

식이성 단백질 함량에 따른 흰쥐에 사염화탄소 투여시 Lipoprotein 분획비의 변동

이혜자 · 윤종국[†] · 이상일*

계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

*계명전문대학 식품영양과

Effect of Dietary Protein on the Changes of Lipoprotein Fractions in Carbon Tetrachloride-Treated Rats

Hye-Ja Lee, Chong-Guk Yoon[†] and Sang-Il Lee*

Dept. of Public Health, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Keimyung Junior College, Taegu 705-307, Korea

Abstract

To evaluate an effect of dietary protein on lipoprotein profile serum of carbon tetrachloride-treated rats, carbon tetrachloride (50% in olive oil) was twice given at 0.1ml/100g body weight at intervals of 24hours to the male rats and then the degree of liver damage in carbon tetrachloride-treated animals fed a low protein diet was compared with that fed a high protein diet. The increasing rate of liver weight/body weight and the serum levels of alanine aminotransferase in carbon tetrachloride-treated rats to the control group were higher in rats fed high protein diet than those fed low protein diet. In the serum levels of lipid (total lipid, total cholesterol and triglyceride) remarkable differences were not found between low protein diet group and high protein diet group. But these serum lipids in carbon tetrachloride-treated rats were decreased and the decreasing rate of serum lipids to control group were higher in carbon tetrachloride-treated rats fed high protein diet than those fed low protein diet. Under the animal model as identified by the present data herein, serum pre β -lipoprotein and α -lipoprotein fractions were decreased in carbon tetrachloride-treated rats, but the serum levels of β -lipoprotein were rather increased in the both group by the injection of carbon tetrachloride. Especially, the decreasing rate of α -lipoprotein fraction was higher in CCl₄-treated rats fed a high protein diet than those fed a low protein diet to its control group and the increasing rate of serum β -lipoprotein fraction was also higher in CCl₄-treated rats fed high protein diet than those fed low protein diet.

Key words : carbon tetrachloride, high protein diet, low protein diet, lipoprotein, serum lipid

서 론

최근 경제성장에 따른 식생활의 다양화에 수반된 동물성식품과 같은 육류와 주류 등의 섭취증가로 간질환, 고혈압, 혈관순환계질환 등의 성인병 발생률이 증가되고 있는 실정이며, 또한 산업발전에 따른 유해산업공해물질이 인체에 폭로됨으로써 질병의 병발증 및 심화현상이 야기될 것으로 사료된다. 이들 유해산업공해물질중 xenobiotics의 일종인 사염화탄소(이하 CCl₄

라 약함)는 간독소의 일종¹⁻⁹⁾으로, 생체의 단백 영양상태에 따라서 그 독성발현이 상당한 차이를 나타낸다고 보고⁹⁾ 되고있다. 특히 생체내에서 식이성 단백질과 CCl₄와의 상호작용이 관심의 대상^{1-4, 10, 11)}이 되어왔다. 최근 윤 등⁹⁾은 식이성 단백질함량에 따라 CCl₄에 의한 간손상이 더욱 심화됨을 관찰하였다. 또한 간장질환시 간조직중 지질함량의 변동이 초래될 뿐만 아니라, 순환기계 질환과 관련이 있는 혈청중 lipoprotein 분획의 변동이 야기된다는 보고¹⁰⁻¹⁵⁾ 및 lipoprotein의 구성성분인 apoprotein이 간에서 합성된다는 점을 고려해 볼 때 CCl₄에 의한 간손상의 정도가 식이성 단백질함량에 따라

[†]To whom all correspondence should be addressed

다르게 나타날 것이며, 이때 혈청중 lipoprotein 분획비의 변동도 상이할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 단백질이조건을 달리하여 성장한 흰쥐에 CCl₄를 투여하였을 때 간손상의 정도를 확인함과 동시에 혈청중 지질함량과 lipoprotein 분획비를 측정하여 이들 성적을 상호비교 하고자 한다.

재료 및 방법

동물 및 처치

동물은 체중 130g 내외인 외견상 건강한 Sprague-Dawley종의 웅성흰쥐를 구입하여 표준단백식으로 3일간 적응시킨후, Table 1의 사료성분표에 의하여 저단백식이군(LP: 7% casein)과 고단백식이군(HP: 20% casein)으로 구분하여 약 1개월간 사육하였다.

저단백식이와 고단백식이로 약 1개월간 사육시킨 LP군 및 HP군 각 7마리에 50% CCl₄ 용액(v/v in olive oil) 일정량(0.1ml CCl₄/100g body weight)을 24시간 간격으로 2회 복강내로 투여하였다. 동물은 사염화탄소 또는 olive oil 마지막 투여후 24시간 동안 물만 주고 금식시켰다.

