

에탄올과 토코페롤이 간조직의 지질과산화와 미토콘드리아 산화능에 미치는 영향

최영선[†] · 서경희* · 조성희*

대구대학교 식품영양학과
*효성여자대학교 식품영양학과

Effects of Ethanol and Tocopherol on Hepatic Peroxidation and Mitochondrial Respiration in the Rat

Young-Sun Choi[†], Kyung-Hee Suh* and Sung-Hee Cho*

Dept. of Food and Nutrition, Taegu University, Kyungsan 713-714, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Hyosung Women's University, Hayang 713-702, Korea

Abstract

To investigate effects of chronic alcohol consumption and tocopherol on lipid peroxidation and mitochondrial respiration 48 male rats of Sprague-Dawley strain were divided into 4 groups. Each group received for 3 weeks one of 4 experimental diets: tocopherol deficient control (TDC), tocopherol deficient-ethanol (TDE), tocopherol-supplemented control (TSC) and tocopherol-supplemented-ethanol (TSE). Composition of the diets was based on the Lieber and DeCarli liquid diet and α -tocopherol was supplemented at the level of 30 mg/liter of diet, and ethanol supplied 36 kcal%. TDC and TSC were pair-fed to TDE and TSE, respectively. Increase of body weight of tocopherol deficient-ethanol group was the lowest and the effect was diminished with tocopherol supplementation. Respiration of liver mitochondria was depressed in ethanol-administered groups and the effect became larger with tocopherol deficiency. Hepatic lipid peroxide level was not influenced by ethanol, but hepatic tocopherol content decreased with ethanol treatment. The result indicates that, although lipid peroxide level was unchanged with chronic ethanol consumption, oxidative stress exists in tissues of rats administered ethanol and may be relieved by tocopherol supplementation.

Key words : ethanol, tocopherol, lipid peroxide

서 론

알콜은 비교적 높은 열량을 공급함에도 불구하고 알콜섭취로 인한 식사량의 감소로 영양 부족 상태를

수반하기 쉬우며, 만성적인 알콜섭취는 소화관 점막을 상하게 하므로써 영양소 흡수 장애를 일으키며, 지방간, 간염 및 간경변까지도 유발시킬 수 있어 간 기능에 큰 타격을 줄 수 있다¹⁻³.

알콜에 의한 간조직의 손상 기전에 관한 가설은 몇 가지가 있으나^{4,5}, 그 중 하나는 에탄올이 대사되는 과정에서 지질과산화가 촉진되어 간조직의 손상을 초

[†]To whom all correspondence should be addressed
이 연구는 1989년도 한국과학재단 연구비 지원에 의한 결과임. 과제번호 : 891-1509-067-1

래한다는 것이다. 만성적인 에탄올의 섭취에 의한 NADPH-cytochrome P₄₅₀ reductase의 유도에 의하거나 아세트알데히드가 xanthine oxidase나 aldehyde oxidase의 기질로 이용되면서 생성된 superoxide가 지질과산화물을 촉진한다고 본다^{8,9}. 그러나 에탄올이 지질과산화물을 증가시키는 많은 증거들이 있음에도 불구하고, 과산화지질이 에탄올 대사의 부산물로서 간 조직 손상의 원인으로 작용하는지 아니면 간조직 손상에 의한 결과로 나타난 것인지에 대한 의문이 제기된다. 지질과산화는 산화 라디칼(oxradicals)에 의해 일어나는 일반적인 산화 스트레스 상태로 보여지므로¹⁰ 이는 막을 구성하는 지질층에서 항산화 작용을 하는 비타민 E의 역할과 관계가 있으며 glutathione의 항산화 역할과도 관련되는 것으로 보고되었다. 에탄올을 섭취시킨 흰쥐에서 간조직의 glutathione의 농도가 감소했으며¹¹⁻¹³ Shaw 등¹⁴은 식이에 glutathione의 전구체인 methionine를 강화한 식이를 섭취한 흰쥐에서는 지질과산화가 감소되었다고 보고하였다.

알콜 섭취 경험이 없는 쥐에게 다량의 에탄올(5~6g/kg)을 투여했을 때 지질과산화가 증가했으나¹¹⁻¹³, 소량(3g/kg)은 영향이 없었다¹⁰. 반면에 만성적으로 알콜을 섭취해 온 쥐에서는 소량(3g/kg)의 투여로도 지질과산화를 촉진시킬 수 있었으며, Baboon에 있어서는 1~2g/kg에 해당하는 양을 투여했을 때 과산화지질이 증가되었다¹⁰. 한편 영양적으로 균형 식이(balanced diet)를 섭취하면서 moderate drinking에 해당하는 양의 알콜을 만성적으로 섭취한 쥐들에 있어서 간장의 과산화지질 함량의 유의한 증가가 보이지 않았다¹⁰. 따라서 에탄올이 지질과산화에 미치는 영향은 섭취하는 알콜의 양, 급성 또는 만성 여부, 사용 동물의 종류 및 식이의 항산화제 수준 등에 의하여 좌우된다고 본다.

