

과산화지질의 투여가 흰쥐 간의 산화와 항산화계에 미치는 영향

권명자 · 전영수 · 송영옥[†]

부산대학교 식품영양학과

The Degree of Lipid Oxidation of Rat Liver Fed Peroxidized Lipid and Its Effects on Anti-Oxidative System

Myeong-Ja Kwon, Young-Su Joun and Yeong-Ok Song[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

Accumulation of peroxidized lipid, fed or injected in the body of rats was investigated and the effect of peroxidized lipid on the antioxidative system was studied also. Three groups each having six of Sprague-Dawley rats were raised for 8 weeks. The peroxide value (POV) of diet fed to the control and the peroxidized group was 5.47 and 22.14meq/kg, respectively. Injected group was given the control diet and peroxidized linoleic acid (POV 31.81meq/kg) was injected into the peritoneal area three times a week. The POV, MDA, and protein carbonyl values of the peroxidized and the injected group (experimental groups) were significantly higher ($p < 0.05$) than those of the control group. Cu, Zn-SOD and Mn-SOD activity of the experimental groups increased 1.6 times that of control group at 4th week, and decreased by 60% of their activity after 8 weeks of feeding ($p < 0.05$). Catalase activity, glutathione and Vt. E contents of the experimental groups were significantly lower ($p < 0.05$) than those of the control group during 8 weeks. The accumulation of peroxidized lipid in liver were observed both in the fed or the injected group. The increase of enzyme activity of the experimental groups during 4 weeks suggests an adaptation of antioxidative system to get rid of the peroxidized lipid. Decrease of enzyme activity and glutathione observed as the peroxidized lipid accumulation proceeded further, however, seems to indicate the oxidative damage of enzyme and protein. Determination of the protein carbonyl content may be used as a method for measuring the oxidative damaging effect of peroxidized lipid.

Key words : peroxidized lipid, protein carbonyl, SOD, catalase, Vt. E

서 론

불포화지방산은 혈청 중성지질 및 cholesterol 함량을 낮추는 효과가 있을 뿐만 아니라, 체내에서 prostaglandin계의 호르몬 합성시 혈관확장, 혈소판 응집 저해, 알레르기원의 생성을 억제하여 성인병의 예방과 치료에 크게 권장되고^(1,2) 있으나 이러한 사실은 불포화지방산이 산화되지 않았을 경우이다. 식이내 불포화지방산은 체내외에서 산화되기 쉽고 생성된 과산화물은 반응성이 큰 유리기를 지니고 있어 생체내 중요한 biochemical들과 반응한다. 유리기들은 생체내의 단백질 또는 아미노산과 반응하여 이들의 기능을 파괴시키거

나 protein radical을 생성시켜 단백질-단백질, 단백질-지질, 단백질-당, 또는 다른 중요한 물질들과 가교결합(cross-linking bridge)을 형성하여⁽³⁾ 여러 조직에서 세포막의 변화를 일으킬 뿐만 아니라 효소활성의 감소, DNA 손상과 돌연변이 및 퇴행성 장애를 일으켜 암, 심장병 및 노화 등의 생리학적인 변화를 초래한다고 보고되고 있다⁽⁴⁾. 최근 10여년간 많은 연구를 통하여 성인병의 예방 및 치료의 목적으로 강조되어온 식물성유지나 어유를 권장하는 식이의 섭취에 따른 체내에서 지질과산화물과 그 부산물의 형성이 최근의 동물실험 결과에 의하여 문제점으로 그 심각성이 부각되고 있다⁽⁴⁻⁷⁾. 이들 과산화지질이 지니고 있는 반응성이 큰 유리기들은 지질의 산화시 생성될 뿐만 아니라 생체내 대사과정 중에서도 생성된다. 생체는 glutathione, super-

[†]To whom all correspondence should be addressed

oxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, non protein bound-SH 그리고 비타민 E 등의 항산화제가 존재하여 생성되는 유리기를 제거하여 생체 항상성을 유지하고 있다.

최근 성인병의 예방과 건강 증진의 목적 또는 뇌구성 성분의 일환으로서의 n-3계 다중불포화지방산의 장점에 대한 건강상식의 전파로 많은 가공제품에 고도의 불포화지방산인 DHA나 EPA를 첨가하여 시판하고 있거나, 또는 순수정제품이 제조되어 시판되고 있어 유통과정 중의 산패 또는 체내에서의 산패에 따른 과산화 축적과 이로 인한 질병의 발생, 더 나아가서는 노화나 퇴행성 변화의 유발 가능성이 지적되고 있다. 불포화지방산의 섭취 정도와 체내의 지질의 산화, 이에 따른 생체내 장애 등에 대한 많은 연구들이 보고되고 있으나 외인성 과산화지질의 체내 흡수에 대하여는 논란이 있다. 과산화지질을 구강내로 투여하였을 때 체내에 흡수가 되지 않았으며, 식이성 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)는 24시간 후 임파에서 발견된⁸⁾ 반면 고도의 불포화지방이 함유된 식이를 섭취한 쥐의 피하지방에 나타난 과산화지질은 체내에서 흡수 후 산패된 것이 아니라 과산화지질이 소장을 통해 흡수되어 축적된 것⁹⁾이라는 상반된 보고와 산패된 지질은 소장의 lipase의 활성을 억제한다¹⁰⁾는 *in vitro* 실험 결과 고도의 불포화지방식이 시중 주요 장기에 축적된 과산화지질은 내인성 뿐만 아니라 외인성에도 기인한다는 지적⁷⁾이 있다. 따라서 본 연구에서는 외인성 과산화지질의 투여시 체내에서의 축적 정도를 살펴보고 이에 따른 생체내의 항산화제의 영향을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 사육 및 식이

