

β-Carotene 대체 급여 및 에탄올의 만성적 급여가 흰쥐의 엽산대사에 미치는 영향*

임은선 · 서정숙 · 민혜선**

영남대학교 식품영양학과, 한남대학교 식품영양학과**

Effects of Dietary β-Carotene Substitution for Vitamin A and Chronic Consumption of Ethanol on Folate Metabolism in Rats

Im, Eun-Sun · Seo, Jungsook · Min, Hyesun**

Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyoungsan 712-749, Korea

Department of Food and Nutrition** Hannam University, Taejeon 306-791, Korea

ABSTRACT

The effects of β-carotene substitution for vitamin A and the chronic consumption of ethanol on hepatic folate metabolism were studied in rats. The substitution of β-carotene for vitamin A depressed hepatic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase(10-formyltetrahydrofolate : NADP oxidoreductase, E.C. 1.5.1.6) activity to 65% of controls($p < 0.001$) and enhanced hepatic 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase(E.C. 6.3.3.2) activity by 56% with respect to control levels($p < 0.001$). Hepatic activity of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase was depressed to about half that of control levels by ethanol administration to rats(36% ethanol diet, $p < 0.001$). The activity of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase was not changed by ethanol consumption. The increased activity of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and the decreased activity of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase appeared to decrease the level of nonmethyl folate coenzymes and the rate of one-carbon metabolism. Plasma homocysteine concentrations were significantly higher in rats fed ethanol($p < 0.01$) or β-carotene($p < 0.001$) than in controls, which suggests that increased activity of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase can depress homocysteine metabolism. We concluded that dietary substitution of β-carotene for vitamin A or chronic administration of ethanol resulted in changes in the activity of hepatic folate-dependent enzymes, which could affect the distribution of folate derivatives, plasma homocysteine levels and one-carbon metabolism. (*Korean J Nutrition* 32(4) : 376~383, 1999)

KEY WORDS : folate · ethanol · β-carotene · 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase · 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase.

서 론

시각회로에 있어서 비타민 A의 기능은 그 작용기전이 비교적 정확하게 규명되었지만 비타민 A의 다른 생리적 기능 가운데 황의 대사¹⁾ 및 당단백질 합성²⁾의 저하현상, 호흡 및 소화기의 감염 위험을 증가³⁾ 및 홍역에 의한 감염을 증가⁴⁾ 등의 생리적 현상에서의 비타민 A의 작용기전은 확실하게 밝혀지지 않았다.

Steele 등⁵⁾은 비타민 A가 결핍된 흰쥐에게 300mg의 (ring-2-¹⁴C)histidine을 투여하였을 때 ¹⁴CO₂로의 산화속도

가 저하되고 소변을 통한 formiminoglutamate(Figlu)의 배설량이 증가되는 사실로부터 비타민 A의 결핍이 엽산을 필요로하는 단일탄소기 대사과정에 손상을 가져오는 것으로 보고하였다. 이때, 다량의 비타민 A를 보충하면 혈장내 히스티딘의 농도와 Figlu의 배설량이 저하되었다.⁶⁾

β-Carotene은 여러 가지 비타민 A 전구체 중에서 식물성 식품에 널리 분포되어 있으며 비타민 A 활성도가 매우 높은 카로티노이드 물질이기 때문에 전세계적으로 가장 중요한 비타민 A 전구체이다. 특히 한국인의 경우 비타민 A 요구량의 대부분을 β-carotene의 형태로 섭취하고 있으며, 한국인의 혈청내 retinol 농도는 구미 외국인보다 낮았고 β-carotene의 농도는 높게 나타났으므로,⁷⁾ β-carotene의 생리적 활성 및 기능에 대한 정확한 정보가 매우 필요한 실정이다.

β-Carotene은 인체, 쥐, 흰 닭비 등의 고등동물의 체내에서 레티날(비타민 A 알데히드)로 전환되며,⁸⁻¹⁰⁾ 이러한 전

채택일 : 3월 24일

*This study was supported by a grant(HMP-97-F-3-0013) of the Good Health R & D Project, Ministry of Health & Welfare, R.O.K.

환과정과 비타민 A의 대사과정은 만성적 에탄올 섭취시 영향받는 것으로 알려져 있다.¹¹⁻¹³⁾ 에탄올의 급여는 흰쥐의 간 조직 및 혈장내 retinol의 농도를 저하시켜 비타민 A 영양 상태를 저하시키며,¹⁰⁻¹³⁾ 에탄올을 급여받은 사람의 혈장내 α -carotene과 β -carotene의 농도 및 lutein과 zeaxanthin의 농도가 저하되므로,¹²⁾ 에탄올은 혈장내 비타민 A와 카로티노이드의 농도에 영향을 주는 것으로 보고되었다.¹²⁾ 종전의 연구¹⁴⁻¹⁷⁾에서 장기간에 걸친 만성적인 에탄올 급여는 소변내 엽산 배설량을 증가시키고, 혈장 및 여러 장기의 엽산 농도를 저하시키며, 혈장 호모시스테인 농도를 증가시키는 것으로 조사되었다.¹⁸⁻²⁰⁾

본 연구는 흰쥐에게 에탄올을 만성적으로 급여하거나 비타민 A 대신 이와 동등한 비타민 A 활성을 나타내는 분량의 β -carotene을 공급하였을 때, 간조직내에서의 단일 탄소기 대사과정에 미치는 영향을 조사함으로써 알코올 급여 및 β -carotene의 대체급여가 엽산대사에 미치는 영향을 조사하고자 실시되었다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

본 연구에 사용한 실험동물은 Sprague-Dawley종 숫쥐로서 환경이 조절된 사육실(온도 20±2°C, 습도 55±1%, 조명 8:00am~20:00pm)에서 stainless steel wire cage에 한 마리씩 분리하여 평균 체중이 200g이 될 때까지 고형 사료로 사육하였다.

