

알코올과 식이엽산수준이 혈장 Homocysteine, 간기능,
간 조직검사에 미치는 영향

장남수 · 김기남 · 김연수 · 서종복* · 권오욱*
이화여자대학교 식품영양학과, 기초과학지원연구소*

Effects of Alcohol Administration and Dietary Folate
on Plasma Homocysteine and Liver Histopathology

Chang, Namsoo · Kim, Kinam · Kim, Yeonsoo
Seo, Jong Bok* · Kwon, Ohoak*

Department of Food and Nutrition, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea
Korean Basic Science Institute,* Seoul Branch, Seoul 136-701, Korea

ABSTRACT

The critical role of folate vitamin in the remethylation pathway for methionine synthesis from homocysteine has been well documented. Hyperhomocysteinemia resulting from inadequate folate nutrition has been implicated in increased incidence of macrovascular diseases, colorectal cancer, neural tube defects, etc. Chronic exposure to ethanol impairs folate nutrition and one-carbon metabolism in the liver, which often results in fatty liver due to a defective remethylation process. This study was carried out to investigate the chronic effects of moderate levels of alcohol and dietary folate on plasma homocysteine levels, and on histopathology and biochemical functions of the liver. Rats were raised on experimental diets with three levels of folate(0, 2, 8mg/kg diet), and 50% ethanol(1.8ml/kg body weight) was administered intragastrically by intubation tubes three times a week for 10 weeks. Plasma homocysteine concentrations were found to be significantly influenced by dietary folate intake and alcohol administration. Among all treatment groups, plasma homocysteine levels were highest in the animals receiving a combined treatment of folate deficient diet and alcohol administration. Plasma homocysteine concentration was negatively correlated with folate concentration in the plasma($p < 0.01$) and liver($p < 0.05$). Among alcohol treated rats, increase in plasma homocysteine values due to ethanol was prevented by folate supplementation. When liver histological tests were performed, macrovascular and microvascular fatty changes and spotted necrosis were observed more frequently in folate-deficient animals diet than those on folate-adequate and folate-supplemented diets in alcohol-treated rats. These results indicate that folate supplementation above the recommended level might be beneficial in the prevention of alcohol-related hyperhomocysteinemia and abnormal histologic changes in the liver due. (*Korean J Nutrition* 31(7) : 1121~1129, 1998)

KEY WORDS : alcohol · dietary folate · liver folate · plasma homocysteine · fatty liver.

서 론

엽산은 호모시스테인(homocysteine)을 메티오닌(methionine)으로 전환시키는 대사과정에 꼭 필요한 수용성 비타민이다¹⁻⁵⁾. 만약 엽산이 결핍되면 homocysteine에서 methionine으로의 재메틸화반응(remethylation)에 장애가 발생하여 세포 내에 homocysteine이 축적되고 이에 따라 혈장 수준이 증가하는 고호모시스테인혈증(hyperhomocysteinemia)이 나타난다¹⁻³⁾⁶⁾⁷⁾. 고호모시스테인혈증은 최근 대혈관질환(macrovascular disease)의 독립적 위험요인으로 밝혀진 바 있으며³⁾⁶⁾⁸⁻¹¹⁾, 엽산의 결핍과 관련이 있는 신경관 결함⁴⁾⁵⁾¹²⁻¹⁶⁾, 암⁵⁾¹²⁾ 등 질병과도 연루되어 있는 것으로 나타나고 있다.

알코올은 섭취, 흡수, 저장, 배설 등 엽산대사의 모든 단계에서 엽산의 영양상태를 저하시키는 것으로 알려져 있다¹⁷⁻²⁴⁾. 알코올 대사물질인 아세트알데히드는 엽산의 분해를 촉진시켜서 엽산 영양상태를 저하시키고 혈중 homocysteine 수준을 상승시키는 것으로 나타났다²⁵⁾²⁶⁾.

간은 알코올 대사와 엽산대사에 있어서 중요한 역할을 지니며²¹⁾²²⁾²⁷⁻²⁹⁾ 과도한 알코올은 간 조직의 fatty infiltration으로 인한 지방간 발생²⁰⁾과 GOT, GPT 등 효소 활성을 증가시킨다²²⁾. 엽산이 결핍되면 간에서 합성된 중성지방의 방출에 필요한 메티오닌 합성이 저해되어 지방간이 악화될 수도 있다¹²⁾²²⁾²⁵⁾. 만약에 엽산결핍과 알코올 중독이 병행되면 재메틸화반응을 저해시키는데 상승효과를 가하면서 간 손상이 더욱 쉽게 나타날 수 있으며 알코올 중독시 엽산을 보충시키면 간 손상의 정도가 경미하게 나타날 수도 있을 것이다.

본 연구의 목적은 식이 엽산 수준과 알코올이 혈장 homocysteine수준, 간 조직과 간 기능에 미치는 영향을 실험동물을 이용하여 관찰하여 homocysteine상태와 간의 엽산 수준, 간 조직검사결과에 어떠한 관계가 있는지 알아보는 데 있다. 아울러 본 연구는 엽산 보충이 간 엽산수준이나 혈장 homocysteine, 간 조직검사 결과 등에 유의한 영향을 미치는지 알아보려고 수행되었다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 동물과 식이

Sprague-Dawley 종의 수컷 흰쥐를 3일간 고형 배합 사료(삼양 사료)로 적응시킨 후 체중에 따라 난괴법으로 실험군당 12마리씩 지정하였으며, 실험식이 개시

당시 동물의 평균 체중은 $146.0 \pm 1.1g$ 이었다. 실험군은 식이엽산함량에 따라 결핍, 적정, 보충 등 3군, 알코올 투여 여부에 따라 2군, 모두 6군으로 나누어 4주, 7주, 10주간 사육하였다.

