

식이중의 Methionine이 흰쥐의 체내 지질과산화와 간 미세구조에 미치는 영향

서정숙 · 양경미 · 박원학* · 정형재* · 이용덕*

Effect of Dietary Methionine on Lipid Peroxidation and Hepatic Ultrastructural Changes in Rat

Seo, Jung Sook, Kyung Mi Yang, Won Hark Park,*
Hyeung Jae Chung* and Yong Deok Lee*

(Received January 20, 1991)

Abstract

To study the effects of dietary methionine level on lipid peroxidation of rats, rats were fed vitamin E, selenium and methionine-deficient diet or the same diet supplemented with various levels (0.3%, 0.6%, 0.9%) of methionine for 6 weeks. The biochemical and morphological changes in the rat liver were investigated. Lipid peroxide levels in plasma and hepatic mitochondrial fraction of MF rats were more increased than those of control rats. However, supplementation with 0.6% methionine modified this increment. Catalase activity was decreased in hepatic mitochondrial fraction from rats fed MF diet. Methionine supplementation did not induce this enzyme.

The ultrastructural evidence for lipid peroxidation was found in plasma membranes facing sinusoids. The most striking changes including disruption and loss of microvilli and development of numerous lipid droplets occurred in rats fed MF diet. These changes were not effectively prevented by the same diet supplemented with 0.3% or 0.9% methionine, but supplementation with 0.6% methionine modulated more or less the changes.

영남대학교 가정대학 식품영양학과

*영남대학교 이과대학 생물학과

서 론

비타민 E와 Selenium(Se)은 고 불포화 지방산이 풍부한 세포막의 산화적 손상에 대하여 보호작용을 나타내는 영양소로서 생체막의 안정성 유지에 중요한 역할을 담당한다(Alfin-Slater, 1977 ; Yarrington and Whitehair, 1975 ; Tappel, 1973). 따라서 이러한 영양소들의 결핍은 인지질이 풍부한 mitochondria, microsome, 적혈구막등의 생체막에서 지질 과산화를 유도하여 free radical을 생성하고 세포의 기질적 손상을 초래한다. 이러한 free radical의 형성은 Xenobiotics의 대사과정과 불균형적인 식이에서는 물론 정상적인 호흡과정(aerobic cellular metabolism)에서도 일어날 수 있다(Freeman and Crapo, 1982 ; Trush *et al.*, 1982).

세포의 안정성 유지는 free radical 생성제와 free radical 방어제 사이의 균형에 주로 의존하게 되는데 생체는 free radical 방어제로서 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-px) 및 catalase등을 포함하는 효소 방어제와 glutathione 및 α -tocopherol등의 영양소 작용에 의한 비효소 방어제를 함유하고 있다. Superoxide dismutase는 superoxide anion(O_2^-)을 제거시키는 효소로서 O_2^- 를 H_2O_2 로, catalase는 H_2O_2 를 H_2O 로 전환시켜주고 GSH-px는 catalase가 작용하지 않은 부위의 H_2O_2 를 H_2O 로, 그리고 hydroperoxide(ROOH)를 hydroxy lipid(ROH)로 환원시켜 세포막을 보호하는 것으로 알려져 있다. 또한 비효소 방어제 중의 비타민 E는 주로 세포막에 분포해 있으면서 free radical을 제거시켜 mitochondria, microsome 등의 인지질 성분에 대해 보호작용을 나타낸다고 하며, Se는 GSH-px의 구성 성분으로서 Se의 결핍시 생체내에서 이 효소의 활성이 현저히 저하되어 지질 과산화물의 생성이 증가되었다는

보고가 있다(Chow, 1979b ; Leibovitz and Siegel, 1980 ; Trush *et al.*, 1982). 따라서 항산화작용을 하는 것으로 알려진 비타민 E와 GSH-px의 구성 성분인 Se이 결핍되면 생체내의 free radical 방어계가 약화되고 불포화 지방산의 과산화가 촉진되어 세포 전체에 심각한 영향을 미칠 수 있다. 특히 Machado들(1971)은 비타민 E와 Se을 결핍시킨 흰쥐의 간에서 식이성 괴사(dietary necrosis)를 보고한 바 있으며 괴사의 초기 현상으로 Disse강 내 microvilli의 미세구조적 변화가 수반된다고 하였다. 이러한 식이성 간 괴사의 발생기전에 관해서는 불명한 점이 많으나 비타민 E와 Se의 공급으로 괴사초기의 미세구조적 변화를 효과적으로 방어할 수 있다고 보고되어 있다(Machado *et al.*, 1971).

한편 함황 아미노산인 methionine은 비타민 E와 Se과 마찬가지로 lipotropic factor로서 그 대사과정 중에 주요 작용기인 -SH (sulfur hydroxy) group을 가지게 됨으로, 비타민 E와 Se의 결핍에서 오는 지질 과산화 반응에 대해 어느정도 방어역할을 할 수 있으리라 예상되며, methionine의 첨가 수준에 대해서도 많은 의견이 제기될 수 있을 것으로 생각된다(Hardwick *et al.*, 1970). 따라서 본 실험에서는 methionine이 흰쥐의 체내 지질 과산화에 미치는 영향을 조사하고자 비타민 E와 Se의 결핍 및 고 불포화 지방 식이에 의한 지질 과산화 반응을 유도하고 methionine이 제한 아미노산인 대두 단백질을 단백질 급원으로 사용하여, 수준별로 첨가된 methionine이 흰쥐의 체내 과산화 지질 함량, catalase활성 및 전자현미경을 통한 간 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

