a round nucleus(N) with prominent nucleolus(Nu) and abundant smooth surfaced endoplasmic reticulum(sER) and mitochondria (Mt) in the cytoplasm. Golgi apparatus(G) is well demonstrated. Uranyl acetate and lead citrate stain. Bar marker, 7,000 μ m. B). Mitochondria of hepatocyte of a rat fed control diet for 6weeks. Elongated mitochondria(Mt) have many cristae and electrodense matrices. Outer leaflet of mitochondrial unit membrane(O) is well defined. Uranyl acetate and lead citrate strain. Bar maker, 15,000 μ m.



**Fig. 3.** A). Hepatocyte of a rat fed standard diet with 10% Cal. of total energy/day of heated oil and 40mg vitamin E/kg of diet for 6weeks. The nucleus(N) has much heterochromatin(C). Rough-surfaced endoplasmic reticulum(rER) and mitochondria(Mt) are abundant. A lipid droplet(L) is present. Uranyl acetate and lead citrate stain. Bar marker, 10,000  $\mu$ m. B). Hepatocyte of a rat fed standard diet with 10% Cal. of total energy/day of heated oil and 40mg vitamin E/kg of diet for 6weeks. Mitochondria(Mt) of the hepatocyte are moderately swollen and decreased in number of cristae. Both smooth-(sER) and rough-surfaced endoplasmic reticulum(rER) are abundant. Uranyl acetate and lead citrate stain. Bar marker, 10,000  $\mu$ m. C). Hepatocyte of a rat fed standard diet with 10% Cal. of total energy/day of heated oil and vitamin E free for 6weeks. Mitochondria(Mt) shows marked swelling and loss of cristae. Uranyl acetate and lead citrate stain. Bar marker, 6,000  $\mu$ m. D). Hepatocyte of a rat fed standard diet with 10% Cal. of total energy/day of heated oil and 200mg vitamin E/kg of diet for 6weeks. The hepatocyte demonstrates large round nucleus(N) with small amount of heterochromatin(C), and large number of intact mitochondria(Mt) and abundant rough-surfaced endoplasmic reticulum(rER). Uranyl acetate and citrate stain. Bar marker, 9,000  $\mu$ m.

### 간세포의 구조변화

전자 현미경 조사에 의한 간세포의 구조적변화를 관찰한 결과 대조군에서는 핵막이 뚜렷하고 세포질 내의 원형 또는 타원형의 mitochondria가 잘 발달되어 있고 mitochondria내의 cristae가 뚜렷하였다 (Fig. 2: A, B).

HO군은 핵내의 heterochromatin이 조금 증가되어 있고 secondary lysosome이 증가되었으며 lipid droplet가 나타났고, 간세포내의 mitochondria가 약간 swelling되었고 cristae의 수가 감소되었다 (Fig. 3: A, B). HOF군은 mitochondria가 현저히 swelling되었고 cristae가 많이 소실되었으며 핵내 핵인이 돌출 되어 있었다 (Fig. 3: C). HOE군은 heterochromatin이 감소하였고 mitochondria의 손상이 HOF군보다 경하였고 rough-endoplasmic reticulum이 많아졌다 (Fig. 3: D).

## 고 찰

본 연구는 식이내 vitamin E 수준을 달리 하였을 때 가열유를 투여하여 흰쥐 간장내의 과산화적 손상에 미치는 VE영향을 알아보고자 시도하였다.

본 실험에서는 6주간 체중 증가율을 관찰한 결과 각 군별에 유의적인 변화는 나타나지 않았다. 간장 무게는 대조군에 비해 가열유를 투여한 군에서 증가하였으나 식이내 VE함량에 따른 각 군간의 유의적인 변화는 나타나지 않았다.

본 실험에서 대조군에 비해 가열유를 투여하고 VE를 40mg 첨가한 식이군인 HO군, VE를 첨가하지 않은 식이군인 HOF군의 SOD활성은 증가하였으나, GPX활성은 감소하였고, vitamin E를 200mg첨가한 식이군인 HOE식이군에서는 SOD활성은 감소, GPX활성은 증가 하였는데 이러한 결과는 산화되기 쉬운 PUFA식이와 VE함량을 달리한 식이를 흰쥐에게 섭취시켰을때 생체내 과산화적 손상을 관찰한 박<sup>33</sup> 및 이<sup>34</sup> 등의 보고와 일치하였다.