100g 내외가 되는 Sprague-Dawley종을 국립보건연구원으로부터 분양받아 7일간 대조군 사료로 적응시킨 후 난괴법으로 6마리를 한군으로 하여 정상적인 사료를 먹이는 군(대조군), 정상적인 사료를 산패시켜 먹이는 군(산패군), 그리고 정상적인 사료를 먹이면서 1주일에 3번씩 규칙적으로 산패한 linoleic acid 0.05cc를 주사하는 군(주사군)의 3가지 군으로 나누어 8주 동안 사육하였다. 주사군에 투여한 산패한 linoleic acid의 투여량은 0.05, 0.1, 0.15cc를 일주일에 세번씩 주사하여 두 달간 예비사육하였을 때 문제가 없었던 양을 택하였다. 식이조제는 사료 100g 당 단백질 15%, 지질 10%로 하고(Table 1), 지방의 급원으로는 대두유

를 사용하였다. 사료는 매주 만들어 -80°C 냉동고에 보관하면서, 식이공급 2시간 전에 실온에서 해동시킨 후 대조군 사료로 사용하였고(POV : 5.47 ± 0.84 meq/kg), 산패군은 대조군 사료를 25°C 항온기에서 48시간 방치하여 산패시킨 것(POV : 22.14 ± 1.04 meq/kg)을 먹였고, 주사군은 대조군 사료를 먹이면서 25°C 항온기에서 2시간 동안 산패시킨 linoleic acid(31.91 ± 0.88 meq/kg)를 0.05cc를 1주일에 3번, 같은 시각에 복강내에 투여하였다. 식이는 쥐의 체중당 사료권장량¹¹⁾(Table 2)에 근거한 제한식이를 하였으며 물은 자유로 주었고, 명암은 12시간 주기로 하였고, 습도는 50~60%, 온도는 22°C 를 유지시켰다. 사육기간 중 1주일에 1번씩 일정한 시간에 체중을 측정하였다.

해부 및 장기적출

일정한 기간 동안 사육한 쥐를 12시간 절식시킨 후,

Table 1. Composition of experimental diet

Ingredient	Content (%)
Casein ^a	15
Corn starch ^b	69
Lipid ^c	10
Mineral mixture ^d	4
Vitamine mixture ^e	1
Cellulose (CMC) ^f	1
Kcal/g	4.22

^a Junsei chemical Co.

^b Miwon Co.

^c Hae-Pyo, Dong-Bang Co.

^d Salt mixture : g per 100g of salt mixture : CaH_2PO_4 7.5g, $\text{K}_2\text{H-OP}_4$ 32.2g, NaCl 16.7g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.2mg, Ferric citrate 2.75g, MnSO_4 0.51g, KI 70mg, $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 35mg ZnCl_4 25mg, $\text{COCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5mg, $(\text{SO}_4\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mg

^e Vitamin mixture : Per 1kg of diet : thiamine HCl 20mg, riboflavin 20mg, pyridoxine 20mg, nicotinic menadione 45mg, vitamin B₁₂ (0.1% tritarate in mannitol 22mg retinyl acetate 2000 I.U., cholecalciferol 1000I.U., dl-tocopheryl acetate 0.1g, choline 1.5g, inositol 0.1g, vitamin C 0.9g, *p*-aminobenzoic acid 0.1g

^f Cellulose : CMC (sodium carboxyl methyl cellulose non-nutritive fiber)

Table 2. Recommended daily allowances for rats¹¹⁾

Weight (g)	RDA (g)	Calory (Kcal)
91~115	14	59.4
116~130	16	68.0
131~145	16	68.0
146~160	18	76.6
161~175	18	76.6
176~190	20	85.2
216~230	24	102.3
231~245	26	110.6

드라이아이스로 마취하여 혈액과 간을 취하였다. 채혈은 쥐의 대퇴부동맥에서 행하였고, 혈액응고를 방지시키기 위해 EDTA 처리된 bial에 넣은 뒤, 3000×g에서 10분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 채혈 후 간을 떼어내어 얼음결정이 있는 상태의 생리식염수에 담귀 행군 후, 조직을 다듬어 이 물질을 제거하고 이를 1.15% KCl을 가하여 10(w/v)농도가 되게 조직마쇄기로 마쇄시킨 후, 각 실험에 사용할 수 있도록 세분화하여 -80°C 냉동고에 보관하였다.

Peroxide value 및 malondialdehyde 측정

사료와 linoleic acid의 POV와 MDA는 A.O.A.C.법¹²⁾에 따랐다. 간과 혈장의 POV는 Ohakawa법¹³⁾의 iodometric Assay에 의해 조직마쇄액에 chloroform : methanol(2 : 1)을 가해 반복하여 지방을 추출한 후 acetic acid : chloroform(3 : 2)와 포화 KI용액을 첨가하여 암실에서 방치한 다음 cadmium acetate를 첨가하여 원심분리한 뒤, 상층액을 취해 353nm에서 측정하였다. 혈장의 POV는 혈장 0.1ml에 acetic acid : chloroform(3 : 2/v:v) 1ml 넣은 뒤, 위와 동일한 방법으로 측정하였다. 과산화물값은 cumene hydroperoxide로 검량곡선을 작성하여 이로부터 농도를 구하였다.

간과 혈장의 MDA 함량 측정은 Ohakawa법¹³⁾에 따랐으며, 반응정지액은 TBA 41.6mg에 0.125N HCl에 용해한 6.8% trichloroacetic acid(TCA)용액 100ml을 가해 녹인 후 6.8mM butylated hydroxy toluene용액을 가하여 조제하였다. 간 추출액 1ml와 혈장 0.1ml에 반응정지액 3ml를 각각 가하여 20분간 가열한 후, 이를 원심분리하여 얻은 상등액을 535nm에서 흡광도를 측정하였다.