본 실험에 사용한 실험동물은 이유한 지

3일된 평균체중이 $87.3 \pm 12.1\text{g}$ 인 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 40마리로서 서울대학교 실험동물 사육장에서 공급받아 1주일 동안 기본식으로 적응시킨 후 체중에 따라 각 처리당 8마리씩 5군으로 임의 배치하였다. 실험동물 사육실의 실내온도는 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도는 $60 \pm 5\%$ 로 유지시켰으며, 각 처리별 실험 식이로 6주간 사육한 후 희생시켰다. 실험기간 중 식이와 물은 자유로이 섭취시켰으며 체중과 식이 섭취량은 매주 일정한 시간에 측정하여 증체량 및 사

료 섭취량을 구하였다. 각 처리별 식이의 구성 성분은 Table 1에 나타나 있다. 지방의 급원으로는 버터와 들깨기름을 사용하였고, 들깨기름은 식이를 만들기 하루 전에 짠 것을 이용하였다. 또한 대조군을 제외하고는 모든 실험식에 비타민 E와 Se을 첨가하지 않았으며, 단백질 급원으로서는 대두 단백질을 사용하였다. Methionine은 DL-methionine의 형태로 기본 식이에는 0.3%, MF군에서는 첨가하지 않았으며 3M, 6M 그리고 9M군은 각각 0.3%, 0.6% 및 0.9% 수준으로 공급시켰다.

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 ¹⁾	62.2	62.5	62.2	61.9	61.6
Butter	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Perilla oil	4.0	8.0	8.0	8.0	8.0
α -Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture ²⁾	3.5	3.5 (-Se)	3.5 (-Se)	3.5 (-Se)	3.5 (-Se)
Vitamin mixture ³⁾	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	0.6	0.9

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

2) The mineral mixture based on the pattern of Rogers and Harper(1965) contained the following (g/100g mineral mixture) ; CaCO_3 29.29, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.43, KH_2PO_4 34.31, NaCl 25.06, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9.98, $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.623, CuSO_4 0.156, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1, ZnCl_2 0.02, KI 0.0005, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0025 $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0015.

3) 100g of vitamin mixture contained the following ; Vitamin A acetate 50,000IU, 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.

2. 실험방법

(1) 시료 수집

실험식이로 6주간 사육한 흰쥐를 12시간 절식시킨 후 가벼운 ether마취 하에 복부 정중선을 따라 개복한 다음 복부 대동맥으

로부터 채혈하여 heparin으로 처리한 다음 혈장을 분리하였다. 채혈 직후 0.05M potassium phosphate buffer(pH 7.4)로 관류시켜 간을 적출한 다음 phosphate buffer로 가볍게 세척하고 일부 간 조직은 절취하여 조직

및 미세구조 연구에 사용하였다. 간 조직중의 mitochondria는 Iritani들(1980)의 방법을 변형시켜 분리하였다. 나머지 모든 시료는 분석시까지 -70°C에서 보관하였다.

(2) 생화학적 분석

1) 성장을 및 사료 효율

매주 일정한 시각에 체중과 식이 섭취량을 측정하였고, 얻어진 성적으로 사료 효율을 계산하였다.

2) 과산화 지질 정량

혈장과 간 mitochondria의 지질 과산화물은 Ohkawa들(1979)의 thiobarbituric acid (TBA) 방법을 이용하여 측정하였다. 과산화 지질의 함량은 생성된 malondialdehyde (MDA)의 n mol농도로 표시하였으며, 이때 표준 용액으로는 1, 1, 3, 3,-tetraethoxypropane(TMP)를 사용하여 표준 검량선을 구하였다.

3) Catalase활성도 측정

간 mitochondria분획의 catalase활성은 Aebi(1974)의 방법에 준해 이 효소에 의한 H₂O₂의 분해를 흡광도의 감소로써 측정하였으며, 반응용액 중의 H₂O₂의 농도가 19.7mM 일 때 pH 7.0, 실온에서 1분동안 1μm의 H₂O₂의 감소를 1 unit로 표시하였다.

4) 단백질 정량

간조직 중의 단백질은 Lowry들(1951)의 방법에 준해 인체 단백질(albumin + globulin, Sigma)을 표준품으로 하여 측정하였다.

(3) 간의 형태학적 분석

1) 광학현미경적 관찰

간의 일반적인 조직학적 관찰을 위하여 개복 즉시 간의 중엽(median lobule)에서 일부 간조직을 절취하고 10% neutral formalin용액에 고정한 다음 수세, 탈수과정을 거친 후 paraffin포매하였다. Paraffin block은 4-5μm두께로 박절하여 H-E염색하고 광학현미경으로 관찰하였다.

2) 전자현미경적 관찰

간 세포내 미세구조의 변화를 관찰하기 위하여 간 조직의 일부는 1mm³의 크기로 세절하여 신선한 2.5% glutaraldehyde에 전고정하였으며, 1% OsO₄에 후고정한 다음 탈수과정을 거친 후 Epon 812에 포매하였다. Block은 glass knife로 50-60nm의 초박 절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후 전자현미경(Hitachi H-600형)으로 관찰하였다.

(4) 통계처리

모든 실험분석 결과는 각 실험군당 평균치와 표준오차를 계산하였고, 각 실험군 평균치 간의 유의성은 p=0.05 수준에서 Duncan's new multiple test에 의해 검증하였다.

결 과

1. 체중, 사료효율 및 간 무게의 변화

6주간 사육한 각 실험군의 체중 증가량, 사료효율 및 간 무게 변화는 Table 2와 같다.