가열유 내의 분해 생성물도 다른 외래 독성물처럼 체내 대사과정에서 free radical을 생성하고, 이때 생성된  $O_2^-$  (superoxide radical)을 처리하기 위해 SOD활성이 증가하였다고 볼 수 있다. Superoxide radical은 호기적 대사기관에서 여러가지 생화학적 반응으로 생성되며, 주로 세포막 지질의 불포화지방산과 반

응하여 지질과산화물을 생성하므로 세포 손상을 초래한다고 알려져 있다.

생체는 이러한 지질과산화에 대한 반응체계로서 SOD에 의하여 superoxide radical을  $H_2O_2$ 로 바꾸며  $H_2O_2$ 는 다시 catalase와 glutathione peroxidase의 작용에 의해  $H_2O$ 로 환원되므로 이들 효소계 반응에 의해서 free radical로부터 생체를 보호할 수 있다<sup>35</sup>. 특히 간세포의 세포질 (cytoplasm)과 mitochondria 기질액 및 적혈구에 다량 존재하는 GPX는 과산화물과 환원형 glutathione과의 반응을 촉매하므로 산소 독에 의한 세포 손상을 줄인다고 한다<sup>36</sup>.

또한, 생체는 효소계반응 외에도  $\alpha$ -tocopherol과  $\beta$ -carotene에 의한 산소기로부터의 보호기전도<sup>37</sup> 가지고 있고, ascorbic acid, cysteine 및 혈액과 간조직중에 존재하는 항산화 물질인 환원형 glutathione의 항산화 작용도 보고<sup>38</sup>되어 있고, GPX같은 체내의 항산화 효소들은 여러가지 항산화 물질에 영향을 받는다는 보고<sup>39</sup>도 있다. VE는 생체내 세포막에 주로 존재하며 지질, 단백질, 효소활성, hormone등 각종 물질대사에 널리 관여하고 특히 항산화제로서 지질과 밀접한 관계가 있다<sup>40</sup>. 본 실험에서는 가열유를 투여한 군에서 VE가 결핍된 식이군인 HOF군이 VE를 충분히 가한 HOE군에 비해 간장조직내 지질 과산화 결과 생성되는 peroxide value가 증가하고 VE함량은 감소하였다. 즉, 과산화물값이 높은 군에서는 산소기들을 처리할수 있는 비 효소계인<sup>38</sup> 간장중의 VE함량이 감소하는 것으로 보아 VE는 mitochondria나 endoplasmic reticulum에서 막에 많이 존재하는 불포화지방산을 lipid peroxidation으로부터 방어하는 항산화제로 작용하여 많이 소모되었기 때문이라고 사료된다.

이와같이 본 연구에서는 산패도가 심한 가열유를 투여시 VE를 충분히 공급한 HOF군에서는 VE결핍식이군 HOF군에 비해 GPX활성이 높게 나타나므로써 과산화가가 낮아졌으나 같은양의 가열유를 투여했을 때 VE가 부족한 식이군에서는 SOD활성이 증가하여도 조직내 VE의 감소 및 GPX활성이 감소하면서 과산화가가 높아지는 결과를 나타내므로써 과산화가와 GPX활성은 역비례관계를 나타내었고 이러한 결과는 박<sup>33</sup>이 고불포화 지방식에서 VE를 결핍시켰을때도 같은 경향을 나타내었다. 또한, 본 연구에서는 GPX가 낮고, 과산화가가 높은 흰쥐 간장조직에서는 세포내 mitochondria가 swelling되고 mitochondria내의



cristae의 소실과 mitochondria등 세포의 구조적 손상이 뚜렷하게 나타났는데 이는 산패도가 심한 가열유 투여시 VE공급이 충분하지 못하면 mitochondria나 endoplasmic reticulum 막에 많이 존재하는 불포화지방산의 과산화로부터 방지하는데 VE가 충분하지 못하므로써 세포내 r-ER이나 mitochondria등의 막의 구조적, 기능적 손상을 초래하여 GPX활성이 저하되므로써 과산화물이 축적된다고 생각된다. 이등<sup>30)</sup>에 의하면 VE제거군의 간조직에서 lipid droplet가 나타났고 myelin이 형성되었다고 하였으며 Nakamura등<sup>30)</sup>은 자동산화유 투여시 lysosome과 고밀도의 granule들이 현저히 증가하였다고 보고하였다.

