

나이에 따른 흰쥐의 혈액, 간, 뇌조직의 철분함량, 산화 스트레스 지표에 대한 비타민 C와 비타민 E공급의 역할*

황은희[§] · 김인숙^{**} · 이형자

원광대학교 생활과학대학 중앙대학교 기초과학연구소^{**}

The Role of Vitamin C and Vitamin E Supplementation on Iron Contents and Biomarkers of Oxidative Stress in Blood, Liver and Brain of Aging Rats*

Hwang, Eun Hee[§] · Kim, In Sook^{**} · Lee, Hyoung Ja

College of Human Environmental Sciences, Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea
Research Institute of Basal Science,^{**} Chung-ang University, Seoul 156-756, Korea

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effect of vitamin C and vitamin E supplementation on the iron contents and oxidative stress of the rats. Rats were fed 18g ascorbic acid and 300IU α -tocopherol/kg diet, respectively. Rats were sacrificed at 1, 3, 5 and 7 month of age. The blood, liver and brain were selected for the quantitation of iron and malondialdehyde(MDA) contents, glutathione peroxidase(GSHPx), superoxide dismutase(SOD) and catalase(CAT) activity. Iron and MDA contents and GSHPx activities were increased with aging. Vitamin C and Vitamin E supplementation increased iron contents of the plasma. Vitamin C raised iron contents, but vitamin E decreased iron contents of the liver. In the brain vitamin C and vitamin E did not affect the iron level. MDA levels were decreased with vitamin C and vitamin E supplementation in the erythrocyte and liver, and vitamin C supplementation elevated MDA levels in the brain. GSHPx activity was increased with vitamin C and vitamin E supplementation. SOD activities of erythrocyte and brain were not affected with age, but in the liver, SOD activity was raised with age and vitamin C supplementation. Vitamin C and vitamin E supplementation promoted CAT activity of erythrocyte and liver, and CAT activity of brain was elevated with vitamin C addition but was decreased with vitamin E addition. Vitamin C and vitamin E decreased iron contents of blood plasma, MDA contents of plasma and liver, and CAT activity of erythrocyte. Above results indicated that iron contents and biomarkers of oxidative stress were more affected by age than antioxidant action of vitamin C and vitamin E. (*Korean J Nutrition* 33(5) : 507~516, 2000)

KEY WORDS : iron contents, biomarkers of oxidative stress, vitamin C and vitamin E supplementation.

서 론

철(iron, Fe)은 우주와 지표에 다량 존재하는 무기질로 생물학적으로 대단히 유용한 영양소로서 상세하게 연구되고 이해가 잘 된 영양소중의 하나이며,¹⁾ 인체에서 철은 hem, 사이토크롬, 철함유 또는 철촉매 효소 등으로 산소운반 및 에너지대사에 필수적인 성분이다.²⁾

지금까지 철에 대한 영양적연구는 전세계적으로 성장기 아동 및 여성의 주된 부족영양소로서 주로 철결핍증에 대한 연구가 이루어져 왔고 이로 인한 질병의 예방과 치료를 목

채택일 2000년 6월 16일

*This research was supported by 1998 grants from Ju-San Foundation of Wonkwang University.

[§]To whom correspondence should be addressed.

적으로 식품에 철분의 강화, 철분 보충제가 권장되었다.³⁾ 최근에는 만성 퇴행성 질환 유병율과 사망률이 증가하고 이러한 질환이 식사패턴과 관련이 깊다는 사실이 밝혀지면서 영양과잉이 영양결핍 못지 않게 중요한 문제로 대두하고 있다.⁴⁾ 최근 10년간 영양소로서 철의 연구에 중요한 변화는 과잉에 대한 관심이 증가하고 있는 것이다.

병적인 철과잉증은 혈색소증(hemochromatosis), 철침착증(siderosis), 지중해성 빈혈(thalassemia), 재생불량성 빈혈 등과 같이 선천적으로 철분의 흡수율이 크거나, 요리 기구 등에서 기인된 철분이 많이 들어 있는 식사를 한 경우, 빈혈로 인해 다량의 철분을 지속적으로 공급받는 경우 여분의 철이 부수적으로 체내에 축적된 것이다.⁵⁾ 생체에서 과량의 철분은 다른 무기질의 이용율을 떨어뜨리는데 이에 관한 연구가 많다.⁶⁾ 특히 근래에는 철의 과잉섭취가 조직에 철

저장을 증가시키므로서 지질 과산화 등을 촉진시키고,⁷⁰⁾ 세포손상을 초래하여 허혈성 심장병,¹¹¹⁾ 뇌질환,¹³⁻¹⁶⁾ 암의 위험요소¹⁷⁾ 노화의 원인¹⁹⁻²¹⁾으로 인식되고 있다.

인체의 노화의 원인에 대해서는 여러 가지 이론들이 있는데²²⁾ 이중 한가지는 산화스트레스 이론으로 자유기가 매개하는 산화적 위해와, 그에 대항하는 항산화적 보호 현상의 균형이 깨어짐으로써 산화반응이 증가하여 노화를 일으키는 것이다.²³⁾ 산화적 스트레스의 일반적인 유형은 지질과산화반응으로 이 반응은 급속하며 연쇄적이고 그 대사 부산물의 독성 때문에 산화스트레스의 첫 번째 지표로 지목되고 있다. 철은 잠재적 산화제 전구물질이고 지질과산화 반응의 촉매로 작용하며 나이가 증가함에 따라 철의 세포내로의 유입과 분비조절이 이루어지지 않아 조직에 과량 축적된 철이 지질과산화 반응의 원인인 자유기를 제공한다고 한다.²³⁾

비타민C는 식품의 페리틴 철로부터 철의 환원을 도와 흡수를 촉진하고 페리틴으로부터 Fe의 유리를 촉진함으로써 유용성을 높이는 것으로 알려져 있다.²⁴⁻²⁷⁾ 비타민 E는 그 구조를 이루는 크로마놀(chromanol)고리가 쉽게 전자를 흡수하거나, 수소를 제공함으로써 반응성이 높은 여러 자유기를 불활성화시키는 지용성 항산화제로서 지질의 과산화 반응을 낮추어 노화를 방지한다.²⁸⁻³⁰⁾

따라서 본 연구에서는 철의 유용성을 높이는 비타민 C와 지질의 과산화반응을 억제하는 비타민 E가 체내 조직의 철분 함량과 지질과산화 반응을 포함하는 산화스트레스에 미치는 영향을 알아보기 위하여 일반사료에 비타민 C와 비타민 E를 각각 사료 1kg당 18g과, 300IU를 첨가하여 흰쥐를 7개월동안 사육하면서 각 실험군에서 2개월마다 7마리씩 희생시켜 혈액과 간, 뇌조직의 철분함량과 지질과산화 반응의 지표로 malondialdehyde(MDA)함량을, 산화스트레스의 지표로 glutathion peroxidase(GSHPx), superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT)의 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 동물사육 및 실험사료

생후3주된 Sprague Dawley계 흰쥐 수컷을 1주일간 고형배합사료(Ralston-Purina, USA)로 적응시킨 뒤 출생 1개월부터 7개월까지 6개월간을 실험사육기간으로 하였다.