Table 2. Effect of dietary methionine on growth and liver weight of rats

Group	Weight Gain (g/day)	FER (feed efficiency ratio)	Liver Weight (g/100g body weight)
C	4.66 ± 0.35 ^{N. S.}	0.29 ± 0.02 ^a	3.37 ± 0.24 ^{N. S.}
MF	3.68 ± 0.38	0.24 ± 0.01 ^b	3.98 ± 0.57
3M	4.37 ± 0.68	0.27 ± 0.02 ^{ac}	3.75 ± 0.43
6M	4.11 ± 0.28	0.28 ± 0.02 ^a	3.77 ± 0.73
9M	3.68 ± 1.12	0.26 ± 0.03 ^{bc}	3.64 ± 0.47

1) Values shown are mean ± S. D.

2) N. S. ; Not significant among 5 groups at p < 0.05

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

체중 증가량의 변화는 기본 식이군인 대조군에 비하여 비타민 E와 Se결핍 및 고불포화 지방식을 급여한 MF군을 비롯한 전 실험군에서 다소 감소하는 경향이었으나 유의차를 보이지는 않았다. 특히 methionine의 첨가 수준별로는 methionine이 결핍된 MF군에 비해 0.3%, 0.6%로 첨가된 3M, 6M군에서 다소 증가하는 양상이었으나 유의성은 없었다. 간 무게의 변화도 대조군과 비교하여 MF군이 다소 증가하는 양상이었으나 유의성은 없었다.

사료효율은 대조군에 비하여 MF군과 9M군에서 유의한 감소를 보였으며 3M군과 6M군은 거의 대조군 수준이었다.

2. 과산화 지질의 함량

지질 과산화 반응의 결과로 형성된 과산화 지질의 함량은 Table 3에서와 같다. Plasma 및 간 mitochondria분획에서 TAB 방법으로 측정된 지질 과산화물의 함량은 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의적인 증가를 보였다.

Plasma에서의 과산화지질 함량은 대조군(1.06 nmoles)과 비교하여 모든 실험군에서 유의적인 증가를 나타내었으나 MF군에 비하여는 6M군에서 유의적으로 감소되었다. 간 mitochondria분획의 과산화지질 함량의 경우, 대조군에 비하여 모든 실험군에서 유

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

Diet	Lipid peroxide value	
	Plasma (MDA nmol/ml)	Liver mitochondria (MDA nmol/mg protein)
C	1.06±0.22 ^a	1.30±0.19 ^a
MF	3.23±0.83 ^b	2.35±0.54 ^b
3M	2.93±0.38 ^{bc}	2.19±0.64 ^b
6M	2.14±0.67 ^c	2.18±0.51 ^b
9M	2.81±1.35 ^{bc}	2.25±0.54 ^b

1) Values shown are mean±S. D.

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

의적인 증가를 보였으나 methionine공급 수준에 따른 차이는 나타나지 않았다.

3. Catalase활성도 변화

간 mitochondria분획에서 catalase활성도는 Table 4에 나타낸 바와 같이 대조군에 비하여 다른 실험군에서 유의적으로 감소되었다. 그러나 methionine 공급 수준에 따른 유의적인 차는 없었다.

Table 4 Effect of dietary methionine level on mitochondrial catalase activity of rat liver

Diet	Catalase(unit/mg protein)
C	38.12±7.47 ^a
MF	20.49±2.22 ^b
3M	23.86±7.33 ^b
6M	15.94±3.76 ^b
9M	20.15±5.54 ^b

1) Values shown are mean±S. D.

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

4. 형태학적 연구

6주동안 실험식으로 사육된 흰쥐 간의 변화를 광학현미경 및 전자현미경을 통해 관찰한 결과는 다음과 같다.

1) 조직학적 연구

기본 식이를 급여한 대조군은 소엽내의 간 세포들이 비교적 잘 보존되어 특이한 변화가 없었고(Fig. 1A), 비타민 E와 Se 및 methionine이 결핍된 식이로 사육된 MF군은 소엽 전역에 걸쳐 동양혈관의 현저한 확장과 더불어 소엽 주변대를 따라 고리형(ring shape)의 주변대 간세포 변성이 관찰되었다(Fig. 1B). Methionine을 0.3% 첨가시킨 3M군에서는 동양혈관의 확장은 MF군에 비해 다소 감소하는 경향이었고 간 세포 주변대 변성은 확인되지 않았다(Fig. 1C). 6M군에서 MF군과 3M군에서 관찰된 동양

혈관의 확장은 없었으며 간 세포 실질에 있어서도 매우 호전된 양상을 보였다(Fig. 1D). 그러나 methionine을 가장 높은 수준으로 첨가시킨 9M군에서는 동양혈관의 확장과 문맥야(portal area) 둘레에서 심한 염증세포의 침윤을 보이는 변성된 간 세포들이 관찰되었고(Ea), 일부에서는 국소적인 용해성 괴사를 나타내기도 하였다(Eb).

2) 미세구조적 연구

기본 식이군인 대조군의 간 세포는 nucleus 및 기타 소기관의 미세구조가 잘 보

존되어 특이한 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 2A).

이와 달리 methionine의 첨가 수준을 달리한 3, 6, 9M에서는 mitochondria의 구조적 변화와 지방소적(lipid droplets), 자식공포(autophagic vacuole)의 출현 및 동양혈관의 변연부를 따라 변성의 정도를 달리하는 microvilli들이 관찰되었다. 이들의 식이군에 따른 양적인 변화는 Table 5에 표시하였다.

