

## 비타민 A 섭취가 에탄올을 급여한 흰쥐의 체내 항산화 영양소 상태에 미치는 영향

서정숙<sup>†</sup> · 양경미 · 최미정

영남대학교 식품영양학과

### Effect of Dietary Vitamin A on the Status of Antioxidants in Ethanol-Treated Rats

Jung-Sook Seo<sup>†</sup>, Kyung-Mi Yang and Mi-Jung Choi

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyungsan 712-749, Korea

#### Abstract

The present study was conducted to investigate the effect of dietary vitamin A on the antioxidant status in ethanol-treated rats. Weaning rats were fed a basal diet until they reached about 160-180g body weight. Thereafter, four experimental groups were fed a liquid diet containing 36% ethanol of total calorie and four pair-fed groups were fed isocaloric sucrose instead of ethanol. Additionally, the liquid diet contained adequate amount of  $\beta$ -carotene, retinyl acetate, or 13-*cis*-retinoic acid except vitamin A deficient diet. The rats were sacrificed after 7 weeks of feeding periods. Significant decrease in hepatic vitamin E content was found in rats treated with chronic ethanol. However, dietary supplementation of retinyl acetate modified the change to some extent. Total vitamin C content of liver increased in vitamin A-deficient or  $\beta$ -carotene groups with ethanol feeding. The ratio of reduced/oxidized vitamin C increased in the plasma and liver of  $\beta$ -carotene group with ethanol feeding. Chronic ethanol intake did not change the total glutathione content of rat liver, but increased reduced glutathione (GSH)/oxidized glutathione (GSSG) ratio. This increase in hepatic GSH after chronic ethanol treatment may be due to increase synthesis of GSH in the liver. Zn and Cu contents of liver decreased after chronic ethanol treatment. The change of Se content in plasma and liver was not consistent. Fe content of liver increased by ethanol treatment, but this increase reduced in rats fed dietary retinyl acetate or 13-*cis*-retinoic acid. Fe content of plasma increased in vitamin A-deficient and  $\beta$ -carotene supplemented groups with ethanol intake.

**Key words** : ethanol, lipid peroxidation, vitamin A, antioxidant

#### 서 론

산업사회의 발달에 따라 그 소비량이 증가되고 있는 에탄올은 체내에서 영양소의 흡수장애 및 요구증대로 인해서 체내 여러 영양소의 함량을 저하시키고 고지혈증, 지방간 및 간 경변과 같은 에탄올성 간 손상을 유발할 수 있다(1). 에탄올의 섭취로 인해 생체내에서 특히 항산화 영양소가 결핍될 경우 산화성 스트레스에 대한 방어능력의 저하로 인해 산화가 촉진되어 각종 질병을 초래하게 된다(2).

Nordmann 등(3)은 에탄올에 의한 지질과산화 반응

은 주 대사산물인 acetaldehyde나 대사 과정에서 생성된 반응성이 강한 free radical의 산화반응으로 일어나며, 이때 혈장과 간 조직내의 지질과산화물 함량과 각종 항산화 효소계 및 항산화 영양소들의 함량 변화가 일어난다고 보고하였다(4).

Acetaldehyde에 의한 지질과산화 반응은 acetaldehyde가 내인성 산화제인 xanthine oxidase의 기질로 작용하여 free radical의 생성 증가나 간 마이크로솜 단백질 중 cysteine이나 lysine의 -SH기와 높은 친화력으로 항산화 물질인 glutathione의 심한 고갈을 초래하여 지방간, 간 괴사, 섬유아증식과 같은 간 질환을 일으킨다(5). 또한 에탄올은 급성 혹은 소량을 단기간 투여할 경우에는 aldehyde dehydrogenase나 cytochrome P-450에 의

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

해서, 만성 혹은 과량일 경우에는 1/2~2/3 이상이 microsomal ethanol oxidizing system (MEOS)에 의해서 대사되며 이때  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$ 와 같은 free radical이 정상적인 생리조건에서 보다 4~8 정도 높게 생성되어 지질과산화 반응이 촉진되게 된다(6). 그러나 에탄올에 의한 지질과산화는 항산화 영양소의 적정 공급을 통해서 미리 예방할 수도 있다는 주장이 제기되었다(7).

지질과산화 반응의 생리적 수준 조절과 관련된 체내 항산화 물질로는 영양소로서 식이공급에 의존하는  $\beta$ -carotene, 비타민 A, C, E, methionine과 체내 항산화 대사 생성물로서 환원형 glutathione, bilirubin, uric acid, 그리고 항산화 작용을 하는 조효소의 구성 성분인 Zn, Se, Mn, Fe, Cu 등을 들 수 있다(8,9). 비타민 E는 세포내 소수성 부분인 막 이중층 내부에 특이적으로 분포되어 막내의 linoleic acid와 같은 n-6 지방산의 산화방지로 free radical 연쇄반응을 차단하는데 반하여 비타민 C는 세포내 친수성 부분인 막 표면층에서  $O_2$ 와  $O_2^-$ 의 불활성화 및  $OH\cdot$  제거제로 작용한다(5). 이외에 에탄올 급여로 체내에서 함량 저하 현상을 보인 retinol, 13-cis-retinoic acid 그리고 전구체인  $\beta$ -carotene은 주로 세포분화나 생체막 기능조절을 통해서 발암물질 제거 및 생체 보호작용을 하는 것으로 알려져 있다(10,11). 그러나 비타민 A 전구체인  $\beta$ -carotene은 많은 free radical 중 특이적으로  $O_2^-$ 와 반응하여 생체내에서 지질과산화물의 생성을 저하시키고 retinol,  $\alpha$ -tocopherol 등의 항산화 영양소와 생체막을 구성하는 불포화지방산의 손실을 감소시킨다(11). 또한 활성형 비타민 A인 retinol은 간 조직내의 지방산 산화나 과산화물 형성 변화에 대한 보호와 주로 세포와 세포막 사이의 free radical의 연쇄 반응을 차단시켜서 세포막 보존에 중요한 역할을 한다고 보고되었다(12). 비타민 A의 최종대사 산물인 13-cis-retinoic acid는 *in vivo*와 *in vitro*에서 지질과산화물의 생성을 저하시키고 retinol의 대체효과로 비타민 A의 기능 수행에 중요한 역할을 할 수 있는 가능성을 보였다(5). 또한 임상적 조사에 의하면 에탄올성 간 손상이 관찰된 환자는 식이섭취량과 관계없이 체내에서 특정 무기질의 결핍증상을 보였는데  $O_2^-$ 을 제거시키는 superoxide dismutase의 구성성분인 Cu, Zn과 Mn, 그리고  $H_2O_2$ 가 세포막을 손상하기 전에 이를 처리하는 glutathione peroxidase (GSH-Px)의 구성성분인 Se의 함량이 크게 저하되었다(13,14). 그러나 만성적으로 에탄올을 섭취할 경우 위산분비가 증가되고 folic acid의 결핍으로 인해 소장에서 Fe의 흡수가 촉진되고 acetaldehyde와 에탄올이 hematopoiesis를 억제함으로써 간의 Fe 저장능력이 증

가된다는 보고도 있다(15). 또한 Fe은 비타민 E, C와 반응하여 이들은 항산화제로서 보다는 오히려 산화를 유도하는 전이원소로 작용하게 된다(16). 그러나 Rao 등(17)은 이러한 에탄올성 간 손상과 항산화 영양소의 체내 함량 변화는 저영양상태에서 뿐만 아니라 전체 칼로리의 36%가 에탄올로 함유된 영양적으로 균형잡힌 유동식의 공급으로도 비타민 A와 같은 항산화 영양소의 고갈과 지방간이 초래된다고 보고하였다.