흰쥐에게 공급한 실험식은 Lieber-DeCarli 액체식이^{21,22)}와 유사한 조성을 가진 식이로서 실험식이 1ml당 1kcal를 공급하며 충분한 엽산(0.5mg/1000kcal)이 함유되도록 구성되었다(Table 1). 실험동물은 Table 2와 같이 8마리씩 4군으로 나누어 4주 동안 사육하였으며, 실험식은 각각 에탄올(36%) 급여의 유무와 비타민 A 또는 β -carotene 공급을 달리하여 제조하였다(Table 2). 식이내 비타민 A의 함량은 2mg/1000kcal로서 AIN의 권장량 수준이었으며 β -carotene의 함량은 비타민 A로의 전환율을 고려하여 12mg/

1000kcal이 되도록 조제하였다. 각 실험군에게 1주일간의 에탄올 식이 적응과정을 거치게 한 후 본 실험식이를 공급하였으며, 에탄올 식이군은 에너지 섭취량이 제한되는 경향이 있으므로 36% 에탄올 급여군에게 식이를 자유로이 공급하고, 이들의 1일 사료공급량을 기준으로 나머지 에탄올 비급여군에게 pair-feeding하였다. 사료섭취량은 매일 확인하였고, 체중은 1주일 간격으로 측정하였다.

2. 시료수집 및 분석

1) 혈액 및 간 조직

실험동물을 희생하기 전 12시간 동안 절식시키고 에테르로 마취하여 개복한 후 즉시 헤파린으로 처리된 주사기를 사

Table 1. Composition of experimental liquid diets

Ingredient	g/l Diet
Casein	41.4
L-cystine	0.5
DL-methionine	0.3
Corn oil	8.0
Olive oil	15.0
Dextrin-maltose ¹⁾	153.0
Fiber	10.0
Xanthan gum	3.0
Choline bitartrate	0.53
Vitamin mixture ²⁾	2.55
Mineral mixture ³⁾	9.0
Ethanol ⁴⁾	0

1) Dextrin-maltose content in experimental liquid diets : 153g/l for non-ethanol group, 64g/l for ethanol group

2) Vitamin mixture ingredients(mg/1000kcal) : Thiamin HCl 1.530, Riboflavin 1.530, Pyridoxine HCl 1.785, Niacin 7.650, Calcium pantothenate 4.080, Folic acid 0.510, Biotin 0.510, Vitamin B₁₂, Vitamin E 25.500, Vitamin D₃ 0.638, Sucrose 2.500, P-aminobenzoic acid 12.500, Inositol 25.000, Vitamin A 2.0 for diet 1 and diet 2, β -carotene 12.0 for diet 3 and diet 4

3) Mineral mixture ingredients(/1000kcal) : CaHPO₄ 4.500g, NaCl 0.666g, Potassium citrate 1.980g, Potassium sulfate 0.468g, Magnesium oxide 0.216g, Manganese carbonate 0.032g, Ferric citrate 0.054g, Zinc carbonate 0.014g, Cupric carbonate 0.090mg, Potassium iodate 0.090mg, Sodium selenite 4.950mg, Chromium potassium sulfate 1.062g, Sucrose 1.062g, Fluoride 0.25mg

4) Ethanol content in experimental liquid diets : 0g/l for non-ethanol group and 50.4g/l for ethanol group

Table 2. Effect of dietary β -carotene substitution for vitamin A and chronic ethanol consumption on tissue folate levels in rats¹⁾

Diet	Ethanol	Vitamin A	β -Carotene	Liver folate (nmol/g)	Plasma folate (pmol/ml)	RBC folate ²⁾ (nmol/ml)
1	-	+	-	16.1 ± 1.9 ^{ab3)}	248.9 ± 21.0 ^a	1.71 ± 0.31 ^b
2	+	+	-	17.7 ± 1.7 ^a	196.9 ± 12.3 ^b	2.42 ± 0.32 ^a
3	-	-	+	15.5 ± 0.9 ^b	215.6 ± 30.3 ^b	1.97 ± 0.52 ^{ab}
4	+	-	+	17.7 ± 1.2 ^a	196.3 ± 24.9 ^b	2.23 ± 0.52 ^{ab}

1) Mean ± standard deviation(n=8), 2) Red blood cell folate

3) Values within a column with different superscripts are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple-range test

용하여 복부 대동맥으로부터 혈액을 채혈하였다. 채취한 혈액 중 0.8ml을 제외한 나머지 혈액을 3000rpm에서 냉장·원심분리하여 혈장을 분리시킨 후 일정량으로 나누어 -70°C 에서 보관하였다. 전혈은 채혈 당일에 엽산분석을 위해 종전과 같은 방법²⁰⁾으로 준비하여 -70°C 에서 보관하였다. 혈액 채취 후 즉시 간을 적출하여 부착되어 있는 지방을 깨끗이 제거한 다음 여과지로 물기를 닦고 무게를 측정하여 일정량으로 나누어 -70°C 에서 보관하였다.

2) 뇨

실험동물의 뇨는 14일 및 28일째에 24시간 동안 metabolic cage에서 sodium ascorbate(1g)를 넣은 플라스틱 병에 알루미늄 박을 씌워서 수집하였다. 뇨는 수집한 즉시 여과하여 총 부피가 100ml이 되도록 증류수로 희석하여 분석할 때까지 냉동 보관하였다.

3) 엽산함량의 분석

시료의 엽산 함량은 *Lactobacillus casei*(*L. casei*, ATCC 7469)를 사용하여 미생물학적 방법으로 분석하였다.²³⁾ 간과 적혈구 추출액은 돼지의 신장으로부터 추출한 folate conjugase²⁴⁾로 처리한 후 엽산분석에 사용되었으며, 혈장과 소변의 추출액은 folate conjugase로 처리하지 않고 일정 비율로 희석한 후 직접 엽산 분석에 이용되었다.

4) 10-Formyl-THF dehydrogenase와 10-formyl-THF hydrolase의 활성도 측정

간조직내 10-formyl-THF dehydrogenase와 10-formyl-THF hydrolase의 활성도는 Kutzbach과 Stokstad²⁵⁾의 방법에 의해 분광광도법에 의해 측정되었으며, 300nm에서 10-formyl-THF로부터 THF가 생성되는 속도를 측정하여 분석하였다.