실험식은 전보³¹⁾와 같이 옥수수전분, 설탕, 카제인, 대두유, 셀룰로스, 무기질 믹스, 엽산을 제외한 비타민 믹스를 배합하여 제조하였다. 실험식이의 엽산수준은 Halsted등³²⁾의 연구결과를 바탕으로 하여 1kg당 0, 2, 8mg으로 설정하였다. 알코올은 전보³²⁾와 같이 삼관 튜브를 사용하여 50% ethanol을 체중 100g당 0.18ml씩 일주일에 3회 투여하였다.

2. 시료채취

희생시키기 전 12시간을 굶긴 후에 에틸 에테르로 마취시켜 회복한 후 3.8% sodium citrate로 미리 처리한 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 EDTA가 들어있는 원심분리관에 담아 2,800rpm, 4℃에서 30분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 간 기능검사를 위한 혈장은 시료 채취후 즉시 분석에 이용되었으며 엽산과 homocysteine분석에 이용될 혈장은 -70℃에 냉동 보관하였다. 혈액 채취 후 실험 동물을 즉시 해부하여 간을 적출하였다. 적출된 간의 중배엽(median lobe)을 절단하여 10% 포르말린용액에 고정시켜서 조직학적 검사에 사용하였다.

3. 엽산분석

혈장 엽산함량은 *Lactobacillus casei*(ATCC 7469)를 이용한 미생물 분석법²⁸⁾에 의해 측정되었다. 전보³¹⁾와 동일한 방법으로 시료에 Folic Acid Casei Medium (Difco 회사)를 넣고 *Lactobacillus casei* bacteria inoculum을 각 시험관에 접종하고 37℃ 항온기에서 배양한 후 600nm의 파장에서 흡광도를 읽어서 엽산표준용액곡선에 대입하여 엽산 함량을 정량하였다.

4. 혈장 Homocysteine분석

혈장 10μl를 reaction vial에 넣고 Pico-Tag workstation(Waters, Japan)에서 진공 건조시켰다. 이에 포름산(formic acid)과 과산화수소(hydrogen peroxide)를 19 : 1로 섞어 만든 performic acid 10μl를 혈장 시료에 첨가하여 실온에서 30분 동안 방치하여 시료를 과산화시켰다. 이를 다시 진공 건조시킨 후 reaction vial의 바닥에 200μl의 0.5% phenol-HCl을 넣고 질소 충전시켜 110℃에서 24시간동안 가수분해를 시켰다. 가수분해된 시료를 다시 진공 건조시킨 후 메탄올 : sodium acetate : triethylamine(TEA)을 2 : 2 : 1로 혼합하여 만든 redry용액을 가하여 건조시켰다. 건조

Table 1. HPLC condition used for plasma homocysteine analysis

Column	Pico · Tag 8.5mm×300mm
Column oven temperature	46℃
HPLC pump	Waters 510
HPLC injector	Waters 712 WISP
Photodiode array detector	Waters 990(254nm)
Solvent	A) 1.4mM NaHAc ¹⁾ , 0.1% TEA, 6% CH ₃ CN ²⁾ B) 60% CH ₃ CN
Elution	Linear gradient of solvent B (0-100%)
Flow rate	1.0ml/min
Run time	25min
Equilibrium time	10min
Injection volume	Standard 4μl Sample 10μl

1) NaHAc : sodium acetate trihydrate
2) CH₃CN : acetonitrile

된 시료에 메탄올 : 여과된 3차 증류수 : TEA : phenylisothiocyanate(PITC)를 7 : 1 : 1 : 1로 섞은 용액을 가하여 약 1시간동안 유도체화시켰다. 유도체화된 시료에 0.1% TEA, 6% acetonitrile을 함유한 1.4mM sodium acetate, pH 6.4 200μl를 섞고 완전히 녹인 후 microcentrifuge에서 원심분리시켰다. 상청액을 0.45 μm filter(HV type)로 여과시켜서 autosampler로 Pico · Tag 8.5×300mm(Waters) column에 주입하였다. 시료와 시료사이에는 60% acetonitrile, 1% EDTA용액으로 column을 세척하였다. 분석에 이용된 HPLC의 조건은 Table 1과 같다. 시료의 area under the peak결과를 동일한 과정으로 분석된 homocysteine standard의 area under the peak와 비교하여 homocysteine 함량을 계산하였다.

5. 간 기능과 간 조직학적검사

Reitman-Frankel법으로 GOT, GPT kit(영동제약)를 사용하여 혈장 GOT(glutamate oxaloacetate transaminase)와 GPT(glutamate pyruvate transaminase)의 활성을 측정하여 간 기능검사를 실시하였다. 단위는 혈장 1L당 unit로 표시하였다.