산화 스트레스가 주어진 조건하에서는 항산화제의 pool이 현저히 감소되며 이때 항산화제의 첨가로 지질과산화가 효과적으로 억제될 수 있다¹⁵. 이와 같은 현상은 peroxidizability index가 높은 식이 지방을 섭취시킨 흰쥐의 간조직에서 토코페롤의 수준이 현저하게 감소된 결과¹⁶에서도 보여진다. 따라서 어떤 system에서 비록 과산화지질 함량은 변화가 없더라도 토코페롤과 같은 생체막 수준에서 작용하는 항산화제의 고갈은 산화 스트레스 상태를 간접적으로 확인시켜 준다고 볼 수 있다.

알콜에 의한 간조직 손상 기전의 또 다른 가설로서

에탄올의 산화과정의 중간대사 산물인 아세트알데히드의 축적이 미토콘드리아의 기능을 저하시켜 미토콘드리아를 손상시킬 수 있다^{3,17,18}는 것이다.

이에 본 연구에서는 흰쥐를 실험동물로 하여 식이 토코페롤 수준을 달리 한 상태에서, 만성적인 에탄올 섭취 후 간장과 심장의 과산화지질 함량의 변화를 보고자 하였으며, 식이 토코페롤 함량이 조직의 토코페롤 수준 및 항산화효소 활성화와 미토콘드리아 중효능의 하나인 산화능에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

식이성분으로 사용한 salt mix는 Teklad사(Madison, Wisconsin, U.S.A.)에서 구입하였으며, vitamin-free casein, 셀룰로스, 덱스트린, 옥수수유, xanthan gum 및 모든 비타민 성분은 Sigma사 제품을 사용하였다. α-토코페롤, glutathione, glutathione reductase, NADPH, TRIS, mannitol, bovine serum albumin, ADP, pyruvate, malate 및 pyrogallol은 Sigma사로부터 구입하였으며, 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane은 Merck사 제품을 사용하였다.

실험동물 및 식이조제

체중이 200g 정도의 Sprague-Dawley 종 숫쥐 48마리를 한국화학연구소에서 공급 받아 일반고형사료로 일정기간 사육하여 체중이 250~260g이 되었을 때, Table 1에 표시된 4군으로 무작위로 나눈 후 실험식을 시작하였다.

실험식의 조성(Table 2)은 Lieber와 DeCarli에 의해 고안된 liquid diet¹⁹의 조성을 기본으로 하였으나,

Table 1. Experimental design

Experimental group*	Tocopherol supplemented	Ethanol
	mg/liter	g/liter
TDC	0	0
TDE	0	50
TSC	30	0
TSE	30	50

*TDC : Tocopherol deficient control

TDE : Tocopherol deficient-ethanol

TSC : Tocopherol supplemented control

TSE : Tocopherol supplemented-ethanol

Table 2. Composition of experimental diets

Ingredients	Gram/liter (1000kcal) liquid diet			
	TDC	TDE	TSC	TSE
Vitamin-free casein	41.4	41.4	41.4	41.4
L-cystine	0.5	0.5	0.5	0.5
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn oil	7.8	7.8	7.8	7.8
Olive oil	14.18	14.18	14.18	14.18
Dextrin-maltose	152.7	63.1	152.7	63.1
α -Cellulose	10.0	10.0	10.0	10.0
Xanthan gum	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline chloride	0.25	0.25	0.25	0.25
Vitamin mix ¹⁾	2.5	2.5	2.5	2.5
Salt mix ²⁾	8.75	8.75	8.75	8.75
Ethanol	0	50	0	50
DL- α -Tocopherol acetate	0	0	30mg	30mg

¹⁾Vit E-free vitamin mix(per kg diet) : Thiamin HCl ; 0.6g, Riboflavin ; 0.6g, Pyridoxine HCl ; 0.7g, Niacin ; 3.0g, Calcium pantothenate ; 1.6g, Folic acid;0.2g, Biotin ; 0.02g, Vitamin B₁₂ (cyanocobalamin) ; 0.01g, Vitamin A (retinyl acetate), 500,000 usp units/g ; 4.8g, Vitamin D (40,000,000 usp units/g ; 0.004g, Menadione sodium bisulfite complex ; 0.05g, p-Aminobenzoic acid ; 5.0g, Inositol ; 10.0g, Glucose ; 973.415g

²⁾Mineral mix, AIN-76 to which 0.06g sodium fluoride per kg was added

지방 함량을 20kcal%로 낮추기 위하여 탄수화물을 늘였고 P/S비를 2로 조정하였다. TDC와 TDE식은 1리터 당 약 11mg의 토코페롤을 함유하였으며, TDE와 TSE 식이는 에탄올을 5% (w/v) 수준으로 첨가하였으며, 이 양은 식이 열량의 36%에 해당하였다. 5% 에탄올 식이를 시작하기 전에 실험식이와 조성은 같으나 에탄올 농도를 1%와 3%로 하는 적응 식이를 각각 3일씩 준 후 5% 에탄올 식이를 3주 동안 섭취시켰다. 매일 같은 시각에 식이섭취량을 조사하여 TDC와 TSC군은 TDE와 TSE군에 각각 pair-feeding 하였다. 물은 자유로이 섭취시켰으며, 2일 마다 식이를 급여하기 전에 체중을 측정하였다.

