

엽산 결핍이 에탄올을 급여한 흰쥐의 체내 콜레스테롤 함량과 항산화계에 미치는 영향*

배민정* · 양경미** · 민혜선*** · 서정숙*§

영남대학교 식품영양학과,* 대구한의대학교 식품조리영양학과,** 한남대학교 식품영양학과***

The Effect of Folate Defficiency on Plasma Cholesterol and Antioxidative System in Ethanol-fed Rats*

Bae, Min Jeong* · Yang, Kyung Mi** · Min, Hyesun *** · Seo, Jung Sook*§

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

Department of Cooking and Nutrition,** Daegu Hanmy University, Gyeongsan 712-715, Korea

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

ABSTRACT

Chronic alcoholism is considered a common cause of malnutrition. Especially, micronutrient deficiency may play a critical role in the incidence of alcoholic liver diseases. This study was conducted to investigate the effect of folate deficiency and ethanol consumption on cholesterol metabolism and the antioxidative system in rats. Plasma concentration of total cholesterol was increased by ethanol administration in folate-fed rats. HDL-cholesterol tended to be higher in the folate-fed group, but it was not significant. The plasma and hepatic levels of malondialdehyde were increased after chronic ethanol feeding, but dietary folate depressed the plasma malondialdehyde content of rats. Ethanol or folate feeding did not significantly change alcohol dehydrogenase activity. But folate feeding increased catalase activity in ethanol-fed rats. There was no significant change in superoxide dismutase activity among the experimental groups. Glutathione peroxidase activity tended to decrease by chronic ethanol feeding, but dietary folate did not affect the glutathione peroxidase activity of chronic ethanol-fed rats. Glutathione-S-transferase activity was not affected by ethanol feeding or folate deficiency. The plasma and hepatic levels of retinol decreased after chronic ethanol feeding. The hepatic level of retinol significantly decreased in ethanol-fed rats by folate deficiency. The plasma level of α -tocopherol tended to be low in the folate deficient group with ethanol feeding, but there was no difference among the experimental groups in the hepatic level of α -tocopherol. These results demonstrate that chronic ethanol consumption changes the plasma cholesterol metabolism and antioxidative system of rats, and optimal folate feeding in ethanol-fed rats exerts protective effects to some extent. (*Korean J Nutrition* 36(8): 801~810, 2003)

KEY WORDS : ethanol, folate, lipid peroxide, retinol, α -tocopherol.

서 론

만성적인 에탄올 섭취시 엽산, 비타민 A, 아연, 철분과 같은 미량 영양소의 섭취량이 낮으며, 소장 용모의 손상과 소화효소 분비의 이상 등으로 인해 이들 영양소의 소화 및 흡수가 저하된다. 또한 에탄올에 의한 간조직 손상은 영양

소의 대사를 변화시켜 이들 영양소 상태가 불량해진다.¹⁻³⁾ 그 중에서도 에탄올 대사산물인 acetaldehyde나 지질과산화물은 비타민 A나 엽산의 분해를 촉진시켜 체내 영양소 함량을 저하시키고 혈중 호모시스테인과 지질과산화물 수준을 상승시켜 항산화 영양소의 함량을 낮추는 것으로 나타났다.^{4,5)}

또한 에탄올성 간손상을 일으키는 원인으로 지질과산화 반응이 중요하게 관련되며 이에 항산화 영양소의 적절한 공급으로 조절이 가능하다는 보고가 있다.⁶⁾ 즉 과량의 에탄올 섭취는 간조직에서 지방대사를 변화시키고 에탄올 대사와 지질과산화 반응과 관련된 효소체계의 변화를 유도하여 간 손상을 악화시키게 된다.

접수일 : 2003년 7월 11일

채택일 : 2003년 8월 12일

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

§To whom correspondence should be addressed.

Halsted 등⁷⁾은 간조직이 에탄올과 엽산의 대사에 중요한 역할을 하며, 과도한 에탄올의 섭취는 엽산을 적정량 공급하더라도 엽산의 장내 흡수 저하로 인해 간 손상의 상승인자로 작용한다고 보고하였다. 이러한 체내 엽산의 결핍은 호모시스테인의 methionine으로의 전환을 방해하여 호모시스테인의 재메틸화반응 (remethylation)을 저해함으로써 세포 내에 호모시스테인이 축적되고 그 결과 호모시스테인혈증과 호모시스테인뇨증이 나타난다.^{8,9)} 또한 엽산 결핍으로 인한 호모시스테인혈증은 간조직의 산화 스트레스를 증가시켜 항산화 효소와 영양소 체계에 변화를 유도할 수 있는 것으로 나타났다.⁹⁾ 동시에 엽산 결핍은 에탄올 섭취로 간에서 합성이 증가된 중성지방의 방출에 필요한 메티오닌 합성을 저해하여 지방간이 악화될 수 있다. 이러한 결과는 알코올 중독시 엽산을 보충시키면 간 손상의 정도가 다소 경미하게 나타날 수 있다는 보고로서 뒷받침된다.⁸⁾ 특히 알코올 섭취자들에서 엽산의 섭취, 흡수 및 대사 저하로 엽산 영양상태가 불량해지면서 나타나게 되는 호모시스테인혈증은 간에서의 산화 스트레스를 가중시킴으로써 에탄올 섭취로 인한 free radical 생성과 항산화 영양소의 함량을 저하시켜 지질과산화 반응을 더욱 자극시킬 수 있다.^{6,10)}

엽산 결핍에 의한 호모시스테인혈증은 신경계와 심혈관계 질환 및 암 발병의 위험을 증가시키며,¹¹⁻¹⁴⁾ 이는 호모시스테인과 관련된 산화적 손상과 관계되는 것으로 보고되고 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 혈관 내막세포를 이용한 *in vitro* 연구에 의하면, 호모시스테인은 내막세포에서 H₂O₂ 생성을 증가시킴으로써 독성효과를 나타냈으며, 항산화계에 영향을 주었고¹⁸⁾ 또한 지질과산화를 촉진하는 것으로 나타났다.¹⁹⁾ 인체 연구에서도 엽산 섭취가 저조할 때 혈장 호모시스테인 농도가 증가되었고, 지질과산화의 척도인 malondialdehyde의 소변내 배설량이 증가되었다.²⁰⁾

최근 비만이나 커피, 담배, 과도한 음주 등 잘못된 생활습관을 가진 사람들에게서 주로 나타나는 호모시스테인혈증은 대혈관질환을 일으키는 독립적 위험요인으로 밝혀졌다.⁸⁾ 그리고 엽산 결핍이 혈액학적 이상을 초래할 뿐만 아니라 호모시스테인혈증을 가져와 신경계와 심혈관계 질환, 암 등 다양한 질환과 관련이 있는 것으로 보고되고 있으며, 특히 만성적 알코올 섭취에 의한 알코올성 간질환은 엽산 결핍과 관련성이 크다고 보고되고 있다.^{2,21,22)} 따라서 본 연구는 간조직 손상의 원인으로 알려진 체내 지질과산화 반응과 항산화계에 미치는 에탄올 섭취와 엽산 결핍의 영향을 조사하고자 시도되었다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