실험군은 정상식이군, 비타민 C 공급군, 비타민 E 공급군으로 나누어 정상식이군은 일반사료로, 비타민 C 공급군은 ascorbic acid(Sigma, USA)을 일반사료 1kg당 18g, 비타민 E 공급군은 α -tocopherol(Sigma, USA)을 일반사료 1kg당 300IU 첨가하였다. 일반사료의 식이조성은 Table 1

과 같다. 사료는 산화를 방지하기위하여 1개월 간격으로 교체하여 -20℃에 보관하면서 물과 함께 자유로 공급하였고, 체중은 1주일 간격으로, 사료섭취량은 1주일에 3회 측정하였다.

2. 시료채취

각 실험군을 30마리씩 7개월간 사육하면서 2개월마다 즉 1개월, 3개월, 5개월 사육후 각각 7마리씩, 7개월사육후에는 9마리씩 희생시켜 혈액과 조직을 얻었다. 실험동물은 희생시키기 전 18시간동안 절식시킨 다음 ethyl ether로 약하게 마취시킨 상태에서 개복한 후 EDTA를 항응고제로 넣고 심장천자하여 채혈하였다. 3,000rpm에서 15분간 냉장 원심분리하여 혈장과 혈구로 분류하고, 아래층의 적혈구는 saline-phosphate buffer로 3,000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하는 세척과정을 2차례 반복하여 세척된 적혈구를 얻었다. 이적혈구와 0.9% NaCl용액의 부피가 1:1이 되도록 희석하여 -70℃에서 분석시까지 냉동 보관하였다.

간과 전뇌는 적출하여 부착되어 있는 근육, 지방, 인대를 제거하고 약 0.8~1.3g의 조직을 떼어 4℃로 유지하여 잘게 분쇄하고, pH 7.4의 sodium potassium phosphate용액에 여러 번 행구어 물기를 닦은 후 균질화 시켰다. 이 균질화된 분획을 단백질, Hb함량, MDA함량, GSH-Px, SOD, CAT활성측정에 사용하였다.

간과 뇌조직의 단백질 정량은 소혈청 알부민을 표준물질로하여 Bradford 방법으로 측정하였다.³¹⁾

3. 시료분석

1) 헤모글로빈(Hb)농도

전혈의 Hb농도는 cyanomethemoglobin법을 이용하였으며, 조직의 Hb함량은 Drabkin's³²⁾ 시약을 사용하였다. 이 시약은 200mg $K_2Fe(CN)_6$, 50mg KCl, 140mg KH_2PO_4 를 증류수에 녹여 900ml로 만든 것이다. Hb에 있는 Fe^{+2} ,

Table 1. Nutritional composition of the basal diet¹⁾

Nutrient	g/kg diet
Corn starch	554
Sucrose	90
Casein	200
Corn oil	50
Crude fiber	50
Mineral mixture ²⁾	40
Vitamin mixture ³⁾	10
DL-Methionine	5
Choline chloride	1

1) Ralston-Purina(U.S.A) 2) AIN-76(Harlen, Madison, USA)

3) ICN Biochemicals(Cleveland, USA)

산화 헤모글로빈, 카아복시 Hb은 ferro cyanide에 의해 Fe⁺³로 산화되어 Met Hb를 만든다. 이 Met Hb는 이온화한 cyanide와 결합하여 안정한 붉은색의 cyan-met Hb를 만듦으로 이를 분광광도계 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 중 철분함량

간과 뇌조직 시료의 총 철분 함량 측정은 복합철을 유리시키는 전처리 방법에 따랐다. 표준 철분 용액은 10.25mg ferrous ethylenediammonium sulfate(Sigma Chem. Co. USA)를 0.01N HCl 250ml에 녹여서 사용하였다.³⁰⁾ 1.2N HCl 100ml와 4.5% KMnO₄(0.285Mole) 100ml를 분해실에서 천천히 섞어 시약 A를 만들었다. 시약 B는 9.7g ammonium acetate와 8.8g ascorbate를 증류수 15ml에 녹였다. 이 혼합용액에 80mg ferrozine과 80mg의 neocuprine을 첨가하여 증류수로 25ml가 되게 하였다. 이것은 최종 5M ammonium sulfate, 2M ascorbate, 6.5mM ferrozine, 13.1mM neocuprine의 용액이다.

15ml polystyrene 시험관에 넣은 조직 시료(3.5mg 단백질)에 500μl 시약 A를 넣고 분해조작을 하였다. 시험관의 뚜껑을 닫아 조직의 분해를 완전하게 하고 철을 유리시키기 위하여 60°C에서 2시간동안 보통정도의 교반을 하였다. 시험관을 찬물에 15~20분 동안 식힌 후 100μl 시약 B를 넣어 실온에서 30분간 방치하였다. 1ml를 1.5ml의 작은 시험관에 옮겨 1000g에서 10분간 원심분리 하여 투명한 보라색-지주색의 상등액을 분광광도계 562nm에서 측정하여 철분함량을 계산하였고 철분은 ng/mg 단백질로 표시하였다.

3) 지질 과산화물의 측정

시료의 지질과산화물은 malondialdehyde(MDA)분석 Kit(LPO-586, Oxis International Inc, USA)를 사용하였다. 이 방법의 원리는 발색시약인 N-methyl-2-phenyl-indole의 반응에 기초한 것이다.³¹⁾ 생성물은 최대 586nm에서 최대 흡광도를 갖으며, 시료에 있는 MDA의 상대적 비율은 표준물질로 MDA(Sigma Co, USA)를 사용하여 구하였고 nM/μg protein으로 표시하였다.

4) Glutathione peroxidase(GSHPx), Superoxide dismutase(SOD), Catalase(CAT)의 활성도 측정

적혈구의 GSHPx 활성은 Paglia와 Valentine 방법으로³²⁾ 측정하였고, 간과 뇌조직의 GSHPx활성은 Flohe의³⁰⁾ 방법을 이용하였다. GSHPx는 H₂O₂와 환원형 glutathione(GSH)과 반응하여 산화형 glutathione(GSSG)을 생성하고 이 GSSG는 glutathione reductase의 도움으로 NADPH에 의해 다시 GSH로 환원되는 원리를 이용한 것으로 GSHPx

의 활성은 매분당 산화된 NADPH의 nmole로 나타내었다. 적혈구의 SOD활성은 Flohe 등의 방법³³⁾으로 측정하였다. 이 방법은 xanthine이 xanthine oxidase에 의해 superoxide를 생성하고 이 superoxide가 ferric cytochrome C(Fe⁺³)를 ferrous cytochrome C(Fe⁺²)로 환원시키는데 이때 SOD가 존재하면 superoxide에 대해 경쟁하여 cytochrome C의 환원속도가 감소된다는 원리를 이용한 것이다. 본 실험에서는 ferric cytochrome C의 환원이 방해되는 정도를 550nm에서 30초 간격으로 3분간 비색정량한 후 ferric cytochrome C의 환원을 50%방해하는 SOD의 양을 1unit로 하여 분당 활성도로 나타내었다. 간과 뇌조직의 SOD 활성은 효소원을 제조한 후 적혈구에서와 동일한 방법으로 측정하였다.