이상의 연구 보고들을 통해서 볼 때 에탄올의 섭취는 사람과 실험동물의 체내에서 항산화 작용과 관련된 영양소 상태를 변화시킬 수 있다. 또 이러한 결과는 최적의 영양상태에서도 유발될 수 있으므로 에탄올 섭취에 항산화 영양소의 적정 공급을 통해 에탄올성 간 손상의 예방 및 치유를 위한 방안이 연구될 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 만성적인 에탄올 급여가 쥐 조직내 항산화 영양소 상태에 미치는 영향을 조사하고 이에 비타민 A 전구체 및 활성형 물질들이 어떤 효과를 나타내는지를 비교·검토하고자 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 식이

한국화학연구소에서 이유한지 1주일된 Sprague-Dawley종 수컷 64마리를 분양받아 평균 체중이 160~180g이 될 때 까지 고형사료(진양사료)로 사육한 후 8마리씩 구분하여 에탄올을 급여하고 동시에 비타민 A 결핍군(VE),  $\beta$ -carotene 섭취군( $\beta$ E), retinyl acetate 섭취군(RE), 13-cis-retinoic acid 섭취군(RAE) 그리고 에탄올 대신에 동일 열량을 sucrose로 공급한 pair-fed군들로서 FP,  $\beta$ P, RP, RAP을 포함하여 모두 8군으로 완전히 임의 배치하여 stainless steel cage에 한 마리씩 분리·사육하였다.

실험식은 Table 1과 2에서 처럼 미리 만들어둔 pre-mixture 성분에 에탄올과 동일한 열량의 sucrose를 각각 첨가하여 물로 용해시킨 액체식이 형태로 공급하였다(18). 이때 단백질 급원으로는 vitamin-free casein을 이용하였으며 구체적인 식이구성 및 비타민 A 공급량은 Table 3과 같다. 식이 공급량은 에탄올 급여군은 무제한으로 공급시켰으며 pair-fed군은 전날 에탄올 급여군이 섭취한 양 만큼 공급함으로써 영양소 섭취량의 차이에 의해 나타날 수 있는 영향을 배제하였다.

### 시료 준비

실험 식이를 7주간 섭취시킨 흰쥐를 12시간 절식시킨 후 에테르로 가볍게 마취시켜 개복한 즉시 복부 하

대정맥에서 헤파린 처리된 주사기로 채혈하여 3000rpm에서 15분간 냉장, 원심분리하여 혈장을 분리하였으며 분석할 때 까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 의 냉동고에 보관하였다. 간 조직은 1.15% KCl 완충용액으로 perfusion시켜 적출하고 여러번 세척한 후 수분을 완전히 제거시킨 다음 분석 실험에 이용하였다.

### 생화학적 분석

혈장내  $\alpha$ -tocopherol 함량은 Bieri 등(19)의 방법에 따라 internal standard로 tocopherol acetate(Sigma Co.)를 이용하여 hexane으로 추출한 후 얻은 최종 시료는 HPLC용 diethylether와 methanol로 용해시켜서 HPLC에 주입시켰다. 간 조직내  $\alpha$ -tocopherol과 tocopheryl acetate 함량은 Furr 등(20)의 방법에 따라 조직의 수분제거를 위해 무수망초( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )로 잘 마쇄한 다음 HPLC용 dichloro-

**Table 1. Premixture composition of diet** (per 100L)

Ingredient	Amount (g)	Energy (kcal)
Sucrose	6500	26650
Corn oil	2198	20000
Mineral mixture	900	435
Vitamin mixture	255	1000
DL-methionine	30	123
Cystine	50	205
Choline bitartrate	53	-
Xanthan gum	300	-
Total	10286	48413

**Table 2. Composition of liquid diet** (per 2L)

Ingredient	Control		EtOH(36%)	
	Amount (g)	Energy (kcal)	Amount (g)	Energy (kcal)
Casein	82.0	336.2	82.0	336.2
Premixture	202.0	950.8	202.0	950.8
Sucrose	174.0	713.4	-	-
Ethanol (95%, w/v)	-	-	100.5	713.4
Total	458.0	2000	384.5	2000

**Table 3. Composition of liquid diets used in experiment**

Ingredient	Group							
	FE	FP	$\beta$ E	$\beta$ P	RE	RP	RAE	RAP
Vitamin free casein	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4
L-cystine	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn oil	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8
Olive oil	14.2	14.2	14.2	14.2	14.2	14.2	14.2	14.2
Sucrose	65	154	65	154	65	154	65	154
Choline bitartrate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
$\alpha$ -tocopherol	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Xanthan gum	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Vitamin mixture <sup>1)</sup>	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
Mineral mixture <sup>2)</sup>	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
Ethanol	50	0	50	0	50	0	50	0
$\beta$ -carotene (mg)			110	110				
Retinyl acetate (mg)					18	18		
Retinoic acid (mg)							10	10

<sup>1)</sup>Vitamin Mix (mg/100g mix) according to AIN-76

Thiamin · HCl	60	D-Biotin	2
Riboflavin	60	Cyanocobalamin	0.1
Pyridoxine · HCl	70	$\alpha$ -Tocopherol acetate	3,676
Nicotinic acid	300	Cholecalciferol	0.25
D-Ca pantothenate	160	Menaquinone	0.5
Folic acid	20	Sucrose	95,451g

<sup>2)</sup>Mineral Mix (g/kg mix) according to AIN-76

Calcium phosphate, dibasic	500.0	Zinc carbonate	1.6
Sodium chloride	74.0	Cupric carbonate	0.3
Potassium citrate, Monohydrate	220.0	Potassium iodate	0.01
Potassium sulfate	52.0	Sodium selenite	0.01
Manganese carbonate	3.5	Chromium potassium sulfate	0.05
Magnesium oxide	24.0	Sodium fluoride	0.06
Ferric citrate	6.0	Sucrose	117