본 연구에 사용한 실험동물은 Sprague-Dawley종 수컷로서 환경이 조절된 사육실 (온도 22±2°C, 습도 55±1%, 조명 08:00~20:00)에서 stainless steel cage에 한 마리씩 분리하여 평균체중이 약 200 g 될 때까지 고형사료로 사육하였다. 흰쥐에게 공급한 실험식은 Lieber와 Decarli²³⁾가 고안한 액체식이를 기본으로 한 식이로서 실험식이 1 mL당 1 kcal을 공급하였고 (Table 1), 엽산을 공급한 군 (0.5 mg/

Table 1. Composition of basal liquid diet

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

1) Dextrin-maltose content in experimental liquid diets: 153 g/L for pair-fed group, 64 g/L for ethanol group

2) Vitamin mixture ingredients (mg/1000 kcal): Thiamin · HCl 1.530, D-Biotin 0.510, Riboflavin 1.530, Cyanocobalamin 0.026, Pyridoxine · HCl 1.785, α -tocopherol acetate 25.500, Nicotinic acid 7.650, Vit D₃ 0.638, D-Ca pantothenate 4.080, Menaquinone 0.383, Sucrose 2.500, P-aminobenzoic acid 12.500, Inositol 25.000

3) Mineral mixture ingredients (/1000 kcal): Calcium phosphate 4.5 g, Sodium chloride 0.666 g, Cupric carbonate 0.090 mg, Potassium citrate 1.980 g, Potassium iodate 0.090 mg, Potassium sulfate 0.468 g, Sodium selenite 4.950 mg, Manganese carbonate 0.032 g, Chromium potassium sulfate 1.062 g, Magnesium oxide 0.216 g, Ferric citrate 0.054 g, Sodium fluoride 0.25 mg, Zinc carbonate 0.014 g, Sucrose 1.062 g

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

Table 2. Experimental design

Group ¹⁾	(per L liquid diet)	
	Ethanol	Folate
PD	-	-
ED	50.4 g	-
PF	-	0.5 mg
EF	50.4 g	0.5 mg

1) PD: Pair-fed group with folate-deficient diet

ED: Ethanol group with folate-deficient diet

PF: Pair-fed group with folate diet

EF: Ethanol group with folate diet

1000 kcal)과 공급하지 않은 군으로 나누었다 (Table 2). 이때 각 실험군에게 에탄올 식이를 농도별로 1주일간 서서히 증가시켜 적응과정을 거치게 한 후 본 실험식이를 공급하였다. 에탄올 섭취로 인한 식이섭취량의 차이를 배제하기 위하여 36% 에탄올 급여군에게 식이를 자유로이 공급하고 이들의 1일 사료 공급량을 매일 확인한 뒤 이 섭취량을 기준으로 에탄올을 비급여군인 pair-fed군에게 같은 양을 공급하였다. 체중은 1주일 간격으로 측정하였다.

2. 시료준비

실험식이로 4주간 사육한 흰쥐를 12시간 절식시킨 후 에테르로 마취하여 개복 후 즉시 헤파린으로 처리된 주사기로 채혈하였다. 복부 대동맥에서 채혈하여 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리한 후 분석시까지 -70℃에 보관하였다. 간 조직은 1.15% KCl 완충용액으로 관류시켜 적출하여 여러번 세척한 다음 수분을 완전히 제거시켜 간 조직의 무게를 측정하였다. 이중 일부를 취해서 조직 균질기 (Teflon Plotter-Elvehjem Homogenizer, USA)를 사용하여 빙냉하에서 1.15% KCl 완충용액으로 10% (w/v) 마쇄균질액을 만든 다음 미토콘드리아, 사이토졸, 마이크로솜 분획을 분리하였다. 미토콘드리아 분획은 catalase 활성도 측정에, 마이크로솜 분획은 지질과산화물 함량, 사이토졸 분획은 alcohol dehydrogenase (ADH), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) 및 glutathione-S-transferase (GST) 활성도 측정에 사용하였다. 나머지 간 조직 중 일부는 비타민 A와 E 함량의 분석에 이용하였다.

3. 콜레스테롤 함량 측정

혈장 내 총 콜레스테롤 함량은 총 콜레스테롤 측정용 kit (Embiel Co.)를 사용하여 혈청 20 μL에 효소시액 3.0 mL를 가하여 잘 혼합하고 37℃에서 5분간 가온하고 5분간 실온에서 방치한 다음 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈장 내 HDL-콜레스테롤 함량은 HDL-콜레스테롤 측정용 kit (Embiel Co.)를 사용하여 혈청 200 μL에 침강시액 0.2 mL를 가하여 잘 혼합한 후 5분간 실온에서 방치하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 HDL-콜레스테롤 이외의 lipoprotein을 침전시켰다. 그런 다음 상층액 0.1 mL를 취하여 조제된 효소시액 3.0 mL와 혼합하고 37℃에서 5분간 가온한 후 실온에서 5분간 방치한 다음 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 지질과산화물 함량과 효소 활성도 측정

혈장과 간 마이크로솜내의 지질과산화물 함량은 thiobar-

bituric acid (TBA)와 반응하여 생성된 malondialdehyde (MDA) 양으로 나타낸 Okawa 등²⁴⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. ADH 활성은 에탄올과 NAD 그리고 효소액을 가하여 340 nm에서 NADH 생성량을 측정하였고,²⁵⁾ catalase 활성은 간 미토콘드리아 부유용액 일정량을 취해 첨가한 H₂O₂ 분해에 따른 흡광도의 감소를 측정하였다.²⁶⁾ 간 사이토솔내 SOD 활성은 ethanol과 chloroform의 혼합액으로 추출한 상층액을 이용하여 riboflavin의 photochemical 환원으로 생성된 O₂의한 nitrobluetetrazolium (NBT)의 환원을 억제하는 정도를 측정하였고,²⁷⁾ GSH-Px 활성은 EDTA, NaN₃, NADPH, GSH, 그리고 GSSG-reductase를 첨가하여 만든 반응 혼합액을 이용하여 H₂O₂ 용액을 첨가하여 반응시켜서 340 nm에서 NADPH의 흡광도 감소를 측정하였다.^{28,29)} GST활성은 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB)을 기질로 사용하여 340 nm에서 단백질 1 mg 당 1분간 포함되는 CDNB의 nmole로 표시하였다.³⁰⁾ 간조직 중의 단백질 정량은 Lowry 등³¹⁾의 방법으로 bovine serum albumin을 표준 단백질 용액으로 하여 표준검량선을 구한 뒤 그 양을 산출하였다.