(1) 시약과 시료 준비

효소분석용 1.5mM 10-formyl-THF 용액은 5-formyl-THF(Sigma사)를 다음과 같이 처리하여 준비하였다. 0.1N HCl 용액(1ml)과 mercaptoethanol(150 μ l)의 혼합용액에 5.6mg의 5-formyl-THF를 녹인 다음 빛을 차단한 상태에서 4분간 물증탕법에 의해 끓인 후 얼음수조에서 10분간 냉각시켰다. 0.5M Sodium phosphate 완충용액(4.5ml, pH 7.2)을 첨가하고 잘 혼합한 후 1시간 30분 동안 실온에서 방치하여 준비하였다.

간조직을 차가운 0.1M sodium phosphate 완충용액(pH 7.3, 2M mercaptoethanol용액 함유)에 넣어 균질화시킨(1:10w/v) 후 20,000g에서 30분간 원심분리하여 그 상층

액을 시료로 사용하였다.

(2) 분석방법

10-Formyl-THF dehydrogenase 활성도 분석은 다음과 같은 조건에서 수행하였다: 0.05M Tris-HCl(pH 7.7), 0.1M 2-mercaptoethanol, 100 μ M NADP, 75 μ M(6-R, S)-10-formyl-THF, 준비된 간조직 시료(1:10w/v). 이 혼합물을 30°C 에서 항온 유지시키며 300nm에서 흡광도의 변화속도를 5분간 측정하였다. 이때 생성되는 THF의 mmol 당 흡광계수는 NADP에 의한 흡광도를 보정한 값 22.6 cm^{-1} 를 사용하였다.

5) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase의 활성도 측정

간조직내 5,10-methylene-THF reductase 활성도는 Kutzbach과 Stokstad 방법²⁶⁾에 의해 측정하였다. 5,10-Methylene-THF reductase는 생체내에서 5,10-methylene-THF를 5-methyl-THF로 환원시키는 작용을 하지만, 이 효소활성을 분석하는 과정에서는 menadione을 시험관내에서의 전자수용체로 사용하여 5,10-methyl-THF와 반응시켜 5,10-methylene-THF로 산화시키는 역반응이 일어나도록 하였다.

(1) 시약과 시료 준비

(\pm)-5- ^{14}C -Methyl-THF (50 μ Ci, Amersham사)를 0.1% mercaptoethanol용액(1ml)에 녹여 5- ^{14}C -methyl-THF 용액을 준비하였다. 5-Methyl-THF(25mg, barium salt, Sigma사)를 12.5ml의 물과 0.3ml의 mercaptoethanol 혼합용액에 녹인 후 75 μ l의 5- ^{14}C -methyl-THF 용액과 혼합하여 준비하였다.

간조직을 3배 분량의 166mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.3)으로 균질화시킨 다음 30,000g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 분석에 사용하였다.

(2) 분석방법

효소반응은 다음과 같은 조건으로 총부피가 1.2ml 이 되도록 혼합하였으며, 빛을 차단한 상태에서 30분간 항온유지(30°C)하며 반응시켰다: 1.6mM EDTA, 0.28mM(\pm)-5- ^{14}C -methyl-THF 용액, 166mM potassium phosphate 완충용액, menadione 뜨거운 과포화용액(약 3.5mM)과 100 μ l의 간조직 추출액. 반응이 끝났을 때 0.3ml의 1M sodium acetate 완충용액(pH 4.5), 2 μ mol의 formaldehyde 및 0.3ml의 0.4M dimedone(50% ethanol 용액에 녹임)을 첨가한 후 formaldehyde-dimedone 첨가화합물의 생성을 가속화하기 위해 95°C 에서 5분간 가열하였다. 얼음

수조에서 5분간 냉각시킨 후 4ml의 toluene과 30초간 잘 혼합하여 추출한 후, 상층액 1ml을 취하여 scintillation cocktail과 혼합하여 scintillation counter로 측정하였다.

6) 혈장 호모시스테인의 정량

혈장 호모시스테인 농도는 Araki와 Sako²⁰⁾의 HPLC 방법으로 분석하였다. HPLC는 2개의 펌프 시스템과 SCL-10A system controller(Shimadzu사)를 사용하여 수행하였다. 시료는 20 μ l 루프를 사용하여 Rheodyne injector로 주입하였으며, Shim-pack CLC-ODS(150 \times 4.6mm I.D., 5 μ m particle size)를 분석용 column으로, Shim-pack CLC-G-ODS(10 \times 4.6mm)를 Guard column으로 사용하였다. 형광도를 측정할 때 excitation wave length는 385nm, emission wave length는 515nm에서 Shimadzu RF 10AXL을 사용하여 측정하였다. 측정된 형광도는 Chromatopac C-R6A로 기록·정량 하였다.

HPLC의 이동상으로는 0.1M acetate buffer(pH 4.0, 2% 메탄올 함유)용액을 A용매로 사용하였고, 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.0, 5% 메탄올 함유)용액을 B용매로 사용하였다. 용매의 flow rate는 1ml/min이었으며, A용매에서 B용매로 linear gradient(0~100%)를 나타내며 20분 동안 흐르게 하였다. 모든 시약과 시료는 HV filter(0.45 μ m, Millipore사)로 여과한 후 column에 주입하였다.

7) 비타민 A 함량 측정

혈장 retinol 함량 및 간조직내 retinol 및 retinyl palmitate 함량은 Bieri 등²¹⁾의 HPLC 방법으로 동시에 정량하였다.