Protein carbonyl 함량 측정

간조직의 protein carbonyl 함량의 측정은 2,4-dinitrophenyl hydrazine(2,4-DNP)법¹⁴⁾으로 하였다. 단백질 함량이 약 1mg 정도가 되게 Lowry법¹⁵⁾으로 측정하여 취한 간균질액에 50nM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES) pH 7.2 buffer에 녹인 1% streptomycin sulfate를 시료량과 동일량으로 가한 뒤 얼음속에서 5분간 방치한 후 1000×g에서 5분간 원심분리하여 그 상층액을 2개의 원추형 원심관(a, b)에 동일량으로 나누고 여기에 동일용량의 20% TCA를 가하여 단백질을 침전시킨다. A시험관에 2N HCl을 넣고 B시험관에는 2,4-DNP 시약을 가해 25°C에서 1시간 방치하는 동안 단백질과 시약이 충분히 반응을

일으키도록 5분 간격으로 단백부유액을 저어준다. 20% TCA용액을 가하여 반응을 정지시키고 11000×g에서 5분간 원심분리하여 얻은 침전물을 ethanol과 ethylacetate의 혼합액으로 5~6회 세척하여 불순물을 제거한다. 얻어진 단백질 침전을 20mM sodium phosphate buffer, pH 6.5에 녹인 6M guanidine HCl을 가하여 침전물을 용해시켜 4°C의 12000×g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 360~390nm에서 흡광도를 측정하여 두 시료 사이의 흡광도 차이를 분자흡광계수($21 \times 10^{-5} \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)를 이용하여 시료의 protein carbonyl 함량을 계산하였다.

Protein carbonyl value(nmol/mg protein)

$$= \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{분자흡광계수} \times \text{반응혼합액의 단백질함량}}$$

효소활성의 측정

Cu, Zn-SOD와 Mn-SOD는 Oyanagui법¹⁶⁾에 의해 간 조직액을 13000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액은 Cu, Zn-SOD의 시료로 하였고, 침전물은 0.1% triton x-100에 녹인 후 phosphate buffer로 농도별로 희석하여 Mn-SOD 시료로 사용하여 측정계에서 생성되는 superoxide가 superoxide dismutase에 의해 50% 저해될 때 반응역 중의 검체량(ID₅₀)을 측정하여 이로부터 효소농도를 구하였다.

$$\text{Inhibition \%} = (1 - \text{시료흡광도} / \text{대조군흡광도}) \times 100$$

$$\text{SOD농도 (NU/mg protein)} = 50\% \text{ inhibition 희석배수} \times \text{시료량} \times 1 / \text{단백농도}$$

Catalase의 활성은 측정은 Chance와 Maehly법¹⁶⁾에 의해 간 추출액을 원심분리하여 얻은 상등액에 H₂O₂ 용액을 가하여 240nm에서 1분간 흡광도 변화를 측정하여 catalase 활성을 측정하였다.

Glutathione의 측정

Cystein-SH량을 측정하여, non protein-SH의 양에서 cysteine-SH의 양을 제하여 glutathione 함량을 산출하였다¹⁷⁾. Nonprotein-SH 함량은 간균질액의 상등액에 NaNO₂와 H₂SO₄(1 : 9/v : v) 혼합액을 가하여 방치시키고 시료액에 sulfamic acid ammonium 수용액을 가하여 격렬하게 혼합한 후 1% HgCl₂과 3.4% sulfanilamide/0.4N HCl(1 : 9/v : v) 혼합액을 가하여 방치한 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로서 125nM glutathione용액을 사용하여 동일한 방법으로

실험하여 흡광도를 구한 뒤 다음의 방법에 의해 농도를 계산하였다.

Non protein-SH함량 (nmol/g tissue)=시료흡광도/표준용액흡광도 $\times 125 \times 2.75$

Cystein-SH 함량은 간장균질액에 10% TCA을 동량 가한 후, 원심분리하여 얻은 상등액 0.5ml에 빙초산 0.5ml와 ninhydrin시약 (250mg ninhydrin/빙초산 6ml+Conc. HCl 4ml)를 0.5ml를 가하였다. 이를 10분간 끓인 다음 즉시 흐르는 물에서 냉각한 다음 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cystein-SH 함량 (nmol/g tissue)=흡광도/25 \times 시료량 $\times 1000$

간의 vitamine E 정량

Taylor법¹⁸⁾에 준해 간장균질액에 methanol과 chloroform이 0.8 : 2 : 1의 비율이 되도록 잘 섞어 얼음속에서 2시간 방치한 뒤 원심분리하여 불용성물질을 제거한 다음, chloroform, methanol 및 물의 혼합액으로 지질을 추출하여 시료로 하였으며 표준 dl- α -tocopherol을 이용하여 검정곡선을 작성하였다.

통계처리

모든 실험결과는 SPSS package¹⁹⁾를 이용하여 one-way ANOVA 검정을 행하였으며 유의성이 발견된 경우 사후검정으로 Duncan의 다중비교검정 ($p < 0.05$)을 실시하였다.