Table 5. Semiquantitative assessment of predominant electron microscopic findings

Group	Mitochondria		Lipid droplets	Lipolysosome	Autophagosome
	Round	Slender			
C	+++	+	+	+	+
MF	+	+++	+++	+++	+++
3M	++	++	++	++	++
6M	+++	+	+	+	+
9M	++	++	++	+	+

The abbreviations used are : +, rare or slight ; ++, common or moderate ; +++, very frequent or marked. Electron micrographs taken at random(primary magnification×5,000) of rat hepatocytes fed five experimental diets.

Methionine을 결핍시킨 MF군의 가장 현저한 미세구조적 변화는 간 세포내 다수의 지방소적 출현과 mitochondria의 cristae의 변성 내지 소실 및 동양혈관 변연부에서 담모세관을 따라 microvilli의 수와 크기가 감소하는 등 막성구조물들의 변성이었다. MF군에서 관찰한 microvilli는 변성된 구조물들이 혼재되어 그 윤곽이 불분명한 것에서부터(Fig. 2Ba) 완전히 소실된 것에 이르기까지(Fig. 2Bb) 그 변성 정도가 다양하였다. 그리고 일부 간 세포에서는 mitochondria와 동양혈관 내막의 소실로 세포질 내부의 구조물들이 동양혈관 내로 유출되는 현상을 보이기도 하였다(Fig. 2Bc). 심한 막성 구조물의 변성을 보이는 mitochondria는 round형과 slender형의 2가지형이 관찰되었

으며 round형이 주로 대조군에서 관찰된 반면(Fig. 2A), MF군에서는 slender형이 주종을 이루었다(Fig. 2Ba, b, c, d). 또한 일부 MF군의 mitochondria는 matrix의 전자밀도가 높아 균질화된 모습을 보였다(Fig. 2Bd). 지방소적은 다양한 크기로 세포질 전역에서 관찰되었으며 lipid droplet와 lysosome이 부착된 형태로 분해 과정에 있는 lipolysosome 및 전자 밀도가 낮은 작은 구형의 소적 등 3가지 형태로 대별할 수 있었다(Fig. 3A, B, C). 전자밀도 면에서 볼 때 lipid droplet와 lipolysosome은 중등도의 전자밀도를 가지는데 비하여 작은 구형의 소적들은 전자밀도가 낮게 나타났으며 이러한 지방소적들은 간세포질 전반에 걸쳐 균등하게 분포되어 관찰되었다. 특히 중등도

의 전자밀도를 가지는 lipid droplet와 lipolysosome은 하나 혹은 그 이상의 mitochondria에 의해 둘러싸여 있었다(Fig. 2Ba, b, c). 변성 구조물을 처리하는 lysosome은 0.5 μ m내지 수 μ m의 직경을 가지고 있었으며 대조군에서는 primary lysosome이 관찰된 반면 비타민 E, Se결핍군에서는 변성된 구조물들을 함유하는 autophagic vacuole들이 주로 관찰되었다. Autophagic vacuole내에는 mitochondria, 내형질세망, 지방소적, 당원과립들이 포함되어 있었으며 이러한 구조물들이 소화 처리된 후에 볼 수 있는 잔여 소체를 포함하는 postlysosome도 관찰되었다(Fig. 4A. B. C).

0.3% methionine을 첨가시킨 3M군의 미세구조적 변화는 Fig. 2C와 같다. Mitochondria의 막성 구조물은 MF군에 비하여 별반 차이점이 없었으나 round형이 많이 관찰되었다. 동양혈관 변연부의 microvilli는 변성 정도가 호전되는 경향을 보였으며 MF군에서 보는 것과 같은 동양혈관내로의 세포 소기관의 유출은 거의 찾아볼 수 없었다. 세포질내 지방소적과 autophagosome은 감소되는 경향을 보였고 lipolysosome이 다소 관찰되었다.

0.6% methionine이 첨가된 6M군은 지방소적과 autophagosome은 훨씬 줄어든 경향이었으며 mitochondria는 round형이 많았다. Microvilli들은 MF, 3M군에 비해 잘 보존된 모습을 보였다. 그러나 내형질세망은 여전히 붕괴되어 있었고 탈락된 free ribosome들이 세포질 전역에 흩어져 관찰되었다(Fig. 2D).

한편 methionine을 0.9% 첨가시킨 9M군에서는 3M군에서와 유사하게 중등도의 전자밀도를 가지는 지방소적들이 관찰되었으며, mitochondria는 cristae를 포함한 내막의 윤곽이 불분명하고 균질된 모습이었고 MF군에서 같이 slender형이 많았다. 동양혈관

변연부의 microvilli도 MF군에서와 같은 완전한 소실은 관찰되지 않았으나 심한 변성을 보였다(Fig. 2E).