3. 통계처리

실험식이의 처리에 의한 각 분석항목의 분석치는 각 식이 별로 평균값과 표준편차로 나타났다. 실험 결과의 통계 처리는 SAS package를 이용하여 에탄올 급여와 β -carotene 대체급여의 이요인 분산분석법(two-way ANOVA)으로 통계 처리한 후 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타난 요인에 대해서는 Duncan의 다중비교법을 사용하여 $p < 0.05$ 에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 간조직 및 혈액의 엽산 함량

모든 실험군에서 간의 엽산함량이 정상범위에 속했으나, 대체로 에탄올 급여군이 에탄올 비급여군보다 유의적으로 높

은 간조직내 엽산 보유량을 나타냈으며($p < 0.01$), β -carotene 급여에 의한 영향은 없는 것으로 나타났다(Table 2). 이와 같이 에탄올 급여에 의해 실험동물의 간조직내 엽산이 현저히 고갈되는 현상은 관찰되지 않았으나, 에탄올 급여군의 간조직내 엽산이 종전 연구²⁰⁾와 달리 에탄올 비급여군보다 다소 높게 조사된 것은 에탄올 급여 기간(4주일)이 간조직내 엽산 농도를 저하시키는데 부족했기 때문인 것으로 보인다.

에탄올 공급이 장기화될 때 간의 엽산 저장량이 고갈되는 것으로 보고되었으나,^{20,29)} 이와 대조적으로 Horne 등³⁰⁾에 의하면 식이열량의 30%를 알코올로 공급하였을 때 간에서 fo-lylpolylglutamate의 합성율이 증가되며 간으로부터 혈액으로의 엽산유출이 저해되어 간의 엽산 저장량이 대조군보다 오히려 높았다.

적혈구의 엽산 농도는(Table 2) 에탄올 급여군이 에탄올 비급여군보다 높았으며($p < 0.01$), 이와 같은 결과는 간조직내 엽산함량이 에탄올 급여에 의해 증가된 것과 관련이 있는 것으로 보인다. 그러나, β -carotene 대체급여는 적혈구내 엽산농도에 뚜렷한 영향을 주지 않았다. 혈장 엽산농도는 β -carotene 대체급여와는 관계없이 에탄올 급여군에서 유의적으로 낮았다($p < 0.001$). 에탄올을 급여받은 흰쥐의 혈장 엽산농도가 비교적 빠른 시일내에 저하되는 것은 소변을 통한 엽산배설량이 조기에 크게 증가되는 것과 관계가 있는 것으로 제안되었다.²⁰⁾²⁹⁾ Wilkinson 등³²⁾은 30% 에탄올식이를 급여했을 때 혈장의 엽산농도가 대조군과 유의적 차이가 없는 것으로 보고하여 본 실험과 차이가 있었다.

2. 소변내 엽산 배설량

에탄올 식이를 급여한 후 2주 및 4주째에 흰쥐의 소변으로 배설된 엽산배설량은 에탄올급여군이 에탄올비급여군보다 유의적으로 크게 높았으며(각각 $p < 0.01$, $p < 0.001$), β -carotene 대체급여에 의해 소변내 엽산배설량은 유의적인 변화가 없었으므로 β -carotene의 대체급여는 소변내 엽산배설량에 영향을 주지 않는 것으로 보인다(Fig. 1).

McMartin 등²⁹⁾은 충분량의 엽산을 공급받은 흰쥐에 있어 에탄올이 소변내 엽산배설량을 크게 증가시키는 효과가 빠른 시일(2주 이내)에 나타나며 간조직내 엽산 저장량의 고갈현상에 선행하여 나타나는 것으로 보고하였으며, 본 실험을 통해 에탄올급여시 소변을 통한 엽산 손실이 혈장 및 간조직내 엽산 고갈의 주요한 요인으로 작용할 수 있음을 확인하였다.

에탄올은 엽산이 신장에서 여과 및 재흡수 될 때, 사구체에서의 여과율에는 영향을 주지 않으나 소변내 엽산배설량

을 증가시키므로 세포관에서의 재흡수과정에 영향을 주는 것으로 제안되었다.³⁶⁾ 최근, Ross와 McMartin의 연구³⁸⁾에 의하면 엽산이 신장에서 재흡수될 때 엽산이 근위세뇨관의 brush border membrane과 결합되는 과정이 에탄올에 의해 영향을 받지 않았으므로, 소변내 엽산 배설량이 에탄올 급여에 의해 증가되는 이유는 신장에서 엽산이 재흡수될 때 brush border membrane과 결합되는 과정이 아닌 다른 단계에 영향을 주거나 엽산 대사의 변화에 기인하는 것으로 보고하였다. Im 등의 연구³⁹⁾에서 에탄올 급여군의 식이를 정상 식이로 전환한 다음 2주후에 소변내 엽산함량이 크게 감소되어 에탄올에 의한 소변내 과다한 엽산 배설현상은 에탄올 급여를 중단한 후 신속하게 회복되는 것으로 밝혀졌다.

3. 간조직내의 10-Formyltetrahydrofolate dehydrogenase/hydrolase의 활성도

에탄올 급여와 β -carotene 대체급여는 간조직내 10-formyl-THF dehydrogenase와 10-formyl-THF hydrolase의 효소 활성도를 크게 저하시켰다(Fig. 2). 10-Formyl-THF dehydrogenase 활성도는 에탄올 급여에 의해 대조군의 53% 수준으로 크게 저하되었으며($p < 0.001$), dehydrogenase의 활성도는 β -carotene 대체급여에 의해서도 대조군의 65% 수준으로 저하되어($p < 0.001$) 에탄올 급여 및 β -carotene의 대체 급여시 10-formyl-THF dehydrogenase의 활성이 크게 저하되는 것으로 조사되었다(Fig. 2). 10-Formyl-THF dehydrogenase는 간세포의 세포질내에서 히스티딘의 산화과정에서 생성되거나 formate와 THF와의

반응 결과 생성되는 10-formyl-THF를 THF와 CO₂로 최종 산화시키는 효소로서, NADP를 조효소로 사용하며 이 효소의 활성저하는 히스티딘 대사능력의 기능 저하를 가져오는 것으로 알려져 있다.²⁶⁾ 10-Formyl-THF hydrolase는 간세포의 미토콘드리아에 존재하면서 10-formyl-THF를 THF와 CO₂로 가수분해하는 효소로서 10-formyl-THF dehydrogenase와 유사한 생리적 기능을 나타내지만 NADP를 조효소로 이용하지 않는다는 점에서 다르다. Fig. 2에서와 볼 수 있듯이 10-Formyl-THF hydrolase의 활성도 또한 알코올 급여 또는 β -carotene 대체급여에 의해 크게 저하되었다.