지금까지의 효소활성을 비롯한 과산화지질량 및 VE함량을 측정함과 아울러 전자현미경적 관찰을 종합해 볼때 산패된 가열유 섭취에 의한 생체내 과산화적 손상에 대해 VE는 식이내에 첨가된 수준의 증가에 따라 지질과산화를 감소시킴으로써 강력한 체내 항산화적 방어작용을 관찰할 수 있었다.

따라서 가열유 섭취시 초래되는 과산화적손상과 VE수준과의 관계는 중요한 과제로 보다 다각적인 연구가 이루어져야 된다고 생각된다.

요 약

가열유 섭취에 따른 동물체내에서의 과산화적 손상에 대한 연구와 VE의 식이중 첨가수준에 따라 가열유로 인한 과산화적 손상에 대한 항산화적 방어현상을 관찰하기 위하여 열화된 가열유(산가 4.02, carbonyl가 27.9, peroxide value 52.7)를 하루 총열량의 10% 그리고 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate의 양을 달리하여(0, 40, 200mg/kg of diet : HOF group, HO group, HOE group) tube feeding하면서 0, 3, 6주간씩 사육하였다. 실험종료후 쥐를 희생시켜 간장을 적출하여 과산화적 손상으로부터 생체를 보호하는 생체내 항산화적 해독기전에 관여하는 효소계인 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX)와 비효소적 방어제인 microsome 내의 VE를 측정함과 동시에 조직의 손상이나 노화의 독성이 되는 지질과산화양을 측정하였고 또한 mitochondria를 비롯한 세포내 각 소기관들의 손상을 전자현미경적으로 관찰하였다.

SOD활성도는 가열유 투여군이 대조군에 비해 다

소 높았고 GPX활성도 및 VE함량이 낮았으며 POV는 현저하게 높았다. 전자현미경적 관찰에서는 mitochondria내막과 cristae가 소실되고 핵막과 chromatin이 불규칙 하였다.

가열유 투여군에서 VE첨가수준을 각각 달리했을때 VE가 부족한 HOF식이군은 HO군, HOE군에 비해 SOD활성이 높았고, GPX활성 및 VE함량이 현저히 저하되었으며, POV가 높았으며, 세포내 mitochondria등을 비롯한 소기관들의 손상이 더욱 현저하게 나타났으나, VE를 다량 첨가한 HOE식이군에서는 HO군, HOF식이군에 비해 이러한 과산화적 손상이 경하게 나타났다. 또 이러한 현상은 3주때보다 6주에서 더 뚜렷하게 나타났다.

문 헌

1. Crampton, E. W., Common, R. H., Farmer, F. A., Wells, A. F. and Crawford, D. : *J. Nutr.*, **49**, 333 (1953)
2. 松尾登 : 油脂の加熱とする變性, *油化學*, **12**(5), 261(1963)
3. 太田靜行, 湯木脱二 : 食田油脂の加木分解, *油化學*, **26**(3), 150(1977)
4. 오영복, 김광호 : 시판 식용유의 고온 연속가열에 따르는 경시적 변화에 관한 연구. *한국영양학회지*, **11**(3), 25(1978)
5. Reporter, M. C. and Hennis, R. S. : Effects of oxidized soybean oil on the vitamin E nutrition of rat. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**, 47(1961)
6. Vergroesen, A. T. : Physiological effects of dietary linoleic acid. *Nutr. Rev.*, **35**, 1(1977)
7. 이경숙, 이순재 : 가열유가 흰쥐 간장내의 지질과산화에 미치는 영향. *한국영양학회지*, **20**(1), 15(1987)
8. Scott, M. L. : Advances in our understanding of vitamin E. *Fed. Proc.*, **39**, 2736(1980)
9. Stampfer, M. J., Willett, W., Castelli, W. P., Taylor, J. D., Fine, J. and Hennekens, C. H. : Effect of vitamin E on lipids. *Am. Soc. Clin. Pathol.*, **79**, 714(1983)
10. Tappel, A. L. : Vitamin E and selenium protection from in vivo lipid peroxidation. In "Micronutrient interreaction," Levander, O. A. and Cheng, L. (eds.), Ann. N. Y. Acad. Sci., New York., p.18(1980)
11. McCay, P. B. and King, M. : Biochemical function. In "Vitamin E. A Comprehensive treatise". Machlin, L. J. (ed), New York, Marcel Dekker, (1980)