포르말린 용액에 고정시킨 간 조직을 paraffin에 포매하여 microtome으로 4μm 두께로 연속 절편한 뒤 이를 철 헤마톡실린(hematoxylin-eosin)과 periodic acid-Schiff(PAS) stain을 시켜 광학 현미경으로 관찰하여 지방성 병변(fatty change), 이형성(dysplasia), 점성 괴사(spotty necrosis) 등의 빈도를 관찰하였다. 조직의 처리 및 판독은 병리학자에게 의뢰하여 이루어졌다.

6. 자료의 처리 및 분석

모든 실험 결과는 평균치와 표준 오차로 나타내었다. 자료는 SAS program을 사용하여 분석하였다. 혈장

homocysteine수준은 알코올 투여, 식이엽산함량, 사육기간의 삼요인 분산분석법으로(three-way ANOVA), 혈장 GOT, GPT는 알코올 투여, 식이엽산함량의 이요인 분산분석법으로(two-way ANOVA) 통계 처리한 후 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타난 요인에 대해서는 Duncan의 다중비교법을 사용하여 평균 값들이 유의적으로 다른지 사후 검증하였다. 혈장 엽산과 혈장 호모시스테인과의 관계는 피어슨의 상관 관계 분석법(Pearson correlation analysis)을 이용하여 분석하였다. 간의 조직학적 검사결과는 교차분석법(χ^2 -analysis)을 이용하여 분석하였다.

실험 결과 및 고찰

1. 혈장 homocysteine

본 실험의 결과 혈장 homocysteine의 농도는 식이 엽산이 결핍되었을 때 가장 높았으며, 식이내 엽산이 충분하거나 보충되었을 때는 혈장 homocysteine수준이 감소되었다(Fig. 1). 알코올 투여시의 혈장 homocysteine 농도는 알코올 비투여시의 homocysteine농도보다 더 높았다.

엽산의 영양상태와 관련된 혈장 homocysteine에 대한 많은 선행 연구들에서도 식이 엽산이 결핍될 경우 혈장 homocysteine수준이 상승되며³³⁻³⁵⁾ 혈장 엽산의 농도가 높을수록 혈장 homocysteine은 감소되는 역관계가 나타났다³³⁾³⁶⁾³⁷⁾. 엽산은 체내에서 remethylation 과정의 조효소로 작용하므로 엽산이 결핍되면 homocysteine이 methionine으로 전환되지 못하고 체내에 축적되어 혈장의 homocysteine수준이 증가하게 된다⁵⁾⁷⁾¹³⁻¹⁵⁾.

전 사육기간에 걸쳐 알코올은 혈장 homocysteine수

준을 상승시키는 효과를 나타내었는데 이 효과는 알코올 투여기간이 길어질수록 더욱 두드러지게 나타났다. Hultburg³⁸⁾와 Cravo³⁹⁾는 만성적인 알코올의 섭취가 hyperhomocysteinemia와 관련이 있다고 하였으며 이는 알코올 또는 그 대사물질이 엽산의 세포내 대사를

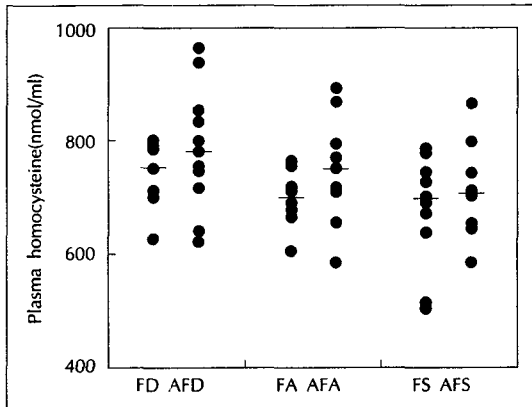


Fig. 1. Distribution of plasma homocysteine concentrations on experimental diets at 10weeks.

FD : No-alcohol administered folate deficient diet, AFD : Alcohol administered folate deficient diet, FA : No-alcohol administered folate adequate diet, AFA : Alcohol administered folate adequate diet, FS : No-alcohol administered folate supplemented diet, AFS : Alcohol administered folate supplemented diet. Median values are represented by horizontal bars.

방해해서 생긴 것이라고 하였다. 그러나, 본 실험결과식이 엽산함량이 높은 엽산 보충군의 경우에는 알코올에 의한 혈장 homocysteine상승효과가 억제되었다. 이로써 알코올 섭취시에 엽산을 권장량 이상으로 보충한다면 알코올에 의한 혈장 homocysteine상승 효과를 완화시키며 알코올로 인해 나타날 수 있는 지방간, 간경변 등 간손상을 억제시킬 수 있는 이점이 있을 것으로 생각된다.

실험식이 투여기간이 경과함에 따라 혈장 homocysteine함량은 증가하였다(Table 2). 알코올 투여 여부에 관계없이 엽산결핍식이와 엽산 적정식이시에는 혈장 homocysteine함량이 유의적으로 증가하였다. 이는 혈장 homocysteine은 나이가 증가할수록 높아진다는 보고들³⁵⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾과 일치하는 것이었다. 엽산을 권장량의 4배 수준으로 보충시켰을 때 혈장 homocysteine은 사육기간에 따라 증가하기는 하였으나 FD, FA와는 달리 10주의 혈장 homocysteine값이 유의적으로 상승되지는 않았다. 이는 엽산보충시 혈장과 간 등 조직의 엽산수준이 높아서 연령에 따라 나타나는 homocysteine수준의 증가현상을 완화시켰기 때문인 것으로 생각된다.