동물의 처치는 ether 마취하에서 복부정중선을 따라 개복한 다음, 복부대동맥으로부터 채혈하여 실험사 시

켰다. 채혈직후 2~4°C의 0.25M sucrose액으로 간을 관류하여 간내에 남아있는 혈액을 제거한 후 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 세척한 다음, 장기내에 남은 생리식염수를 여과지를 사용하여 제거한 후 그 무게를 측정하였다.

한편 채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후에 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여, 생화학 실험에 사용하였다.

Alanine aminotransferase의 활성도 측정

Alanine aminotransferase (ALT) 활성도는 Reitmann과 Frankel의 방법¹⁶⁾에 준하여 측정하였으며, 활성단위는 혈청 ml당 Karmen unit¹⁷⁾로 나타내었다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 등¹⁸⁾ 및 Biuret 방법¹⁹⁾에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로하여 측정하였다.

혈청 지질함량 측정

혈청중 cholesterol은 Richardson 등²⁰⁾의 방법으로, 총지질은 sulfophosphovanillin법²¹⁾에 의해, triglyceride는 Iatron사의 효소법²²⁾에 의해 각각 측정하였으며, 이때 각 지질의 함량단위는 mg/dl로 나타내었다.

혈청 lipoprotein 분획비 측정

혈청 lipoprotein의 각 분획은 cellulose acetate membrane (Hellena사)을 이용해 전기영동한 후, oil red O로 염색하여 densitometer로 각 분획을 측정해서 백분율(%)로 나타내었다.

결과 및 고찰

성장기간동안 체중의 변동

Casein으로 식이를 조절하여 저단백(7% casein) 및 고단백(20% casein) 식이조건으로 약 1개월간 성장시키는 동안에 체중의 증가율을 나타낸 것이 Fig. 1이다.

성장기간동안 체중의 증가율은 HP군이 처음 체중의 1.9배, LP군은 약 1.2배로 증가하여 LP군이 HP군에 비해 체중의 증가율이 약 37% 정도 낮게 나타남을 관찰할 수 있었다. 이같은 실험결과는 Borer 등²³⁾의 보고와 유사하였다.

그러므로 본 실험조건이 LP군 및 HP군의 모델임을 확인 할 수가 있었다.

Table 1. Composition of experimental diet (g/kg diet)

Ingredients	Low protein diet	High protein diet
Casein	70	200
Corn starch	804.36	674.36
Corn oil	64.85	64.85
Vitamin A and D mix ¹⁾	10.2	10.2
Vitamin E and K mix ²⁾	2	2
Water soluble vitamin mix ³⁾	3	3
Vitamin B ₁₂ ⁴⁾	1	1
Salt mixture ⁵⁾	40	40
α-cellulose	20	20

¹⁾ Vitamin A & D mixture : 51,000 unit of A and 5,100 unit of D dissolved in 100ml of corn oil

²⁾ Vitamin E & K mixture : 5g of α-tocopherol and 0.2g of menadion dissolved in 200ml of corn oil

³⁾ Water soluble vitamin mixture : contained (mg) ; choline chloride 2,000, thiamine hydrochloride 10, riboflavin 20, nicotinic acid 120, pyridoxine 10, Ca-pantothenate 100, biotin 0.05, folic acid 4, inositol 500, p-aminobenzoic acid 100

⁴⁾ Vitamin B₁₂ : 5mg of vitamin B₁₂ dissolved in 500ml of distilled water

⁵⁾ Salt mixture : contained (g) ; CaCO₃ 300, potassium phosphate dibasic 322.5, MgSO₄ 102, Ca-phosphate monobasic 75, NaCl 167.5, ferric citrate 27.5, KI 0.8, ZnCl₂ 0.25, CuSO₄ · 5H₂O 0.3, MnSO₄ 5, molybdic acid 0.2

간무게, 혈청 ALT활성 및 혈청A/G ratio 변동

단백식이조건을 달리하여 성장시킨 흰쥐에 CCl₄ 투여시 간무게 및 혈청중 ALT의 활성변동을 관찰한 것이 Table 2이다.

Olive oil만 투여한 대조군에서는 LP군 및 HP군간의 체중당 간의 무게가 별다른 차이를 볼 수 없었으나, CCl₄투여로 인하여 HP군에서는 약 45%, LP군은 약 30%의 유의한 증가(p<0.001)를 나타내었다.