5. 비타민 A와 E 정량

혈장 retinol과 α-tocopherol함량은 HPLC를 이용한 Bieri 등³²⁾의 방법에 의하여 동시 정량하였다. 혈장에 internal standard로 retinyl acetate와 tocopherol acetate를 ethanol을 가하여 잘 섞은 후 각각의 시료액을 hexane으로 추출하여 최종 시료액을 얻었다. 간조직에서도 혈장에서와 같이 retinol과 α-tocopherol을 동시에 정량하였다. 즉 Furr 등³³⁾의 방법에 의하여 간조직 일정량에 2~3배의 anhydrous sodium sulfate (w/w)를 가하여 잘 마쇄한 다음 dichloromethane을 가하여 원심분리하여 최종 추출액을 얻었다. 각각의 최종 추출액은 teflon lever의 syringe (5 mL, Hamilton, USA)를 사용하여 pore size 0.45 μm의 membrane filter (Hamilton, USA)로 여과시킨 다음, 농축시킨 추출물은 HPLC용 ether : methanol (1 : 3, v/v)로 각각 용해시킨 후 HPLC에 주입시켰다. 이때 HPLC의 분석조건은 Table 3과 같다.

6. 통계처리

모든 실험 결과는 SAS 통계 package를 이용하여 실험군 당 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 실험 결과는 엽산 결핍과 에탄올 섭취의 영향을 two-way ANOVA로 통계 처리한 후 통계적으로 유의성이 나타난 요인에 대해서는 α = 0.05 수준에서 Duncan's multiple test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 체중증가율, 식이섭취량 및 사료효율

Table 4에서 보는 바와 같이 실험기간에 따른 일일 체중 증가량과 사료효율은 에탄올 급여군이 각각의 pair-fed 군 보다 낮았고 엽산 결핍의 영향은 없었다. Rao 등³⁴⁾은 35% 에탄올 액체식을 2주 동안 자유로이 공급시킨 결과, 식이섭취량의 급격한 감소로 체중증가량 역시 감소되었다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 에탄올 급여군과 pair-fed군의 열량 섭취량이 동일하였으므로 에탄올로 인한 식이섭취

Table 3. Operating conditions of HPLC for measurement of vitamin A and E

Item	Condition	
	Plasma	Liver
Instrument	shimadzu	Waters 6000A with Young in D520A
Column	μ Bondapak C ₁₈	μ Bondapak C ₁₈
Detector	UV detector	UV detector
Mobile phase	Methanol : H ₂ O (95 : 5)	Eluent A-Methanol : H ₂ O (90 : 10) Eluent B-Methanol : THF : H ₂ O (65 : 30 : 5)
Flow rate	1.0 mL/min	1.0 mL/min
Injection volume	20 μ L	20 μ L
Attenuation	0.2	0.2
Chart speed	0.5 cm/min	0.5 cm/min

Table 4. Effect of folate deficiency on food intake, body weight gain and food efficiency ratio in ethanol-fed rats

Group ¹⁾	PD	ED	PF	EF
Food intake (ml/day)	82.76 \pm 3.26 ^{4)NS5)}	81.48 \pm 3.61	82.12 \pm 3.01	80.62 \pm 3.60
B.W.G. ²⁾ (g/day)	5.60 \pm 0.69 ⁶⁾	4.57 \pm 0.74 ^{b)}	5.68 \pm 0.54 ^{c)}	4.41 \pm 0.97 ^{b)}
F.E.R. ³⁾	0.068 \pm 0.007 ^{a)}	0.056 \pm 0.007 ^{b)}	0.069 \pm 0.005 ^{c)}	0.054 \pm 0.010 ^{b)}

1) See the legend of Table 2

2) B.W.G.: Body Weight Gain

3) F.E.R.: Feed Efficiency Ratio

4) Values are the mean \pm SD (n = 10)

5) NS: Not significant

6) Values with the same superscript letter within a row are not significantly different (p < 0.05)

Table 5. Effect of folate deficiency on plasma levels of total cholesterol, HDL-cholesterol, and HDL-/total cholesterol of ethanol-fed rats

Group ¹⁾	(mg/dL plasma)		
	Total cholesterol	HDL-cholesterol	HDL/Total cholesterol
PD	63.59 \pm 8.53 ²⁾³⁾	24.31 \pm 7.51 ^{NS4)}	0.383 \pm 0.101 ^{NS}
ED	60.82 \pm 29.47 ^{b)}	19.72 \pm 7.12	0.305 \pm 0.110
PF	53.69 \pm 13.15 ^{b)}	24.31 \pm 9.21	0.419 \pm 0.096
EF	72.91 \pm 16.02 ^{a)}	23.67 \pm 13.91	0.302 \pm 0.187

1) See the legend of Table 2

2) Values are the mean \pm SD (n = 10)

3) Values with the same superscript letter are not significantly different (p < 0.05)

4) NS: Not significant

량 감소에 따른 영양소 결핍의 영향을 배제하였음에도 불구하고 에탄올군에서 체중증가량이 낮았다. 이와 같은 결과는 Lieber와 Decarli²³⁾가 액체식이 형태로 36% 에탄올 급여군과 pair-fed군에게 동일한 열량을 섭취시켰으나 체중증가량은 감소하였다는 연구 결과와 동일한 경향이였다. Pikaar 등³⁵⁾은 에탄올 섭취로 인한 체중증가량의 감소는 주로 체지방의 손실, 식이 섭취량의 감소, 그리고 높은 에너지의 소비 등이라고 설명하였다. 그러나 체중증가량이 감소되는 주 원인은 식이섭취량의 감소에 기인하거나 동일한 열량을 공급받더라도 대부분의 에탄올이 microsomal ethanol oxidizing system (MEOS)에 의해 산화되어 섭취되는 에너지중 일부가 futile cycle 반응에 소모되기 때문인 것으로 보고되었다.³⁶⁾

체중증가에 따른 사료효율은 에탄올 급여군이 각각의 pair-fed군에 비해 유의적으로 감소하였으며 이때 엽산 보충의 효과는 없었다. 엽산 결핍식이나 보충식이 적어도 10주간의 섭취기간 동안에는 식이섭취량이나 체중에 큰 영향을 주지 않았다는 Chang과 Kim³⁷⁾의 보고를 보면 본 실험에서 4주간의 엽산 보충이 체중 증가량이나 사료효율에 큰 영향을 미칠 수 있는 기간은 아닌 것으로 여겨진다.