엽산결핍과 적정수준의 엽산 식이를 10주간 먹었을 때는 알코올 투여로 혈장 homocysteine수준이 각각 7.9%, 11.2% 상승되었으나 엽산 보충식이를 먹었을 때는 알코올에 의한 혈장 homocysteine 상승률이 5.6%로 다른 식이처리군에 비해 낮게 나타났다.

Table 2. Plasma homocysteine levels of rats on experimental diets (nmol/ml)

Diet group ¹⁾	4 weeks	7 weeks	10 weeks
FD	²⁾ 625.2 ± 27.5 ^{N53)α4)}	679.2 ± 39.3 ^{N5αβ}	725.2 ± 24.7 ^{ab5β}
AFD	676.4 ± 39.0 ^α	713.1 ± 18.6 ^{ab}	782.4 ± 28.5 ^β
FA	586.1 ± 39.0 ^α	661.4 ± 31.0 ^{ab}	682.4 ± 17.6 ^{ab}
AFA	613.7 ± 41.0 ^α	681.0 ± 31.3 ^{ab}	758.7 ± 28.2 ^{abβ}
FS	588.2 ± 31.0 ^{N5}	645.3 ± 38.3	670.2 ± 31.5 ^α
AFS	637.0 ± 37.5 ^{N5}	671.8 ± 31.2	707.9 ± 28.0 ^{ab}

Significant factor⁶⁾ A, B, C⁶⁾

- 1) FD : No-alcohol administered folate deficient diet
AFD : Alcohol administered folate deficient diet
FA : No-alcohol administered folate adequate diet
AFA : Alcohol administered folate adequate diet
FS : No-alcohol administered folate supplemented diet
AFS : Alcohol administered folate supplemented diet
- 2) Mean ± S.E.
- 3) Not significant at p < 0.05 by Duncan's multiple range test.
- 4) Values with different Greek letters in the same folate levels in diet are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test
- 5) Values with different alphabets in the same feeding period are significantly different at P < 0.05 by Duncan's multiple range test
- 6) Statistical significance of factors was analyzed by 3-way ANOVA
A : Effect of folate levels in diet was significant at p < 0.05
B : Effect of feeding period was significant at p < 0.05
C : Effect of alcohol administration was significant at p < 0.05

사람의 경우 정상 범위보다 12% 높은 경미한 고호모시스테인증으로 인해 급성심근경색증 위험율이 3.4배나 증가하는 것으로 보고된 바 있다⁶⁾. 이는 혈장 homocysteine수준을 조금만 감소시켜도 homocysteine과 연루된 질병의 발생 위험을 낮출 수 있음을 시사한다고 볼 수 있다. 본 연구에서 알코올 투여시 권장량의 4배 수준으로 엽산을 보충시켰을 때 혈장 homocysteine수준에 미치는 영향이 유익하게 나타났는데 이러한 결과가 지방간, 고호모시스테인증과 관련된 질병의 발생에 어떠한 영향을 미칠 수 있지 않을까 생각해 볼 수 있다.

2. 혈장, 간 엽산함량과 혈장 homocysteine농도와의 관계

혈장 homocysteine함량을 혈장 엽산함량과 비교하면 알코올 투여에 관계없이 식이내 엽산을 결핍시켰을 때 혈장 엽산 수준이 낮았으며 혈장 homocysteine함량은 높았다. 식이 엽산 함량이 증가할수록 혈장 엽산 수준은 증가하였으며 혈장 homocysteine함량은 가장 낮아졌다. 이러한 결과는 지금까지 혈장 homocysteine과 혈장 엽산농도와의 관련성을 연구했던 많은 보고들과 일치하는 것이었다⁷⁾⁴²⁾.

Table 3에 제시된 바와 같이 혈장 엽산농도는 혈장 homocysteine농도와 음의 상관관계를 보여서($r = -0.35, p < 0.001$) 혈장 엽산 농도가 증가함에 따라 혈장 homocysteine농도는 유의적으로 감소하였다. 실험식이 투여기간 10주에서 알코올 투여여부에 따른 혈장 엽산함량과 혈장 homocysteine농도간에도 음의 상관관계가 나타났고, 알코올 투여시 혈장 엽산 함량이 높을수록 혈장 homocysteine농도는 유의적으로 감소하였다($r = -0.36, p < 0.01$).

본 실험 결과 실험식이 투여기간 10주에서 간 엽산함량과 혈장 homocysteine농도 사이에도 유의적인 음의 상관관계($r = -0.33, p < 0.05$)가 나타났다. 간 조직의 엽산 함량과 혈장 homocysteine농도사이에도 유의적인 상관관계가 있다고 보고한 연구는 아직 없었는데 본 실험결과 간 조직의 엽산 함량이 혈장 homocysteine수준과 유의적인 음의 상관관계가 있음이 관찰되었다.

Table 3. Pearson's correlation analysis of plasma and liver folate concentrations with plasma homocysteine concentrations

	Plasma homocysteine	
	r ¹⁾	p-value
Plasma folate	-0.3560	0.0002
Liver folate	-0.3304	0.0113

1) Pearson's correlation coefficient

10주간 사육하였을 때 알코올 투여군과 알코올 비투여군의 혈장 homocysteine농도와 혈장 엽산농도 및 간 엽산 함량 사이의 상관관계를 각각 Fig. 2와 Fig. 3에 제시하였다. 간 엽산 농도와 혈장 엽산 농도의 상관성은 비슷한 분포를 보였다.