β -Carotene 대체 급여군의 간조직내 비타민 A 함량(Table 3)은 비타민 A 급여군보다 유의적으로 낮은 수준이었으며($p < 0.001$) 모든 실험군의 비타민 A 함량은 정상범위에 속했다. 그러나, 이와같이 β -carotene 대체 급여군의 상대적으로 저조한 비타민 A 저장량과 낮은 10-formyl-THF dehydrogenase 및 hydrolase 활성도 사이에 관계가 있는 것으로 보인다. 따라서, 비타민 A와 동등한 생리적 활성을 가져 올 수 있는 수준으로 알려져 있는 6배 분량의 β -carotene 대체급여가 간조직내 비타민 A 수준 및 엽산대사의 저하를 가져 올 수 있는 것으로 보인다.

본 연구에서 에탄올의 만성적 급여 및 β -carotene의 대체 급여시 간조직내 총엽산량은 크게 저하되지 않았으나 10-formyl-THF dehydrogenase 및 hydrolase의 활성도가 저하된 사실로부터 엽산 조효소 형태들의 분포가 영향을 받았을 것으로 사료되며, 이때 대사상 기능성이 높은 엽산 조효

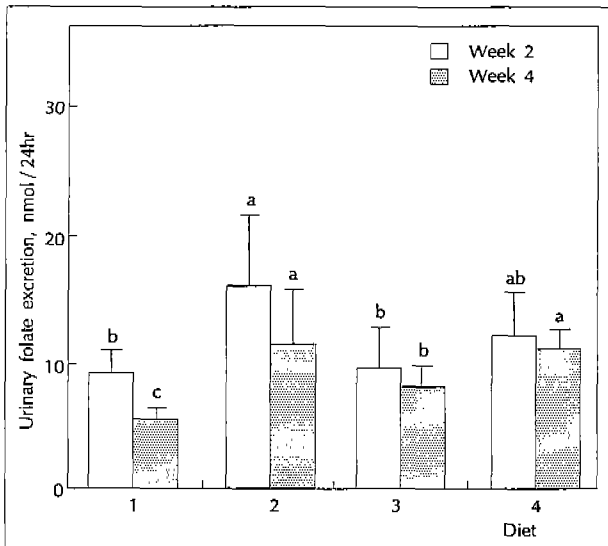


Fig. 1. Effect of dietary β -carotene substitution for vitamin A and chronic consumption of ethanol on urinary folate excretion. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple-range test.

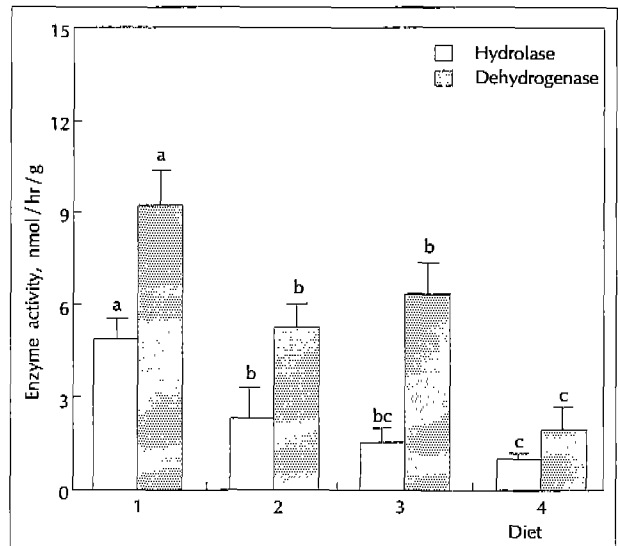


Fig. 2. Effect of dietary β -carotene substitution for vitamin A and chronic consumption of ethanol on hepatic 10-formyl-THF dehydrogenase and hydrolase activities. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple-range test.

소의 비율 저하가 장기간에 걸친 엽산대사 및 영양상태에 영향을 미칠 것으로 보이므로 이에 대한 보충연구가 필요하다. 이외에도, 10-formyl-THF dehydrogenase의 활성도는 엽산 결핍상태 및 갑상선 기능 항진상태³⁰에서 저하되는 것으로 보고되고 있다. Kelly 등³⁰은 에탄올의 만성적 급여에 의해 마이크로솜내의 엽산 분해효소들의 합성속도가 증가되었지만 엽산 분해속도가 증가되지는 않는 것으로 보고하였다.

4. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase의 활성도

흰쥐에게 에너지 섭취량의 36%를 에탄올로 급여하였을 때 간조직내 5,10-methylene-THF reductase의 활성도에는 변화가 없었으나, β-carotene의 대체급여는 간조직내 5,10-methylene-THF reductase의 활성도를 대조군보다 56% 증가시켰다(p<0.001, Fig. 3).

5,10-Methylene-THF reductase는 5,10-methylene-

THF를 5-methyl-THF로 환원시키는 효소이므로 이 효소 활성도의 증가는 5-methyl-THF의 축적을 가져오게 된다. 이와같이 5-methyl-THF가 증가되면 DNA 합성 및 아미노산의 상호전환과 대사과정에서 기능을 갖는 THF를 비롯하여 다른 비메틸형 엽산 조효소들이 부족해져서 이들 단일탄소기 대사과정에 손상을 가져오게 되며, 체내 엽산 저장량의 저하를 가져오게 된다. 또한, THF의 비율이 감소되면 간조직내에서 히스티딘 분자의 고리구조내 2번 탄소를 CO₂로 분해하는 속도가 저하되므로 소변내 Figlu 배설량이 증가되는 것으로 알려져 있다.

5. 혈장 호모시스테인 농도

실험동물에게 에탄올 급여 및 β-carotene 대체급여를 실시하였을 때 혈장 호모시스테인 농도가 증가되었다(각각 p<0.01, p<0.001, Fig. 4). 이때, 혈장 호모시스테인 농도는 간조직내 엽산 농도와는 직접적인 관계가 없었으며 혈장내 엽산 농도와 반대 경향성을 나타냈다(Fig. 4, Table 2).