Table 4. HPLC conditions for the determination of vitamin A and E

	$\beta$ -carotene	Retinol & Vitamin E	Retinoic acid
Instrument	HPLC (Waters 6000A)	HPLC (Waters 6000A)	HPLC (Waters 6000A)
Integrator	Young-in D 520A	Young-in D 520A	Young-in D 520A
Column	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub> (30cm × 3.9mm, 10 $\mu$ m)	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub> (30cm × 3.9mm, 10 $\mu$ m)	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub> (30cm × 3.9mm, 10 $\mu$ m)
Detector	UV 436nm	UV 280nm	UV 313nm
Mobile phase	Methanol : Acetonitrile : Chloroform (47 : 42 : 11)	Methanol : H <sub>2</sub> O (95 : 5)	Methanol : Phosphate buffer (pH 7.2) (98 : 2)
Flow rate	2.0ml/min	1.5ml/min	1.0ml/min
Sample injection	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Attenuation	0.01	0.02	0.02
Chart speed	0.5cm/min	0.5cm/min	0.5cm/min

methane으로 추출한 후 최종 시료를 얻었으며 이때 분석조건은 Table 4와 같다. 혈장과 간 조직내 비타민 C 함량은 Shah과 Nath (21)의 방법을 변형하여 2% metaphosphoric acid 용액과 혼합한 희석액과 마쇄한 부유액을 indophenol과 2,4-dinitrophenyl-hydrazin 용액으로 발색시킨 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준용액으로는 ascorbic acid (Sigma Co.)을 이용하여 표준 검량선을 구해 그 양을 산출하였다. 간 조직내 총 glutathione의 함량은 Theodorus와 Helmut (22)의 방법에 따라 glutathione reductase-DTNB recirculation assay법을 이용하여 412nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 이때 표준용액으로는 산화형 glutathione (GSSG)을 이용하여 표준 검량선을 구해 그 양을 산출하였다. 간 조직내 GSSG 함량은 NADPH와 glutathione reductase에 의해서 GSSG가 환원형 glutathione (GSH)으로 변화됨에 따라서 감소되는 NADPH를 340nm에서 1분 동안 관찰한 후 nmol로 계산하였으며, GSH 함량은 총 glutathione 과 GSSG의 차로써 그 양을 구하였다. 혈장과 간 조직내 무기질 함량은 Thomson과 Blanchflower (23)의 방법에 따라 진한 질산과 과염소산으로 가수분해, 여과한 후 희석하여 inductively coupled plasma emission spectroscopy (Baird ICP PS-4, USA)로 측정하였다.

#### 통계처리

본 실험에서 얻은 data는 SAS 통계 package를 이용하여 각 실험군 마다 평균치와 표준편차를 산출하였고  $\alpha=0.05$  수준에서 Duncan's multiple test로 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 혈장과 간조직의 비타민 E 함량

혈장내  $\alpha$ -tocopherol 함량은 에탄올 급여군 중 retinyl acetate 섭취군을 제외한 나머지 군에서 유의적으로 감소되었으며 (Fig. 1), 간 조직내  $\alpha$ -tocopherol 함량은 에탄올을 급여하고 동시에  $\beta$ -carotene을 공급한 군만 pair-fed군에 비해 현저히 감소된 반면 나머지 실험군에서는 pair-fed군과 별다른 차이가 없었다. 그러나 에탄올 급여로 인한  $\alpha$ -tocopherol 함량 감소는 혈장과 동일하게 retinyl acetate를 공급시켰을 때 초래되지 않았으며 간 조직내 tocopherol ester 함량은 에탄올 급여로 감소되었다 (Fig. 2, 3).

에탄올에 의한 조직내  $\alpha$ -tocopherol 함량의 저하원인은 에탄올이 비타민 E 흡수와 수송의 주요인자인 lipoprotein의 분비를 감소시키기 때문이라고 Traber 등 (24)은 밝혔다. 이외에도 Majumdar 등 (25)은 *in vivo* 실험에서 에탄올에 의해 생성된 지질과산화물을 중화시키는

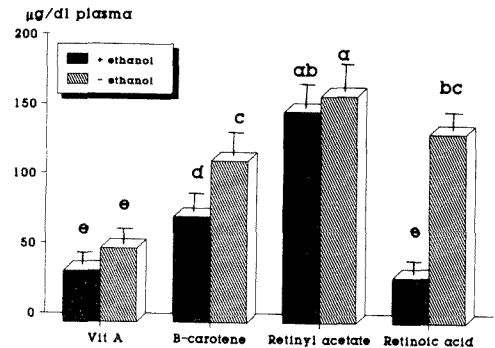


Fig. 1. Effects of vitamin A and ethanol administration on the levels of plasma  $\alpha$ -tocopherol in rats.

Mean  $\pm$  S.D. (n=8)

Values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

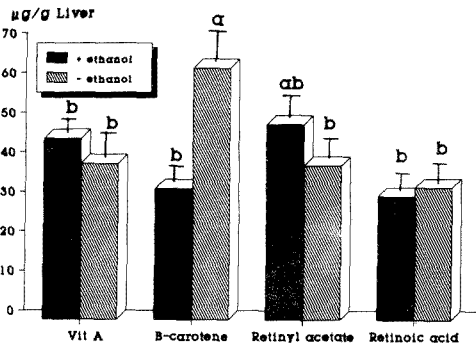


Fig. 2. Effects of vitamin A and ethanol administration on the levels of liver  $\alpha$ -tocopherol in rats.

Mean  $\pm$  S.D. (n=8)

<sup>a,b</sup>Values with different letters are significantly different (p < 0.05).

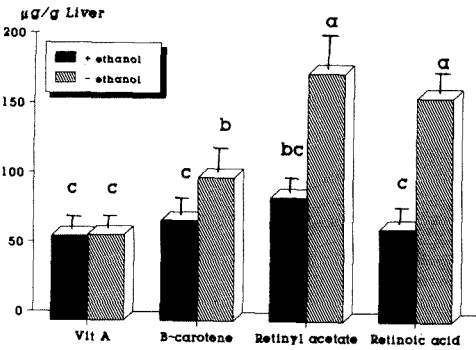


Fig. 3. Effects of vitamin A and ethanol administration on the levels of liver tocopheryl esters in rats.

Mean  $\pm$  S.D. (n=8)

<sup>a,b,c</sup>Values with different letters are significantly different (p < 0.05).

데 비타민 E가 소모된다고 보고하였다. 본 실험에서도 지질과산화물의 함량이 높은 에탄올 급여군에서 비타민 E의 함량이 저하되었으므로 에탄올에 의해 유도된 지질과산화 반응에 비타민 E가 이용된 것으로 보인다.

뿐만 아니라 체내 비타민 E 함량은 비타민 A의 영향을 받는 것으로 보고되었다(26).  $\alpha$ -Tocopherol과 retinyl acetate는 항산화 작용에 대해서 상승작용을 보인 반면, 이동과정과 흡수되는 부위에서는 경쟁적인 작용으로 uptake와 저장에 대해서 길항작용을 보였다. Alam 등(27)은 쥐에게  $\beta$ -carotene과 13-cis-retinoic acid를 Nutrition Recommended Committee(NRC)의 10와 50배로 각각 공급시킨 결과 13-cis-retinoic acid 공급량과 비례해서 간 조직내의  $\alpha$ -tocopherol 함량은 감소하고 지질과산화물 함량이 증가된데 반해  $\beta$ -carotene을 섭취한 쥐에서는 모두 대조군과 같은 수준을 유지하였다고 하였다. 그러나  $\alpha$ -tocopherol 함량 감소는 13-cis-retinoic acid에

의해서 증가된 지질과산화물의 분해작용으로 소모되기 보다는 소장에서 13-cis-retinoic acid나 all-trans-retinoic acid에 의해서  $\alpha$ -tocopherol의 흡수가 저하된 결과로 보았다. 또한  $\beta$ -carotene은 체내에서 자동산화되며 상당량의 비타민 E에 의해서  $\beta$ -carotene이 환원된다. 뿐만 아니라  $\beta$ -carotene은 75% 이상이 LDL에 의하여 수송되며  $\alpha$ -tocopherol 역시 대부분 LDL에 의해서 수송되므로 이 두 영양소가 동시에 이동될 경우 서로 경쟁적 반응으로 항산화 능력에 의한 것과는 상반된 반응을 보여줄 수 있다(26). 따라서 비타민 E는 비타민 A 대사와 자동산화에 의한 영향으로 체내 함량이 변화될 수 있는 것으로 여겨진다.