본 실험 결과 엽산 적정군이나 보충군의 혈장 엽산 수준은 실험 식이 투여기간 7주후에 더 이상 증가하지 않아(data not shown) 혈장 엽산 pool이 포화되는 것으로 나타났으나 혈장 homocysteine은 계속 증가하는 것으로 나타났다. 또한 엽산 결핍시 알코올 투여군과 비투여군의 혈장 엽산 농도 함량에는 차이가 없었으나 혈장 homocysteine수준은 알코올 투여군의 경우 높게 나타났는데 이러한 현상은 혈장의 엽산수준에 차이가 없음에도 불구하고 혈장 homocysteine수준이 높다고 보고한 Cravo 등³⁹⁾⁴³⁾⁴⁴⁾의 연구결과에서도 나타난 적이 있다.

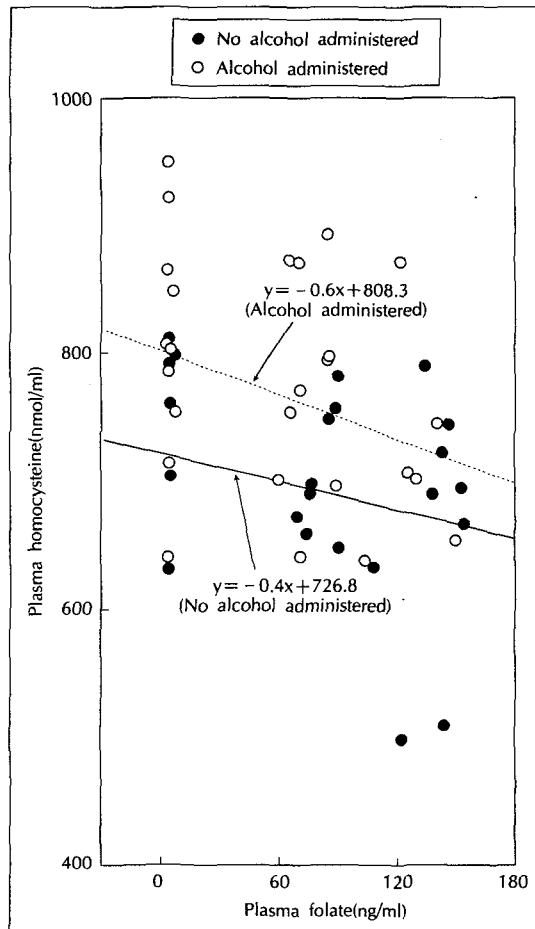


Fig. 2. Distribution of plasma homocysteine concentration with plasma folate concentration at 10 weeks by alcohol administration.

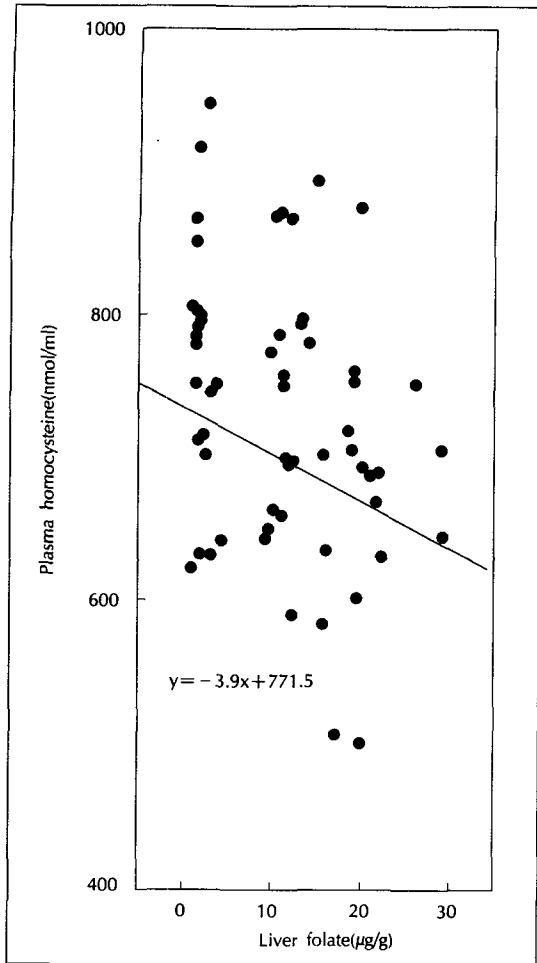


Fig. 3. Distribution of plasma homocysteine concentration with liver folate concentration at 10 weeks.

3. 간의 생화학적 기능과 병리상태

알코올의 투여와 식이 엽산 수준이 간의 생화학적 기능에 미치는 영향을 파악하고자 혈장 GOT, GPT의 활성도를 측정하였다. 그 결과 식이 엽산 수준은 GOT, GPT수준에 영향을 미치지 못하였으며 알코올 투여 역시 간의 생화학적 기능을 저하시키지 않는 것으로 나타났다(Table 4). AFD군의 GOT, GPT 효소 활성의 평균치가 가장 높게 나타나기는 했으나 변이가 커서 유의성은 없었다.