고 찰

비타민 E와 Se의 결핍 및 고 불포화 지방산에 의해 지질과산화물을 유도하고 수준별로 methionine을 첨가한 식이를 급여한 흰쥐의 체중, 사료 효율 및 간 무게의 변화는 전 실험군에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나 사료효율은 대조군에 비해서 MF군과 9M군이 감소되었다. 이러한 결과는 비타민 E와 Se을 결핍시켰을 때 증체량과 사료효율이 감소되었다는 Combs들(1984)의 보고와 함황아미노산인 methionine의 적정량 공급은 체중증가와 사료효율을 증진시키지만 과잉의 methionine공급은 오히려 체중저하를 유발한다는 Sowers들(1972)과 Stockland들(1973)의 보고와 유사하였다. 체중에 대한 간무게(%)의 변화에 있어서는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 대조군에 비해서 비타민 E와 Se을 결핍시킨 MF군에서 가장 높은 값을 나타내었다. Freeman과 Crape(1982) 그리고 Ohki들(1984)은 고도 불포화 지방산의 공급증가와 더불어 비타민 E와 Se이 부족할 때 생체막 인지질의 과산화로 간장세포막이 손상되고 유동성이 증가되어 체액의 유입, 유출이 자유로워지기 때문에 간의 비대현상이 나타난다고 하였다. 그러나 비타민E를 결핍시킨 쥐의 적혈구막에서 인지질과 arachidonic acid의 감소, 용혈현상과 지질과산화물의 생성 증가로 인해 막의 유동성이 감소된다는 보고도 있다(Kameda *et al.*, 1985). 간변성에 대한 methionine의 효과를 연구한 Schwarz(1965)에 의하면 methionine은 항산화제로 알려진 비타민E의 절약작용과 관련이 있으며 비타민E와 Se의 결핍으로 인한 간변성에 대해 보호작용을 나타낼 수 있다고 하였

고 또한 methionine은 methyl donor로서 항 지방간성 인자인 choline의 합성에 관여함으로써 간보호 작용을 나타낸다고 하였다.

혈장과 간 mitochondria에서 과산화지질 함량은 대조군에 비해서 MF군이 유의적으로 증가되어 있었다. Brady들(1978)과 Iritani들(1980)은 비타민E와 Se의 공급으로 과산화지질 함량을 저하시킬 수 있으며, Wills(1966)는 methionine 반응물질인 cysteine과 glutathione이 과산화지질 함량을 낮출 수 있다고 보고하였다. 따라서 본 실험의 MF군에서 과산화지질 함량이 증가한 것은 비타민E와 Se부족에 methionine 부족이 가중됨으로써 일어난 현상으로 여겨진다. Tappel(1973) 그리고 Summerfield와 Tappel(1984)은 일단 형성된 지질과산화물의 free radical은 인접한 효소단백과 RNA, DNA, 인지질과 cross-linkage를 형성해 형성 물질인 lipofuscin의 축적 및 생체막의 손상을 유발하고, DNA 돌연변이와 각종 퇴행성질환을 유발하는 등 세포구성과 기능에 손상을 초래한다고 하였다.

Methionine을 수준별로 공급시킨 군들간의 지질과산화물 함량은 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 혈장의 지질과산화물 함량은 MF군에 비해서 6M군만이 유의적으로 낮게 나타났다. Methionine의 지질과산화에 대한 반응은 -SH기를 함유한 methionine 대사산물이 세포내 cysteine과 glutathione의 구성성분으로 작용하여 과산화물을 감소시켜 독성물질에 의한 간손상 및 간괴사현상에 대해 보호작용을 나타낸다고 보고되었다(Mitchell et al., 1973). Yarlington과 Whittehair(1975)는 비타민E와 Se를 결핍시켰을 때 오리의 십이지장과 위장하부 gizzard의 sarcoplasmic reticulum, mitochondria 부위가 변성되고 lysosome이 결합된 lipid droplet와 mineral deposits가 출현했으며 Green들(1967)은 간괴사현상이

나타난다고 하였다. 이러한 현상들은 비타민E와 Se의 공급으로 보호할 수 있으며 Se에 의한 보호효과 보다도 비타민E의 보호효과가 더 큰 것으로 보고되었다. 또한 methionine, cysteine 그리고 glutathione 역시 약물과 항산화제의 결핍으로 유발된 간 괴사에 대해 보호작용을 나타낸다고 하나 그 효과는 비타민E의 보호수준에는 미치지 못한다고 하였다(Green et al., 1967 ; Mitchell. et al., 1973 ; Reddy et al., 1982). 투여량에 있어서도 cysteine의 과잉공급시 생체내의 과잉존재로 오히려 과산화물의 형성이 증가되어 독성을 나타낸다는 실험결과도 있다 (Wills, 1966 ; Hardwick et al., 1970).

간 mitochondria에서의 catalase활성도는 전 실험군들이 대조군에 비해서 유의적으로 낮게 나타났다. 지질과산화 방어효소 중 catalase는 모든 동물조직에서 발견되고 있으나 간과 적혈구에 가장 많이 함유되어 있으며 GSH-px와 더불어 hydrogen peroxide 분해를 촉진하고 이들로 부터 세포구성 성분을 보호하는 것으로 보고되어 있다 (Chow, 1980). Chow(1979a)와 Masugi와 Nakam-ura(1976)는 비타민 E가 catalase활성 유도에는 직접 관여하지 않으나 지질과산화물 분해와 밀접한 관계가 있다고 하였으며, Se은 GSH-px의 형성에는 관여하나 catalase 활성유도에는 별다른 영향을 미치지 못한다고 하였다. 이와 같이 비타민E와 Se는 catalase활성의 직접적인 유도 보다는 지질과산화물 형성 및 분해에 관여함으로써 catalase활성도에 간접적인 영향을 미치는 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서 비타민E와 Se 그리고 methionine결핍군들은 대조군과 비교하여 볼 때 지질과산화물이 증가됨에 따라 catalase활성도가 저하된 것으로 생각되며 methionine투여군들에 대한 catalase활성은 MF군과 유의적인 차이를 보이지 않아 methionine 첨가만으로는 cata-

lase 활성유도에 효과를 나타내지 못한 것으로 사료된다.