분석시료처리

16시간 절식시킨 쥐를 에테르로 마취시켜 개복하여 간장과 심장을 적출하여 무게를 달았다. 간장의 일부분을 취하여 정확히 무게를 잰 후, sucrose/EDTA (0.25M/1mM) 냉용액에 넣어 세절하고 세번 수세하여 혈액을 제거한 다음, sucrose/EDTA 용액 내에서 마쇄기 (Potter-Elvehjem homogenizer) 로 분쇄하여 10% 마쇄액을 만들어 원심분리 (600×g, 5분) 하였다. 이 상등액을 다시 원심분리 (10,000×g, 10분) 하여 얻어진 mitochondrial pellet을 약 10ml의 상기 sucrose/EDTA 용액에 분산시켜 다시 원심분리 (10,000×g, 10분) 하여 얻어진 mitochondrial pellet에 상

기용액을 약 0.4ml 넣어 분산시킨 후 산화능 측정에 사용하였다. 10,000×g에서 원심분리하여 얻어진 첫 번째 postmitochondrial fraction의 일부를 취하여 superoxide dismutase 활성 측정 시료로 사용하였으며, 나머지는 상기 sucrose/EDTA 용액을 첨가하여 105,000×g에서 60분간 원심 분리하여 얻은 상등액 (cytosol)을 glutathione peroxidase 활성 측정 시료로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 0~4℃에서 실시하였다.

한편 간장의 남은 조직과 심장은 신속하게 액체 질소로 냉각시킨 크랩프로 눌러 급속히 동결시켜 -60℃에 보관하였다가 과산화지질, 토코페롤 및 아세트 알데히드 정량 시료로 사용하였다.

간 미토콘드리아 산화능 측정

미토콘드리아의 산소 소모량 및 호흡지수는 Gilson Oxygraph (Model 5/6H) 에 의하여 37℃에서 측정하였다. 기본 medium은 110mM KCl, 33mM TRIS (pH 7.4), 5mM MgCl₂, 5mM K₂HPO₄로 구성되었으며 5mM glutamate를 기질로 사용하였고 0.5mM malate를 TCA 촉매 물질로 사용하였다.

총 incubation medium은 2ml로 기본 medium의 초기 산소 함량을 37℃에서 1ml 당 390ng atom으로 측정²⁰⁾하여 총산소량을 780ng atom으로 하여 계산에 이용하였다. 산소 소모율은 ng atom O/mg mitochon-

ndrial protein/min으로 계산하였고, 200 μ moles의 ADP를 가한 후 나타나는 state 3과 ADP 소모 후 나타나는 state 4의 각각의 호흡을 조사한 후 state 3/state 4의 비율로 respiratory control을 계산하였고 P/O ratio는 200 μ moles의 ADP를 인산화시키는 과정에 소모된 산소의 양으로부터 계산하였는데 이 때 합성된 ATP의 양은 P/O \times state 3 respiration으로 계산하였다.

효소활성측정

Postmitochondrial fraction의 superoxide dismutase의 효소 활성은 Marklund와 Marklund법²⁰⁾을 약간 변형한 Zidenberg-Cherr 등의 방법²¹⁾에 의하였다. TRIS-cacodylic acid (50 mM, pH 8.2) buffer 2.9ml에 post-mitochondrial fraction 0.1ml를 넣고 0.1M pyrogallol 수용액 0.05ml를 첨가하여 섞은 후, 420nm에서 recorder로 4분간 흡광도를 기록하였다. 흡광도의 기울기로부터 pyrogallol 산화를 50% 억제하는 효소의 양을 효소 활성의 1 단위로 하였다.

Glutathione peroxidase 활성은 Paglia와 Valentine의 방법²²⁾을 변형한 Lawrence와 Burk의 방법²³⁾으로 측정하였다. 반응 혼합물은 50mM potassium phosphate buffer (pH 7), 1mM EDTA, 1mM NaN₃, 0.2ml NADPH, 1 E.U./ml GSSG-reductase, 1mM GSH, 0.25mM H₂O₂로 이루어졌으며, 측정 부피는 3ml, 반응온도는 25 $^{\circ}$ C였다. 간 cytosol 0.1ml를 첨가한 후, 0.3ml의 H₂O₂를 첨가하여 섞은 즉시 340nm에서 흡광도를 4분간 기록하였다. 기울기로부터 계산된 단위 분 당 산화된 NADPH μ moles를 효소 활성으로 하였다.

Catalase 활성은 Luck의 방법²⁴⁾으로 측정하였으며, 간장 마쇄액(10%)을 50mM phosphate buffer로 800배 희석한 후, 2.0ml의 희석된 시료액에 1.0ml의 H₂O₂(30mM)를 첨가하여 240nm에서 흡광도를 2분간 기록하였다. Catalase의 활성단위는 분 당 산화된 H₂O₂ μ moles로 하였다.