알코올을 10주간 투여한 군(AFD, AFA, AFS)의 간 조직 검사결과 경미한 손상, 즉 지방성의 변화, 간세포의 이형성 및 점성괴사 등이 관찰되었으나 평화성 퇴화나 염증이 관찰되지 않았다(Table 5).

간에 나타난 지방성 변화는 알코올 투여군 중 엽산 결핍군(AFD)에서 가장 많이 나타났으며, 특히 더 병

Table 4. Plasma GOT and GPT activities of rats at 10 weeks

Diet group ¹⁾	GOT(U/L)	GPT(U/L)
FD(n=7)	²⁾ 82.19±8.89	16.94±1.67
FA(n=8)	85.78±9.61	18.52±1.29
AFD(n=12)	97.96±13.98	19.53±2.58
AFA(n=12)	77.09±9.24	16.51±1.25
AFS(n=9)	81.46±7.48	18.46±1.61
Significant factor ³⁾	NS ³⁾	NS ³⁾

- 1) FD : No-alcohol administered folate deficient diet
FA : No-alcohol administered folate adequate diet
AFD : Alcohol administered folate deficient diet
AFA : Alcohol administered folate adequate diet
AFS : Alcohol administered folate supplemented diet
- 2) Mean±S.E.
- 3) Statistical significance of factors was analyzed by 2-way ANOVA
NS : Not significant at p<0.05

리적이라는 macrovesicular fatty change의 빈도가 알코올-엽산결핍군(AFA)이나 알코올-엽산보충군(AFS)에 비해 엽산결핍군에게서 더 높게 나타났다. Mezey²⁹⁾는 알코올 중독자를 대상으로 조사한 결과, 간 질환 증세가 없는 사람의 56%에서 간에 fatty infiltration이 나타났다고 하였다. 알코올의 대사로 인하여 간 세포내 NADH/NAD비율이 증가하게 되는데 이는 간세포의 지방산의 산화를 억제시키고 지방산의 합성을 과도하게 촉진시킨다²⁹⁾. 여기에 엽산이 결핍되면 중성지방의 방출에 필요한 methionine의 합성이 저해되어 지방간이 더욱 악화되는 것이다²⁹⁾.

간조직의 점성 괴사 역시 알코올-엽산결핍군(AFD)에서 두드러지게 높게 나타났다. 만성적인 알코올의 투여는 간조직의 산화를 촉진시키며 괴사를 일으키는데²⁹⁾, 엽산은 생체내에 환원제로 작용하는 glutathione의 합성과정에 조효소로 작용하므로 엽산 결핍시 간 조직의 산화가 더욱 촉진될 수 있다²⁹⁾.

본 실험 결과, 간 조직의 지방성의 변화와 점성괴사는 알코올의 투여와 엽산 결핍이 병행되었을 때 더욱 높게 나타났다. Halsted⁴⁹⁾는 간이 알코올의 대사와 엽산의 대사 및 저장에 중요한 역할을 하며, 과도한 알코올의 노출과 엽산 결핍은 간의 손상에 상승효과가 있다고 보고하였다. Matthias³⁰⁾는 알코올이 엽산 저장량을 감소시키고 엽산이 활성형의 조효소형태로 전환되는 것을 감소시켜서 homocysteine대사에 장애를 일으킨다고 하였다. 알코올은 그 대사를 위해 glutathione의 요구량을 증가시키고 glutathione의 전구물질인 methionine을 과도하게 손실시켜 혈장 homocysteine의 수준을 증가시킨다³⁰⁾. 그리고 알코올로 인한 간 손상이 homocysteine대사를 방해하고 이로 인해서 glutathi-

Table 5. Histological changes of ethanol administered rat livers at 10 weeks number of animals(%)

Diet group ¹⁾	Fatty change macrovesicular		Fatty change microvesicular		Liver cell dysplasia		Spotty necrosis	
	+	-	+	-	+	-	+	-
AFD (n=12)	10 (83.3)	2 (16.7)	12 (100.0)	0 (0.0)	10 (83.3)	2 (16.7)	10 (83.3)	2 (16.7)
AFA (n=12)	3 (25.0)	9 (75.0)	9 (75.0)	3 (25.0)	8 (66.7)	4 (33.3)	5 (41.7)	7 (58.3)
AFS (n=9)	3 (33.3)	6 (66.7)	6 (66.7)	3 (33.3)	9 (100.0)	0 (0.0)	5 (55.6)	4 (44.4)
	p=0.010 ³⁾		p=0.109		p=0.444		p=0.106	

1) AFD : Alcohol administered folate deficient diet
 AFA : Alcohol administered folate adequate diet
 AFS : Alcohol administered folate supplemented diet
 2) Degree of histological change : -, normal ; +, abnormal
 3) Chi-square analysis p value

one합성이 감소되면서 간 손상이 더욱 촉진되어 악순환이 계속된다.²²⁾²⁵⁾ 이처럼 알코올과 엽산 결핍은 단일 탄소대사를 손상시키고, 따라서 혈중 homocysteine수준을 상승시킨다고 할 수 있다. 만성적으로 알코올을 섭취시킨 Yucatan micropig에서 메티오닌 합성효소가 감소되고 혈청내 homocysteine수준이 증가하며 간 세포내 uracil/thymidine비율의 이상, programed cell death와 세포 분화에서의 전암성 이상이 나타났다는 보고도 있었다.⁴⁶⁾

식이 엽산이 결핍되면 주 3회 10주간 투여 받은 비교적 경미한 알코올 섭취로도 간조직에는 지방성 변화, 점성괴사 등 조직검사상에 이상이 나타났으나 GOT, GPT 등 효소 활성을 통해 관찰한 간 기능에는 변화가 없었다. 점성괴사 등이 관찰될 때는 GOT, GPT의 효소 활성에 변화가 발생한다고 보고된 바가 많은데 본 실험의 경우에는 변화가 없었다.