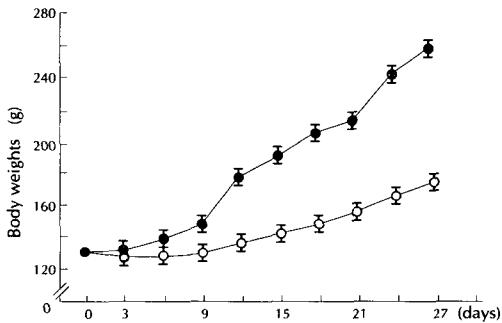


Fig. 1. One month weight gains in rats fed a low or high protein diet. Each value is the mean±S.E. of 14 rats. ○—○ : low protein diet, ●—● : high protein diet

한편 혈청중 ALT 활성도는 olive oil만 투여한 대조군에서는 양군간의 차이를 관찰할 수 없었으나 CCl₄ 투여시의 혈청 ALT활성도 변동은 LP군에서 대조군에 비해 약 5.4배의 유의한 증가(p<0.001)를 나타내었고, HP군에서는 대조군에 비해 약 8.9배의 유의한 증가(p<0.001)를 나타내었다. 또한 혈청중의 A/G 비율은 CCl₄를 투여하였을 때 양군 공히 대조군에 비해 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다.

이상의 실험결과를 종합하여 볼 때 CCl₄에 의한 간손상이 HP군이 LP군보다 높게 나타났으며 이는 타 연구자들^{1,9)}의 보고와 유사하였다.

혈청 총지질, 총 cholesterol 및 triglyceride의 함량변동

간손상시에 지질합성율이 저하된다는 보고^{1,3,10-12)}와 CCl₄ 투여로 인한 간조직중 지질함량은 LP군에서 HP군보다 그 감소율이 낮게 나타남과 동시에 병리조직학적소견에서도 지방축적이 HP군보다 LP군이 높게 나타남을 이와 윤¹¹⁾이 보고하였다. 따라서 간손상시 조직중 지질함량의 변동은 혈청 지질의 함량에 상당한 영향을 미칠 것으로 생각되어 본 실험조건에서 혈청

Table 2. Effect of carbon tetrachloride treatment on the weights of organ, ALT activities and the ratio of A/G in serum of rats fed a low or high protein diet

Parameters	High protein diet		Low protein diet	
	Control	CCl ₄	Control	CCl ₄
Liver Wt.(g)	6.37±0.22	8.49±0.28***a)	4.29±0.16	5.33±0.30***b)
	Wt. (% body)	3.08±0.09	4.46±0.11***a)	3.20±0.06
ALT activity	23.67±2.40	210.30±23.90***a)	21.98±2.88	119.40±22.56***b)
Total protein	6.20±0.50	6.13±0.35	5.95±0.22	5.78±0.31
A/G ratio	0.84±0.08	0.76±0.03	0.80±0.05	0.79±0.06

Rats were treated with CCl₄ according to the protocol described in the experimental methods

Values are mean±S.E. of 7 rats

^{a)}Significantly different from the high protein diet control group

^{b)}Significantly different from the low protein diet control group

p<0.01, *p<0.001, ALT unit : Karmen unit/ml serum, Protein unit : g/dl of serum

Table 3. Effect of carbon tetrachloride treatment on the total lipid, total cholesterol and triglyceride levels in sera of rats fed a low or high protein diet (Unit : mg/dl of serum)

Parameters	High protein diet		Low protein diet	
	Control	CCl ₄	Control	CCl ₄
Total lipid	395.38±52.03	332.57±43.38	404.73±52.10	410.69±22.05
Total cholesterol	67.50±0.84	48.97±2.27***a)	69.00±9.67	63.34±5.39
Triglyceride	88.85±6.55	66.25±13.35	79.42±12.50	75.75±3.45

The assay procedure was described in the experimental methods

The other conditions are the same as described in the Table 2

^{a)}Significantly different from the high protein diet control group

***p<0.001

지질함량 변동을 관찰한 것이 Table 3이다.

CCl₄ 투여로 인한 혈청 총지질 함량은 HP군에서는 약 16% 정도 감소되었으나, LP군에서는 대조군과 실험군간에 별다른 차이를 볼 수 없었다. 또한 CCl₄ 투여로 인한 triglyceride함량 역시 HP군에서는 약 25% 감소되었으나, LP군에서는 대조군과 별다른 차이를 관찰할 수 없었다. 그리고 CCl₄ 투여로 인한 cholesterol함량은 HP군에서는 약 28%의 유의한 ($p < 0.001$) 감소를 보였으나, LP군에서는 대조군과 실험군간에는 별다른 차이를 볼 수 없었다.