결과 및 고찰

성장율 및 간중량의 변화

성장속도는 4주 까지 현저하였으나 이후 다소 둔화되었다. 실험군 중 대조군의 성장율이 가장 높았고, 다음이 산패군 그리고 주사군의 순으로 식이기간에 현저한 성장율의 차이가 있었다 ($p < 0.05$) (Fig. 1). 실험기간 중 모든 군에 있어서 사료섭취에 별문제가 없었으나, 주사군은 복강주사 후 다음날 사료섭취량이 다소 감소함 (약 10% 정도)을 관찰할 수 있었으나 곧 정상으로 되돌아왔다. 이는 복강주사로 인한 stress 때문인 것으로 사료된다. 식이와 주사로 투여된 외인성 과산화지질의 POV 값은 대조군이 5.47meq/kg, 산패군이 22.12meq/kg, 그리고 주사군이 31.91meq/kg이었으며 TBA값은 대조군은 0.63, 산패군은 1.58 그리고 주사군

은 2.12meq/kg으로서 대조군, 산패군 그리고 주사군의 순으로 외인성 과산화지질의 투여량이 많았다. 성장율과 외인성 과산화지질의 양과는 역의 상관관계를 보이고 있어 식이로 투여한 과산화지질이 성장에 영향을 미친 한가지 요인으로 생각된다. 8주간 사육 후 간장의 무게를 측정해 본 결과 실험군들간에 유의적인 차이가 없었다.

과산화지질의 축적에 따른 POV 및 MDA의 변화

식이 또는 복강내로 투여된 과산화지질의 간에서의 축적 정도를 살펴보았을 때 4주와 8주의 POV는 대조군에서는 각각 122.16, 199.5nmol/g tissue, 산패군에서는 215.16, 28.5nmol/g tissue 그리고 주사군에서는 268, 50.7nmol/g tissue이었다. 4주째 산패군과 주사군의 POV는 대조군 POV의 176%와 216% 만큼 높았으며 8주째에는 대조군의 15%, 24%에 해당되는 값으로 이들의 차이는 유의적이었다 ($p < 0.05$) (Fig. 2). 간의 MDA 함량은 세군 모두 전 실험기간 동안 증가하였으

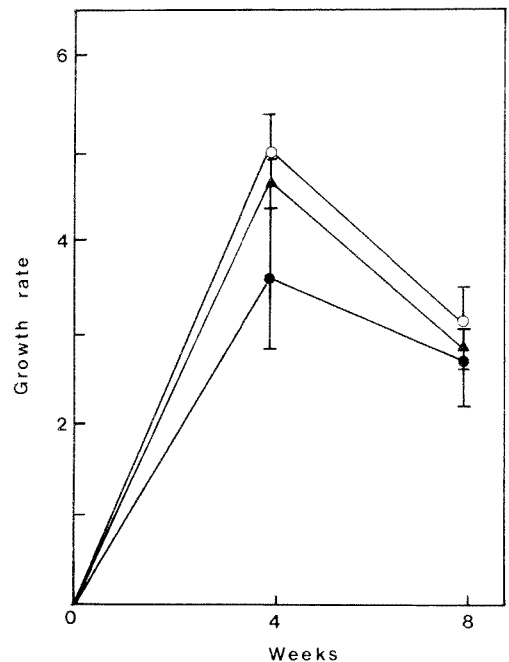


Fig. 1. Change in growth rate of rats fed or injected different amount of peroxidized lipid for 8 weeks.

Control group (—○—) was given normal diet (POV 5.47 \pm 0.12meq/kg). The normal diet was incubated at 25°C for 48 hours (POV 22.14 \pm 1.04meq/kg) and then supplied to the peroxidized group (—▲—). The injected group (—●—) was given the normal diet and peroxidized linoleic acid (POV 31.91 \pm 0.88meq/kg) was injected into the peritoneal area 3 times a week.

며 8주째의 산패군과 주사군의 MDA값은 대조군값의 215%와 270%에 해당되는 값으로 그 차이가 통계적

으로 유의하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 2). 혈장 중의 과산화물 값은 8주 사육 후 산패군과 주사군의 POV가 대조군

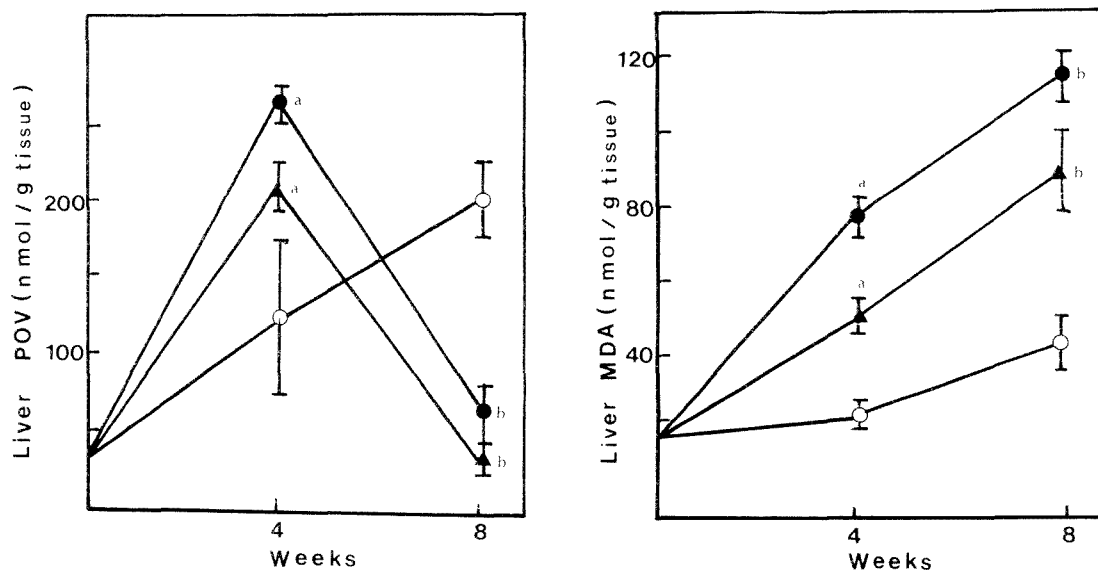


Fig. 2. Change in peroxidized value and malondialdehyde content of rat liver.