2. 혈장의 콜레스테롤 함량

혈장에서의 콜레스테롤 함량은 Table 5에 제시하였다. 총 콜레스테롤 함량은 엽산 결핍시에는 에탄올 섭취에 의해 차이가 유도되지 않았으나 정상엽산군에서는 에탄올 섭취

시에 유의적으로 증가되었다. HDL-콜레스테롤 함량은 전 군에서 유의적인 차이가 없었으나 HDL-콜레스테롤과 총 콜레스테롤을 비는 에탄올 급여군이 각각의 pair-fed군에 비해 유의적이지는 않으나 낮은 수치를 보였다. 이는 에탄올 섭취기간이 길어질 때 혈관계질환에 대한 위험가능성을 내포하고 있는 것으로 보인다.

에탄올 섭취로 인하여 간과 혈액의 중성지방과 콜레스테롤 함량이 증가되며, 이로 인해 심혈관계 질환, 에탄올성 간 질환, 고지혈증이 초래된다고 보고되었다.³⁸⁾ 그러나 HDL-콜레스테롤의 농도는 동맥경화증의 예방인자이므로 고지혈증에서는 혈청 중성지방과 LDL-콜레스테롤을 감소시키고 HDL-콜레스테롤을 증가시키는 것이 동맥경화 예방에 좋은 영향을 미치게 된다.³⁹⁾ 반면에 LDL-콜레스테롤은 동맥경화의 위험인자이며 체내 염산이 결핍될 경우에 나타나는 호모시스테인혈증 역시 관상동맥경화증의 독립적인 위험인자로 작용한다. 이 현상은 만성적인 에탄올 섭취자들에게서도 나타나는데 에탄올 섭취자들의 혈장 호모시스테인 농도는 대조군보다 두배나 높고 그 정도는 에탄올 투여기간이 길어질수록 더욱 두드러지게 나타났다.⁴⁰⁾

3. 혈장과 간조직의 지질과산화물 함량과 효소 활성도

혈장과 간 마이크로솜 내 지질과산화물 함량은 Fig. 1에서와 같다. 혈장 지질과산화물 함량은 엽산 결핍군인 PD와 ED군에서 에탄올 급여 유무와 관계없이 높았으며, 엽산 공급군에서는 에탄올을 급여한 EF군이 pair-fed군인 PF군에 비해서 유의적인 증가를 보였다. 에탄올을 급여한 경우에는 지질과산화물 함량 증가에 대하여 엽산 공급이 아무런 보호효과를 주지 못한 것으로 나타났지만 에탄올을 급여하지 않

은 경우에는 엽산 결핍에 의해 지질과산화물 함량이 증가되어 엽산이 혈장 지질과산화물 처리에 영향을 미쳤다. 간 마이크로솜 내 지질과산화물 함량은 엽산군이 엽산결핍군보다 다소 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다.

에탄올 섭취에 의해서 생성되는 지질과산화물의 증가는 간 손상의 주된 원인으로 작용하는데, 주로 에탄올의 직접적인 작용이나 대사효소 그리고 cytochrome P450과 MEOS와 같은 효소의 작용으로 생성되는 acetaldehyde나 반응성이 강한 free radicals로 인하여 생성된다.⁴¹⁾ P450에 의한 free radical 생성은 NADPH나 P450 reductase에 의해 O₂⁻ 생성되며, 이것이 Fe과 연결된 Haber-Weiss 반응으로 OH와 H₂O₂를 생성한다. 에탄올에 의한 free radical 생성의 또 다른 경로는 간 미토콘드리아내에서 NAD⁺/NADH의 감소로 인한 O₂⁻와 alkane의 생성 등이 있는 것으로 보고되었다.⁴²⁾ 에탄올 섭취에 의한 지질과산화반응의 유도는 스트레스, 에탄올의 섭취방법이나 농도 등 많은 변수들이 작용하여 나타난다.⁴³⁾ 본 연구결과에서 에탄올에 의한 지질과산화물 함량의 증가 역시 에탄올 섭취에 의해 지질과산화 반응이 민감한 반응을 보였다는 것을 알 수 있다. 또 엽산을 결핍시킨 군에서는 모두 지질과산화물 함량이 높았는데, 이는 Huang 등⁹⁾이 식이 중 엽산을 결핍시킨 군과 식이 kg당 0.5와 2 mg을 각각 4주 동안 공급 후 간조직에 H₂O₂와 Fe²⁺를 처리하여 산화적 스트레스를 가한 결과, 엽산을 결핍시킨 군에서는 지질과산화 반응이 증가되었다는 결과와 비슷한 경향이였다.

에탄올 대사효소와 항산화 관련 효소계 활성도의 변화는 Table 6에 나타내었다. ADH 활성도는 에탄올 급여군과

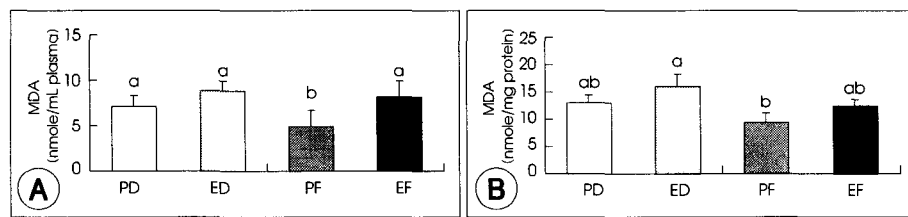


Fig. 1. Effect of folate deficiency on plasma (A) and liver microsomes (B) levels of lipid peroxide of ethanol-fed rats. See the legend of Table 2. Values with the same superscript letter are not significantly different ($p < 0.05$). MDA: malonaldehyde.

Table 6. Effects of folate deficiency on hepatic activities of ADH, catalase, SOD, GSH-Px and GST of ethanol-fed rats

Group ¹⁾	ADH	Catalase	SOD	GSH-Px	GST
	nmole/min/mg protein		unit/mg protein		
PD	3.46 ± 0.92 ^{ab2,3)}	10.11 ± 1.45 ^{ab}	14.38 ± 1.93 ^{NS4)}	2.01 ± 0.50 ^a	0.98 ± 0.11 ^{NS}
ED	3.04 ± 0.42 ^b	10.56 ± 1.81 ^a	13.50 ± 1.56	1.49 ± 0.42 ^{bc}	1.01 ± 0.26
PF	4.08 ± 1.42 ^a	8.29 ± 1.50 ^b	14.47 ± 2.12	1.78 ± 0.33 ^{ab}	1.03 ± 0.19
EF	3.17 ± 0.81 ^{ab}	10.34 ± 1.95 ^a	13.32 ± 1.99	1.25 ± 0.38 ^c	0.96 ± 0.13

1) See the legend of Table 2

2) Values are the mean ± SD (n = 10)

3) Values with the same superscript letter within a column are not significantly different ($p < 0.05$)

4) NS: Not significant, ADH: alcohol dehydrogenase, SOD: superoxide dismutase, GSH-Px: glutathione peroxidase, GST: glutathione-S-transferase

pair-fed군 사이에 유의적인 차이가 아니었지만 에탄올 급여에 의해 감소하는 경향을 나타냈으며, 엽산이 결핍된 에탄올군이 엽산 공급 pair-fed군에 비해 유의적으로 감소되었다. 이는 섭취한 에탄올을 대사시키기 위해 관련 효소가 소모되었기 때문에 여겨진다. Catalase 활성도는 에탄올 급여와 함께 엽산을 섭취시킨 EF군이 pair-fed군인 PF군에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였다.