CCl₄ 투여로 인한 혈청중 지질함량의 감소율이 LP군보다 HP군에서 더 높게 나타남은 간손상이 HP군에서 크게 나타남에 기인된 것으로 사료되며, 특히 본 실험에서 CCl₄ 투여로 인한 혈청 cholesterol함량감소율이 LP군보다 HP군이 크게 나타남은 cholesterol의 운반에 관여하는 lipoprotein함량과 관련이 있을 것으로 생각된다.

혈청 lipoprotein 분획비 변동

단백식이조건을 달리하여 성장시킨 흰쥐에 CCl₄ 투여시 혈청 lipoprotein 분획비 변동을 관찰한 것이 Table 4이다.

대조군 간에는 각 lipoprotein의 분획비율이 별다른 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 CCl₄를 투여하였을 때는 α -lipoprotein 비율이 HP군은 약 49% 유의한 감소 ($p < 0.05$)를 보였고, LP군에서는 약 21%의 감소를 보였으며, pre β -lipoprotein 비율은 LP군에서 약 14%, HP군에서 약 10%의 감소를 나타내었다. 이와는 반대로 β -lipoprotein의 비율은 HP군이 약 42%, LP군이 약 24% 정도 증가하였다.

이상의 성적들을 관찰한 결과 CCl₄를 투여함으로써 양군 공히 pre β -lipoprotein 비율은 감소되었으나, β -lipoprotein의 비율이 증가된 것은 간손상시 apoprotein합성장애로 VLDL은 감소하고, LDL은 증가

한다는 보고^{3,11,13,15})와 β -lipoprotein의 제거가 간장에서 주로 일어난다³)는 점을 고려해 볼 때 CCl₄에 의한 간손상으로 인하여 나타난 결과로 사료되어진다. 특히 CCl₄ 투여시 α -lipoprotein 비율은 HP군에서 LP군보다 감소율이 더 크게 나타남은 간손상시 lecithin : cholesterol acyltransferase 및 HDL apoprotein합성이 저하된다^{12,15})는 사실을 고려해 볼 때 CCl₄투여에 의해 간조직 손상이 HP군에서 LP군보다 더욱 심하였기 때문에 혈청중 α -lipoprotein의 분획비가 더욱 저하된 것으로 사료된다.

요 약

단백식이조건을 달리하여 성장시킨 동물에 CCl₄를 투여하였을 때 혈청중 lipoprotein 분획비의 변동 및 이의 원인을 검토할 목적으로 흰쥐를 저단백식이(7% casein : LP) 및 고단백식이(20% casein : HP)로 성장시킨 후, 50% CCl₄(v/v in olive oil)를 복강내 주사한 다음 간 중량 및 혈청 ALT 활성도 측정으로 간손상을 확인함과 동시에, 혈청지질과 혈청 lipoprotein 분획비를 측정하였다. CCl₄투여시 체중 당 간 무게 및 혈청중 ALT의 활성도는 대조군에 비해 증가하였으며 그 증가율은 HP군이 LP군보다 더 높게 나타났다. 혈청중 총지질, 총 cholesterol 및 triglyceride의 함량은 대조군간에 별다른 차이를 관찰할 수 없었으나, CCl₄투여로 인하여 이들 지질은 대조군에 비해 감소하였으며, 그 감소율은 HP군이 LP군보다 높게 나타났다. CCl₄투여로 인한 lipoprotein분획비의 변동은 대조군에 비하여 양군 공히 pre β -lipoprotein비율 및 α -lipoprotein 비율은 감소되었고, 그 감소율은 HP군이 LP군에 비해 더 크게 나타났다. 한편 β -lipoprotein비율은 CCl₄ 투여로 인하여 두군 공히 증가하였으며 그 증가율은 HP군에서 높게 나타났다. 이상의 실험결과와 문헌상의 지견을 종합해 볼 때 CCl₄ 투여시 LP군에 비하여 HP군에서 간손상

Table 4. Effect of carbon tetrachloride treatment on the lipoprotein fractions in sera of rats fed a low or high protein diet

Lipoproteins (%)	High protein diet		Low protein diet	
	Control	CCl ₄	Control	CCl ₄
α -lipoprotein	20.38 ± 3.56	10.33 ± 3.21**	16.57 ± 1.62	13.14 ± 1.80
Pre β -lipoprotein	42.05 ± 4.37	37.88 ± 7.52	43.93 ± 5.46	37.67 ± 4.51
β -lipoprotein	35.97 ± 4.21	51.09 ± 9.74	39.56 ± 1.44	49.19 ± 9.62

The assay procedure was described in the experimental methods

The other conditions are the same as described in the Table 2

**Significantly different from the high protein diet control group

* $p < 0.05$

이 보다 더 심하게 나타나며, 이로 인하여 apoprotein의 합성억제현상이 초래됨으로써 혈청중 lipoprotein분획비의 변동이 높게 나타날 것으로 생각된다.