—○—: Control group, —▲—: Peroxidized group, —●—: Injected group

For the diet preparation, see the legend of Fig. 1.

The values are means of 3 replicates of 6 rats.

^{a,b}The values of peroxidized and injected group are significantly different ($p < 0.05$) compared to that of control.

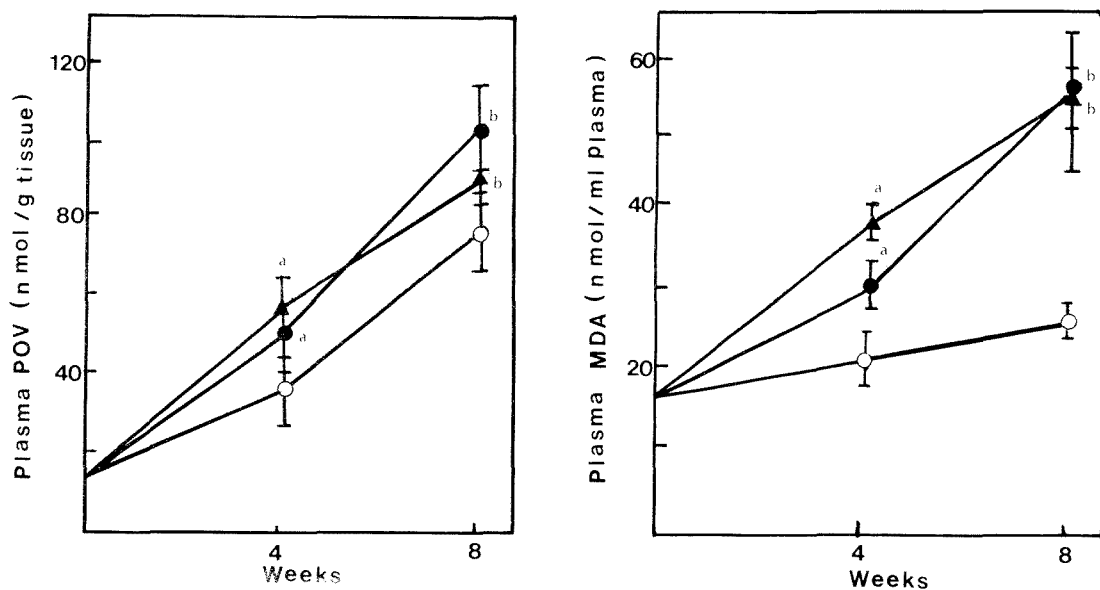


Fig. 3. Change in peroxidized value and malondialdehyde content of plasma.

—○—: Control group, —▲—: Peroxidized group, —●—: Injected group

For the diet preparation, see the legend of Fig. 1.

The values are means of 3 replicates of 6 rats.

^{a,b}The values of peroxidized and injected group are significantly different ($p < 0.05$) compared to that of control.

POV의 118%와 136%, MDA값은 대조군의 185%와 213%의 값으로 대조군에 비해 유의적으로 높았다($p < 0.05$)(Fig. 3). 외인성 과산화지질의 투여에 따른 체내 축적 정도는 간장에 축적되는 정도가 혈장 보다 높았으며 간과 혈액 모두 대조군 식이에 비해 산패군 주사군의 과산화물값이 유의적으로 높아 식이나 복강으로 투여된 과산화지질은 체내에 축적되는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 어유식이 섭취군에 있어서 중요장기에 축적된 TBARS가 내인성 뿐만 아니라 외인성의 것에도 기인한다는 조 등²⁾의 결과와 일치하는 것으로 생각된다.

Protein carbonyl compound의 변화

대사과정 중 생성된 활성산소나 지질의 과산화물이 지니고 있는 유리라디칼에 의한 생체내 손상을 측정하기 위해 오랫동안 지질산화의 2차생성물인 MDA의 함량을 측정하여 왔으나 최근에는 이 보다도 더 민감하게 손상 정도를 나타내어 줄 수 있는 protein carbonyl 법¹⁴⁾이 보고되고 있다. 지질의 산화시 생성되는 유리기들이 생체내의 단백질과 반응하여 이들을 파괴시킴으로서 protein carbonyl compound가 형성되고 이러한

단백질의 파괴는 지질 산화생성물인 hydroperoxide나 malondialdehyde 생성 보다 먼저 일어난다.²⁰⁾ 고하여 생체내 지질의 산화정도를 측정하는 민감한 방법으로 보고되고 있다. 본 실험에 사용한 protein carbonyl 측정 방법은 2,4-DNP법으로 전 실험기간을 통하여 대조군, 산패군, 그리고 주사군에서 지속적으로 그 함량이 증가함을 볼 수 있었다. 8주째 대조군의 protein carbonyl compound 함량은 36.96nmol/mg protein이었고, 산패군은 66.2nmol/mg protein 그리고 주사군은 71.93 nmol/mg protein으로 대조군에 비해, 179%, 194% 높은 값이므로 통계적인 유의성이 있었다($p < 0.05$)(Fig. 4). 양 등²¹⁾의 보고에 의하면 흰쥐의 피부조직에서 과산화지질 함량이 증가함에 따라 피부조직에서 protein carbonyl 함량이 증가함을 보고하였고 최근의 노화에 관한 일련의 보고²²⁾에서는 지질산화에 의한 생체내 손상을 MDA값으로 나타내는 대신 protein carbonyl compound 함량으로 나타내고있다. 노화를 위시한 지질에 의한 생체내 산화적 손상의 연구시 지질의 과산화함량을 측정하는 것 보다는 산화 손상물질인 protein carbonyl 함량을 측정하는 것이 더욱 민감하고 타당하다고 보고하고 있다²³⁾. 본 실험에서 측정된 간의 MDA 값과 protein carbonyl 함량 사이의 상관계수는 0.9 이상으로 본 실험과 같은 실험 design에서도 protein carbonyl 측정법을 생체내 산화적인 손상을 나타내어 줄 수 있는 지표로 사용할 수 있다고 생각하며, 또한 MDA 및 protein carbonyl compound의 생성과 사육기간과의 관계를 회귀직선식으로 살펴보았을 때 전자는 $y=1/2x$ 로 후자는 $y=x$ 로 나타낼 수 있어 protein carbonyl compound의 측정법이 POV나 MDA 측정법 보다 더욱 민감한 것으로 생각된다.