유전적으로 5,10-methylene-THF reductase의 다형성(polymorphism)을 나타내는 사람들 가운데 돌연변이성 동형접합체(homozygote)의 혈장 호모시스테인 농도는 정상형질의 동형접합체 또는 이형접합체(heterozygote)와 비교할 때 유의적으로 높았다.³⁰ 그러나, 본 연구에서는 정상보다 높은 5,10-methylene-THF reductase 활성을 나타내는 동물의 혈장 호모시스테인 농도가 대조군보다 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 3, 4). 따라서, 5,10-methylene-THF reductase의 활성이 비정상적으로 낮은 경우³⁰ 뿐만

Table 3. Effect of dietary β-carotene substitution for vitamin A and chronic ethanol consumption on tissue vitamin A concentration in rats¹⁾

Diet ²⁾	Plasma		Liver	
	Retinol(μg/ml)	Retinol(μg/g)	Retinyl palmitate(μg/g)	
1	3.38±0.27 ^{ab}	9.74±1.95 ^b	426.72±25.32 ^a	
2	2.77±0.47 ^b	12.99±5.76 ^a	333.07±31.69 ^b	
3	3.14±0.41 ^{ab}	10.46±1.65 ^{ab}	295.59±65.46 ^b	
4	2.84±0.19 ^b	12.24±3.04 ^a	214.52±38.23 ^c	

- 1) Mean±standard deviation(n=8)
- 2) Diet 1(control), Diet 2(ethanol-fed), Diet 3(β-carotene-substituted), Diet 4(ethanol-fed plus β-carotene-substituted)
- 3) Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple-range test

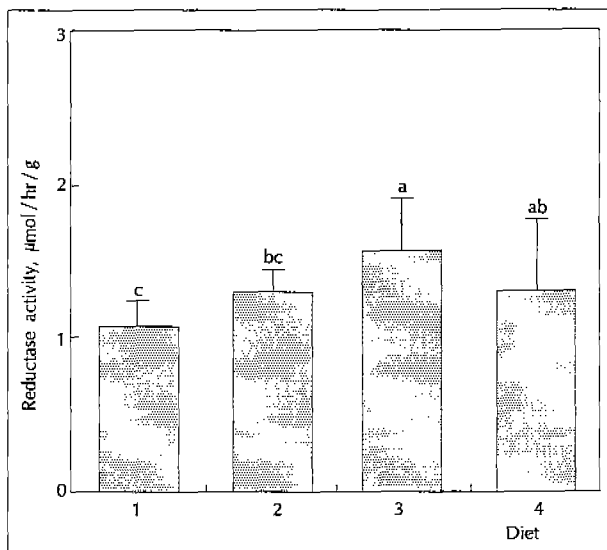


Fig. 3. Effect of dietary β-carotene substitution for vitamin A and chronic consumption of ethanol on hepatic 5,10-methylene-THF reductase activity. Values with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple-range test.

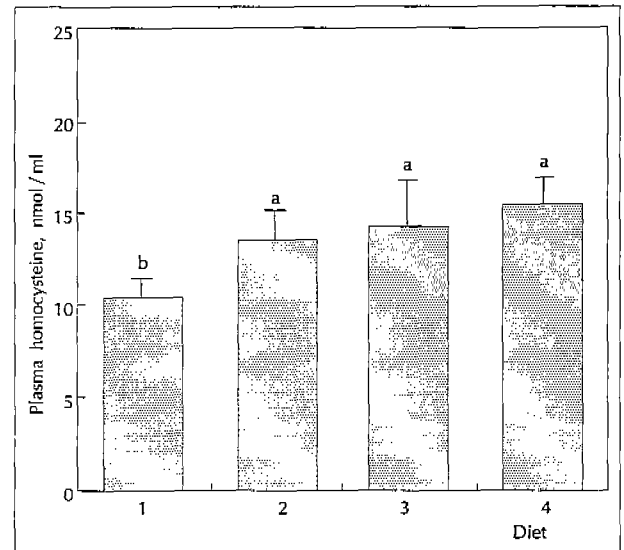


Fig. 4. Effect of dietary β-carotene substitution for vitamin A and chronic ethanol consumption on plasma homocysteine levels in rats. Values with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple-range test.

아니라, 본 연구에서와 같이 활성도가 비정상적으로 높은 경우에도 혈장 호모시스테인의 농도가 증가되며, 이는 5, 10-methylene-THF reductase 활성 증가로 인해 단일 탄소기 대사과정이 저해되기 때문인 것으로 보인다.

최근 엽산과 과호모시스테인혈증과의 관계³⁷⁻³⁹가 밝혀짐에 따라 이에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다. 메치오닌이나 엽산 또는 비타민 B₁₂ 대사과정에 선천적 결함을 지닌 환자들에게서 호모시스테인혈증 및 호모시스테인뇨 증세가 나타나는 것으로 알려져 있다.^{40,41} 그러나, 혈관계 질환자들 가운데에는 호모시스테인뇨 증세는 나타나지 않고 경미한 호모시스테인혈증만 나타나는 경우도 빈번하다.^{42,43} 또한, 비타민 B₁₂, 엽산 또는 비타민 B₆ 결핍이 호모시스테인혈증과 밀접한 상관관계가 있는 것으로 조사되었다.^{37,38} 혈청 엽산 수준이 한계결핍상태 또는 결핍상태인 사람들의 약 30% 이상이 비정상적으로 혈장 호모시스테인 농도가 높은 것으로 나타나 혈중 엽산농도와 과호모시스테인혈증 사이에 뚜렷한 상관관계를 보였으며, 만성적인 에탄올 섭취자들의 혈장 호모시스테인 농도가 대조군보다 두배 높은 것으로 나타났다.³⁷