적혈구의 CAT 활성은 Johnsson과 Hakan Borgbom³⁴⁾에 의하여 분광광도계 550nm에서 흡광도를 측정한 후 formaldehyde를 표준용액으로 하여 얻은 표준곡선으로부터 활성을 계산 하였다. 간과 뇌조직의 CAT 활성은 각조직 0.2g을 20배의 25mM KH₂PO₄-NaOH buffer(pH7.0)에 넣고 균질화 시킨 후 같은 buffer로 60배 희석한 후 ice bath에서 초음파분쇄기(Heat system-Ultrasonics Inc. W-385)로 15초씩 2회 반복하여 분해한 후 적혈구와 같은 방법으로 활성을 측정하였다.

5) 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 평균치와 표준오차를 구하였고 Duncan's multiple range test에 의하여 α = 0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 토의

1. 실험동물의 체중과 사료섭취량

실험동물의 하루평균 사료섭취량, 실험기간 동안의 체중 증가량과 이들로부터 계산된 식이효율을 Table 2에 정리하였고, 실험기간 동안의 실험동물의 체중변화는 Fig 1에 나타내었다.

정상식이군, 비타민 C첨가군, 비타민 E첨가군 모두에서 사료섭취량, 체중증가에 유의적 차이가 없었다. 본실험에서 사료이용효율이 다른 연구들에 비하여 낮은 것은 장기간 사육한 때문으로 생각된다. 흰쥐에서 비타민 C는 합성되는데 본실험에 사용한 비타민 C는 사료 1kg당 18g으로 ICN (ICN Biochemicals, USA)에서 제시한 0.45g/10g vitamin mixture/kg diet의 40배가량이다. 안 등³⁵⁾의 실험에서는 흰쥐에 비타민 C를 사료 kg당 24g 첨가하였을 때 체

Table 2. Food intake, body weight gain and food efficiency ratio(FER)

Group	Food intake	Body weight(g)		Body weight gain(g)	FER
	(g/day)	initial (n = 90)	final (n = 27)	(g/6month) (n = 27)	
Normal diet	*19.6 ± 4.3	95.2 ± 3.3	525.0 ± 23.2	429.8 ± 27.8	0.12
Vit C diet	20.3 ± 5.0	94.8 ± 4.6	497.7 ± 24.0	405.0 ± 24.2	0.11
Vit E diet	21.8 ± 5.2	95.5 ± 3.8	518.3 ± 17.9	420.3 ± 29.9	0.14

*Mean ± Standard error

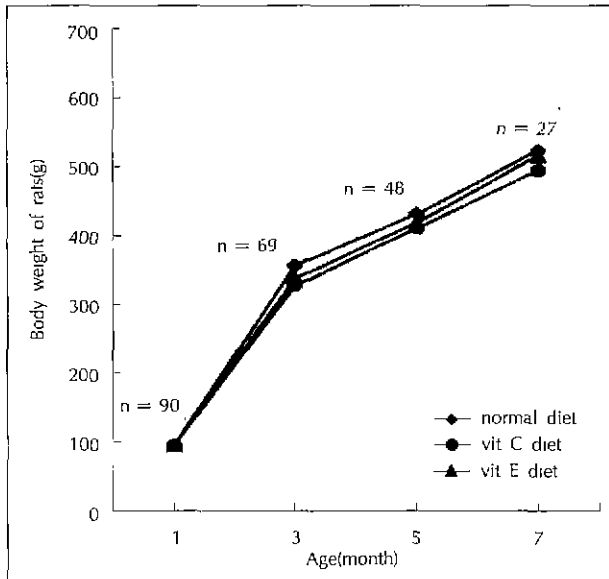


Fig. 1. Body weight of rats fed diet containing vitamin C and vitamin E supplementation during experimental periods

중에 유의적 차이가 없었고, 이 등⁴⁰⁾은 4주동안 흰쥐에 비타민 C를 하루에 체중 100g당 300mg 경구투여 한 경우 비타민 C공급군의 체중 증가량은 낮고 식이섭취량은 차이가 없었다고 보고하였다. Barja 등⁴¹⁾도 guinea pig에게 최소필요량의 40배의 비타민 C를 사료에 혼합 공급하였을 때 체중증가가 감소되었다는 결과를 보고하였다. 그러나 흰쥐에게 체중100g당 100mg의 비타민 C를 6~20주까지 경구 투여했을때도 체중 증가 및 사료섭취량에 전혀 영향이 없었다는 상반된 보고도 있어⁴²⁾ 이러한 차이는 비타민 C공급량, 사료 등 실험조건이 다르기 때문으로 사료된다.

2. Hb함량

나이 및 실험군에 따른 흰쥐의 혈액, 간, 뇌조직의 Hb함량은 Table 3과 같다.

혈액의 헤모글로빈 수준은 실험군간에 차이가 없었다. 이³⁾ 전 등⁹⁾의 보고에서는 식이 칼슘과 철, 셀레니움 수준이 Hb함량에 영향을 미쳤는데 본 실험에서 비타민 C와 비타민 E는 혈액의 Hb함량에 영향을 미치지 않았다.

간조직의 Hb량은 정상식이군과 비타민 E 첨가군이 나이

가 증가함에 따라 많이 졌다. 비타민 E첨가군의 간 Hb량이 다른 두군에 비해 높았으며 사육기간이 경과함에 따라 비타민 C첨가군도 높아져 비타민 C와 비타민 E가 흰쥐의 간의 Hb량을 증가시켰음을 알 수 있었다.

뇌조직의 Hb량은 나이가 증가함에 따라 비타민 C와 비타민 E 첨가군에서 높아졌는데 비타민 E 첨가군만이 유의성이 있었다.

비타민 C는 철을 환원형태로 유지시켜 주므로 철의 흡수율을 촉진하는데 흰쥐의 비타민 필요량의 40배량을 첨가한 본 실험에서 간조직과 뇌조직의 Hb량을 증가시켰다. 특히 비타민 E첨가군의 간과 뇌조직의 Hb량이 정상식이군, 비타민 C 첨가군보다 많았다 Cook 등⁴³⁾은 정상식이의 60%만을 공급하는 식이제한으로 2년동안 사육시킨 흰쥐에서 간과 뇌조직의 Hb량이 나이에 따른 유의성이 없었다고 보고하였는데 본 실험의 비타민 C와 비타민 E 공급은 조직 Hb에 영향을 줌을 알 수 있었다.

3. 혈장 및 조직의 철분함량

혈장 및 간, 뇌조직의 철분함량은 Table 4와 같다.

혈장의 철함량은 249.5 ± 14.8~492.1 ± 30.2µg/dl로서 세군 모두에서 나이증가에 따라 많아졌으며 사육 3개월후부터 비타민 C와 비타민 E 첨가군이 정상식이군보다 높았다.

간조직의 철함량은 475.0 ± 29.2~707.8 ± 25.3ng/mg protein으로서 세군 모두 나이가 많아질수록 증가하였으며 7개월 사육후에는 정상식이군에 비하여 비타민 C 첨가군은 높았고, 비타민 E 첨가군은 낮았다.