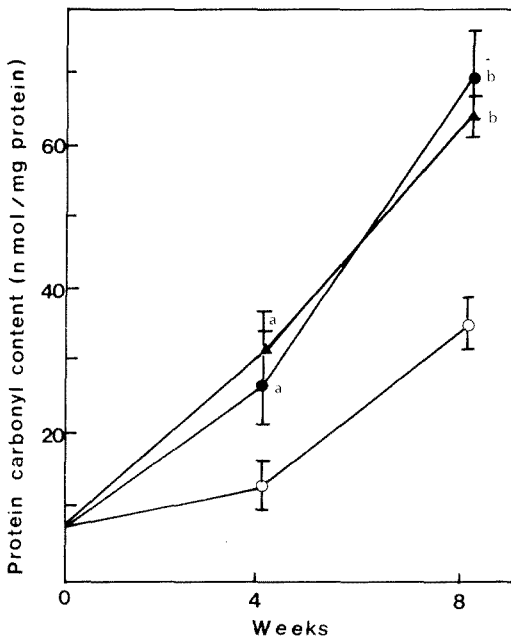


Fig. 4. Change in the protein carbonyl content of rat liver.

—○—: Control group, —▲—: Peroxidized group, —●—: Injected group

For the diet preparation, see the legend of Fig. 1.

The values are means of 3 replicates of 6 rats.

^{a)}The values of peroxidized and injected group are significantly different($p < 0.05$) compared to that of control.

간의 superoxide dismutase, catalase 활성 및 glutathione의 함량 변화

Cu, Zn-SOD와 Mn-SOD의 활성을 살펴보았을 때 (Table 3) 4주째의 Cu, Zn-SOD는 산패군과 주사군의 활성이 대조군에 비해 150% 이상 증가하였으며, 사육기간의 증가에 따라 대조군의 효소의 활성은 증가하였으나 8주째의 산패군 주사군의 경우 4주째와는 달리 효소의 활성이 대조군에 비해 상당히 감소하였다($p < 0.05$). 이러한 현상은 Mn-SOD의 경우에 있어서도 같은 경향으로 8주 동안 대조군의 효소 활성이 증가한 사실이나, 4주째의 산패군 주사군의 효소 활성이 대조군 보다 높았던 사실은 간내 과산화지질의 증가에 따라 이를 제거하려는 효소 합성증가로 항산화 효소계의 적

응현상²¹⁾이라고 생각되며, 8주째의 과산화지질 투여군에 있어서의 효소 활성의 감소는 과산화물질의 축적에 따른 산화적인 손상으로 유리기에 의한 효소의 파괴현상^{1,24)}으로 생각된다 가열유를 vitamin E 수준을 달리하여 6주 동안 사육한 흰쥐의 Cu, Zn-SOD와 Mn-SOD 활성은 간의 과산화지질 함량이 증가함에 따라 3주째까지는 증가하였으나, 6주째에는 활성이 감소되었다는²⁵⁾ 본 실험과 유사한 결과를 보고하였다. Catalase 활성은 대조군의 경우 사육기간의 경과에 따라 활성이 감소함을 볼 수 있었으나 산패, 주사군에 있어서는 대조군에 비해 4주, 8주 모두 그 활성이 낮아졌는데 ($p < 0.05$) 이는 과산화지질에 의한 산화적 손상이 SOD 보다 현저하게 나타난 것으로 catalase가 SOD에 비해 산화적 손상에 다소 민감한 것으로 사료된다. 이들 항산화계 효소들은 대사과정 중 발생하는 활성산소종의 유리기를 제거할 뿐만 아니라 이들 활성산소종에 의해 그 활성이 비가역적으로 불활성화 될 수 있으며²⁶⁾ 또한 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 능력이 있는 것으로 보고되어 있다.^{25,27)}

Glutathione 함량의 변화는 항산화계 효소의 변화와는 달리 사육기간의 증가에 따라 그리고 과산화지질의 축적정도에 따라 감소하였다 ($p < 0.05$) (Table 3). 피부조직의 산화 상태와 항산화 활성의 변화를 알아보는 실험에서 피부조직의 지질과산화도가 증가할수록 glutathione 함량이 감소함을 보고하여 지질산화 정도와 양의 상관 관계가 있음을 보고하였고²¹⁾, Videla 등은 ethanol을 흰쥐에 투여하였을 때 ethanol에 의해 생성된 과산화지질이 glutathione과 반응하여 산화됨으로써 그 함량이 감소하였다고 보고하였다.²⁸⁾

간의 vitamin E 함량의 변화

간의 vitamin E 함량은 4주, 8주에 대조군은 각각 38.