토코페롤의 정량

0.9% NaCl로 만든 10% 간장마쇄액 0.5ml에 2% pyrogallol 5.0ml과 포화 KOH 용액 0.3ml를 가하여 검화시킨 후, hexane으로 추출하여 원심분리 후 hexane phase를 시료로 하여 ferric-chloride dipyridyl 법(Emmerie-Engel reaction)²⁵⁾에 의해 정량하였다. 표

준품으로 DL- α -tocopherol을 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

과산화지질의 정량

간장조직의 과산화지질의 정량은 Ohkawa의 TBA법²⁶⁾에 의하여 측정하였고 표준검량선을 얻기 위하여 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane을 표준품으로 사용하였다.

단백질 정량

간장조직 마쇄액과 mitochondrial suspension 및 postmitochondrial fraction의 단백질 농도는 Biuret법²⁶⁾으로 측정하였고, cytosol 분획의 단백질 농도는 Lowry법²⁷⁾에 의하였다. 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하였다.

아세트알데히드의 정량

동결된 간장 조직을 액체질소내에서 식힌 mortar속에서 가루로 만들어 0.5g을 취하여 ice-cold perchloric acid(0.6N/40mM thiourea)를 가하여 10% 용액을 만들었다. 상등액 0.5ml를 취하여 head-space sample vial에 옮겨 65 $^{\circ}$ C에서 15분간 둔 후, head-space gas chromatography(Hewlett Packard, Model No. 19395 A)로 분석하였으며 분석 조건은 Eriksson의 방법²⁸⁾에 의하였다.

통 계

실험 결과는 평균치와 표준오차를 산출하였고 각 실험군의 평균치간의 검증은 Anova와 Duncan's multiple range test로 검증하였다. 알콜과 토코페롤 각각의 효과와 알콜과 토코페롤 상호작용에 의한 효과는 이원변량분석에 의하여 검증하였다.

결과 및 고찰

식이 섭취량, 성장률 및 심장과 간의 무게비

Fig. 1은 실험기간 동안의 흰쥐의 체중 변화를 보여주며, 27일간의 액체식이 섭취 후의 흰쥐의 식이섭취량, 성장률 및 조직의 무게비는 Table 3에 나타난 바와 같다. 흰쥐의 성장 곡선에서 액체식이의 시작 후 6일이 경과하면서 체중의 감소가 보이는 것은 6일 째에 5% 에탄올 식이 시작으로 식이 섭취량이 갑자

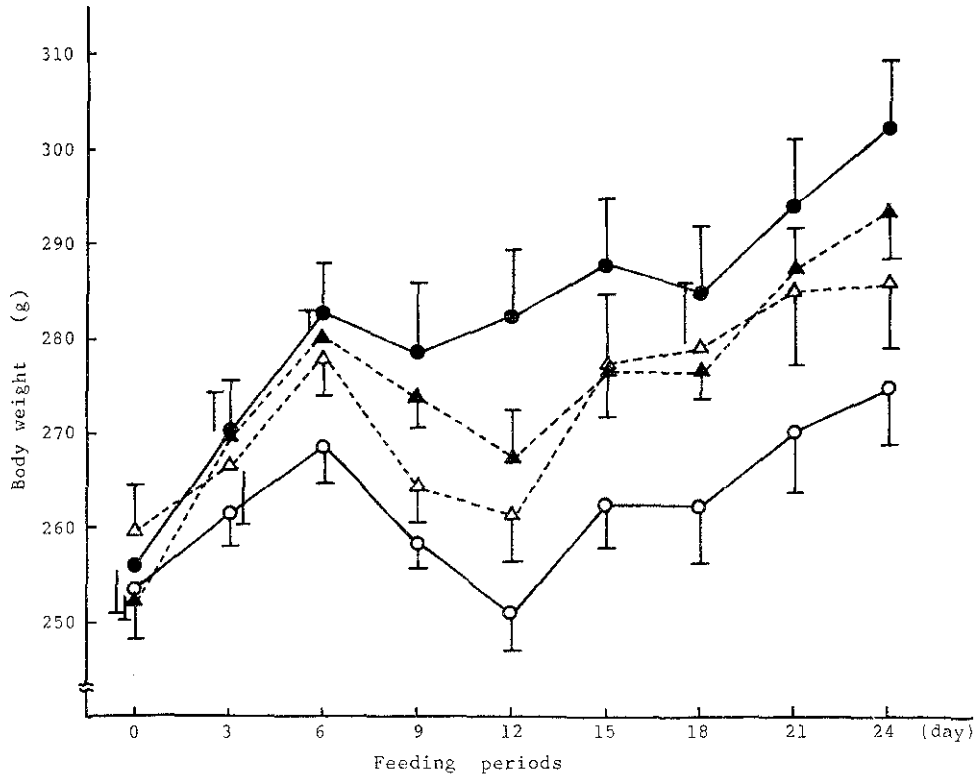


Fig. 1. Growth curves of rats red experimental diets. Points with error bars are means \pm SEM of body weights of 12 rats. ●-●, TDC ; ○-○, TDE ; ▲-▲, TSC ; △-△, TSE

Table 3. Effects of tocopherol and ethanol on food intake, weight gain, and relative weights of heart and liver