본 실험에서는 에탄올 급여군에서 혈장과 간 조직내의 비타민 E 함량은 감소되는 경향이었으며 이러한 결과는 에탄올에 의해 증가된 지질과산화물 함량과 관계되는 것으로 보여진다. 이에 대해 retinyl acetate의 급여는 비타민 E의 함량 감소를 다소 저하시킬 수 있는 것으로 나타났다.

#### 혈장과 간조직의 비타민 C 함량

혈장내 총 비타민 C 함량은 에탄올을 급여하고 동시에  $\beta$ -carotene이나 retinyl acetate 섭취군이 pair-fed군에 비해 유의적으로 낮았으며, 환원형/산화형 비는  $\beta$ -carotene을 섭취한 군을 제외한 에탄올 급여군에서 낮게 나타났다. 그러나 간 조직내에서는 에탄올을 급여하였을 때 비타민 A 결핍군과  $\beta$ -carotene 공급군에서 pair-fed군에 비해 높은 경향을 보였으며 환원형/산화형 비는 혈장과 동일하게  $\beta$ -carotene을 섭취한 군에서 높게 나타났다(Table 5).

Kumet와 Tappel(28)은 비타민 C가 결핍된 guinea pig에게 사염화탄소를 투여했을 때 비타민 C,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene 등을 공급시켰을 때 보다 지질과산화 반응 생성물인 pentane이나 ethane량이 현저하게 증가한다고 보고하였다. 또한 비타민 C는 xanthine oxidase 또는 ascorbic acid-Fe<sup>2+</sup>에 의해 유발된 지질과산화 반응을 억제시키는 항산화 영양소로 작용하며 이는 지용성 peroxy radical를 중화 또는 제거하는 첫 방어체제로 작용한다(11,18). Wickramasinghe와 Hanson(29)는 in vitro 실험에서 A9 세포에 10~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 비타민 C를 에탄올 공급하기 3시간 전에 미리 배양시킨 결과 간 독성이 약하다는 것을 밝혔다. 또한 in vivo 실험에서는 사람에게 미리 비타민 C를 섭취시킨 후 에탄올을 마시게 했을 때 조직내에서 acetaldehyde와 albumin의 결합 조절로 세포독성을 예방했을 뿐만 아니라 혈중 에탄올이 저하되었

Table 5. Effects of vitamin A and ethanol administration on the levels of vitamin C in rats

Group	Total ascorbic acid ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ plasma)	Reduced/ Oxidized form	Total ascorbic acid ( $\mu\text{g}/\text{g}$ liver)	Reduced/ Oxidized form
FE	2.32 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	3.38 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>	170.6 $\pm$ 30.3 <sup>ab</sup>	2.48 $\pm$ 0.75 <sup>ab</sup>
FP	2.41 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	4.11 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	135.1 $\pm$ 31.4 <sup>a</sup>	2.56 $\pm$ 0.58 <sup>ab</sup>
$\beta$ E	2.63 $\pm$ 0.34 <sup>abc</sup>	7.41 $\pm$ 1.77 <sup>a</sup>	172.0 $\pm$ 32.5 <sup>ab</sup>	5.87 $\pm$ 1.36 <sup>c</sup>
$\beta$ P	3.36 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	5.37 $\pm$ 1.36 <sup>ab</sup>	125.5 $\pm$ 19.2 <sup>a</sup>	3.94 $\pm$ 1.12 <sup>cd</sup>
RE	2.67 $\pm$ 0.29 <sup>ab</sup>	2.96 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	188.2 $\pm$ 33.3 <sup>a</sup>	4.63 $\pm$ 1.37 <sup>bc</sup>
RP	3.70 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	3.51 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	189.1 $\pm$ 28.1 <sup>a</sup>	7.64 $\pm$ 3.15 <sup>a</sup>
RAE	2.83 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	3.50 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	148.4 $\pm$ 21.7 <sup>bc</sup>	2.77 $\pm$ 0.85 <sup>cd</sup>
RAP	2.84 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	7.08 $\pm$ 1.76 <sup>a</sup>	168.4 $\pm$ 32.2 <sup>ab</sup>	2.18 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>

Means $\pm$ S.D. (n=8)<sup>a-c</sup>Values with a same superscript letter within the same column are not significantly different ( $p < 0.05$ )

다고 보고되었다. 그러나 이때 에탄올의 공급으로 체내 비타민 C의 함량 감소가 일어났다. 비타민 C는 다른 항산화 영양소와의 상호작용을 통해서 산화될 경우 비타민 E와 혈장내 thiol기를 가진 단백질 그리고 glutathione에 의해서 재생되어 또 다시 지질과산화 반응에 대한 방어체로서 작용한다(30). 그러나 비타민 C는  $\beta$ -carotene과 마찬가지로 간 미토콘드리아에서 농도 의존성 지질과산화반응을 보였는데 0.05mM의 저농도에서는 산화전구체로 작용한 반면 5mM의 고농도에서는 항산화제로 작용하기 때문에 그 섭취량과 조직내 농도와 관련하여 더욱 진전된 연구의 필요성이 제기되고 있다(11).

본 실험의 경우 에탄올과 동시에  $\beta$ -carotene 섭취군은 지질과산화물의 함량 증가에도 불구하고 간 조직내 총 비타민 C 함량과 환원형/산화형의 비가 증가되었는데 이러한 결과는 비타민 C 대신에 다른 항산화 영양소가 이용되었던 결과나 비타민 C의 합성능력에 따른 차이로 여겨진다.

#### 간조직의 glutathione 함량

간 조직내 총 glutathione 함량은 에탄올 급여군과 pair-fed군 간에 유의적인 차이가 없었으나 GSH/GSSG는 에탄올 급여군에서 높게 나타났으며 이때 retinyl acetate와 13-*cis*-retinoic acid를 섭취시켰을 때 가장 높은 수준을 유지하였다(Fig. 4A, B). 외부의 산화적 손상에 대한 세포방어 효소인 glutathione-S-transferase와 GSH-Px의 중요한 기질로 작용하는 tripeptide 형태의 GSH는 세포내 지질과산화물과 이물질 제거, 아미노산 수송 및 저장고로서 다양한 세포기능을 수행한다. 특히 에탄올은 미토콘드리아에서 주로 free radical을 형성시켜서 특이적인 독성을 보이며 이 부위에 저장된 GSH의 고갈은 에탄올 독성에 의한 세포의 생존 능력을 감소시킬수 있다(5).