이러한 식이군의 생화학적 변화는 간의 조직학적 및 미세구조적 변화로도 설명되었다. 비타민E와 Se 및 methionine이 결핍된 MF군에서는 소엽 전반에 걸쳐 동양혈관의 현저한 확장과 주변대 간세포 변성이 특징적으로 관찰되었다. 동양혈관의 확장은 비타민 E와 Se의 생체내에서의 역할을 고려해 볼 때, 본 실험에서는 이들 영양소의 결핍은 간세포막의 손상을 초래하여 유동성을 증가시키고 더우기 고 불포화 지방 식이가 가중됨으로써 세포막의 지질과산화물을 촉진하여 세포내액이 동양혈관내로 유입되었기 때문으로 사료된다. 미세구조적으로도 동양혈관 microvilli들의 수적감소와 변성이 확인되었고(Fig. 2Ba, b), 일부 동양혈관내 microvilli는 물론 내막의 손실로 혈관내부에 mitochondria등과 같은 세포소기관과 지방소적들이 관찰되었다(Fig. 2Bc). 이러한 간세포막의 변화는 Machado들(1971)이 비타민 E와 Se를 결핍된 식이로 사육한 흰쥐에서도 관찰한 바 있으며 세포막의 표지효소인 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase와 5'-nucleotidase의 활성감소를 생화학적 및 조직화학적 방법으로 확인하였다. 또한 이들은 비타민 E와 Se를 공급함으로써 세포막의 손상을 효과적으로 방어할 수 있다고 하였다. MF군에서 H & E염색으로 관찰된 고리형의 간소엽 주변대 변성(peripheral degeneration)은 비타민 E, Se, methionine 결핍 및 고 불포화 지방 식이가 공급됨으로써 지방대사 장애는 물론 지질과산화물이 축적되어 초래된 지방변성(fatty degeneration)으로 사료된다. 미세구조적으로도 지방변성이 일어난 간세포에서 다양한 크기와 모양을 가진 지방소적들이 관찰되었다. 특히 간소엽중 중심대는 비교적 잘 보존되어 있으나 주변대에서 지방변성이 관찰되는 것은 지방대사

(lipid metabolism)에 관여하는 microbody와 세포소기관 및 β -hydrobutyric dehydrogenase, esterase들이 주로 중심대에 분포되어 있는 반면 주변대에는 결여되어 있기 때문으로 사료된다(Novikoff, 1959 ; Novikoff and Essner, 1960 ; Wachstein and Meisel, 1957 ; Loud, 1968, Ahlab and Bernard, 1971 ; Goldficher *et al.*, 1971 ; Inestrosa *et al.*, 1979 a, b).

간 세포질 전역에서 관찰된 지방소적들은 lipid droplet과 lipolysosome, 전자밀도가 낮은 구형의 소적 등 3가지 형태로 대별되었다. 이들은 전자밀도면에서 볼 때 서로 차이가 있었으며 이는 지방적을 구성하는 지방조성의 차이때문이라 사료된다. 이러한 견해를 지지하는 것으로 Mehta와 Ghadially(1973)가 포화 지방산의 하나인 autologous fat를 흰쥐 관절내로 주입하여 연골세포내에서 전자밀도가 낮은 지방소적을 관찰한 바 있고 불포화 지방산인 corn oil을 주입하여 전자밀도가 높은 지방소적을 관찰한 바도 있다. 본 연구에서는 지방산 조성은 분석하지 않았지만 methionine 첨가수준에 따라 지방산 조성의 변화가 예상된다. 또한 중등도의 전자밀도를 가지는 지방소적들은 mitochondria 외막과 접하여 관찰되었는데, 이는 mitochondria내의 일부 효소(fatty acid oxidase)가 지방산 대사에 관여하기 때문으로 생각된다(Palade and Schidlowsky, 1958 ; Palade, 1959). Mitochondria는 round형과 slender형이 관찰되었는데 slender형의 mitochondria는 MF군에서 많이 관찰된 반면, round형은 대조군과 6M군에서 많이 관찰되었다. Slender형의 mitochondria는 이미 존재하고 있던 mitochondria가 단순히 확장되었거나 몇개의 mitochondria가 융합되어 형성될 수 있으며, 이들 두 과정이 연합되어 형성된다고도 한다(Ghadially, 1975).

본 연구에서 관찰된 slender형의 mitochondria들은 하나의 mitochondria가 확장된 때문으로 생각되며 이는 hypoxia가 유발된 흰쥐의 심근세포에서도 관찰된 바 있다 (Sun *et al.*, 1969). 특히 MF군의 일부 간세포질에서 관찰된 전자밀도가 높은 mitochondria는 Vodovar들(1977)이 고지방식이로 사육한 흰쥐에서도 관찰한 바 있다.

결론

비타민 E, Se 그리고 methionine 결핍 및 고 불포화 지방식을 섭취시켰을 때 흰쥐의 체내에서 지질과산화물 형성증가와 catalase활성도 변화가 초래되었으며 형태학적으로는 methionine을 공급하지 않은 실험군(MF군)에서 지방소적 및 변성구조물들이 많이 관찰되었다. Methionine 공급 수준별로 볼 때 MF군에 비해서 0.6% 수준의 methionine을 공급한 실험군에서 지방소적의 감소와 변성된 막성구조물들이 다소 호전되는 양상을 보였으나 이러한 형태적 변화는 대조군 수준에는 미치지 못했다. 따라서 methionine 단독으로서의 효과보다 항산화작용을 가진 다른 영양소와의 상호작용에 의해 그 효과가 증대될 수 있다고 생각되며 보다 균형적인 영양소 섭취로써 지질과산화의 유해한 반응으로부터 보호작용을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

References

Aebi, H. 1974. Catalase, Methods of enzymatic analysis. Second edition edit by Hans Ulrich Bergmeyer, pp. 673-684.
 Ahlabo, I. and T. Bernard. 1971. Observations on peroxisomes in brown adipose tissue of the rat. J. Histochem. Cytochem. 19, 670-675.
 Alfin-Slater, R. B. 1977. Vitamin E. Nutr. Rew. 35(2) 57-62.