12. Vatassery, G. T., Angerhofer, C. K., Knox, C. A. and Deshmusk, D. S. : Concentrations of vitamin E in various neuroanatomical regions and subcellular fractionations and the uptake of vitamin E by specific areas of rat brain. *Biochem. Biophys. Acta*, **792**, 118(1984)
13. Francesco, P. C., Sivana, V., Anna, M., Kevin, H. C. and Trevor, F. S. : Lipid peroxidation and molecular damage to polyunsaturated fatty acids in rat liver. Recognition of two classes of hydroperoxides formed under conditions in vivo. *Biochem. Pharm.*, **34**(1), 397(1985)
14. Zalkin, H. and Tappel, A. L. : Studies of the mechanism of vitamin E action. IV. lipid peroxidation in the vitamin E deficient rabbits. *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 113(1960)
15. 이만정 : 식품분석. 동명사, 서울, p. 84(1982)
16. 이현기 외 5인 : 식품화학실험. 수학사, 서울, p. 219(1983)
17. 최혜미, 배명숙 : 튀김재료가 튀김기름의 변화와 튀김산물에 미치는 영향. 대한가정학회지, **18**(1), 25(1980)
18. 高分子學會編 : 高分子科學實驗法. 東京化學同人, p. 179(1981)
19. Metcalfe, L. D. and Schmitz, A. A. : The rapid preparation of fatty acid esters for gaschromatographic analysis. *Anal. Chem.*, **33**, 363(1961)
20. Marklund, S. and Marklund, D. : Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469(1974)
21. Lawrence, R. A. and Back, R. F. : *J. Biochem. Res. Commun.*, **71**, 952(1976)
22. Satoh, K. : Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica. Chimica. Acta.*, **90**, 37(1987)
23. Kayden, H. J., Chow, C. K. and Bjornson, L. K. : Spectrophotometric method for determination of  $\alpha$ -tocopherol in red blood cells. *J. Lipid Res.*, **14**, 533(1973)
24. Taylor, S. L. : Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. *Lipids*, **11**, 530(1975)
25. Hawk, P. B., Oser, B. L. and Summerson, W. H. : Ferric chloride dipyriddy method (Emmenrie-Engel reaction). *Practical Physio. Chem.*, 13th ed, J LA Churchill Ltd p.1272(1956)
26. Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. : Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, **177**, 751(1949)
27. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
28. Luft, J. H. : Improvement in epoxy resin embedding method. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 409(1961)
29. Reynolds, E. S. : The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**, 208(1963)
30. Snedecor, G. W. and Cochran, W. G. : Statistical methods, 6th ed., *Iowa State University Press, Iowa*, p.1(1967)
31. 박규영, 이순재 : 식이 불포화지방산과 vitamin E 함량이 흰쥐간장내 지질과산화에 미치는 영향. 한국영양학회지, **21**(5), 295(1988)
32. 이효상, 최임순 : 정어리 섭취시 지질과산화 억제 를 위한 몇가지 산화방지제의 효과. 한국영양학회지, **22**(6), 466(1989)
33. Chow, C. K. : Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049(1969)
34. McCord, J. M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase ; An enzymatic function for erythrocyte(hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049(1969)
35. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. : Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, **59**, 527(1979)
36. Halliwell, B. : Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms ; the key role of superoxide dismutase. *Cell Biol. Int. Rep.*, **2**, 113(1978)
37. Roger A. S. and Hoekstra, W. G. : Structure, synthesis and function of glutathione peroxidase. *Nutr. Rev.*, **38**(8), (1980)
38. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : Free radicals in biology and medicine, London(1984)
39. 이양자, 조혜영, 김정숙, 한성주 : Vitamin E의 기능규명을 위한 영양 생화학적 및 병리학적 연구. 한국영양학회지, **15**(4), 277(1982)
40. Nakamura, M., Tanaka, H., Hattori, Y. and Watanabe M. : Biological effects of autoxidized safflower oils. *Lipid*, **8**(10), 566(1972)
41. Iritani, N., Fukuda, E. and Kitamura, Y. : Effect of corn oil feeding on lipid peroxidation in rats. *J. Nutr.*, **110**, 924(1980)
42. Chow, C. K., Reddy, K. and Tappel, A. L. : Effect of dietary vitamin E on the activities of the glutathione peroxidase system in rat tissues. *J. Nutr.*, **103**, 618(1973)

(1991년 1월 23일 접수)