요약 및 결론

본 연구에서는 알코올의 섭취가 혈장 엽산과 homocysteine수준에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험동물에 알코올을 투여하고 식이 엽산수준을 달리하여 10주간 사육하였다. 혈장 엽산은 *Lactobacillus casei*(ATCC 7469)를 이용한 미생물법에 의하여 분석하였으며 혈장 homocysteine은 가수분해를 거친 후 PITC로 유도체화시켜 HPLC를 이용하여 분석하였다.

혈장 homocysteine수준은 엽산 결핍식이군에서 가장 높았다. 엽산 결핍식이와 알코올의 투여가 10주간 지속된 경우 엽산 섭취량이 양호하면서 알코올을 투여 받지 않은 군에 비해 혈장 homocysteine수준이 유의적으로 높게 나타났다. 알코올 투여시 엽산을 보충시키

면 혈장 homocysteine의 상승을 억제하는 것으로 나타났다.

알코올 투여군의 간조직 검사결과 알코올-엽산 결핍군에서 지방간, 점성괴사가 엽산 적정군이나 보충군에 비해 높게 나타났다. 이러한 간조직의 이상성은 알코올-엽산 결핍군에서의 혈장 homocysteine 상승과 관련이 있을 것으로 생각할 수 있다.

본 연구 결과, 알코올과 식이 엽산 수준은 혈장 homocysteine수준에 영향을 미치며 엽산 결핍과 알코올 투여기간이 증가하면서 homocysteine수준에 나타나는 악영향이 더욱 두드러졌다. 앞으로 알코올과 엽산 섭취량, homocysteine대사와의 상호관련성에 관한 연구가 지속적으로 이루어지면 알코올 중독이나 고호모시스테인혈증과 관련된 질환의 발생원인을 규명하고 예방책을 강구하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

Literature cited

- 1) Kang SS, Wong PWK, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 36(5) : 458-462, 1987
- 2) Wilcken DEL, Dudman NPB, Tyrrell PA, Robertson MR. Folic acid lowers elevated plasma homocysteine in chronic renal insufficiency : Possible implications for prevention of vascular disease. *Metabolism* 37(7) : 697-701, 1988
- 3) Lewis CA, Pancharutti N, Sauberlich HE. Plasma folate adequacy as determined by homocysteine level. *Ann NY Acad Sci* 669 : 360-362, 1992
- 4) Herbert V. Recommended dietary intakes(RDI) of folate in humans. *Am J Clin Nutr* 45 : 661-670, 1987
- 5) Zimmermann MB, Shane B. Supplemental folic acid. *Am J Clin Nutr* 58 : 127-128, 1993
- 6) Swain RA, Clair LS. The role of folic acid in deficiency