75, 37.13mg/g tissue, 산패군은 각각 35.6, 26.9mg/g tissue 그리고 주사군은 각각 28.6, 27.2mg/g tissue로 사육기간 동안 지속적으로 감소되었고 그 감소의 정도는 대조군에 비해 유의적이었다 ($p < 0.05$) (Fig. 5). Vitamin E가 부족한 세포내에서는 lipid peroxidation이 증가된다는 사실이 일반적인 반면, 불포화도가 높은 기름의 투여로 plasma vitamin E가 감소함에도 불구하고, plasma MDA에는 아무런 영향이 없었다는 보고도 있

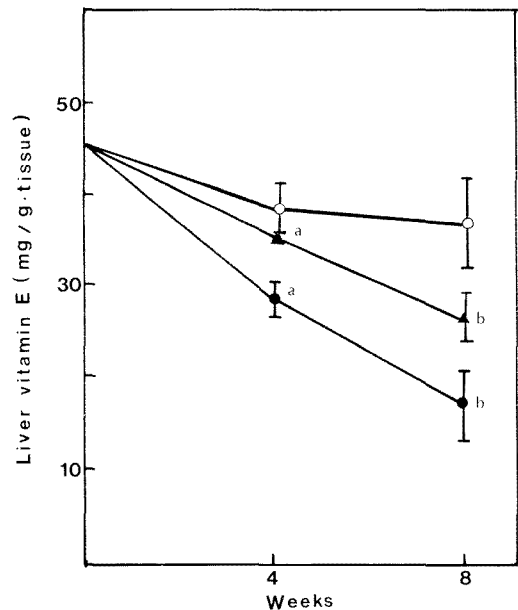


Fig. 5. Change in the vitamin E content of rat liver.

○—○ : Control group, ▲—▲ : Peroxidized group, ●—● : Injected group

For the diet preparation, see the legend of Fig. 1.

The values are means of 3 replicates of 6 rats.

^{a,b} The values of peroxidized and injected group are significantly different ($p < 0.05$) compared to that of control.

Table 3. Change in the antioxidative system of rat liver due to the accumulation of peroxidized lipid fed or injected in the body

	Cu, Zn - SOD (Nu/mg prot.)		Mn - SOD (Nu/mg prot.)		Catalase (U/mg prot.)		Glutathione (nmol/g tissue)	
	4w	8w	4w	8w	4w	8w	4w	8w
Control group ¹⁾	17.60±2.40	20.94±2.58 ^a	1.48±0.37 ^a	2.34±0.67 ^a	17.01±0.15 ^a	26.06±3.08 ^a	262.00±145.19	305.45±127.81 ^a
Peroxidized group ²⁾	29.15±3.44	13.05±0.21 ^b	2.55±2.17 ^b	1.72±0.31 ^b	12.13±0.98 ^b	17.02±0.31 ^b	350.93±109.57	285.91±52.42 ^a
Injected group ³⁾	28.13±8.05	10.74±3.66 ^b	2.30±1.31 ^b	1.20±0.22 ^b	8.69±0.82 ^c	14.94±3.00 ^b	270.25±37.96	214.42±84.60 ^b

¹⁾ Diet for control group was prepared every week and kept frozed at -80°C and thawed 2hr before supplied (POV 5.47±0.12meq/kg)

²⁾ Diet for the peroxidized group was prepared as incubation the control diet at 25°C for 48hr (POV 22.14±1.04meq/kg)

³⁾ Injection group was given the control diet and peroxidized linoleic acid was injected into the peritoneal area 3 times a week (POV 31.91±0.88meq/kg)

The values are means of 3 replicates of 6 rats

^{a,b,c} Different letters in the same column are significantly different at level of 0.05

다²⁹⁾. 일반적으로 투여한 식이지방산의 불포화도가 증가될수록 불포화 지방산 자체의 산화를 막기 위해 세포 내 vitamin E 이용율이 높아져 조직내의 vitamin E 수준이 감소되는 현상을²⁹⁾ 볼 수 있다.

요 약

식이나 복강주사로 투여한 외인성 과산화지질이 체내 주요 장기에 축적되는 지를 조사하기 위하여 정상식이 (POV 22.14meq/kg)를 주는 군(대조군), 산패시킨 식이 (22.14meq/kg)를 공급한 군(산패군), 그리고 대조군 식이를 주면서 일주일에 3회 산패한 linoleic acid (POV 31.81meq/kg)를 복강에 주사한 군(주사군)을 8주 동안 사육하면서 간과 혈액의 산화정도를 측정하였고, 과산화지질의 투여에 따른 항산화계의 변화도 살펴보았다. 4주째 산패군과 주사군의 간의 POV는 대조군의 176%와 216%로 높은 값을 보였으나 8주째에는 대조군의 15%와 24%에 해당되는 현저히 낮은 값이었다 ($p < 0.05$). 산패군과 주사군의 MDA 함량은 사육기간 동안 대조군 보다 높았으며 (4주 : 115%, 8주 : 170%), 4주에 비해 8주의 차이가 더 현저하였다 ($p < 0.05$). 간의 항산화계 효소의 변화를 살펴보면 Cu, Zn-SOD의 활성은 사육 4주째에는 산패군과 주사군의 활성이 대조군에 비해 약 1.6배 정도 증가하는 현상을 보였으나 8주 후에는 대조군의 활성의 50~60%로 감소하였다 ($p < 0.05$). Catalase와 glutathione 그리고 vitamin E의 함량은 산패군과 주사군에 있어서 사육기간이 경과함에 따라 대조군에 비해 현저히 감소하였다 ($p < 0.05$). 이상의 실험결과로부터 식이 또는 주사로 투여한 과산화지질이 장기내에 축적되는 현상을 볼 수 있었고, 사육 4주째에 산패군과 주사군의 효소의 활성이 증가한 것은 항산화계가 생성된 과산화물을 제거하려는 적응현상으로 보아지며, 사육기간 동안 효소활성, glutathione과 vitamin E 함량의 감소 사실은 과산화지질의 과다한 축적에 따른 산화적인 손상의 결과로 생각된다. Protein carbonyl 함량 측정법은 과산화지질에 의한 생체내 산화적인 손상을 측정하기에 민감한 방법으로 생각되며, 본 실험 design과 유사한 연구에서도 적용할 수 있을 것으로 여겨진다.