뇌조직의 철함량은 292.8 ± 24.5~360.9 ± 31.2ng/mg protein으로서 나이증가에 따라 증가 경향이었으나 유의성은 없었으며 실험군별 유의적인 차이도 보이지 않았다.

Table 3에 정리된 혈액, 간, 뇌조직의 Hb 함량을 총철분함량으로 환산하여 Table 4의 혈액, 간, 뇌조직의 총철분함량과 비교한 결과, 그 비율이 0.02%미만이기 때문에 혈액에 의한 Hb함량이 조직의 총 철분함량에 미치는 영향은 무시해도 좋다고 생각된다.

Sharma 등⁴⁴⁾은 0~240일간 사육한 흰쥐에서 간의 총 철

Table 3. Blood, liver and brain Hb levels of rats fed diet containing vitamin C and vitamin E supplementation

Group	Age(month)			
	1 (n = 7)	3 (n = 7)	5 (n = 7)	7 (n = 9)
food(g/dl)				
Normal diet	14.0 ± 0.6	12.9 ± 0.5	13.5 ± 0.6	12.4 ± 0.8
Vit C diet	14.7 ± 0.4	13.9 ± 0.7	14.0 ± 0.1	13.6 ± 0.9
Vit E diet	13.8 ± 0.8	14.6 ± 1.2	15.3 ± 0.9	14.9 ± 1.0
Liver(ng/mg protein)				
Normal diet	12.3 ± 3.3	11.9 ± 2.5	12.2 ± 2.8	14.7 ± 3.2*
Vit C diet	11.0 ± 2.6	11.7 ± 2.9	13.4 ± 3.1	12.7 ± 4.5
Vit E diet	12.4 ± 3.9	14.3 ± 3.8	14.8 ± 4.2	16.8 ± 3.2**
Brain(ng/mg protein)				
Normal diet	7.34 ± 0.53	7.58 ± 0.69	6.90 ± 0.81 ^b	6.23 ± 0.01 ^c
Vit C diet	6.77 ± 0.79	8.02 ± 0.54	7.84 ± 0.62 ^b	8.18 ± 1.30 ^b
Vit E diet	7.70 ± 0.55	8.93 ± 0.77	9.37 ± 0.72 ^b	9.45 ± 1.79 ^{a*}

*, ** : Significantly different at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ during experimental periods in the same diet group
a,b value indicate significantly different among the groups in the same period

Table 4. Iron content of plasma, liver and brain of rat fed diet containing vitamin C and vitamin E supplementation

Group	Age(month)			
	1 (n = 7)	3 (n = 7)	5 (n = 7)	7 (n = 9)
plasma(μ g/dl)				
Normal diet	259.7 ± 8.7	298.5 ± 17.2 ^b	360.8 ± 10.9 ^b	411.4 ± 27.2 ^{b*}
Vit C diet	249.5 ± 14.8	358.8 ± 19.2 ^a	439.5 ± 15.4 ^a	492.1 ± 30.2 ^{a**}
Vit E diet	263.8 ± 13.6	382.3 ± 18.5 ^a	442.0 ± 9.3 ^a	487.8 ± 20.3 ^{a**}
liver(ng/mg protein)				
Normal diet	475.8 ± 29.2	578.3 ± 40.1	650.0 ± 28.3	670.7 ± 15.1 ^{b*}
Vit C diet	481.1 ± 25.8	542.2 ± 29.3	672.2 ± 34.4	707.7 ± 25.3 ^{a**}
Vit E diet	485.2 ± 38.9	513.8 ± 32.9	625.6 ± 28.1	642.9 ± 24.1 ^{c*}
Brain(ng/mg protein)				
Normal diet	299.3 ± 27.8	331.9 ± 29.0	340.5 ± 38.9	347.6 ± 20.1
Vit C diet	292.8 ± 24.5	348.0 ± 25.7	322.7 ± 32.8	360.9 ± 31.2
Vit E diet	311.4 ± 30.2	320.8 ± 15.9	325.2 ± 29.6	342.8 ± 16.7

*, ** : Significantly different at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ during experimental periods in the same diet group
a,b value indicate significantly different among the groups in same period

분함량은 60~240일 동안에는 변화가 없었고, 뇌조직의 철분함량은 눈에 띄는 축적이 없었다고 보고하였다 이에 반해 Massie 등은 C57BL/6J 수컷생쥐에서 출생 45일에서 900일까지 간, 신장, 뇌조직의 철분함량의 변화를 보고하였다. 간의 철분함량이 216%, 신장이 54%, 뇌가 27%까지 증가하였고, 신장과 간에서는 355일이 지나서야 철분함량이 증가하고 이후에 간의 철분함량이 140%, 신장은 44% 더 증가함으로써 나이증가에 따라 철분축적이 관련되어있음을 제시하였다. 나이에 따른 철분축적 현상을 지지하는 다른 연구는 Ghoro 등²¹⁾에 의해서 이루어졌는데 나이는 사람과 흰쥐의 폐에서 비헴철(Fe^{3+})의 증가를 관찰하였다. 본 실험에서는 나이증가에 따른 조직의 철분함량에 미치는 영

향은 조직특이성이 있으며, 나이가 조직의 철분 함상성에 영향을 준다는 것을 제시하고 있다. 이 사실은 철분이 잠재적 산화제 전구물질이고 자유기 반응의 촉매로서 철분의 산화적 스트레스가 노화과정의 중심원리로 인식되기 때문에 중요하다.

철의 특성은 Fe^{+2} 와 Fe^{+3} 두 가지 상태로 존재 할 수 있는 성질로부터 유래되어 산화환원 반응에 전자를 매개한 촉매 역할을 한다. 건강인에서 비타민 C는 철의 흡수를 증가시키고, chelator 철 pool을 증가시키며 lysosomal protease를 억제하거나²⁶⁾ lysosomal autophagy를 줄임으로서²⁷⁾ 페리틴의 리소좀에 의한 분해를 지연시켜 철저장을 증가시킨다고 한다. 체내에서 철대사의 조절이 안되는 경우 또는 유전

적 철과잉환자에게 비타민 C의 과량공급은 높은 철저장을 유발하여 철독성을 증가시키거나 죽음에 이르게하기도 한다.²⁴⁾

페리틴은 분자량이 약 500,000dalton, 바깥직경 12~13 nm, 내경 7~8nm의 속이 비어있는 단백질 껍질모양으로서, 24 subunit protein으로 구성되어 있는 무기복합체이며 1분자당 4500개의 철(Fe^{3+})을 저장 할 수 있는데^{46,47)} 비타민 C는 페리틴 단백질의 중심에 있는 철을 표면쪽으로 이동시키면서 Fe^{+3} 을 Fe^{+2} 로 바꾸거나 유리된 철을 헤모시테린으로 전환시킴으로써 헤모시테린의 양을 증가시켰다는 보고도 있다.²⁴⁾ 또한 과량의 비타민 C는 산화제로 작용하기도 하여 페리틴 분자의 내부에 수많은 자유기들을 발생시키고 이 경우 항산화제나 철결합 단백질에 의해 적절히 조절되지 않으면 지방산이나 단백질, 핵산과 같은 세포구성물에 손상을 줄 수 있다²⁵⁾고 한다.