Group	Food intake	Weight gain	Relative heart weight	Relative liver weight
	ml/day	g/day	% body weight	% body weight
TDC	61.9 \pm 0.91 ^{NS}	1.86 \pm 0.233 ^a	0.93 \pm 0.024 ^{NS}	2.91 \pm 0.058 ^b
TDE	61.9 \pm 0.91	0.94 \pm 0.158 ^b	0.88 \pm 0.019	3.63 \pm 0.055 ^a
TSC	61.9 \pm 0.46	1.50 \pm 0.195 ^{ab}	0.91 \pm 0.016	2.97 \pm 0.074 ^b
TSE	61.9 \pm 0.46	1.02 \pm 0.136 ^{bc}	0.91 \pm 0.025	3.59 \pm 0.086 ^a

Mean \pm SEM (n=12)

Means not followed by the same letter within a column are significantly different at the p < 0.05 level (Duncan's multiple range test)

NS ; not significant

기 줄어들었기 때문이며 그 후 점차 적응하므로써 서서히 체중이 다시 증가되고 있음을 볼 수 있다.

TDC군과 TSC군은 TDE군과 TSE군의 전일 식이섭취량과 같은 양을 각각 pair-feeding 하였으므로, 식이섭취량은 군간에 동일하였으며, 토코페롤 첨가에 따른 식이섭취량의 차이는 없었다. 토코페롤을 첨가하지 않은 TDC군과 TDE군간에는 성장율이 2배 정도 차이가 났으나 토코페롤을 첨가한 TSC군과 TSE

군간의 차이는 유의하지 않았으므로, 토코페롤이 부족한 식이에서 에탄올에 의한 성장 저해가 뚜렷한 반면에 토코페롤이 첨가된 경우 에탄올의 성장 저해가 유의하게 완화되었다.

알콜섭취 후 발생하는 간조직 손상이 에탄올의 직접적인 효과인지 알콜섭취로 인한 영양소 섭취 부족에서 오는 것인지를 좀 더 명확히 조사하기 위하여 고안된 Lieber와 DeCarli의 liquid diet¹⁹⁾는 에탄올을

Table 4. Contents of tocopherol and lipid peroxide of rat tissues

Group	Liver tocopherol	Liver lipid peroxide	Heart lipid peroxide
	$\mu\text{g}/\text{mg protein}$	malondialdehyde nmole/100mg protein	
TDC	1.11 ± 0.078^{ab}	154.8 ± 8.69^a	148.9 ± 35.49^{NS}
TDE	0.72 ± 0.065^c	164.4 ± 12.27^a	132.3 ± 20.76
TSC	1.15 ± 0.035^a	122.3 ± 6.95^b	124.1 ± 22.21
TSE	0.94 ± 0.055^b	125.0 ± 9.32^b	109.0 ± 21.50

Mean \pm SEM (n=12)Means not followed by the same letter within a column are significantly different at the $p < 0.05$ level (Duncan's multiple range test)

NS ; not significant

첨가하는 대신에 탄수화물 함량을 낮추고 나머지 영양소는 동등한 농도로 하였기 때문에 성장 저해가 토크페롤을 제외한 타영양소의 결핍에서 비롯되었을 가능성은 배제되었다. 에탄올의 만성적 섭취는 microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) 을 유도하여 에탄올의 산화 과정에서 NADPH를 소모하므로써 에너지의 낭비를 초래하는 것³¹⁾으로 알려져 있다.

체중에 대한 간 무게비는 TDE군과 TSE군에서 TDC와 TSC군에 비하여 유의하게 증가하였으며, 토크페롤 첨가에 따른 차이는 없었다. 간장의 비대화 (hepato-megaly) 현상은 만성적인 에탄올 섭취시 나타나는 초기증상의 하나로서 간세포 cytosol에 지방, 단백질, 수분의 증가로 인한 세포용적의 증가에 기인하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 한편, 체중에 대한 심장의 무게비는 군간에 차이가 없었다.

간의 토크페롤 함량과 간과 심장의 과산화지질 함량

간의 토크페롤 함량 (Table 4) 을 보면 TDE군은 TDC군에 비하여, TSE군은 TSC군에 비하여 유의하게 낮았으며 TSE군은 TDE군에 비하여 유의하게 높았으나 TDC군과 TSC군 간에는 차이가 없었다. 만성적으로 에탄올을 섭취한 쥐에서는 식이 토크페롤의 첨가로 간의 토크페롤 함량이 증가하였으나, 이원변량 분석 결과에서 식이 토크페롤 첨가에 의한 효과 ($p < 0.05$) 보다 에탄올 섭취효과 ($p < 0.001$) 가 간장 토크페롤 함량에 미치는 영향이 더 큰 것으로 나타났다. 토크페롤은 생체막에서 가장 효과적인 항산화제이며 지질보다 수 배나 빠른 속도로 과산화 radical과 반응한다³²⁾는 점에서 막의 안정과 기능에 영향을 미

Table 5. Activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase of hepatic tissue

Group	Superoxide dismutase	Glutathione peroxidase	Catalase
	Units/mg protein	$\mu\text{moles NADPH}/\text{min}/\text{mg protein}$	$\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg protein}$
TDC	5.52 ± 0.504^{NS}	356.3 ± 24.88^{ab}	172.3 ± 12.15^{NS}
TDE	5.13 ± 0.561	328.6 ± 23.48^b	159.3 ± 13.22
TSC	5.13 ± 0.530	418.8 ± 24.13^a	153.2 ± 9.10
TSE	4.42 ± 0.436	332.4 ± 17.81^a	178.1 ± 14.31

Mean \pm SEM (n=10)Means not followed by the same letter within a column are significantly different at the $p < 0.05$ level (Duncan's multiple range test)

NS ; not significant

치게 되며 산화된 토크페롤은 glutathione-비타민 C를 포함하는 repair mechanism을 통하여 다시 재생될 수도 있다³³⁾.