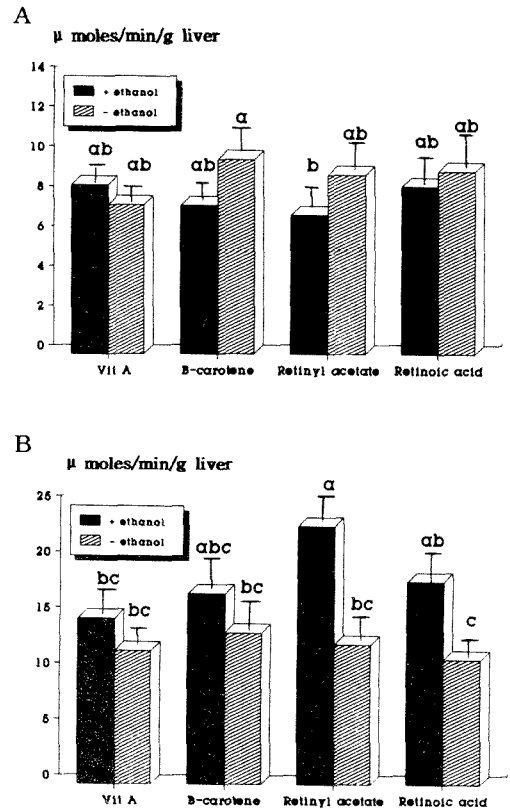


Fig. 4. Effects of vitamin A and ethanol administration on the levels of total glutathione (A) and GSH/GSSG (B) in rat livers.

Mean $\pm$ S.D. (n=8)<sup>a-c</sup>Values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Rosenblum(31)은 전체 식이 칼로리 중 36%가 에탄올로 이루어진 액체식을 공급시켰을 때 쥐 고환에서 지질과산화물 증가와 함께 GSH 함량이 감소되었다고 보고하였다. 에탄올과 GSH의 상호반응은 acetaldehyde

와 GSH의 직접적 반응 혹은 GSH의 합성전구체인 cysteine 이나 lysine과의 간접적 결합 그리고 에탄올 산화 생성물인 지질과산화물과의 반응에 의해서 GSH 함량이 감소된다고 설명되고 있다(5). 뿐만 아니라 만성적으로 급여한 에탄올은 GSH를 분해시키는 효소인  $\gamma$ -glutamyl-transferase 활성도를 증가시켜서 GSH의 turn over를 유도하여 평형상태 (steady-state)의 GSH 수준 저하로 이 물질에 대한 민감도를 증진시켜서 산화반응을 촉진하게 된다(32). 또한 에탄올은 adrenaline, corticosteroid 그리고 glucagon 등 각종 호르몬의 분비 촉진으로 간으로부터 GSH의 sinusoidal efflux를 증가시킴에 따라서 조직내 GSH 감소가 일어나며 이차적으로 free radical에 의한 지질과산화 반응을 유도한다고 보고되었다(33). 그러나 조직내 GSH의 감소로 지질과산화 반응이 유도되기 보다는 지질과산화 반응이 일어난 후에 고갈이 가속화되었고 따라서 GSH와 지질과산화물 함량은 역상관관계를 보였다(45).

그러나 Pierson과 Mitchell(34)은 에탄올 급여로 쥐 간에서 오히려 GSH의 합성능력이 증가되었다고 보고하였고, 이외에도 Morton과 Mitchell(32)은 만성적인 에탄올 급여에 의해 GSH의 합성이 유도되었다고 보고하였다. 이러한 결과는 end-product feed back 저해작용으

로 일어나며 산화 반응이 증가될 경우 간에서 혈장 쪽으로 GSH efflux가 증가되는데 대한 보상작용으로 GSH 합성이 증가된다고 하였다. 간 조직내에서 GSH 합성은 ATP에 의존적으로 반응하며 따라서 외부에서 산화적 손상 물질이 유입되는 동안 ATP의 합성과 이용능력에 좌우되어 합성된다. 만성적인 에탄올 섭취는 ATP 합성을 저하시키며 여기에 대한 하나의 보상작용으로 ATP를 효율적으로 이용하여서 GSH 합성을 증진시킨다는 것이다. 본 실험에서는 에탄올 공급이 만성화됨에 따라 GSH 소모에 대한 보상작용으로 합성이 증가된 것으로 여겨지며 이때 retinyl acetate 공급으로 GSH 함량이 가장 증가되었다.

#### 혈장과 간조직의 Zn, Cu, Se과 Fe 함량

혈장내 Zn 함량은 에탄올 급여와 동시에 비타민 A 결핍군과 retinyl acetate 섭취군이 pair-fed군에 비해서 높았으며 나머지 군은 유의적인 차가 없거나 낮았고, 간 조직내에서는 에탄올 급여군이 pair-fed 군에 비해서 그 함량이 감소된 경향이 있었다(Table 6, 7).

급성적인 에탄올 투여는 소뇌에서 Zn을 비롯하여 Se 과 Cu의 감소를 초래하였는데 이러한 감소는 Zn이 에탄올 대사 과정 중 생성된  $O_2^-$ 의 초기 손상을 억제시키

Table 6. Effects of vitamin A and ethanol administration on the levels of plasma Zn, Cu, Se and Fe in rats ( $\mu\text{g/ml}$  plasma)

Group	Zn	Cu	Se	Fe
FE	19.01 $\pm$ 5.70 <sup>bc</sup>	4.31 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>	1.36 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>	9.80 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>
FP	9.94 $\pm$ 0.10 <sup>e</sup>	4.43 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	1.49 $\pm$ 0.14 <sup>d</sup>	5.86 $\pm$ 0.49 <sup>cd</sup>
$\beta$ E	15.59 $\pm$ 2.65 <sup>cd</sup>	3.28 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>	0.97 $\pm$ 0.15 <sup>e</sup>	7.08 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>
$\beta$ P	18.24 $\pm$ 3.77 <sup>bc</sup>	3.82 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.96 $\pm$ 0.12 <sup>e</sup>	6.80 $\pm$ 1.18 <sup>bc</sup>
RE	36.60 $\pm$ 10.44 <sup>a</sup>	2.90 $\pm$ 0.97 <sup>cd</sup>	2.09 $\pm$ 1.56 <sup>b</sup>	4.91 $\pm$ 0.47 <sup>de</sup>
RP	17.30 $\pm$ 3.47 <sup>bcd</sup>	3.92 $\pm$ 1.12 <sup>ab</sup>	1.90 $\pm$ 0.41 <sup>c</sup>	5.06 $\pm$ 0.78 <sup>e</sup>
RAE	13.82 $\pm$ 1.98 <sup>d</sup>	2.69 $\pm$ 0.10 <sup>cd</sup>	3.62 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	4.49 $\pm$ 1.91 <sup>c</sup>
RAP	20.39 $\pm$ 5.40 <sup>b</sup>	2.28 $\pm$ 0.18 <sup>d</sup>	3.16 $\pm$ 1.09 <sup>b</sup>	6.51 $\pm$ 0.98 <sup>bc</sup>

Means  $\pm$  S.D. (n=8)

<sup>a-e</sup>Values with a same superscript letter within the same column are not significantly different ( $p < 0.05$ )

Table 7. Effects of vitamin A and ethanol administration on the levels of liver Zn, Cu, Se and Fe in rats ( $\mu\text{g/g}$  liver)