간조직내 에탄올 대사는 에탄올이 acetaldehyde로 산화되는 1단계와 acetaldehyde가 acetate로 산화되는 2단계 과정으로 나뉘어지는데, 1단계에는 NADP⁺를 조효소로 이용한 ADH가 관여하며, MEOS와 catalase도 일부 관여한다.⁴⁴⁾ 에탄올의 산화과정에서 생성된 acetaldehyde는 에탄올에 의한 간 손상을 유발하는 주요 인자로서 간 실질 세포내의 세포질에 고농도로 편재해 있다. 특히, 만성 에탄올성 간질환에서 간조직의 ADH 활성은 감소하는 것으로 알려져 있으며, ADH 활성의 감소가 에탄올 그 자체의 독성에 의한 것이라는 보고⁴⁵⁾도 있고 별다른 영향을 주지 못한다는 보고⁴⁶⁾도 있다. 그러나 Figueroa 등⁴⁷⁾의 연구에서 3주에서 12주까지 20% 용액의 에탄올을 섭취시킨 쥐에게서 ADH 활성이 3주에서 증가하였다가 12주에서는 유의적으로 감소하였다고 보고되었다. 또 만성적인 에탄올 섭취자에서 에탄올 대사가 증가하는 것은 ADH가 아닌 MEOS를 포함한 다른 알코올 대사 효소 활성의 증가에 의한 것이라는 보고도 있다.⁴⁸⁾ 본 실험의 결과에서도 ADH 활성도 변화가 뚜렷하지 않은 것으로 보아서 에탄올의 대사에 다른 관련 효소의 작용이 더 많은 영향을 미쳤을 것으로 여겨진다.

Catalase는 free radical을 H₂O와 OH기로 변환시켜 지질과산화에 대한 세포손상을 방어하는데 밀접하게 관련하는 것으로 알려져 있다. Antonenkov와 Panchenko⁴⁹⁾는 만성적인 에탄올 섭취시 catalase의 활성이 증가되었으나 과산화물 대사와 관련된 다른 효소의 활성에는 유의적인 변화가 없었다고 하였다. 그러나 Oh 등⁵⁰⁾은 식이열량의 36%를 에탄올로 급여한 흰쥐의 심장에서 catalase의 활성이 유의적으로 증가하였다고 하였다. Fahimi 등⁵¹⁾의 결과에서도 catalase 활성의 유의적인 증가가 18주간 계속되었다. 만성적인 에탄올 섭취로 조직 중의 catalase 활성이 증가하는 것은 대사과정에서 생성되는 과량의 H₂O₂를 처리하는데 중요할 뿐만 아니라, 에탄올 대사를 보완하여 생체를 보호하는 항상성에도 중요하게 관여한다고 하겠다. 그러나 catalase는 지질과산화물 분해에 이용되거나 peroxisome의 H₂O₂ 생성계의 존재 하에서 에탄올을 산화시키는 것으로 보고되었다.⁵²⁾ 그러나 에탄올 투여가 catalase 활성의 변화에 그다지 영향을 주지 않는다는 보고도 있다.⁵³⁾ 본 실험

의 경우 혈장에서 지질과산화물 함량의 증가를 보인 엽산 결핍군들과 에탄올과 함께 엽산을 공급시킨 EF군에서 catalase 활성이 유도된 것으로 보아서 지질과산화물 함량의 변화와 관련성이 있는 것으로 여겨진다.

간 세포질의 SOD 활성은 전 군에서 유의적인 차이가 없었고 GSH-Px는 에탄올 급여군이 각각의 pair-fed군에 비하여 유의적으로 낮은 활성을 보였으며 특히 에탄올과 함께 엽산을 섭취한 EF군에서 가장 낮은 활성을 나타내었다. 그리고 GST 활성은 전 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. SOD는 metalloenzyme로서 O₂²⁻를 H₂O₂로 전환시켜 에탄올 대사시 생성되는 oxygen radical의 축적을 막는다.⁵⁶⁾ 20%의 에탄올 액체식을 섭취시켰을 때 시간이 경과함에 따라 생성된 O₂ 대사에 SOD가 소모되어 그 활성이 저하되었다.⁵⁴⁾ 식이내 엽산 결핍이 SOD 활성 저하를 유도시킨다는 Huang 등⁵⁾의 보고에서도 유사한 수준의 엽산 공급군 (2 mg/kg diet)에서는 SOD 활성에 유의적인 차이가 없었다. GSH-Px 활성은 catalase와 마찬가지로 H₂O₂를 H₂O로 환원시켜 주는 주 효소로서 세포를 산화적 손상으로부터 보호하며 기질로 glutathione (GSH)을 이용한다.⁵⁵⁾ 만성적으로 20%의 에탄올을 공급했을 때 GSH-Px의 활성이 증가되었으나 보다 많은 양의 에탄올을 급여시 활성이 낮게 나타났으며, 이때 감소된 GSH-Px 활성은 acetaldehyde와의 결합으로 효소 활성이 감소되었거나 또는 에탄올 섭취에 따른 조직내의 GSH 감소에 의해 저하되었다고 보고되었다.⁵⁶⁾ 본 실험에 있어서도 에탄올을 급여시킨 ED와 EF군이 각각의 pair fed군에 비해서 GSH-Px 활성이 낮았고 엽산 결핍의 영향은 없는 것으로 나타났다. GST는 에탄올로 유도 생성된 free radical과 GSH의 결합을 촉매하는 생체내 항산화 효소로서 에탄올 섭취 수준에 의존적으로 GSH와의 결합도 증대되어 간 조직의 함량을 감소시켜 GST 활성이 감소되는 반면에, 만성적으로 섭취했을 때는 GSH 합성의 증가를 유도한다고 한다.⁵⁷⁾

4. 혈장과 간조직 중의 비타민 A와 E 함량

혈장 retinol 함량과 간 조직의 retinol과 retinyl palmitate 함량은 Fig. 2와 3에 나타내었다. 혈장 retinol 함량은 엽산의 공급 유무와 상관없이 에탄올 급여군인 ED와 EF군이 각각의 pair-fed군에 비하여 유의적으로 낮은 함량을 보였다. 간 조직내 retinol 함량은 엽산 결핍군에서는 에탄올 급여군인 ED군이 pair-fed군인 PD군에 비하여 유의적으로 현저히 낮은 함량을 보였으나 엽산 보충군에서는 에탄올 급여군과 pair-fed군 간에 유의적인 차이를 보이지 않아서 엽산 식이가 간조직 retinol 함량의 저하에 대

하여 보호효과를 보였다. 간조직 retinyl palmitate 함량 역시 엽산의 보충 유무와 상관없이 에탄올 급여군이 pair-fed군에 비하여 유의적으로 낮은 함량을 나타내었다.