간의 과산화지질의 함량은 Table 4에서 보는 바와 같이 에탄올 섭취에 의한 영향은 없는 반면에, 토크페롤 결핍식을 섭취한 경우에 간의 과산화지질 함량이 유의하게 증가하였으며, 심장에서도 비슷한 경향이었으나 그 효과가 통계적으로 유의하지 않았다. 에탄올로 인한 간 손상이 지질과산화와 관계가 있는지는 여전히 논란이 되고 있으며, 흰쥐에서 에탄올 투여 후 지질과산화가 촉진되었다는 보고들에서는 fasting 후 에탄올을 주거나 많은 양의 에탄올을 투여한 경우였다^{11~13, 34)}.

본 연구에서 에탄올 섭취 후 조직내 과산화지질의 증가가 없었음에도 불구하고, 에탄올을 섭취한 쥐 간의 토크페롤 함량이 유의하게 감소하였음은 에탄올의 대사과정에서 토크페롤의 소모가 높아졌음을 의미하며 조직내에 산화 스트레스가 증가했음을 시사한다. 식이 토크페롤이 부족한 경우에 만성적인 에탄올의 섭취는 생체내 산화 스트레스를 증가시키며 토크페롤의 소모율이 높아져 조직의 토크페롤 pool을 감소시키고 따라서 지질과산화가 증가되어 생체막의 손상을 초래케 될 것으로 보며, 이 때 식이 토크페롤의 증가로 산화 스트레스를 완화시킬 수 있으리라 사료된다.

간장의 항산화관련 효소들의 활성화

지질과산화와 관련된 효소들의 활성화는 Table 5에서 보는 바와 같이 superoxide dismutase의 활성화는 군간

Table 6. Oxidative activity of hepatic mitochondria

Group	O ₂ consumption ng atom/mg protein/min	P/O ratio	Respiratory control	ATP synthesis nmole / mg protein / min
TDC	60.5±2.03 ^a	1.87±0.059 ^{NS}	2.49±0.091 ^{ab}	113.3±5.45 ^a
TDE	51.2±2.16 ^b	1.67±0.057	2.49±0.152 ^{ab}	85.3±3.11 ^b
TSC	61.5±2.63 ^a	1.79±0.095	2.86±0.154 ^a	110.2±7.63 ^a
TSE	55.5±4.36 ^{ab}	1.63±0.084	2.29±0.137 ^b	90.5±8.08 ^b

Mean ± SEM (n=8)

Means not followed by the same letter within a column are significantly different at the p<0.05 level (Duncan's multiple range test)

NS ; not significant

에 유의한 차이는 없었으며 이러한 결과는 에탄올의 급성³⁵⁾ 및 만성적³⁶⁾ 투여 후 superoxide dismutase의 활성이 증가하였다는 보고와는 일치하지 않았다. 에탄올 첨가군인 TDE군과 TSE군의 glutathione peroxidase활성이 TSC군에 비하여 유의하게 감소되었으며 catalase활성은 차이가 없었다.

간 미토콘드리아 산화능

미토콘드리아의 중요한 기능들인 호흡능과 산화적 인산화 반응이 에탄올과 토코페롤 첨가에 의하여 영향을 받은 것으로 나타났다. Table 6에서 보는 바와 같이 TDC군에 비하여 TDE군의 간 미토콘드리아의 산소 소모량이 유의하게 감소하였으며, TSC군에 비하여 TSE군의 산소 소모량도 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. 토코페롤 부족시 에탄올 섭취로 인하여 ATP합성율은 25%나 저하되었고, 토코페롤이 첨가된 식이를 섭취한 군에서는 에탄올 섭취로 인하여 ATP합성율이 18% 저하되었다.

이상의 결과를 볼 때, 본실험에서 에탄올 식이후 저하된 간 미토콘드리아의 산화능이 생체막에 축적된 과산화지질에 기인된 것이 아님을 알 수 있다. 만성적인 에탄올 섭취 후 간 미토콘드리아막의 지질 조성의 변화³⁷⁾, 원형질막 인지질의 지방산 조성 변화³⁸⁾, 미토콘드리아의 구조변화³⁹⁾ 및 미토콘드리아 단백질의 합성과 turnover율의 변화⁴⁰⁾ 등이 가능하며, 따라서 미토콘드리아의 기능적인 변화도 초래될 수 있을 것이다.