Brady, P. S., L. J. Brady, P. A. Whetter, D. E. Ullrey and L. D. Fay. 1978. The effect of dietary selenium and vitamin E on biochemical parameters and survival of young among whitetailed deer(*Odocoileus virginianus*). J. Nutr. 108, 1439-1448.
 Chow, C. K. 1979a. Effect of dietary selenium and vitamin E on the antioxidant defense systems of rat erythrocytes. Internat. J. Vit. Nur. Res. 49, 182-185.
 Chow, C. K. 1979b. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. Am. J. Clin. Nutr. 32, 1066-1081.
 Chow, C. K. 1980. Glucose and dietary vitamin E protection against catalase inactivation in the red cells of rat. Internat. J. Vit. Nutr. Res. 50, 364-369.
 Combs, G. F., C. H. Liu, Z. H. Lu and Q. Su. 1984. Uncomplicated selenium deficiency produced in chicks fed a corn-soy-based diet. J. Nutr. 114, 964-976.
 Freeman, B. A. and J. D. Crapo. 1982. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. Lab. Invest. 47(5), 412-425.
 Ghadially, F. N. 1975. Mitochondria ; Chap. III. in Ultrastructural pathology of the cell. Butterworths. London. pp. 101-185.
 Goldficher, S., P. S. Rohein, D. Edelstein and E. Essner. 1971. Hypolipidemia in a mutant strain of "acatalasemic" mice. Science 173, 65.
 Green, J., A. T. Diplock, J. Bunyan, I. R. Muthy and D. Mchale. 1967. Vitamin E and stress. 4*The metabolism of D- α -tocopherol during nutritional hepatic necrosis in the rat and the effects of selenium, methionine and unsaturated fatty acids. Br. J. Nutr. 21, 497-506.
 Hardwick, D. F., D. A. Applegarth, D. M.

- Cockcroft, P. M. Ross and R. J. Calder. 1970. Pathogenesis of methionine-induced toxicity. *Metabol.* 19(5), 381-391.
- Inestrosa, N. C., M. Bronfman and F. Leighton. 1979a. Properties of fatty acyl-coa oxidase from rat liver, a peroxisomal flavoprotein. *Life Science* 25, 1127-1136.
- Inestrosa, N. C., M. Bronfman and F. Leighton. 1979b. Detection of peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase activity. *J. Biochem.* 182, 779-788.
- Iritani, N., E. Fukuda and Y. Kitamura. 1980. Effect of corn oil feeding on lipid peroxidation in rats. *J. Nutr.* 110, 924-930.
- Kameda, K., M. Imai and M. Swujo. 1985. The effect of vitamin E deficiency on some erythrocyte membrane properties. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 31, 481-490.
- Leibovite, B. E. and B. V. Siegel. 1980. Aspects of free radical reactions in biological systems ; *Aging. J. Geronto.* 35(1), 45-56.
- Loud, A. V. 1968. Quantitative stereological description of the ultrastructure of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 37, 27-46.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Machado, E. A., E. A. Porta, W. S. Hartroft and F. Hamilton. 1971. Studies on dietary hepatic necrosis. II. Ultrastructural and enzymatic alteration of hepatocytic plasma membrane. *Lab. Inv.* 24(1), 13-20.
- Masugi, F. and T. Nakamura. 1976. 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, 187-191.
- Mehta, P. N. and F. N. Ghadially. 1973. Articular cartilage in corn oil-induced lipoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 32, 75.
- Mitchell, J. R., D. J. Jollow, W. Z. Potter, J. R. Gillette and B. B. Brodie. 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J. Pharm. Exp. Therap.* 187(1), 211-217.
- Novikoff, A. B. 1959. Cell heterogeneity within the hepatic lobule of the rat (staining reactions). *J. Histochem.* 8, 240-244.
- Novikoff, A. B. and E. Essner. 1960. The liver cell. Some new approaches to its study. *J. Am. Med.* 29, 102-131.
- Ohkawa, H., N. Oshishi and K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.
- Ohki, K., T. Takamura and Y. Nozawa. 1984. Effect of α -tocopherol on lipid peroxidation and acyl chain mobility of liver microsomes from vitamin E deficient rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 30, 221-234.
- Palade, G. E. and G. Schidlofsky. 1958. Functional association of mitochondria and lipid inclusions. *Anat. Res.* 130, 352.
- Palade, G. E. 1959. In subcellular particles. New York : Roland Press. pp. 64.
- Reddy, C. C., R. W. Soholz, C. E. Thomas and E. J. Massaro. 1982. Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Life Sci.* 31, 571-576.
- Roger, Q. R. and A. E. Harper. 1965. Amino acid diets and maximal growth in the rat. *J. Nutr.* 87, 267-273.