Sato와 Lieber⁵⁸⁾는 36% 에탄올 액체식이를 4주 동안 공급 후 간에 저장된 비타민 A가 59%나 감소했다고 하며, Rosenblum 등⁵⁹⁾은 만성적으로 36% 에탄올 액체식이를 쥐에게 급여했을 때, retinyl acetate를 권장량의 10배로 섭취시켜도 고환에서는 지질과산화물의 함량이 증가와 함께 간 조직내의 비타민 A 함량이 저하되었다고 보고하였다. 또 Kim 등⁶⁰⁾의 연구에서 36%의 액체식이를 공급한 쥐에게서 비타민 A의 현저한 감소를 가져왔으며 간의 총 retinoids, retinol, retinyl palmitate와 oleate가 급격히 감소하였다고 하였다. 특히 체내에 저장된 형태의 80% 정도가 retinyl palmitate로 에탄올에 가장 민감한 반응을 보인다고 하였다. 본 실험에 있어서도 지질과산화물 함량이 높은 에탄올 급여군인 ED와 EF군이 각각의 pair-fed군에 비해서 비타민 A의 함량이 낮았으며 엽산의 공급으로 혈장 비타민 A 함량에는 영향을 주지 않았으나 간조직 내 retinol의 소모를 막을 수 있었다.

만성적인 에탄올 섭취로 인한 혈장과 간 조직내 비타민 E 함량은 Fig. 4에서와 같다. 혈장내 비타민 E 함량은 엽산을 결핍시킨 군 중 에탄올 급여군인 ED군이 pair-fed

군인 PD군에 비하여 유의적으로 낮았으며 엽산을 보충시킨 군에서는 에탄올에 의한 비타민 E 감소현상은 나타나지 않았다. 간조직 내 비타민 E 함량은 전 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다.

비타민 E의 주된 기능은 다른 항산화제 보다 더 효과적으로 free radicals 생성을 억제하고 중화시켜 지질과산화물을 통제하므로 생체의 방어기전에 중요한 역할을 한다.⁶¹⁾ 그러나 에탄올 중독자들을 대상으로 혈청 α -tocopherol 함량을 조사한 결과 정상인에 비하여 낮은 것으로 나타났다.³⁾ 에탄올에 의한 조직내 α -tocopherol 함량의 저하 원인은 에탄올이 비타민 E 흡수와 수송의 주요인자인 chylomicron과 lipoprotein 합성과 분비를 감소시키기 때문이라는 보고⁶²⁾가 있고, 또 에탄올 섭취로 인한 과량의 acetaldehyde 생성에 따라 free radicals와 지질과산화물이 증가되고, 이에 대한 항산화 방어계의 활성화로 인해 체내 항산화 영양소의 요구량이 증가되기 때문에 비타민 E의 부족현상이 일어날 수 있다고 본다.⁶³⁾ 본 실험의 경우 지질과산화 함량이 증가된 에탄올 급여군에서 혈장내 비타민 E 함량이 저하되는 것으로 보아서 지질과산화물과 항산화효소계 변화로 인한 비타민 E 저하현상으로 볼 수 있다.

요 약

본 연구는 만성적인 에탄올 섭취시 엽산 결핍이 체내 콜레스테롤 함량과 항산화계에 미치는 영향을 조사하고자 Sprague-Dawley종 흰쥐에게 총 열량의 36%에 해당하는 에탄올을 함유한 액체식이를 4주간 급여하였다. 본 실험에서 얻은 결과는 다음과 같다.

일일 체중증가량과 사료효율은 알코올 급여군이 각각의 pair-fed군보다 낮았고 엽산 공급의 유무에 따른 영향은 없었다. 총 콜레스테롤 함량은 엽산 결핍과 함께 에탄올을

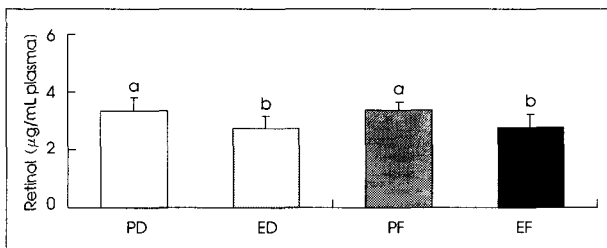


Fig. 2. Effect of folate deficiency on plasma levels of retinol of ethanol-fed rats. See the legend of Table 2. Values with the same superscript letter are not significantly different ($p < 0.05$).

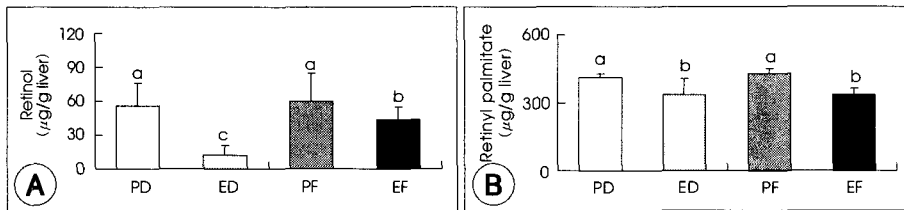


Fig. 3. Effect of folate deficiency on hepatic levels of retinol (A) and retinyl palmitate (B) of ethanol-fed rats. See the legend of Table 2. Values with the same superscript letter are not significantly different ($p < 0.05$).

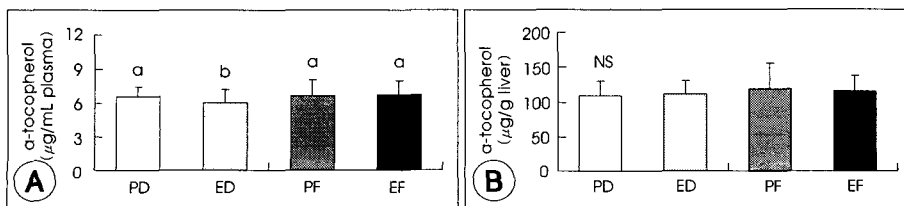


Fig. 4. Effect of folate deficiency on plasma (A) and hepatic (B) levels of α -tocopherol of ethanol-fed rats. See the legend of Table 2. Values with the same superscript letter are not significantly different ($p < 0.05$).