만성적인 에탄올 섭취 후 간 미토콘드리아의 기능 저하와 형태 변형의 원인으로서는 에탄올 대사에서 생성되는 아세트알데히드의 축적으로 미토콘드리아가 손상된다고 추정되었으며^{3,17,41,42)}, 아세트알데히드는 미토콘드리아의 중요한 기능의 하나인 산화능을 직접

적으로 억제한다고 보고되었다¹⁶⁾. 본연구에서 16시간 fasting 후 희생된 쥐의 간조직의 아세트알데히드의 양이 극미량에 불과했으므로 에탄올 섭취군에서 미토콘드리아 기능이 유의하게 저하된 것은 in vitro assay에서 아세트알데히드의 영향은 아닌 것으로 사료된다.

요 약

에탄올과 토코페롤이 흰쥐 간의 지질과산화와 미토콘드리아 산화능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley 종 255g 내외의 숫쥐 48마리를 4종류의 실험식으로 3주간 사육하였다. 실험식은 토코페롤 결핍식이(TDC), 토코페롤 결핍-에탄올 식이(TDE), 토코페롤 첨가식이(TSC) 및 토코페롤 첨가-에탄올 식이(TSE)로서 Lieber와 DeCarli의 liquid diet의 조성을 기본으로 하여 토코페롤 첨가는 리터 당 30mg으로 하였고 에탄올은 36kcal%에 해당하는 양을 탄수화물에 대체하였으며, TDC군과 TSC군은 TDE군과 TSE군에 각각 pair-feeding 하였다.

4군간에 식이 섭취량은 같았으나 체중 증가에 있어서 TDE군은 TDC군에 비하여 유의하게 낮은 반면에 TSE군과 TSC군의 차이는 유의하지 않았다. 체중에 대한 간 무게비는 에탄올 급여군에서 유의하게 높았으나 토코페롤에 의한 차이는 없었다. 간 미토콘드리아의 산소 소모량과 ATP 합성율이 에탄올 급여군에서 유의하게 감소되었으며, 토코페롤 결핍시 감소 현상이 더 현저하였다. 간의 과산화지질함량은 토코페롤 결핍식이군에서 증가하였으며 에탄올 급여에 의한 차이는 없었으나, 간의 토코페롤 함량은 에탄올 급여군에서 유의하게 감소되었다. 이는 에탄올의 대사 과정에서 더 많은 토코페롤이 소모되었다고 보여지므로

에탄올은 조직내에서 산화 스트레스를 주었음을 간접적으로 시사하며 이와 같은 현상은 식이에 토코페롤의 첨가로 완화될 수 있었다.

문헌

1. Mezey, E. : Alcoholic liver disease : roles of alcohol and malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 2709(1980)
2. Mitchell, M. C. and Herlong, H. F. : Alcohol and nutrition : caloric value, bioenergetics, and relationship to liver damage. *Ann. Rev. Nutr.*, **6**, 457(1986)
3. Badaway, A. A. B. : Nutrition and the biochemical pathology of the alcohol-induced liver injury. *Alcohol and Alcoholism*, **20**, 175(1985)
4. Lieber, C. S. : Alcohol and the liver : Metabolism of ethanol, metabolic effects and pathogenesis of injury. *Acta Med. Scand., Suppl.* **703**, 1(1985)
5. Lieber, C. S. and DeCarli, L. M. : Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase : activity enhanced by ethanol consumption. *Science*, **170**, 78(1970)
6. Kaplowitz, N., Fernandez-Checa, J. and Ookhtens, M. : Glutathione, alcohol and hepatotoxicity. In "Nutrition and the Origins of Disease", Halsted, C. H. and Rucker, R. B. (eds.), Academic Press, New York. p.269 (1989)
7. Videla, L. A., Fernandez, V., Ugante, G. and Valenzuela, A. : Effect of acute ethanol intoxication on the content of reduced glutathione of the liver in relation to its lipoperoxidative capacity in the rat. *FEBS letter*, **111**, 6(1980)
8. Spisky, H., McDonald, A., Giles, G., Orrego, H. and Israel, Y. : Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. *Biochem. J.*, **225**, 565(1985)
9. Fernandez-Checa, J. C., Ookhtens, M. and Kaplowitz, N. : Effect of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. Compartmentation, efflux, and response to incubation with ethanol. *J. Clin. Invest.*, **80**, 57(1987)
10. Shaw, S., Jayatilleke, R., Ross, W. A., Gordon, E. R. and Lieber, C. S. : Ethanol induced lipid peroxidation: potentiation by chronic alcohol feeding and attenuation by methionine. *J. Lab. Clin. Med.*, **98**, 417(1981)
11. Diluzio, N. R. : The effect of acute ethanol intoxication on liver and plasma lipid fractions in the rat. *Am. J. Physiol.*, **194**, 453(1968)
12. Comporti, M., Beneditte, A. and Chieffi, E. : Studies on in vitro peroxidation of liver lipids in ethanol-treated rats. *Lipids*, **8**, 498(1973)
13. MacDonald, C. M. : The effects of ethanol on hepatic lipid peroxidation and on the activities of glutathione reductase and peroxidase. *FEBS Letters*, **35**, 227(1973)
14. 최영선, 정경희, 조성희, 최경호 : 에탄올과 식이 지방량이 흰쥐의 혈액성상 간조직에 미치는 영향. *한국영양식량학회지*, **19**, 1(1990)
15. Tirmenstein, M. and Reed, D. J. : Effects of glutathione on the α -tocopherol-dependent inhibition of nuclear lipid peroxidation. *J. Lipid Res.*, **30**, 959(1989)
16. Chautan, M., Calaf, R., Leonardi, J., Charbonnier, M., Andre, M., Portugal, H., Pauli, A. M., Lafont, H. and Nalbone, G. : Inverse modifications of heart and liver α -tocopherol status by various dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratios. *J. Lipid Res.*, **31**, 2201(1990)
17. Lieber, C. S., DeCarli, L. M., Feinman, L., Hasumura, Y., Korston, M., Matsuxaki, S. and Teschke, R. : Effect of chronic alcohol consumption on ethanol and acetaldehyde metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **59**, 185(1975)
18. Cederbaum, A. I. and Rubin, E. : Protective effect of cysteine on the inhibition of mitochondrial functions by acetaldehyde. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 963(1976)
19. Lieber, C. L. and DeCarli, L. M. : The feeding ethanol in liquid diets. *Alcoholism : Clin. Exp. Res.*, **10**, 550(1986)
20. Estabrook, R. W. : Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratios. *Methods in Enzymology*, **10**, 41(1967)
21. Marklund, S. and Marklund, G. : Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469(1974)
22. Zidenberg-Cherr, S., Hurley, L. S., Lonnerdal, B. and Keen, C. L. : Manganese deficiency : Effects on susceptibility to ethanol toxicity in rats. *J. Nutr.*, **115**, 460(1985)
23. Paglia, D. E. and Valentine, W. N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158(1967)
24. Lawrence, R. A. and Burk, R. F. : Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952(1976)
25. Luck, H. : Catalase. In "Methods of Enzymatic Analysis", Bergmeyer, H. U. (ed.), Academic Press, New York. p.885 (1963)
26. Hawk, P. B., Oser, B. L. and Summerson, W. H. : Ferric chloride dipyriddy method(Emmeri-