Group	Zn	Cu	Se	Fe
FE	21.19 $\pm$ 4.49 <sup>d</sup>	3.38 $\pm$ 1.19 <sup>ab</sup>	1.43 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>	90.81 $\pm$ 9.52 <sup>a</sup>
FP	25.94 $\pm$ 6.08 <sup>bcd</sup>	3.74 $\pm$ 1.78 <sup>ab</sup>	1.69 $\pm$ 0.72 <sup>ab</sup>	89.93 $\pm$ 10.01 <sup>ab</sup>
$\beta$ E	20.19 $\pm$ 2.27 <sup>d</sup>	2.56 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup>	1.63 $\pm$ 0.64 <sup>ab</sup>	83.44 $\pm$ 9.07 <sup>ab</sup>
$\beta$ P	29.20 $\pm$ 6.07 <sup>abc</sup>	4.09 $\pm$ 2.15 <sup>ab</sup>	1.31 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	76.70 $\pm$ 12.25 <sup>bc</sup>
RE	29.29 $\pm$ 7.75 <sup>abc</sup>	3.34 $\pm$ 2.51 <sup>ab</sup>	1.69 $\pm$ 0.84 <sup>ab</sup>	76.52 $\pm$ 16.80 <sup>bc</sup>
RP	33.01 $\pm$ 4.99 <sup>a</sup>	4.43 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	2.17 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>	66.89 $\pm$ 18.00 <sup>cd</sup>
RAE	23.47 $\pm$ 2.63 <sup>cd</sup>	2.30 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup>	1.45 $\pm$ 0.66 <sup>ab</sup>	69.80 $\pm$ 10.96 <sup>cd</sup>
RAP	31.71 $\pm$ 10.90 <sup>a</sup>	2.76 $\pm$ 1.50 <sup>ab</sup>	1.58 $\pm$ 0.82 <sup>ab</sup>	61.67 $\pm$ 9.48 <sup>d</sup>

Means  $\pm$  S.D. (n=8)

<sup>a-d</sup>Values with a same superscript letter within the same column are not significantly different ( $p < 0.05$ )

는 효소인 superoxide dismutase의 구성성분과 glutathione-S-transferase 활성도의 유도, 그리고 항산화 대사 산물인 -SH기 산화에 이용됨에 따라서 일어나게 된다(9). 또한 Zn은 적혈구와 라이소좀막의 구성성분으로써 막 인지질의 불포화지방산을 안정화시킴으로서 생체막의 구조와 기능 수행에 필수적인 영양소로 밝혀졌다(35). 실제로 Zn은 *in vivo* 실험에서  $Fe^{3+}$ 에 의해서 erythrocyte ghosts에 증가된 지질과산화물 함량을 저하시킨다는 것이 입증되었다(36). 이외에도 Zn은 산화전구체인 이온인 Cu나 Fe의 결합부위에서 서로 경쟁적으로 반응하여 전이 원소에 의한 과산화반응을 억제시켜서 항산화 효과를 가진다(37). 그리고 에탄올의 주 대사효소인 alcohol dehydrogenase의 구성요소로 작용하여 에탄올 대사를 원활하게 하는 것으로 나타났다(38).

Zn은 에탄올과의 상호반응 이외에도 비타민 A 대사에도 관련되는데 retinol을 운반하는 retinol binding protein의 구성요소로 작용하며 Zn이 결핍된 식이를 쥐에게 공급시켰을 때 retinol binding protein 결합의 결합으로 간 조직에서 다른 조직으로의 비타민 A 이동에 문제가 생긴다는 것이다(39). 따라서 에탄올 급여와 비타민 A의 부적절한 공급은 체내 Zn 불균형을 초래하게 된다. 본 실험에서는 에탄올을 급여시킨 군에서 혈장내에서는 일정한 경향을 보이지 않았으나 간 조직에서는 에탄올 공급으로 감소되었으며 이러한 결과는 지질과산화 반응과 연관성을 보였다.

혈장과 간 조직내 Cu 함량은 에탄올 급여군과 pair-fed군 사이에 유의적인 차이가 없으나 간 조직내 Cu 함량은 에탄올을 급여시킨 모든 군에서 감소되었다(Table 6, 7). Cu는 체내에서 주로 산화, 환원계의 구성성분으로 촉매제와 지질과산화 반응의 원인인  $O_2^-$ 를 제거시키는 superoxide dismutase의 구성성분으로 작용하는 것으로 보고되었다(9). 특히 Cu는  $Fe^{2+}$ 이온이  $Fe^{3+}$ 이온으로 전환되는데 필요한 효소인 ferroxidase의 활성화에 필수성분으로 작용함에 따라서 Fe 대사에 중요한 작용을 한다. 따라서 Cu가 결핍된 식이를 공급시킬 경우 간이나 신장 조직 등에서 Fe의 농도는 증진되며 주로 마이크로솜막에 축적되어 지질과산화반응을 증진시키는 것으로 보고되었다(37). 뿐만 아니라 Hammerlluer 등(37)은 Cu와 Zn을 동시에 결핍시켰을 때 쥐 간 마이크로솜에서 cytochrome P 450의 감소가 있었으며 이것에 의해서 free radical의 생성 불균형으로 지질과산화 반응이 촉진된다고 하였고, Kontush 등(40)은 Cu는 LDL에 결합해서 산화반응을 촉진시킨다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 Zn의 함량과 동일한 경향으로 혈장에서는 일

정한 경향을 보이지 않았으나 간 조직에서는 에탄올에 의해서 감소되었다.

혈장내 Se 함량은 13-cis-retinoic acid를 섭취한 군에서 가장 높은 반면에  $\beta$ -carotene을 섭취한 군에서 가장 낮은 함량을 보였다(Table 6). 간 조직내에서는 에탄올 급여에 의한 유의적인 차이는 나타나지 않았으며,  $\beta$ -carotene 급여군에서 Se 함량이 증가되었으나 유의적이지는 않았다(Table 7). Se은 유기 과산화물이나  $H_2O_2$ 를 가수분해시키는 GSH-Px 효소의 구성 성분으로 체내 항산화기구의 중요한 구성요소로 작용하게 된다(38). 식이 중의 Se 양은 GSH-Px 활성도에 영향을 미치며 조직내 Se 함량이 낮을 경우 GSH-Px 활성도는 민감하게 작용하므로 식이 중 Se 양은 지질과산화 반응에 대한 방어 체계로 중요하다(37). 생체내 Se 함량은 외부로부터 유입되는 산화제에 의해서 감소되는데 임상적 그리고 영양학적인 결과가 일치되지는 않으나 알콜성 간 괴사를 앓고 있는 환자의 경우 혈중의 Se 농도가 낮으며 또한 알콜에 의한 간 기능의 손상이 없고 영양상태가 적절하더라도 혈중의 Se 농도가 현저히 저하되는 것으로 밝혀졌다(14). 그 원인은 Se 의존형 GSH-Px는 에탄올에 의한 지질과산화 반응에 이용되며 이때 Se의 소모가 증진되기 때문이다. 그러나 쥐의 경우 에탄올이 Se을 운반하는 단백질의 합성을 저하시켜서 조직의 Se 함량이 낮아진다는 또 다른 기전이 제시되었다(41). 또한 에탄올에 의한 지질과산화 반응에 있어서 GSH-Px 활성도는 또 다른 구성성분인 GSH에 민감하게 반응하는 것으로 나타났다(33).