급여시킨 ED군과 pair-fed군인 PD군 사이에는 유의적인 차이가 없었으나 엽산과 함께 에탄올을 급여시킨 EF군이 pair-fed군인 PF군보다 유의적으로 높았다. HDL-콜레스테롤 함량과 HDL/총 콜레스테롤 함량은 전 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 혈장내 지질과산화물 함량은 엽산 결핍군인 PD와 ED군 모두 높았으며 엽산급여군에서는 에탄올을 급여한 EF군 pair-fed군인 PF군에 비해 유의적인 증가를 보여서 에탄올에 의한 지질과산화물 함량 증가에 엽산 공급이 아무런 도움을 주지 못한 것으로 나타났다. 간 마이크로솜 내 지질과산화물 함량 역시 혈장내 지질과산화물 함량과 동일한 경향으로 에탄올 급여로 증가된 지질과산화물 함량에 대하여 엽산이 별다른 효과를 보이지 않았다. ADH 활성도는 전군에서 유의적인 차이가 없었고 catalase 활성도는 엽산을 결핍시킨 PD와 ED군과 에탄올 급여와 함께 엽산을 공급한 EF군이 pair-fed군인 PF군에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였다. 간 세포질에서 SOD 활성은 전 군에서 유의적인 차이가 없었고 GSH-Px 활성은 에탄올 급여군이 각각의 pair-fed군에 비하여 유의적으로 낮은 활성을 보였으며 특히 에탄올과 함께 엽산을 공급한 EF군에서 가장 낮은 활성을 나타내었다. 그리고 GST 활성은 전 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다.

혈장내 retinol 함량은 엽산의 공급 유무와 상관없이 에탄올 급여군인 ED와 EF가 각각의 pair-fed군에 비하여 유의적으로 낮은 함량을 보였다. 간조직 내 retinol 함량은 엽산 결핍군에서는 에탄올 급여군인 ED군이 pair-fed군인 PD군에 비하여 유의적으로 낮은 함량을 보였으나 엽산 공급군에서는 에탄올에 의한 retinol 함량 저하에 대하여 엽산이 보호효과를 보였다. 간조직 내 retinyl palmitate 함량 역시 엽산의 공급 유무와 상관없이 에탄올 급여군이 비급여군에 비하여 유의적으로 낮은 함량을 나타내었다. 혈장내 비타민 E 함량은 엽산을 결핍시킨 군 중 에탄올 급여군인 ED군이 pair-fed군인 PD군에 비하여 유의적으로 비타민 E 함량이 낮았으며 엽산을 공급시킨 군에서는 에탄올 급여군과 pair-fed군 사이에 유의적인 차이가 없었다.

이상의 결과를 통해서 볼 때 에탄올 급여시 혈장 내 콜레스테롤 함량은 엽산 섭취에 의해 증가되었으나 지질과산화물과 항산화 효소 및 항산화 영양소의 변화에 대하여 엽산 결핍이 에탄올 섭취에 의해 변화된 항산화제의 손상을 더욱 가중시키는 경향이 있는 것으로 나타났다.

Literature cited

- 1) Lewis CA, Pancharuntti N, Sauberlich HE. Plasma folate adequacy as determined by homocysteine level. *Ann NY Acad Sci* 669: 360-362, 1992
- 2) Zimmermann MB, Shane B. Supplemental folic acid. *Am J Clin Nutr* 58: 127-128, 1993
- 3) Koo BK, Chung JM, Lee HS. Biochemical evaluation of nutritional status of vitamins and minerals in patients with alcoholic liver disease. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 27: 1244-1252, 1998
- 4) Shaw S, Jayatilleke E, Herbert V, Colman N. Cleavage of folates during ethanol metabolism. *Biochem J* 257: 277-280, 1989
- 5) Health and social welfare review. Korean Institute for Health and Social affairs, 1996
- 6) Seo JS. Hepatotoxicity induced by ethanol consumption and nutritional effects. *J East Society of Dietary Life* 5(3): 371-384, 1995
- 7) Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, Chandler CJ. Metabolic interactions of alcohol and folate. *Am Soc Nutr Sci* 132: 2367S-2372S, 2002
- 8) Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, Niemel O, Parkkila S, Garrow TA, Wallock LM, Shigenaga MK, Melnyk S, James SJ. Folate deficiency disturbs hepatic methionine metabolism and promotes liver injury in the ethanol-fed micropig. *Proc Natl Acad Sci* 99: 10072-10077, 2002
- 9) Huang R-FS, Hsu YC, Lin HL, Yang FL. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J Nutr* 131: 33-38, 2001
- 10) Halsted CH. Folate deficiency in alcoholism. *Am J Clin Nutr* 33: 2736-2741, 1980
- 11) Boushey CJ, Beresford SAA, Omen GS, Motulsky AGA. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *J Am Med Assoc* 274: 1049-1057, 1995
- 12) Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 354: 407-413, 1999
- 13) Pietrzik K, Bronstrup A. Folate in preventive medicine: A new role in cardiovascular disease, neural tube defects and cancer. *Ann Nutr Metab* 41: 331-343, 1997
- 14) Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'agostino RB, Wilson PWF, Belanger AJ, O'leary DH, Wolf PA, Rush D, Schaefer EJ, Rosenberg IH. Relationship between plasma homocysteine, vitamin status and extracranial carotid-artery stenosis in the Framingham study population. *J Nutr* 126: 1258S-1265S, 1996
- 15) Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. The cell-damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress. *Toxicology* 123: 33-40, 1997
- 16) Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e) inemia. *J Clin Invest* 98: 5-7, 1996
- 17) Olszewski AJ, McCully K. Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. *Free Radic Biol Med* 14: 683-693, 1993
- 18) Blundell G, Jones BG, Rose FA, Tudball N. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. *Atherosclerosis* 122: 163-172, 1996
- 19) Jones BG, Rose FA, Tudball N. Lipid peroxidation and homocysteine induced toxicity. *Atherosclerosis* 105: 165-170, 1994
- 20) Jacob RA, Wu MM, Henning SM, Swendseid ME. Homocysteine increases as folate decreases in plasma of healthy men during short-term dietary folate and methyl group restriction. *J*