- Engel reaction). *Practical Physio. Chem.*, 13th ed. p.1272 (1956)
27. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351 (1979)
 28. Gornall, A. G., Bardwill, C. J. and Davis, M. M. : Biuret method for protein. *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949)
 29. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. T. : Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
 30. Eriksson, C. J. P., Sippel, H. W. and Forsander, O. A. : The determination of acetaldehyde in biological samples by head-space gas chromatography. *Anal. Biochem.*, **80**, 116 (1977)
 31. Teschke, R., Moreno, F. and Petrides, A. S. : Hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) : Respective roles of ethanol and carbohydrates for the enhanced activity after chronic alcohol consumption. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1745 (1981)
 32. Malonino, M., Coassin, M., Roveri, A. and Ursini, F. : Microsomal lipid peroxidation : Effects of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxides and selected oxidants. *Lipids*, **24**, 721 (1989)
 33. Tamai, H., Miki, M., Yasuda, H., Maeda, H. and Mino, M. : Effects of α -tocopherol on membrane oxidation. In "Clinical and nutritional aspects of vitamin E", Hayaishi, O. and Mino, M. (eds.), Elsevier Sci Publishers, Amsterdam. p.317 (1987)
 34. Sinaceur, J., Ribiere, C., Sabourault, D. and Nordmann, R. : Superoxide formation in liver mitochondria during ethanol intoxication : possible role in alcohol hepatotoxicity. *Free Radicals Liver Inj.*, Proc. Int. Meet., 1st. p.175 (1985)
 35. Valenzuela, A., Fernandez, N., Fernandez, V., Ugarte, G. and Videla, L. A. : Effect of acute ethanol ingestion on lipoperoxidation and on the activity of the enzymes related to peroxide metabolism in rat liver. *FEBS Letters*, **111**, 11 (1980)
 36. Keen, C. L., Tamura, T., Lonnerdal, B., Hurley, L. S. and Halsted, C. H. : Changes in hepatic superoxide dismutase activity in alcoholic monkeys. *Am. J. Clin. Nutr.*, **41**, 929 (1985)
 37. Foudin, L., Sun, G. Y. and Sun, A. Y. : Changes in lipid composition of rat heart mitochondria after ethanol administration. *Alcoholism : Clin. Exp. Res.*, **10**, 606 (1986)
 38. Lee, H. and Hosein, E. A. : Adaptive changes in rat liver plasma membranes after chronic alcohol administration and its subsequent withdrawal. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **64**, 85 (1986)
 39. Rouach, H., Clement, M., Orfanelli, M.-T., Janvier, B., Nordmann, J. and Nordmann, R. : Hepatic lipid peroxidation and mitochondrial susceptibility to peroxidative attacks during ethanol inhalation and withdrawal. *Biochim. Biophys. Acta*, **753**, 439 (1983)
 40. Hofmann, I. and Hosein, E. A. : Effects of chronic ethanol consumption on the rate of rat liver mitochondrial protein turnover and synthesis. *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 457 (1978)
 41. Kiessling, K.-H. : The effect of acetaldehyde on mitochondrial respiration. *Exp. Cell Res.*, **30**, 569 (1963)
 42. Matsuzaki, S. and Lieber, C. S. : Increased susceptibility of hepatic mitochondria to the toxicity of acetaldehyde after chronic ethanol consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 1059 (1977)

(1991년 7월 12일접수)