본 실험에서 총철분함량이 혈액에서는 비타민 C와 비타민 E 첨가군에서, 간조직에서는 비타민C 첨가군에서 높았고 비타민E 첨가는 간조직의 총철분함량을 감소시키고, 뇌조직에서는 두항산화비타민에 대한 영향이 없었다. 비타민 C와 비타민 E가 체내 철분대사에 미치는 영향에 대한 연구는 유리철, 트랜스페린, 페리틴, 헤모시테린을 분리 측정함으로써 가능하리라고 생각된다.

철과 비타민 C와의 관계에서 가장 중요한 문제는 비타민 C 부족은 철결핍을 일으킬 수 있고, 과잉의 비타민 C는 철의 독성을 나타낼 수 있는 것이다. 그런데 보통의 철과잉 환자는 철이 비타민 C를 산화시키기 때문에 비타민C 부족이 되는데 이 경우 철의 독성을 일으키지 않으면서 철의 유용

성을 높이는 비타민C의 필요량의 설정이 필요하다. 또한 철분영양제를 이용할 때 철의 과잉섭취로부터의 위험성을 줄이고 철의 이용성을 높이기 위하여 1주일에 한번씩 철분 영양제를 복용하는 주(週) 단위 철분보충방식이 효과적이라는 보고⁴⁸⁾도 있어 성인기이후 빈혈예방 및 치료에 사용하는 철분영양제의 이용에서 철의 산화반응에 대한 주의가 필요하며 이에 대한 연구가 절실하다고 생각된다.

4. 지질과산화물 함량

혈장과 간, 뇌조직의 MDA 함량은 table 5에 나타내었다.

혈장의 MDA함량은 $12.8 \pm 8.0 \sim 73.7 \pm 18.1$ nmole/ml plasma, 간조직은 $3.23 \pm 0.72 \sim 9.19 \pm 0.9$ ng/mg protein, 뇌조직은 $4.23 \pm 2.9 \sim 15.7 \pm 1.8$ ng/protein 으로 혈장, 간, 뇌조직 모두에서 나이가 증가할수록 MDA양이 많아졌으며 혈장의 MDA가 나이의 영향을 가장 많이 받았다. 혈액과 간조직에서는 비타민C와 비타민 E 첨가군의 MDA가 정상식이군에 비하여 낮았고 비타민 E첨가에 의한 MDA감소효과가 더 컸다. 그러나 뇌조직에서는 나이가 많아짐에 따라 비타민 C 첨가군의 MDA 함량이 정상사료군, 비타민 E첨가군보다 높아졌다. Cook 등⁴⁹⁾은 식이제한에서 혈액의 지질 과산화물이 적어지고 나이가 증가할수록 MDA량이 많아졌다고 보고하였고, 박 등⁴⁰⁾의 연구에서는 비타민 C첨가가 지질과산화물을 감소시켰고, 강 등⁵⁰⁾도 당뇨쥐에서 항산화 비타민 섭취 후 지질과산화물이 감소한 것은 항산화 비타민의 효과라고 하였다. 본연구에서 뇌조직에서 비타민 C첨가군의 MDA가 증가한 것은 비타민C의 효과가 조직에 따라 다르게 영향을 미치는 것으로 생각된다. 한편 Andorn

Table 5. MDA contents of plasma, liver and brain of rat fed diet containing vitamin C and vitamin E supplementation

Group	Age(month)			
	1 (n = 7)	3 (n = 7)	5 (n = 7)	7 (n = 9)
Plasma(nmole/ml)				
Normal diet	12.8 ± 8.0	35.9 ± 7.8	53.7 ± 12.9	73.7 ± 18.1***
Vit C diet	16.9 ± 7.4	25.0 ± 9.2	42.4 ± 13.9	68.2 ± 26.9**
Vit E diet	18.2 ± 9.3	26.1 ± 10.2	38.8 ± 12.8	2.5 ± 18.2*
liver(ng/mg protein)				
Normal diet	3.23 ± 0.72	5.62 ± 0.71	7.63 ± 1.26	9.19 ± 0.96**
Vit C diet	3.51 ± 0.93	5.88 ± 1.35	6.11 ± 1.67	7.22 ± 1.82**
Vit E diet	3.36 ± 0.82	4.24 ± 2.17	5.52 ± 1.83	5.16 ± 1.77
brain(ng/mg protein)				
Normal diet	4.93 ± 1.90	7.92 ± 1.68	8.21 ± 1.62	12.2 ± 2.09**
Vit C diet	5.13 ± 1.28	6.82 ± 1.50	9.61 ± 1.27	15.7 ± 1.86**
Vit E diet	4.72 ± 2.95	4.24 ± 2.17	5.77 ± 1.84	7.32 ± 1.73*

*, **, *** : Significantly different at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ during experimental periods in the same diet group
a,b value indicate significantly different among the groups in same period

등⁴⁸⁾에 의하면 정상 또는 내과적, 신경학적 병력이 없는 사람의 갑작스런 사고나 심근질환으로 사망한 60세이하의 정상적인 사람의 부검시에 뇌의 내부에서 조직을 채취하여 행한 연구에서 비타민 C의 첨가는 지질과산화물을 6배로 증가시켰고 이 경우 지질과산화는 H₂O₂·OH·기와는 무관하고 철과 O₂에 의존함을 밝혀냈다.

비타민 C는 수용성이고 비타민 E는 지용성이므로 독립적으로 작용하는 것처럼보이나 박 등⁴⁹⁾은 비타민 C가 비타민 E의 재생을 도와 서로의 요구량에 영향을 미친다고 하였으며, Girotti⁵⁰⁾는 아스코르빈산염 음이온은 알파토코페롤 자유기를 환원시켜 알파토코페롤과 아스코르빌 자유기를 생성시킨다고 하였다. 이때 생성된 아스코르빌 자유기는 비교적 반응성이 없으므로 과산화손상을 일으키지 않지만 철이 이탈되거나 항산화제가 취약해진 상황에서 지질과산화물을 일으켜 뇌에서 유해한 효과를 갖음으로서 비타민 C와 비타민 E가 상호반응한다고 보고하였다 Sadrgadeh 등⁵¹⁾은 뇌에서 헤모글로빈이 매개하는 산화제손상은 내인성 비타민 C를 필요로 하는 철분의존성 과정이라는 것을 밝혀냄으로서 비타민 C가 뇌의 철분대사에 산화제로 작용한다고 하였다.

본 연구에서 혈액과 간조직에서 항산화 비타민 첨가가 정상식이군에 비해 MDA양이 적었으나 나이가 많아짐에 따라 MDA가 많아진 것은 항산화 비타민의 지질과산화반응 저해효과보다 나이에 따른 산화스트레스가 더 크게 작용한 것으로 판단된다.

5. 항산화 효소 활성

적혈구, 간, 뇌조직의 GSHPx활성은 table 6에 정리하였다.