1) Lewis CA, Pancharuntti N, Sauberlich HE. Plasma folate ade-

- Nutr* 124: 1072-1080, 1994
- 21) Berwanger CS, Jeremy JY, Stansby G. Homocysteine and vascular disease. *Br J Surg* 82: 726-731, 1995
 - 22) Swain RA, Clair LS. The role of folic acid in deficiency states and prevention of disease. *J Fam Pract* 44: 138-144, 1997
 - 23) Lieber CS, Decarli LM. The feeding of ethanol in liquid diets. *Exp Res* 10: 550-553, 1986
 - 24) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-361, 1979
 - 25) Koivula T, Koivusalo M. Different from of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochem Biophys* 397: 9-16, 1975
 - 26) Aebi H. Catalase. *Methods of enzymatic analysis*. 2nd edition by Han Ulrich Bergmeyer., pp.673-684, 1974.
 - 27) Winterbourn CC, Hawkins RE, Brain M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 85: 337-344, 1975
 - 28) Paglia DE, Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Lab Clin Med* 70: 158-169, 1967
 - 29) Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Com* 71: 952-958, 1976
 - 30) Habig WH, Pbst MJ, Jabby WB. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step mercapturic acid formation. *J Bio Chem* 249: 7130-7139, 1974
 - 31) Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis FA, Raxdall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-272, 1951
 - 32) Bieri JG, Tolliver TJ, Catilgnani GL. Simultaneous determination of tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *J Clin Nutr* 32: 2143-2149, 1979
 - 33) Furr HC, Amedee-Manesme O, Olson JA. Gradient reversed-phased high-performance liquid chromatographic separation of naturally occurring retinoids. *J Chromato* 309: 299-307, 1984
 - 34) Rao GA, Sankaran H, Larkin EC. Rat models for chronic alcohol consumption. *J Nutr* 118: 799-804, 1988
 - 35) Pikaar NA, Wedel M, Vander Beek EJ, Van DW, Kempen HJ, Klufft C, Ockhuizen T, Hermus RJ. Effects of moderate alcohol consumption on platelet aggregation fibrinolysis and blood lipids. *Metabolism* 36: 538-544, 1987
 - 36) Lieber CS. Perspective-Do alcohol calories count? *Am J Clin* 4: 976-984, 1991
 - 37) Chang NS, Kim YS. Effects of dietary folate intake on plasma and tissue folate concentration in rats. *Kor J Nutr* 31: 271-278, 1998
 - 38) Lieber CS. *Medical and nutritional complications of alcoholism: mechanism and management*, pp.579, Plenum press, New York, 1992.
 - 39) Gorden T, Castell UP, Hortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham study. *Am J Med* 62: 707-714, 1977
 - 40) Chang NS, Kim KN, Kim YS, Seo JB, Kwon OO. Effects of alcohol administration and dietary folate on plasma homocysteine and liver histopathology. *Kor J Nutr* 31: 1121-1129, 1998
 - 41) Lieber CS. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* 106: 1085-1093, 1994
 - 42) Nordmann R, Ribiere C, Rouach H. Implication of free radical mechanism in ethanol-induced cellular injury. *Free Rad Biol Med* 12: 219-228, 1992
 - 43) Cederbaum AI. Role of lipid peroxidation and oxidative stress in alcohol toxicity. *Free Rad Biol & Med* 7: 537-541, 1989
 - 44) Antonenkov VD, Panchenko LF. Effect of chronic ethanol treatment under partial catalase inhibition on the activity of enzymes related to peroxide metabolism in rat liver and heart. *Int J Biochem* 20: 823-830, 1988
 - 45) Figueroa RB, Klotz AP. Alterations of liver alcohol dehydrogenase and other hepatic enzymes in alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 43: 40-48, 1962
 - 46) Mezy E, Tobon F. Rate of ethanol clearance and activities the ethanol-oxidizing enzymes in chronic alcohol patients. *Gastroenterology* 62: 707-713, 1971
 - 47) Figueroa RB, Klotz AP. Alterations of alcohol dehydrogenase and other hepatic enzymes following oral alcohol intoxication. *Am J Clin Nutr* 11: 235-241, 1962
 - 48) Lieber CS, Decarli LM. Ethanol oxidation by hepatic microsomes. *Hepatology* 162: 917-926, 1968
 - 49) Antonenkov VD, Panchenko LF. Effect of chronic ethanol treatment under partial catalase inhibition on the activity of enzymes related to metabolism in rat liver and heart. *Int J Biochem* 20: 823-830
 - 50) Oh SI, Park JS, Park YC, Kim CI, Park SC. Effect chronic ethanol administration on oxidative stress and cellular defense system in rat myocardium. *Kor J Nutr* 29: 721-728, 1996
 - 51) Fashimi HD, Kino LH, Thorp K, Albelman WH. Increased myocardial catalase in rats fed alcohol. *Am J Pathol* 96: 373-380, 1979
 - 52) Ribiere C, Hininger I, Rouach H, Nordmann R. Effects of chronic ethanol administration on free radical defense in rat myocardium. *Biochem Pharmacol* 44: 1495-1503, 1992
 - 53) Rieber C, Sincour J, Nordmann JA, Nordmann R. Discrepancy between the different subcellular activities of rat liver catalase and superoxide dismutases in response to acute ethanol administration. *Alcohol & Alcoholism* 20: 13-21, 1985
 - 54) Nadkarni GD, D'Souza NB. Antioxidant and free radical scavenging enzymes in chronically ethanol-consuming rats; controversy over hepatic lipid peroxidation. *Drug Alcohol Depend* 22: 161-168, 1988
 - 55) Tauchi K, Tautsumi Y, Tsukamoto H, Hasegawa H, Yoshimura S, Watanaba K. Glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase, class α , in rat intestine. *Jap Soci Patho* 41: 573-580, 1991
 - 56) Schisler NJ, Singh SM. Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free radicals. *Free Rad Biol Med* 7: 117-121, 1989
 - 57) Pierson JL, Mitchell MC. Increased hepatic efflux of glutathione after chronic ethanol feeding. *Biochem Pharmacol* 35: 1533-1541, 1986
 - 58) Sato, M, Lieber CS. Hepatic vitamin A depletion after chronic ethanol consumption in baboons and rats. *J Nutr* 111: 2015-2022, 1981
 - 59) Rosenblum ER, Gavaler JS, Van Thiel DH. Vitamin A at pharmacologic dose ameliorates the membrane lipid peroxidation

- injury and testicular atrophy that occurs with chronic alcohol feeding in rats. *Alcohol & Alcoholism* 22: 241-250, 1987
- 60) Kim CI, Leo MA, Lowe N, Lieber CS. Effects of vitamin A and ethanol on liver plasma membrane fluidity. *Hepatology* 8: 735-741, 1988
- 61) Horwitt MK. Data supporting supplementation of humans with vitamin E. *J Nutr* 121: 424-429, 1991
- 62) Traber MG, Lane JC, Lagmay NR, Kayden HJ. Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins. *Lipids* 27: 657-663, 1992
- 63) Skol RJ. The coming age of α -tocopherol. *Hepatology* 9: 649-654, 1989