- states and prevention of disease. *J Fam Pract* 44(2) : 138-144, 1997
- 7) Kim YI, Miller JW, Costa K, Nadeau M, Smith D, Selhub J, Zeisel SH, Mason JB. Severe folate deficiency causes secondary depletion of choline and phosphocholine in rat liver. *J Nutr* 124 : 2197-2203, 1994
 - 8) Masser PA, Taylor LM, Porter JM. Importance of elevated plasma homocysteine levels as a risk factor for atherosclerosis. *Ann Thorac Surg* 58 : 1240-1246, 1994
 - 9) McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nature Medicine* 2(4) : 386-389, 1996
 - 10) Berwanger CS, Jeremy JY, Stansby G. Homocysteine and vascular disease. *Br J Surg* 82 : 726-731, 1995
 - 11) Ubbink JB. Vitamin nutrition status and homocysteine : An atherogenic risk factor. *Nutr Rev* 52(11) : 383-393, 1994
 - 12) US public health service. Recommendation for the use of folic acid to reduce numbers of cases of spinal bifida and other neural tube defects. *MMWR* 41(RR-14) : 1-7, 1992
 - 13) Marsack CR, Alsop CL, Kurinczuk JJ, Bower C. Pre-pregnancy counselling for the primary prevention of birth defects : Rubella vaccination and folate intake. *Med J Australia* 162 : 403-406, 1995
 - 14) Phull E, Hirst SL. Folic acid in pregnancy. *Br J General Pract* 45 : 688, 1995
 - 15) Pietrzik K, Prinz R, Reusch K, Bung P, Mallmann P, Chronides A. Folate status and pregnancy outcome. *Ann NY Acad Sci* 669 : 371-373, 1992
 - 16) Report of the American Institute of Nutrition. Ad Hoc committee on standard for nutritional studies. *J Nutr* 107 : 1340-1348, 1977
 - 17) McGuffin R, Goff P, Hillman RS. The effect of diet and alcohol on the development of folate deficiency in the rat. *Brit J Haemat* 31 : 185-192, 1975
 - 18) Gloria L, Cravo M, Carmilo ME, Manuela R, Cardoso JN, Gouveia A, Oliveria, C Nobre Leitão, F Costa Mira. Nutritional deficiencies in chronic alcoholics : Relation to dietary intake and alcohol consumption. *Am J Gastroenterol* 92(3) : 485-489, 1997
 - 19) Halsted CH, Robles EA, Mezey E. Intestinal malabsorption in folate-deficient alcoholics. *Gastroenterol* 64 : 526-532, 1973
 - 20) Halsted CH, Robles EA, Mezey E. Decreased jejunal uptake of labelled folic acid (³H-PGA) in alcoholic patients : Roles of alcohol and nutrition. *N Engl J Med* 285(13) : 701-706, 1971
 - 21) Wilkinson JA, Shane B. Folate metabolism in the ethanol-fed rat. *J Nutr* 112 : 604-609, 1982
 - 22) Weir DG, McGing PG, Scott JM. Folate metabolism, the enterohepatic circulation and alcohol. *Biochem Pharm* 34 (1) : 1-7, 1985
 - 23) McMartin KE, Collins TD. Role of ethanol metabolism in the alcohol-induced increase in urinary folate excretion in rats. *Biochem Pharm* 33(17) : 2549-2555, 1983
 - 24) McMartin KE, Collins TD, Bairnsfather L. Cumulative excess urinary excretion of folate in rats after repeated ethanol treatment. *J Nutr* 116 : 1316-1325, 1986
 - 25) Shaw S, Jayatilleke E, Herbert V, Colman N. Cleavage of folates during ethanol metabolism. *Biochem J* 257 : 277-280, 1989
 - 26) Health and social welfare review. Korean Institute for health and social affairs, 1996
 - 27) Naughton CA, Chandler CJ, Duplantier RB, Halsted CH. Folate absorption in alcoholic pigs : In vitro hydrolysis and transport at the intestinal brush border membrane. *Am J Clin Nutr* 50 : 1436-1441, 1989
 - 28) Tamura T, Romero JJ, Watson JE, Gong EJ, Halsted CH. Hepatic folate metabolism in the chronic alcoholic monkey. *J Lab Clin Med* 97 : 654, 1981
 - 29) Mezey E. Alcoholic liver disease : Roles of alcohol and metabolism. *Am J Clin Nutr* 33 : 2709-2718, 1980
 - 30) Matthias D, Becker CH, Riezler R, Kindling PF. Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine. *Atherosclerosis* 122 : 201-216, 1996
 - 31) Chang NS, Kim YS. Effects of dietary folate intake on plasma and tissue folate concentrations in rats 31(3) : 271-278, 1998
 - 32) Chang NS, Kim KN. Effect of alcohol administration on folate metabolism in rats 31(4), 1998
 - 33) Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, Gaziano JM, Allen RH, Stabler SP, Reynolds RD, Kok FJ, Hennekens CH, Willet WC. Homocysteine Metabolism and risk of myocardial infarction : Relation with vitamins B6, B12, and folate. *Am J Epidemiol* 143 : 845-859, 1996
 - 34) Lin JY, Kang SS, Zhou J, Wong PW. Homocysteinemia in rats induced by folic acid deficiency. *Life Sci* 44 : 319-325, 1989
 - 35) Miller JM, Nadeau MR, Smith D, Selhub J. Vitamin B-6 deficiency vs folate deficiency : Comparison of responses to methionine loading in rats. *Am J Clin Nutr* 59 : 1033-1039, 1993
 - 36) Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE, Perkins LL, Sauberlich HEGo RCP, Jese OA, Maurizio M, Ronald TA, Robert BC, A Lucien C, Thomas BG, Phillip EC, Jeffrey MR. Plasma homocysteine, folate and vitamin B-12 concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 59 : 940-948, 1994
 - 37) Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants

- of homocysteinemia in an Elderly population. *JAMA* 270 : 2693-2698, 1993
- 38) Hultberg B, Gerlund M, Andersson A, Frank A. Elevated plasma homocysteine in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 17 : 687-689, 1993
- 39) Cravo ML, Gloria LM, Selhub J, Nadeau MR, Camilo ME, Resende MP, Cardoso JN, Leitao CN, Mira C. Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism : Correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status. *Am J Clin Nutr* 63 : 220-224, 1996.
- 40) Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease : Plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 473-501, 1989
- 41) Selhub J, Rosenberg IH. Folic Acid : Ziegler EE, Filer LJ. Present Knowledge in Nutrition pp206-219, ILSI Press, New York 1996
- 42) Westermann J, Schwitzer R, Jecker P, Pabst R. Lymphocyte subsets in the blood. *Scand J Immunol* 31 : 327-334, 1990
- 43) Kang SS, Wong PW, Cook HY, Norusis M, Joseph VM. Protein-bound homocysteine-a possible risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 77 : 1482-1486, 1986
- 44) Rodriguez HS. Folic Acid Requirements of man : A conspectus. *J Nutr* 108 : 1983, 1978
- 45) Halsted CH. Folate requirements and metabolism in alcoholic liver disease. *Nut Res* 41(9) : 1439-1456, 1994
- 46) Halsted CH. Ethanol feeding of micropigs alters methionine metabolism and increases hepatocellular apoptosis and proliferation. *Hepatology* 23(3) : 497-505, 1996