문 헌

1. Simopoulos, A. P. : Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 438 (1991)

2. Dyerberg, J. : Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutr. Rev.*, **44**, 125 (1986)
3. Gardner, H. W. : Lipid hydroperoxides reactivity with protein and amino acids. A review. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 220 (1979)
4. Kobatake, Y., Kuroda, K., Jinouchi, H., Nishide, E. and Innami, S. : Dietary effect of ω -3 type polyunsaturated fatty acids on serum and liver lipid levels in rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 11 (1983)
5. Leibovits, B. E., Hu, M. L. and Tappel, A. L. : Lipid peroxidation in rat tissue slices : Effect of dietary vitamin E, corn oil, lard and menhaden oil. *J. Nutr.*, **110**, 924 (1980)
6. Hu, M. L., Frankel, E. L., Leibovitz, B. E. and Tappel, A. L. : Effect of dietary lipids and vitamin E on *in vitro* lipid peroxidation in rat liver and kidney homogenate. *J. Nutr.*, **119**, 1574 (1989)
7. 조성희, 임정교, 최영선 : 어유 섭취시 식이비타민 E 수준에 따른 환취체내 비타민 E, A, 글루타치온 상태의 기간별 변화. *한국영양학회지*, **25**, 586 (1992)
8. Iritani, N., Fukuda, E. and Kitamura, Y. : Effect of corn oil feeding on lipid peroxidation in rats. *J. Nutr.*, **110**, 924 (1980)
9. Bunyan, J., Green, J., Nerrellum, E. A., Diplock, A. T. and Cawthorne, M. A. : On postulated peroxidation of unsaturated lipids in the tissues of vitamin E deficient rats. *Br. J. Nutr.*, **22**, 97 (1968)
10. Yoshida, M., Suzuki, K. and Kaneda, T. : Studies on the toxicity of the autoxidized oils. II. The effects of autoxidized oils on the enzymatic activities. *Yukagaku*, **21**, 881 (1972)
11. 전세열, 김천호 : 영양학실험. 수확사, p.121 (1992)
12. A.O.A.C. : *Official Method of Analysis*. Association of official analytical chemists, 13th ed., Washington, D.C. (1980)
13. Buege, J. A. and Aust, S. D. : Microsomal peroxidation. *Methods in enzymol.*, Vol. 52, p.302 (1978)
14. Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climet, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S. and Stadtman, E. R. : Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymol.*, Vol.186, p.464 (1990)
15. Oyanagui, Y. : Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.*, **42**, 290 (1948)
16. Chance, B. and Maehly, A. C. : Assay of catalase and peroxidase. II, Academic Press, p.764 (1955)
17. Higashi, T. : Critical review on the determination of glutathione in biological preparations. *Proteins, Nucleic Acid and Enzyme*, **33**, 1370 (1988)
18. Taylor, S. L. : Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. *Lipid*, **11**, 530 (1975)
19. 이상근, 김범중, 채서일 : SPSS/PC를 이용한 통계분석. 학연사, p.101 (1993)
20. Davies, K. J. A. and Goldberg, A. L. : Protein damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *Biol. Chem.*, **262**, 8227 (1987)

21. 양성렬, 최기호, 손세호, 안봉환, 이민화, 김영표 : 흰쥐의 나이에 따른 피부조직의 산화상태와 항산화활성의 변화. *한국노화학회지*, **2**, 117 (1992)
22. Orr, W. C. and Sohal, R. S. : Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, **263**, 1128 (1994)
23. 박명희, 최경원, 장경숙, 조성희 : 어유섭취가 출생 후 발달과정의 흰쥐의 간과 뇌조직의 지질과산화와 그 관련기능에 미치는 영향. *한국영양학회지*, **20**, 111 (1987)
24. Song, Y. O., Cheigh, H. S. and Byun, J. H. : Change in free amino acids by lipid deterioration in the biological system of rice bran. *J. Korean. Soc. Food Nutr.*, **20**, 214 (1991)
25. 이순재, 이경숙 : 가열유가 흰쥐 간장내의 지질과산화에 미치는 영향. *한국영양식량학회지*, **20**, 15 (1987)
26. Fritsche, K. and Johnston, P. V. : Rapid autoxidation of fish oil in diets without added antioxidants. *J. Nutr.*, **118**, 425 (1988)
27. 오미현, 정혜영, 양한석, 김규원, 정한영, 오우라히코 키치, 요꼬자와다카코 : Gensenoside Rb2가 노화촉진마우스 (SAM-R/1)의 항산화물질에 미치는 영향. *한국생화학회지*, **25**, 492 (1992)
28. Videla, L. A., Fernandez, V., Valenzuela, A. and Ugarte, G. : The effect of chronic alcohol ingestion on free radical defense in the miniature pig. *Pharmacology*, **22**, 343 (1981)
29. Bieri, J. G., Thorp, S. L. and Toliver, T. J. : Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on tissue vitamin E status. *J. Nutr.*, **108**, 393 (1978)
30. Johnson, G. D. : Correlation of color and constitution. I. 2,4-dinitrophenylhydrazones. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2720 (1953)

(1994년 9월 24일 접수)