혈장내 Fe 함량은 에탄올 급여와 동시에 비타민 A 결핍군과  $\beta$ -carotene 섭취군에서 증가되었으며, 간 조직내에서는 에탄올을 급여한 전 실험군에서 증가되었다(Table 6, 7). 생체내에서 Fe은 hydroxylase의 구성 요소로서 해독작용에 관여한다(42). 그러나 Fe은  $Fe^{3+} + O_2^-$ 와 반응하는 Haber-Weiss 반응을 통해서 free radical의 생성을 촉진하여 지질과산화 반응을 유발시키는 인자로 작용한다(38).  $Fe^{2+}$ 나  $Fe^{3+}$ 가 산화전구체로 작용하는 것은 조직내의  $H_2O_2$ 와 비타민 C 농도에 의해서 좌우되는 것으로 나타났다. 대개  $H_2O_2$ 와 비타민 C의 농도가 낮을 경우 지질과산화 반응이 촉진되며 높은 농도에서는  $Fe^{2+}$ 와  $Fe^{3+}$ 의 농도를 일정하게 유지시켜서 오히려 지질과산화 반응을 저하시키므로 Fe과 비타민 C는 생체내 농도 변화가 중요한 의미를 지닌다고 볼 수 있다(38).

Situnayake 등(8)은 에탄올성 간 손상은 Fe의 축적으로 일어나며 에탄올을 처리한 소뇌의 사이토졸에서도



Fe의 함량이 증가되는 것을 관찰했다. 그러나 에탄올성 간 손상이 유발된 후 간에서 Fe 대사가 제대로 이루어지지 않아 간 조직내 Fe의 축적이 증가되어서 지질과산화 반응이 촉진된다는 보고도 있다(43). 즉 축적된 Fe의 함량이 증가됨에 따라서 과산화 반응이 촉진되어 간 손상이 더욱 가중된다는 것이다. 뿐만 아니라 Fe은  $\beta$ -carotene이 retinol로 전환되는 과정에 관여하며 비타민 A 역시 체내에서 불균형 상태일 경우에는 Fe의 대사가 방해되어 혈중 Fe의 함량 저하로 빈혈 등을 유발하는 것으로 알려졌다(44). 주로 비타민 A는 간조직으로부터 Fe의 수송을 조절하기 때문에 비타민 A가 결핍될 경우 간 조직내에서는 Fe가 축적되는 반면에 혈액에서는 감소되며, 반대로 비타민 A가 과잉일 경우에는 혈액과 간 조직내에서 모두 감소되는 것으로 나타났다(15,44). 본 실험에서는 에탄올의 공급으로 유의적이지는 않으나 조직내 Fe의 축적이 일어났으며 이러한 결과는 지질과산화 반응과 연결된 결과로 여겨진다.

## 요 약

본 연구는 만성적인 에탄올 급여에 의한 조직내 항산화 영양소 함량의 변화에 대하여 비타민 A의 형태별 급여효과를 조사하고자 실시되었다. 실험동물은 Sprague-Dawley종 숫컷 흰쥐를 사용하였으며 에탄올 공급과 동시에 비타민 A 결핍군(FE),  $\beta$ -carotene 섭취군(BE), retinyl acetate 섭취군(RE) 그리고 13-cis-retinoic acid 섭취군(RAE)과 에탄올 대신 동일 열량을 sucrose으로 공급시킨 각각의 pair-fed군 등 모두 8군으로 나누어 7주 동안 실험 식이를 공급하였다. 항산화 영양소로 비타민 E, C, glutathione 그리고 무기질 함량의 분석을 통해서 에탄올에 의해 변화되는 생체내 항산화 영양소 상태와 이에 비타민 A의 형태별 급여 효과를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 혈장내  $\alpha$ -tocopherol 함량은 에탄올 급여로 감소되었으나 간 조직내에서는  $\beta$ -carotene 섭취군만이 낮은 함량을 보였다. 그러나 간 조직내 tocopherol acetate 함량은 pair-fed군에 비해서 에탄올 급여로 현저히 저하되었다. 혈장과 간 조직내에서 에탄올 급여에 의한 비타민 E 함량 감소는 retinyl acetate 공급으로 그 감소 정도가 가장 저하되었다. 혈장내 총 비타민 C 함량은 에탄올 급여와 동시에  $\beta$ -carotene이나 retinyl acetate 섭취군이 pair-fed군에 비해서 낮았으며 환원형과 산화형 비타민 C 함량비는 에탄올 급여로 낮았으나  $\beta$ -carotene을 섭취시킨 군만이 높게 나타났다. 간 조직내 총 비타민 C 함량은 13-cis-retinoic acid 섭취군을 제외한 전 군

에서 에탄올 급여로 증가되었으며 환원형과 산화형 비타민 C 비는 에탄올 급여군 중  $\beta$ -carotene을 섭취시켰을 때 가장 높았다. 간 조직내 총 glutathione 함량은 에탄올 공급군과 pair-fed군 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 환원형과 산화형의 함량비에서는 에탄올과 동시에 retinyl acetate나 13-cis-retinoic acid 섭취군에서 pair-fed군에 비해 높았다. 혈장내 Zn, Cu, Se, Fe 함량은 에탄올 급여군과 pair-fed군 사이에 일정한 경향을 보이지 않았으나 간 조직내 Zn, Cu 함량은 에탄올 급여로 감소된 반면 Fe 함량은 증가되었다. 이러한 결과들로 보아 에탄올은 체내 항산화 영양소 상태의 변화를 초래하며 비타민 A의 공급여부 뿐만 아니라 형태별 섭취에 의해서 항산화 영양소 상태가 변화될 수 있는 것으로 나타났다. 그러나 생체내 항산화 영양소들은 서로 상쇄, 상승 혹은 길항작용을 통해서 상호영향을 미치므로 각각의 항산화 영양소 상태 변화에 대한 정확한 기전 규명을 위해서는 다각적인 연구가 요구된다고 볼 수 있다. 그러나 지질과산화물의 함량과 체내 항산화 영양소 상태는 상호관련성이 있었으며 본 실험에서 에탄올 공급에 의한 항산화 영양소 함량의 감소는 대체로 비타민 A를 retinyl acetate 형태로 섭취시켰을 때 다소 경감되는 것으로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 1994년도 영남대학교 학술 연구 조성비와 한국과학재단 연구비(과제번호 : 941-0600-020-2)에 의한 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Mezey, E. : Alcoholic liver disease ; Roles of alcohol and malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 2709(1980)
2. Missbleck, N. G. and Campbell, T. C. : The role of ethanol in the etiology of primary liver cancer. *Adv. Nutr. Res.*, **7**, 129(1985)
3. Nordmann, R., Ribiere, C. and Rouach, H. : Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Rad. Bio. Med.*, **12**, 219(1992)
4. Cederbaum, A. I. : Introduction ; Role of lipid peroxidation and oxidative stress in alcohol toxicity. *Free Rad. Bio. Med.*, **7**, 537(1989)
5. Lieber, C. S. : Interaction of ethanol with drugs, hepato toxic agents, carcinogens and vitamins. *Alcoholism*, **25**, 157(1990)
6. Lieber, C. S. : Alcohol and the liver. *Gastro.*, **106**, 1085(1994)
7. Di Luzio, N. R. : The role of lipid peroxidation and anti-