- Schwarz, K. 1965. Role of vitamin E, selenium and related factors in experimental nutritional liver disease. *Fed. proceed.* 24, 58-67.
- Sowers, J. E., W. L. Stockland and R. J. Meade. 1972. L-methionine and L-cysteine requirements of the growing rat. *J. Animal Sci.* 35(4), 782-788.
- Stockland, W. L., R. J. Meade, D. F. Wass and J. E. Sower. 1973. Influence of levels of methionine and cysteine on the total sulfur amino acid requirement of the growing rat. *J. Animal Sci.* 36(3), 526-530.
- Summerfield, F. W. and A. L. Tapel. 1984. Effects of dietary polyunsaturated fats and vitamin E on aging and peroxidative damage to DNA. *Arch. Biochem. Biophysic.* 233, 408-416.
- Sun, C. N., N. S. Dhalia and R. E. Olson. 1969. Formation of gigantic mitochondria in hypoxic isolated perfused rat hearts. *Experimentia* 25, 763-764.
- Tappel, A. L. 1973. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proceed.* 32 (8), 1870-1874.
- Trush, M. A., E. G. Mimnaugh and T. E. Gram. 1982. Commentary. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implication for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biol. Pharm.* 31, 3335-3346.
- Vodovar, N., F. Desnoyers, R. Cluzan and R. Levillain. 1977. Pathologie ultrastructurale des mitochondries des cellules myocardiques de porc, induite par les lipides alimentaires. *J. Cell Biol.* 29, 37-44.
- Wachstein, A. and E. Meisel. 1957. Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH. *J. Am. Clin. Pathol.* 27, 13-23.
- Wills, E. D. 1966. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem. J.* 99, 667-676.
- Yarrington, J. T. and C. K. Whithehair. 1975. Ultrastructure of gastrointestinal smooth muscle in ducks with a vitamin E-selenium deficiency. *J. Nutr.* 105, 782-790.

Figure Legends

- Fig 1.** Light micrograph of hepatic tissue of rats fed five experimental diets(H & E, $\times 1200$)
- A. Liver specimen of control group
No significant abnormality in hepatic structure is found.
Liver parenchymal cells are arranged as cords of cells with vascular sinusoidal spaces between the cord.
 - B. Liver specimen of MF group
Wide spread dilatation of sinusoids and peripheral degeneration are also seen.
 - C. Liver specimen of 3M group
Milder dilatation of sinusoids in comparison to MF group are seen, but no peripheral degeneration.
 - D. Liver specimen of 6M group
No significant change in comparison with control group.

E. Liver specimen of 9M group

(a) Spotty necrosis with inflammatory cell infiltration is localized at portal tract.

(b) Focal lytic necrosis of hepatocys in the midzonal area is present.

Fig. 2. Electron micrograph of hepatocytes of rats fed five experimental diets

A. Portion of rat hepatocyte from control group ($\times 12,000$).

Mitochondria(M) with short but well preserved cristae scattered throughout cytoplasm. Rough endoplasmic reticulum(RER) display normal configuration.

Note normal sinusoidas border of hepatocyto showing a continuous plasma membrane with numerous slender and well preserved microvilli(MV). N, nucleus ; Kup, Kupffer cell ; LD, lipid droplet

B. Portion of rat hepatocyte from MF group

(a) Mitochondria show dilatation and pallor, and hemogenation of their cristae network. Large and small electronlucent lipid droplets(LD) present in the center of cytoplasm, showing close association with mitochondria(arrow). In upper right conner highly electronlucent lipid droplets are also seen. Note altered sinusoidal border of hepatocyte showing distortion of degeneratong microvilli(MV).

Inset, A ; higher magnification of microvilli in Disse's space, $\times 42,000$. BC, bile canaliculi ; Co, collagen fiber

(b) Note the considerable widening of the endematous endothelium(En) and complete loss of microvilli(Mv).

Note also the distended sinusoids and the disrupted endothelium

(c) The distended sinusoid filled with lipid droplets(LD) and mitochondria(M) which escape from ruptured microvilli and sinusoidal endothelium

(d) Note highly electronlucent lipid droplets(LD) in cytoplasm and mitochondria contains high electron dense matrix.

C. Portion of rat hepatocyte from 3M group

The cytoplasm contains a degradated lipid droplets by fusion of lysosomqse (lipolysosome). Note sinusoidal border of the hopatocytes showing considerable preservation compare to Fig. 2B. MV, microvilli ; LL, lipolysosome ; Sn, sinusoid

D. Portion of rat hepatocyte from 6M group

Sinusoidal border of hepatocyte showing well preserved microvilli, although cisternae of the rough endoplasmic reticulum are still fragmented, and mitochondria appear similar to those seen in previous figures.

Inset, a higher magnification of microvilli in Disse's space($\times 42,000$)

E. Portion of rat hepatocyte from 9M group

Sinusoidal border of a liver cell similar to the one in Fig. 2Ba. The cytoplasm contains a large numbers of electronlucent lipid droplets. Mv, microvilli

Fig. 3. Various profiles of lipid droplets in hepatocytes of rats fed five experimental diets

There are three types of lipid droplets in the hepatocytes of the this experimental diet groups.

A. The lipid droplets are associated with lysosome(lipolysosomes).($\times 42,000$)

B. The lipid droplets display degraded granular content.($\times 48,000$)

C. The lipid droplets contain high electronlucent matrix.($\times 54,000$)

Fig. 4. Various profiles of autophagic vacuoles in hepatocytes of rats fed five experimental diets.

A. The sequestration of cytoplasmic organelles with surrounding cytoplasm into a pocket formed probably by mitochondria and ribosome($\times 42,000$)

B. Autophagosome contains subcellular components with lipid droplets and rough endoplasmic reticulum.($\times 51,000$)

C. Residual body is filled with electron dense membranous materials and lipid droplets.
($\times 55,000$)