호모시스테인혈증은 관상동맥경화증의 원인 인자로서, 혈중 low density lipoprotein(LDL) 농도가 낮아도 혈장의 호모시스테인 농도가 높을 때 관상동맥경화증이 나타날 수 있기 때문에 LDL의 농도와는 독립적으로 관상동맥성 질병에 영향을 미치는 요인으로 알려져 있다.⁴⁴ 또한, 엽산 결핍시 발병율이 크게 증가되는 것으로 알려져 있는 태아의 신경관 손상도 호모시스테인혈증에 의해 유발되는 것으로 보고되었으며, 관상동맥경화증 환자 혹은 급성 심근경색증 환자에게 엽산, 비타민 B₆, 또는 비타민 B₁₂를 보충·공급할 때 호모시스테인의 농도가 감소되어 호모시스테인혈증이 개선되었다.^{45,46}

결론적으로, 알코올의 만성적 급여 또는 β -carotene의 대체 급여가 소변내 엽산 배설량을 증가시키고, 엽산 대사에 관여하는 10-formyl-THF dehydrogenase 및 5,10-methylene-THF reductase의 효소 활성에 영향을 줌으로써 엽산 대사를 저하시키는 것으로 조사되었다. 이와같은 엽산 대사의 저하로 인해 흰쥐의 간조직내 단일 탄소기 대사과정이 손상되며, 이로 인해 과호모시스테인혈증이 유발되는 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 Sprague-Dawley종 흰쥐를 대상으로 에탄올 급여 및 β -carotene 대체 급여가 체내 엽산 영양상태,

소변내 엽산배설량, 엽산 대사에 관여하는 효소 활성도 및 혈장 호모시스테인 농도에 미치는 영향을 조사하여 단일 탄소기대사가 변화되는 원인을 조사하고자 하였다.

간과 적혈구의 엽산함량은 모든 실험군에서 정상범위를 나타냈으나, 에탄올 급여군에서 증가되었으며(각각 $p < 0.01$, $p < 0.01$) β -carotene 대체 급여에 의해서는 영향받지 않았다. 이들 조직내 엽산농도가 에탄올 급여에 의해 증가된 것은 세포내 엽산이 혈중으로 방출되는 과정이 에탄올 급여에 의해 저해되기 때문에 나타나는 단기적인 영향으로 보인다.

혈장 엽산농도는 에탄올급여에 의해 저하되었으나($p < 0.001$) β -carotene 대체 급여에 의해서는 변화되지 않았다. 따라서, 혈장내 엽산 농도는 에탄올 급여에 의해 조기에 저하되며, 간조직 및 적혈구의 엽산이 고갈되는 데에는 보다 장기간에 걸친 에탄올 급여가 필요한 것으로 보인다.

소변의 엽산배설량은 에탄올급여에 의해 크게 증가되었으나($p < 0.01$) β -carotene 대체 급여에 의한 뚜렷한 변화는 나타나지 않았다. 혈장 호모시스테인 농도는 에탄올 급여 및 β -carotene 대체 급여에 의해 증가되는 경향이였다(각각 $p < 0.01$, $p < 0.001$).

간조직내 5,10-methylene-THF reductase 활성도는 에탄올 급여에 의해서는 변화되지 않았으나 β -carotene 대체 급여에 의해 56% 증가되었으므로($p < 0.001$), β -carotene 대체 급여시 간조직내 비메틸 엽산 조효소의 수준을 낮추므로써 엽산대사 및 단일 탄소기 대사에 영향을 줄 수 있다. 혈장 호모시스테인의 농도는 5,10-methylene-THF reductase 활성이 과도하게 높은 동물에게서 유의적으로 증가되었으며, 이러한 결과는 지금까지 알려진 바와 달리 5,10-methylene-THF reductase 활성이 비정상적으로 낮을 경우 뿐 아니라 높을 경우에도 혈장 호모시스테인의 농도가 증가되는 것으로 조사되었다.

간조직내에서 히스티딘의 대사과정에 관여하는 10-formyl-THF dehydrogenase 활성도는 에탄올 급여($p < 0.001$) 및 β -carotene 대체 급여($p < 0.001$)에 의해 크게 저하되었으며, 이로 인해 간조직내 THF의 재생과정이 저하되며, 엽산 대사 및 단일 탄소기 대사과정에 영향을 주는 것으로 보인다.

이상의 결과로부터 에탄올 급여는 소변을 통한 엽산배설량을 증가시킬 뿐 아니라 10-formyl-THF dehydrogenase의 효소활성도를 변화시키므로써 엽산 대사 및 엽산 영양상태에 영향을 주는 것으로 사료된다. 또한, β -carotene 대체 급여시 엽산 대사에 관여하는 효소활성(5,10-methylene-THF reductase 및 10-formyl-THF dehydrogenase)에

영향을 주어 엽산 대사 및 단일 탄소기 대사과정에 영향을 주는 것으로 보인다.