적혈구의 GSHPx활성은 26.3 ± 4.9~89.0 ± 4.5µmole/min/mg Hb, 간은 466.2 ± 28.8~584.5 ± 42.0nmole NADP/mg protein, 뇌조직은 9.7 ± 2.6~35.8 ± 5.6µmole/min/mg Hb로서 세군 모두 나이에 따라 증가하였으며, 정상식이군에 비해 비타민 C와 비타민 E 첨가군의 GSHPx 활성이 높았고 비타민C의 효과가 더 컸다. 이 등⁴⁰⁾은 비타민 C를 체중 100g당 300mg으로 과량섭취시킨 연구에서 과량의 비타민 C는 적혈구의 산화스트레스를 증가시켜 GSHPx 활성을 유도시켰다고 하였다. GSHPx 활성은 철분, 비타민 E, 필수지방산 결핍시 감소하고 산화적 스트레스에 의하여 증가한다고 알려졌는데 본 실험에서는 과량의 비타민 C와 비타민 E가 GSHPx 활성을 높였다. 박 등⁴⁹⁾의 연구에서는 비타민 E보충이 오히려 GSHPx 활성을 감소시켰는데 이는 비타민 E가 자유라디칼을 제거하여 과산화지질의 생성을 감소시켜 나타난 것이지 비타민 E가 항산화 효소 활성에 영향을 준 것은 아니라고 하였다. 장 등⁵⁴⁾은 dl-α-tocopherol acetate를 2080IU/kg diet 로한 고비타민 E 식이에서 췌장의 GSHPx 활성이 낮아졌다. 이는 비타민 E가 조직의 과산화적 손상을 막아주므로 산화적스트레스를 감소시키고 GSHPx에 대한 요구가 감소하였다고 분석하였다. 이 등⁴⁰⁾은 흰쥐에서 체중100g당 아스코르빈산을 100mg으로 과량투여한 경우는 동맥경화 억제가능성은 있지만 반대로 체내 산화스트레스 증가, 성장지연 등 부정적 영향에 대하여 언급하였다.

적혈구, 간, 뇌조직의 SOD활성은 table 7과 같다.

적혈구의 SOD 활성은 10.9 ± 3.1~17.5 ± 3.7, 간은 12.3 ± 7.8~56.6 ± 10.8, 뇌조직은 0.10 ± 0.04~2.02 ±

Table 6. GSHPx activity of erythrocyte, liver and brain of rat fed diet containing vitamin C and vitamin E supplementation

Group	Age(month)			
	1 (n = 7)	3 (n = 7)	5 (n = 7)	7 (n = 9)
erythrocyte(nmole/min/mg Hb)				
Normal diet	27.6 ± 5.1	35.7 ± 3.2	43.8 ± 2.7 ^b	50.3 ± 2.8 ^{b***}
Vit C diet	30.4 ± 3.2	38.2 ± 5.7	52.5 ± 5.0 ^b	67.9 ± 5.9 ^{ab*}
Vit E diet	26.3 ± 4.9	45.8 ± 6.8	75.2 ± 5.0 ^a	89.0 ± 4.5 ^a
liver(nmole NADP/mg protein)				
Normal diet	466.7 ± 28.8	502.0 ± 31.9	529.0 ± 34.8	548.5 ± 42.0
Vit C diet	482.6 ± 46.2	511.2 ± 34.9	565.9 ± 40.6	568.0 ± 29.8
Vit E diet	480.9 ± 47.8	512.5 ± 29.4	552.8 ± 45.3	574.1 ± 33.7
brain(nmole NADP/mg protein)				
Normal diet	10.2 ± 2.8	16.2 ± 2.9	14.7 ± 5.2	18.2 ± 2.7
Vit C diet	9.7 ± 2.6	20.1 ± 7.3	30.8 ± 6.2	35.8 ± 5.6
Vit E diet	11.2 ± 3.4	15.0 ± 4.5	24.2 ± 3.5	28.7 ± 7.2

*, *** : Significantly different at p < 0.05 and p < 0.001 during experimental periods in the same diet group
a,b value indicate significantly different among the groups in the same period

Table 7. SOD activity of erythrocyte, liver and brain of rat fed diet containing vitamin C and vitamin E supplementation

Group	Age(month)			
	1 (n = 7)	3 (n = 7)	5 (n = 7)	7 (n = 9)
erythrocyte(unit/min/mg protein)				
Normal diet	11.4 ± 2.3	14.6 ± 2.5	12.8 ± 2.3	13.2 ± 1.9
Vit C diet	10.9 ± 3.1	12.4 ± 3.2	17.5 ± 3.7	16.0 ± 2.6
Vit E diet	12.1 ± 2.5	13.4 ± 1.8	11.8 ± 2.6	12.7 ± 3.3
liver(unit/min/mg protein)				
Normal diet	15.9 ± 5.7	24.1 ± 7.2	30.0 ± 8.4 ^a	42.7 ± 7.3 ^{b*}
Vit C diet	12.3 ± 7.8	29.2 ± 9.0	34.8 ± 5.2 ^b	56.6 ± 10.8 ^{a**}
Vit E diet	12.9 ± 3.8	18.1 ± 4.6	20.9 ± 6.6 ^b	30.8 ± 5.2 ^{c*}
brain(unit/min/mg protein)				
Normal diet	0.92 ± 0.01	0.10 ± 0.04	6.83 ± 0.04	1.13 ± 0.05
Vit C diet	0.73 ± 0.04	0.42 ± 0.02	2.02 ± 0.05	1.02 ± 0.02
Vit E diet	0.14 ± 0.02	0.62 ± 0.05	0.57 ± 0.06	0.74 ± 0.04

*, ** : Significantly different at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ during experimental periods in the same diet group
a,b value indicate significantly different among the groups in the same period

Table 8. CAT activity of erythrocyte, liver and brain of rat fed diet containing vitamin C and vitamin E supplementation

Group	Age(month)			
	1 (n = 7)	3 (n = 7)	5 (n = 7)	7 (n = 9)
erythrocyte (nmole formaldehyde/mg protein)				
Normal diet	712.8 ± 209.3	1836.5 ± 310.5	1982.6 ± 289.5 ^a	2112.7 ± 320.6 ^{**}
Vit C diet	1687.3 ± 192.9	1794.7 ± 292.6	1812.8 ± 302.8 ^b	1919.9 ± 272.7 ^{a*}
Vit E diet	1842.1 ± 213.9	1992.5 ± 302.8	1794.5 ± 278.2 ^c	1613.8 ± 298.8 ^b
liver (nmole formaldehyde/mg protein)				
Normal diet	4422.3 ± 520.8	4788.5 ± 216.8	5018.7 ± 365.5 ^a	5316.8 ± 416.9 ^{**}
Vit C diet	4007.8 ± 616.7	4482.6 ± 278.9	4688.9 ± 416.8 ^b	4722.7 ± 360.8 ^{b*}
Vit E diet	4620.9 ± 240.7	4718.9 ± 321.6	4807.8 ± 366.8 ^b	4922.6 ± 327.9 ^b
brain (nmole formaldehyde/mg protein)				
Normal diet	209.1 ± 22.8	214.6 ± 30.9	220.6 ± 30.2	240.2 ± 28.0 ^b
Vit C diet	180.2 ± 17.8	224.2 ± 32.6	231.5 ± 27.8	262.6 ± 37.9 ^{**}
Vit E diet	240.9 ± 25.3	232.1 ± 40.4	232.4 ± 35.7	213.6 ± 31.2 ^c