- oxidants in ethanol-induced lipid alterations. *Exp. Mol. Pathol.*, **8**, 394 (1968)
8. Stiunayke, R. D., Crump, B. J., Thurnham, D. I., Gearty, J. A. and Davis, M. : Lipid peroxidation and hepatic antioxidant in alcoholic disease. *Gut.*, **31**, 1311 (1990)
  9. Halliwell, B. : Free radicals, antioxidants, and human disease : Curiosity cause, or consequence? *Lancet*, **344**, 721 (1994)
  10. Leo, M. A., Sato, M. and Lieber, C. S. : Effect of hepatic vitamin A depletion on the liver in humans and rats. *Gastro.*, **84**, 562 (1983)
  11. Krinsky, N. I. : Antioxidant functions of carotenoids. *Free Rad. Bio. Med.*, **7**, 617 (1989)
  12. Mettlin, C. : Epidemiologic studies on vitamin A and cancer. *Adv. Nutr. Res.*, **6**, 47 (1984)
  13. McClain, C. J., Antonow, D. R., Cohen, D. A. and Shedlofsky, S. I. : Zinc metabolism in alcoholic liver disease. *Alcoholism : Clin. Exp. Res.*, **10**, 582 (1986)
  14. Dworkin, B. M., Rosenthal, W. S., Gordon, G. G. and Jankowski, R. H. : Diminished blood selenium levels in alcoholics. *Alcoholism : Clin. Exp. Res.*, **8**, 535 (1984)
  15. Mejia, L. A. and Francisco, C. : Hematological effect of supplementing anemic children with vitamin A alone and in combination with iron. *Am. J. Clin. Nutr.*, **48**, 595 (1988)
  16. Dabbagh, A., Mannion, T., Lynch, S. M. and Frei, B. : The effect of iron over-load on rat plasma and liver oxidant status *in vivo*. *Biochem. J.*, **300**, 799 (1994)
  17. Rao, G. A., Sankaran, H. and Larkin, E. L. : Rat models for chronic alcohol consumption. *J. Nutr.*, **118**, 799 (1988)
  18. Lieber, C. S. and Decarli, L. M. : The feeding of ethanol in liquid diets. *Exp. Res.*, **10**, 550 (1986)
  19. Bieri, J. G., Tolliver, T. J. and Catilgnani, G. L. : Stimulation determination of tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *J. Clin. Nutr.*, **32**, 2143 (1979)
  20. Furr, H. C., Amedee-Manesme, O. and Olson, J. A. : Gradient reversed-phased high-performance liquid chromatographic separation of naturally occurring retinoids. *J. Chromato.*, **309**, 299 (1984)
  21. Shah, S. and Nath, N. : Effect of castration on the metabolism of L-ascorbic acid in rat prostate. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **31**, 107 (1985)
  22. Theodorus, P. M. and Helmut, S. : Assay of glutathione, glutathione sulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Method Enzymol.*, **77**, 373 (1981)
  23. Thompson, R. H. and Blanchflow, W. J. : Wet-ashing apparatus to prepare biological materials for atomic absorption spectrometry. *Lab. Prac.*, **20**, 859 (1984)
  24. Traber, M. G., Lane, J. C., Lagmay, N. R. and Kayden, H. J. : Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins. *Lipids*, **27**, 657 (1992)
  25. Majumdar, S. K., Shaw, G. K. and Thomson, A. D. : Plasma vitamin E status in chronic alcoholic patients. *Drug. Alcohol Depend.*, **12**, 269 (1983)
  26. Alam, B. S., Brown, L. R. and Alam, S. Q. : Influence of dietary fats and vitamin E on plasma and hepatic vitamin A and  $\alpha$ -carotene levels in rats fed excess  $\beta$ -carotene. *Nutr. Can.*, **14**, 111 (1990)
  27. Alam, S. Q. and Alam, B. S. : Lipid peroxide,  $\alpha$ -tocopherol and retinoid levels in plasma and liver of rats fed diets containing  $\beta$ -carotene and 13-*cis*-retinoic acid. *J. Nutr.*, **113**, 2608 (1983)
  28. Kunrt, K. J. and Tappel, A. L. : The effect of vitamin C on *in vivo* lipid peroxidation in guinea pigs as measured by pentane and ethane production. *Lipids*, **18**, 271 (1983)
  29. Wickramasinghe, S. N. and Hanson, R. : *In vivo* effects of vitamin C on the cytotoxicity of post-ethanol serum. *Biochem. Pharma.*, **48**, 621 (1994)
  30. Frei, B., England, L. and Ames, B. N. : Ascorbate is outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 6377 (1989)
  31. Rosenblum, E. R., Gavaler, J. S. and Van Thiel, D. H. : Vitamin A at pharmacologic doses ameliorates the membrane lipid peroxidation injury and testicular atrophy that occurs with chronic alcohol feeding in rats. *Alcohol & Alcoholism*, **22**, 241 (1987)
  32. Morton, S. and Mitchell, M. C. : Effects of chronic ethanol feeding on glutathione turnover in the rat. *Biochem. Pharma.*, **34**, 1559 (1985)
  33. Aykac, G., Usual, M., Yalcin, S., Kocak-Toker, N., Sivas, A. and Oz, H. : The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxico.*, **36**, 71 (1985)
  34. Pierson, J. L. and Mitchell, M. C. : Increased hepatic efflux of glutathione after chronic ethanol feeding. *Biochem. Pharma.*, **35**, 1533 (1986)
  35. Bray, T. M. and Bettger, W. J. : The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Rad. Bio. Med.*, **8**, 281 (1990)
  36. Yang, C. M. and Carlson, G. P. : Effects of ethanol on glutathione conjugation in rat liver and lung. *Biochem. Pharma.*, **41**, 923 (1991)
  37. Hammermueller, J. D., Bray, T. M. and Bettger, W. J. : Effect of zinc and copper deficiency on microsomal NADPH-dependent active oxygen generation in rat lung and liver. *J. Nutr.*, **117**, 894 (1987)
  38. McCord, J. M. : Free radicals and prooxidants in health and nutrition. *Food. Tech.*, p.106 (1994)
  39. Russell, R. M. : Vitamin A and zinc metabolism in alcoholism. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 2741 (1980)
  40. Kontush, A., Hubner, C., Finckh, B., Kohlschutter, A. and Beisiegel, U. : Low density by copper correlates to its initial ubiquinol-10 and polyunsaturated fatty acid content. *BBA*, **818**, 391 (1985)
  41. Halsted, C. H. : Alcoholism and malnutrition introduction to the symposium. *Am. J. Clin Nutr.*, **33**, 2705 (1980)
  42. Mihos, A. A. and Tavassoli, M. : The effect of ethanol on the uptake, binding and desilylation of transferrin by rat liver endothelium : Implications in the pathogenesis of alcohol-associated hepatic siderosis. *Am. J. Med. Sci.*, **301**, 299 (1991)
  43. Gey, K. F., Brubacher, G. B. and Stahelin, H. B. : Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, **45**,

- 1368 (1987)
44. Olson, R. E., Stotz, E. H. and Abelman, R. H. : Vitamin A deficiency and anemia. *Nutr. Rev.*, **37**, 38 (1979)
45. Girotti, A. W., Thomas, J. P. and Jordan, J. E. : Inhibitory effect of zinc (II) on free radical lipid peroxidation in erythrocyte membranes. *J. Free Rad. Bio. & Med.*, **1**, 395 (1985)

(1995년 9월 15 일 접수)