Literature cited

- 1) Mohan PS, Rao KS. Sulfate metabolism in vitamin A-deficient rats. *J Nutr* 110 : 868-875, 1980
- 2) Deluca LM, Silverman-Jones CS, Barr RM. Biosynthetic studies on mannanolipids and mannoproteins of normal and vitamin A-depleted hamster livers. *Biochim Biophys Acta* 409 : 342-359, 1975
- 3) Deluca LM. The direct involvement of vitamin A in glycosyl transfer reactions of mammalian membranes. *Vitam Horm* 35 : 1-57, 1977
- 4) Sommer A, Kalz J, Tarwojto I. Increased risk of respiratory disease and diarrhea in children with preexisting mild vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr* 40 : 1090-1095, 1984
- 5) Barclay AJ, Foster A, Sommer A. Vitamin A supplements and mortality related to measles : A randomized clinical trial. *Brit Med J* 294 : 294-296, 1987
- 6) Fell A, Steele RD. The effects of vitamin A deficiency on hepatic folate metabolism in rats. *Arch Biochem Biophys* 240 : 843-850, 1985
- 7) Recommended Dietary Allowances for Koreans, 6th Revision, 1995
- 8) Wang XD, Tang GW, Fox JG, Krisnky NI, Russell RM. Enzymatic conversion of β -carotene into β -apocarotenals and retinoids by human, monkey, ferret and rat tissues. *Arch Biochem Biophys* 285 : 8-16, 1991
- 9) Goodman DS, Huang HS, Shiratori T. Mechanism of the biosynthesis of vitamin A from β -carotene to retinal. *J Biol Chem* 241 : 1929-1932, 1966
- 10) Goodman DS, Blomstrand R, Werner B, Huang HS, Shiratori T. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and β -carotene in man. *J Clin Invest* 45 : 1615-1623, 1966
- 11) Russell RM. Vitamin A and zinc metabolism in alcoholism. *Am J Clin Nutr* 33 : 2741-2749, 1980
- 12) Forman MR, Beecher GR, Lanza E, Reichman ME, Graubard BI, Campbell WS, Marr T, Yong LC, Judd JT, Taylor PR. Effect of alcohol consumption on plasma carotenoid concentrations in premenopausal women : A controlled dietary study. *Am J Clin Nutr* 62 : 131-135, 1995
- 13) Rimm E, Colditz G. Smoking, alcohol, and plasma levels of carotenes and vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 686 : 323-334, 1993
- 14) Herbert V, Zalusky R, Davidson CS. Correlation of folate deficiency with alcoholism and associated macrocytosis, anemia, and liver disease. *Ann Intern Med* 58 : 977-988, 1963
- 15) Halsted CH. Folate deficiency in alcoholism. *Am J Clin Nutr* 33 : 2736-2740, 1980
- 16) Eichner ER, Hillman RS. Effect of alcohol on serum folate level. *J Clin Invest* 52 : 584-591, 1973
- 17) Halsted CH. Alcoholism and malnutrition. Introduction to the symposium. *Am J Clin Nutr* 33 : 2705-2708, 1980
- 18) McMartin KE, Collins TD, Eisenga BH, Fortney T, Bates WR. Effects of chronic ethanol and diet treatment on urinary folate excretion and development of folate deficiency in the rats. *J Nutr* 119 : 1490-1497, 1989
- 19) McMartin KE, Collins TD, Bairnsfather L. Cumulative excess urinary excretion of folate in rats after repeated ethanol treatment. *J Nutr* 116 : 1316-1325, 1986
- 20) Im ES, Seo JS, Min HS. Effects of chronic ethanol feeding on folate metabolism and plasma homocysteine concentration in the rats. *Kor J Nutr* 31(6) : 1006-1013, 1998
- 21) Lieber CS, Decarli LM. The feeding of ethanol in liquid diets. *Exp Res* 10 : 550-553, 1986
- 22) Lieber CS, Decarli LM. Animal models of chronic ethanol toxicity. *Method Enz* 233 : 585-594, 1994
- 23) Bird OD, McGlohon VM, Vaitkus JW. A microbiological assay system for naturally occurring folate. *Can J Microbiol* 15 : 465-472, 1969
- 24) Min H, Kim CK. A study of blood folate levels in adolescent girls. *Korean J Nut* 28(11) : 104-111, 1996
- 25) Kutzbach C, Stokstad ELR. 10-Formyltetrahydrofolate : NADP oxidoreductase. *Methods Enzymol* 18B : 793-797, 1971
- 26) Kutzbach C, Stokstad ELR. Feedback inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase in rat liver s-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 139 : 217-220, 1967
- 27) Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by HPLC with fluorescence detection. *J Chromatogr* 422 : 43-52, 1987
- 28) Bieri JC, Tolliver TJ, Catilgnani GL. Simultaneous determination of tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *J Clin Nutr* 32 : 2143-2148, 1979
- 29) McMartin KE, Collins TD. Role of ethanol metabolism in the alcohol-induced increase in urinary folate excretion in rats. *Biochem Pharmacol* 32 : 2549-2555, 1983
- 30) Tamura T, Romer JJ, Watson JE, Gong EJ. Hepatic folate metabolism in the chronic alcoholic monkey. *J Lab Clin Med* 97 : 654-661, 1981
- 31) Horne DW, Briggs WT, Wagner C. Ethanol stimulates 5-methyltetrahydrofolate accumulation in isolated rat liver cells. *Biochem Pharmacol* 27 : 2069-2074, 1978
- 32) Wilkinson JA, Shane B. Folate metabolism in the ethanol-fed rat. *J Nutr* 112 : 604-609, 1982
- 33) Ross DM, McMartin KE. Effect of ethanol on folate binding by isolated rat renal brush border membranes. *Alcohol* 13(5) : 449-454, 1996
- 34) Min H. The effect of thyroxine status on hepatic levels of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *Kor J Nutr* 24(4) : 350-355, 1991
- 35) Kelly A, Reed B, Weir D, Scott J. Effect of acute and chronic alcohol ingestion on the rate of folate catabolism and hepatic enzyme induction in mice. *Clin Sci* 60 : 221-224, 1981
- 36) Ma J, Stampfer, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, Malinow MR, Willett WC, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 94 : 2410-2416, 1996
- 37) Kang SS, Wong PWK, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 36(5) : 458-462, 1987
- 38) Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 81 : 466-474, 1988
- 39) Lin JY, Kang SS, Zhou J, Wong PWK. Homocysteinemia in rats induced by folic acid deficiency. *Life Sci* 44 : 319-325, 1988
- 40) Carson NAJ, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 37 : 505-513, 1962
- 41) Mudd SH, Uhlendorf BW, Freeman JM, Finkelstein JD, Shih VE. Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 46 : 905-912, 1972
- 42) Brattrom LE, Hardebo JE, Hultberg BL. Moderate homocysteinemia-a possible risk factor for arteriosclerotic cerebrovascular disease. *Stroke* 14 : 1012-1016, 1984
- 43) Kang SS, Wong PWK, Cook HY, Norusis M, Messer JV. Protein-bound homocyst(e)ine. A possible risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 77 : 1482-1486, 1986
- 44) Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocysteinemia : An independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 324 : 1149-1155, 1991
- 45) Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube : Effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 15227-15232, 1996
- 46) Ubbink JB, Vermaak WJH, Merwe A, Becker PJ. Vitamin B₁₂, vitamin B₆, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 57 : 47-53, 1993