* : Significantly different at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ during experimental periods in the same diet group
a,b value indicate significantly different among the groups in same period

0.05unit/min/mg protein이었다. 적혈구와 뇌조직의 SOD 활성은 나이증가에 따른 일관성이 없었으며 간조직의 SOD 활성은 나이에 비례하였다. 간조직에서는 비타민 C 첨가군의 SOD 활성이 정상식이군보다 높았고, 비타민 E 첨가군은 정상식이군보다 낮았다. 이처럼 간에서 두 항산화 비타민에 의한 효과가 상반되고, 적혈구와 뇌조직에서는 항산화 비타민에 영향을 받지 않는 결과를 보인 것은 SOD의 불안정성과 조직에 대한 특이성에 의한 것으로 생각된다. 강 등⁵⁰⁾은 지질의 과산화가 촉진된 상태에서는 적혈구의 SOD 활성이 증가하고 비타민E 섭취로 활성이 감

소하였다고 보고하였고 박 등⁴⁹⁾의 연구에서는 비타민 E에 의하여 SOD활성의 변화가 없었는데 본 연구에서는 간조직에서만 두 항산화 비타민의 영향이 상반되게 나타났다.

적혈구, 간, 뇌조직의 CAT 활성은 table 8에 정리하였다. 적혈구의 CAT활성은 1687.3 ± 192.9~2112.7 ± 320.5, 간은 4007.8 ± 616.7~5316.8 ± 416.9, 뇌는 180.2 ± 17.8~262.6 ± 37.9 nmole formaldehyde/mg protein이었다. 적혈구에서는 정상식이군과 비타민 C첨가군이 나이증가에 따라 CAT활성이 증가하였다. 3개월 사육후부터 적혈구 CAT 활성이 비타민C와 비타민 E 첨가에 의해 낮아졌

다 간조직은 세 실험군 모두에서 나이에 따라 증가하는 경향이었으나, 정상식이군과 비타민 C첨가군의 CAT 활성이 통계적으로 유의적인 증가를 보였다.

비타민C와 비타민E 첨가군의 CAT 활성이 정상식이군보다 낮았다. 뇌에서는 비타민C 첨가군이 나이증가에 따라 CAT 활성이 증가하였다. 비타민E 첨가군은 오히려 감소하였으며 7개월 사육 후에는 정상식이군에 비해 비타민C 첨가군의 CAT활성이 높고 비타민 E 첨가군은 낮았다. 강 등⁵⁰⁾은 흰쥐에서 CAT 활성이 항산화비타민 섭취 후 감소하였고 비타민 E만 섭취한 경우보다 비타민 C나 비타민 C와 비타민 E를 동시에 섭취한 경우에 더 유의적으로 감소하였고 보고하였다. 그러나 강 등⁵⁴⁾은 당뇨쥐에서는 당뇨로 인한 간에서의 항산화효소 활성감소가 비타민 E보충으로 억제되었다는 보고도 있다. 박,⁴⁹⁾ 김 등⁵⁵⁾의 연구에서는 비타민 E첨가가 간의 CAT 활성에 영향이 없었다는 결과도 있어 이에 대한 세심한 연구가 요구된다. 본 실험에서는 적혈구와 간의 CAT 활성이 나이에 따라 증가하였고 비타민 C와 비타민 E 보충으로 감소하였고 뇌에서는 비타민 C와 비타민 E 첨가가 CAT 활성에 서로 반대로 영향을 주어 조직마다 다르게 나타남을 알 수 있었다.

요약 및 결론

비타민 C와 비타민 E가 철분함량과 산화스트레스에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각각 일반사료 1kg당 18g, 300IU 첨가한 사료를 만들어 흰쥐를 7개월동안 사육하였다. 각 실험군에서 1, 3, 5개월에 7마리씩, 7개월에 9마리씩 희생시켜 혈액과 간, 뇌조직의 철분함량과 MDA, GSHPx, SOD, CAT 활성을 측정하였다.

혈액, 간, 뇌의 철함량은 정상식이군, 비타민 C첨가군, 비타민 E첨가군 모두에서 나이가 많아짐에 따라 증가하였다. 혈장의 철함량은 정상식이군보다 비타민 C첨가군과 비타민 E 첨가군에서 더 높았다. 간의 철 함량은 세군 모두에서 나이가 많아짐에 따라 증가하였는데 정상식이군에 비하여, 비타민 C첨가는 간조직의 철함량을 증가시켰으며 비타민 E는 철함량을 낮추었다. 뇌에서는 실험군별 차이를 보이지 않았다

MDA 함량이 나이에 따라 증가하였고, 비타민 C와 비타민 E첨가로 혈장과 간조직의 MDA가 낮아졌고 비타민 E의 효과가 더 컸다. 뇌조직에서는 비타민 C가 MDA를 높혔다

GSHPx 활성도 나이에 따라 증가하였고 적혈구, 간, 뇌 조직 모두에서 비타민 C와 비타민 E 첨가에 의하여 높아졌

고 비타민 C의 효과가 더 컸다.

적혈구와 뇌조직의 SOD 활성은 나이의 영향이 없었다. 간조직의 SOD활성만이 나이에 비례하였으며 비타민 C는 SOD 활성을 높이고 비타민 E는 감소시켰다.

CAT 활성은 세 조직 모두에서 나이에 비례하여 증가하였고, 비타민 C와 비타민 E는 적혈구의 CAT 활성을 낮추었다.

이상의 결과 비타민 C와 비타민 E는 혈장의 철함량, 혈액과 간의 MDA감소, GSHPx 증가, 적혈구 CAT 감소효과가 있었다. 비타민 C는 뇌의 MDA 증가, 간의 SOD 증가, 뇌의 CAT 증가효과가 있었고, 비타민 E는 간의 철함량 감소의 효과를 보여 조직에 따른 차이를 보였다. 전반적으로 나이가 증가함에 따라 철분 함량, MDA함량, GSHPx, CAT활성이 높아진 것은 항산화비타민에 의한 항산화 작용보다 나이증가에 따른 산화스트레스가 더 크게 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Ziegler EE, Filer LJ Present Knowledge in Nutrition 7th Edi 277-292, ILSI Press, Washington DC, 1996
- 2) Lauffer RB. Iron and Human Disease. CRC, Press. Boca Raton, 1992
- 3) Kim SH. Advanced Nutrition. 320-353, Shinkwang Pub. Seoul, 1999
- 4) Chang NS. Is there a need for an estimate of an upper safe limit of nutrient intake? *Kr J Nutr* 28(3): 229-238, 1995
- 5) Lee YS, Lee JH. Effect of calcium and iron loading on bioavailability of minerals in normal and Ca/Fe deficient rats. *Kr J Nutr* 32(3): 248-258, 1999
- 6) Jun YS. Prevent effect of selenium supplementation on iron acculation of rats fed diet containing high levels of iron. *Kr J Nutr* 30(3) 318-325, 1997
- 7) Houghlum KM, Filip JL, Wigztum and M Chojkier. Molonaldehyde and 4-hydroxynonenal protein adducts in plasma and liver of rats with iron over load. *J Clin Invest* 86 1191-1198, 1990
- 8) Halliwell B, Gutteridge J. Iron and radical reaction. two aspects of antioxidant protection. *Trends in Biochemical Science* 11 372-375, 1986
- 9) Lesnefsky E J. Tissue iron overload and mechanism of iron catalyzed oxidative injury free radicals in diagnostic medicine Edited by D. Armstrong. Plenum Press, New York, 1994
- 10) Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton JW. Iron catalyzed hydroxyl radical formation. *J Biol Chem* 259. 3620-3624, 1984
- 11) Bacon BR, Park CH, Brittenham GM, O'Neil R, Travill AS. Hepatic mitochondrial oxidative metabolism in rats with dietary iron over load *Hepatology* 5 789-797, 1985
- 12) Lnk G, Pinson A, Hershko C. Iron loading of cultured cardiac myocytes modifies sarcolemmal structure and increases lysosomal fragility. *J Lab Clin Med* 121 127-134, 1993
- 13) Roberts R, Sandra A, Seik GC, Lucas JJ, Fine RE. Studies of the mechanism of iron transport across the blood-brain barrier. *Ann Neurol* 32. S43-S50, 1992
- 14) Gerlach M, Ben-Shachar D, Riedrer P, Youdim BH. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative disease? *J Neurochem* 63(4): 793-807, 1994