문 헌

1. 이해자, 윤종국: 저단백식이로 성장한 흰쥐에 사염화탄소 투여시 간 조직 중 지질함량의 변동. 기초과학연구논집(계명대학교), 9, 135(1990)
2. Drill, V. A., Loomis, T. A. and Belford, J.: Effect of protein-carbohydrate intake on liver injury: Produced in dogs by carbon tetrachloride. *J. Industrial Hygiene Toxicology*, 29, 180(1947)
3. Wakasugi, J. W., Katami, K., Ikeda, T. and Tomikawa, M.: Action of malotilate on reduced serum cholesterol level in rats with carbon tetrachloride-induced liver damage. *Japan J. Pharmacol.*, 38, 391(1985)
4. Sternger, R. J.: Hepatic parenchyma; Cell alterations after long-term carbon tetrachloride administration. *Am. J. Pathologist Bacteriologist*, 43, 867(1963)
5. 윤종국: 사염화탄소를 투여한 흰쥐에서의 간장 및 혈청 xanthine oxidase활성의 변동. 과학논집(계명대학교 생활과학연구소), 6, 75(1980)
6. Smuckler, E. A. and Beneditt, E. P.: Carbon tetrachloride poisoning in rats: Alteration in ribosomes of the liver. *Science*, 140, 308(1963)
7. Autor, A. P., Frank, L. and Roberts, R. J.: Developmental characteristics of pulmonary superoxide dismutase: Relationship to idiopathic respiratory distress syndrome. *Pediat. Res.*, 10, 154(1976)
8. Smuckler, E. A. and Beneditt, E. P.: Studies on carbon tetrachloride intoxication. 3. A subcellular defect in protein synthesis. *Biochem.*, 4, 671(1965)
9. 윤종국, 강희양, 이상일: 저단백식이로 성장한 흰쥐에 사염화탄소 투여가 aniline hydroxylase활성에 미치는 영향. 기초과학 연구논집(계명대학교), 7, 125(1988)
10. Plaa, G. L.: Toxic response of the liver. In "Casarett and Doull's toxicology" Klassen, C. D.(ed.), Macmillan Publishing Company, N. Y., p.286(1986)
11. Robinson, D. S.: The development in the rat of fatty

- livers associated with reduced plasma-lipoprotein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 62, 163(1962)
12. Myes, P. A.: Lipid transport and storage. In "Harper's biochemistry" Murray, R. K. (ed.), Appleton and Lange, Norwalk, p.226(1988)
13. Yokota, F., Igarashi, Y. and Suzue, R.: Effects of ethionine feeding on fatty liver and plasma lipoprotein fractions in rats. *J. Nutr.*, 112, 405(1982)
14. Kuller, L. H., Hulley, S. B., Neaton, J. and Dai, W. S.: Environmental determinants, liver function, and high density lipoprotein cholesterol levels. *Am. J. Epidemiol.*, 117, 406(1983)
15. Chung, T. H.: Changes in lipids and apoprotein moieties of serum high density lipoprotein in patients with liver cirrhosis. *Keimyung Univ. Med. J.*, 4, 28(1985)
16. Reitmann, S. and Frankel, S.: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, 28, 58(1957)
17. Karmen, A.: A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J. Clin. Invest.*, 34, 131(1951)
18. Lowry, O. H., Rosebrouth, H. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951)
19. Gornell, A. G.: Determination of serum proteins by means of the Biuret reagent. *J. Biol. Chem.*, 177, 751(1949)
20. Richardson, R. W., Setchell, K. D. and Woodman, D. D.: An improved procedure for the estimation of serum cholesterol. *Clin. Chem. Acta*, 31, 403(1971)
21. Toro, G. and Ackermann, P. G.: *Practical clinical chemistry*. Little Brown Company, Boston, p.351(1975)
22. Bucolo, G. and David, H.: Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.*, 19, 476(1973)
23. Borer, K. T., Hallfrisch, J., Tsai, A. C. and Kuhns, L. R.: The effect of exercise and dietary protein levels on somatic growth, body composition and serum lipid levels in adult hamsters. *J. Nutr.*, 109, 222(1979)

(1992년 11월 19일 접수)