- 15) Jenner P. Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 87: S146: 6-13, 1993
- 16) Connor JR, Snyder BS, Beard JL, Fine RE, Mufson EJ. Regional distribution of iron and iron regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *J Neuroscience Research* 31: 327-335, 1992
- 17) Weinberg ED. Roles of iron in neoplasia. *Biological Trace Element Research* 34: 123-140, 1992
- 18) Nelson RL. Dietary iron and colorectal cancer risk. *Free Radical Biol Med* 12: 161-168, 1992
- 19) Yu BP. Free Radicals in Aging. 58-88 CRC Press Inc. Boca Raton, 1993
- 20) Harrison PM, Arosio P. The ferritin: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1275: 161-203, 1996
- 21) Roskams AJ, Connor JR. Iron, transferrin, and ferritin in the rat brain during development and aging. *J Neurochem* 63: 709-716, 1994
- 22) Christofalo VJ, Bajer GT. In memorial Nathan W. Shock 1906-1989. *J Gerontol* 45: B1-B2, 1990
- 23) Yu BP. Aging, and oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 21: 651-668, 1998
- 24) Herbert V, Shaw S, Jayatilke. Vitamin C-driven free radical generation from iron. *J Nutr* 126: 1213S-1220S, 1996
- 25) Bridges KR, Heffman KE. The effect of effects of ascorbic acid on the intracellular metabolism of iron and ferritin. *J Biological Chem* 261(30): 14273-14277, 1996
- 26) Aruoma OI, Halliwell B. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxy radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *Biochem J* 241: 273-278, UK, 1987
- 27) Bridgeo KR. Ascorbic acid inhibits lysosomal autophagy of ferritin. *J Biol Chem* 262(30): 14773-24778, 1987
- 28) Diplock AT. Antioxidant nutrients and disease prevention. *Am J Clin Nutr* 53: 189S-193S, 1991
- 29) Byers T, Perry G. Dietary carotenes, Vitamin C and Vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu Rev Nutr* 12: 139-159, 1992
- 30) Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 328: 1450-1456, 1993
- 31) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- 32) Wendell, TC. Chemical and diagnostic specificity of laboratory tests. *Am J Clin Path* 37: 445-464., 1962
- 33) Fish W. Rapid Colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Meth Enzymol* 158: 357-365., 1988
- 34) Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Med* 9: 515-540., 1990
- 35) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169, 1967
- 36) Flohe L, Gunzler WA. Assay of glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 105: 114-121, 1984
- 37) Flohe L, Brigelius R, Lengfelder E, Otting F. Convenient assay for superoxide dismutase. *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine* 287-293, 1992
- 38) Johnsson LH, Hagen Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue sample. *Analytical Biochem* 174: 331-336, 1988
- 39) Ahn HS, Kang SA, Lee IH. Effects of vitamin E and vitamin C supplementation on the decrease of cognitive function induced by Scopolamine. *Kr J Nutr* 32: 239-247, 1999
- 40) Lee JW, Kim SY, Kwak CS. Effect of excess vitamin C feeding on blood and liver lipid and its peroxidation levels and platelet thromboxane A₂ formation in rats. *Kr J Nutr* 30: 639-647, 1997
- 41) Barja G, Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Prat J, Pamplona R. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. *Free Rad Biol Med* 17(2): 105-115, 1994
- 42) Nandi BK, Majumber AK, Subramanian N, Chatterjee I. Effect of large dose of vitamin C in guinea pigs and rats. *J Nutr* 103: 1688-1695, 1973
- 43) Cook CI, Yu BP. Iron accumulation in aging modulation by dietary restriction. *Mechanisms of Aging and Development* 102: 1-13, 1998
- 44) Sharma OP. Age related changes in lipid peroxidation in rat brain and liver. *Biochem and Biophys Res Comm* 78: 469-474, 1977
- 45) Ghio AJ, Pritchard RJ, Dittrich KL, Samat JM. Non-Heme(Fe³⁺) in the lung increases with age in both human and rats. *J Lab Clin Med* 129: 53-61, 1997
- 46) Harrison PM, Arosio P. The ferritin molecular properties iron storage function and cellular regulation. *Biochem Biophys Acta* 1275: 161-203, 1996
- 47) Treffy A, Zhao Z, Quail MA, Guest JR, Harrison PM. Dinuclear center of ferritin: studies of iron binding and oxidation show difference in two iron sites. *Biochem* 36: 432-441, 1997
- 48) YU KH, Yoon JS. The effect of weekly iron supplementation on iron and zinc nutritional status in pregnant women. *Kr J Nutr* 31: 1270-1282, 1998
- 49) Park S, Yu JG, Lee UJ. Analysis of factors to influence requirement of vitamin E and vitamin C in young and healthy men and women. *Kr J Nutr* 31: 729-738, 1998
- 50) Kang NE, Kim WK. Effects of antioxidant vitamins supplementation on antioxidative status and plasma lipid profiles in Korean NIDDM patients. *Kr J Nutr* 32(7): 775-780, 1999
- 51) Andron AC, Britton RS, Bacon BR. Ascorbate-stimulated lipid peroxidation in human brain is dependent on iron but not on hydroxyl radical. *J Neurochem* 67: 717-722, 1996
- 52) Girotti A. Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med* 1: 87-95, 1985
- 53) Sadrzadeh SM, Eaton JW. Hemoglobin mediated oxidant damage to the central nervous system requires endogenous ascorbate. *J Clin Invest* 82: 1510-1515, 1988
- 54) Chang YS, Ahn HS, Kim H. Effects of vitamin E supplementation on the lipid peroxides and activities of antioxidative enzymes in the pancreas of diabetic KK mice. *Kr J Nutr* 31(2): 153-158, 1998
- 55) Kim ES, Kim MK. Effect of dried leaf powders and ethanol extracts of Persimmon, Green Tea and Pine needle on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Kr J Nutr* 32(4): 337-352, 1999