

식이에 첨가한 Conjugated Linoleic Acid (CLA)가 만성적으로 알코올을 섭취한 쥐에서 간조직의 항산화 체계에 미치는 영향*

김세나 · 김민석 · 박현서[§]

경희대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effects of Dietary Conjugated Linoleic Acid (CLA) on Antioxidant System in the Liver of Chronically Ethanol-Treated Rats*

Kim, Se-Na · Kim, Min-Seok · Park, Hyun-Suh[§]

Department of Food & Nutrition, Kyung Hee university, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT

The study was designed to observe antioxidant activities of conjugated linoleic acid (CLA) by determining antioxidant enzyme protein levels [cytochrome P450 E1 (CYP2E1), Copper, Zinc-superoxide dismutase (CuZn-SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase (GST)] by Western blot analysis and the levels of α -tocopherol and 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the liver of chronically ethanol-treated rats. Sixty Sprague Dawley male rats were divided into 3 groups (Control, EtOH, EtOH+CLA). All rats were fed Lieber-DeCarli liquid diet for 4 weeks by pair-feeding against the EtOH group. The liquid diet was supplemented with 1.77g CLA mixture per kg diet in the EtOH+CLA group. Isocaloric maltose dextrin was added in replace of 50g ethanol (36%kcal) for the Control group. Ethanol ingestion significantly increased the levels of CYP2E1 protein and TBARS, but significantly reduced CuZn-SOD protein level and increased GST protein level. There was no significant effect on the level of GSH-Px protein and α -tocopherol in the liver by ethanol. CLA supplementation with ethanol significantly increased the levels of CuZn-SOD, GSH-Px and GST and also significantly attenuated TBARS level, whereas there was no significant effect on the levels of CYP2E1 protein and α -tocopherol by CLA. Overall, the CLA supplemented to ethanol could significantly increase the levels of CuZn-SOD, GSH-Px and GST proteins and reduce the level of TBARS in the liver of chronically ethanol-treated rats. (*Korean J Nutrition* 40(2): 105~110, 2007)

KEY WORDS : CLA, ethanol, lipid peroxide, α -tocopherol, antioxidant enzymes.

서 론

최근 보고된 자료에 의하면 한국인의 음주율이 점차 증가하고 이는 알코올성 간질환 발병도 증가시킬 것이라고 보고하였다.¹⁾ 체내에서 일차적으로 알코올을 대사시키는 기관인 간에서는 주로 alcohol dehydrogenase (ADH)경로와 microsomal ethanol oxidizing system (MEOS)경로를 통해 acetaldehyde로 산화된다.²⁾ ADH경로와는 다르게 MEOS 경로에 의해서는 다량의 알코올 섭취에 의해

cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)가 유도되고, reactive oxygen species (ROS) 생성을 증가시켜 조직에 손상을 주게 된다.³⁾ 이와 같이 간 조직은 알코올에 의한 직접적인 영향과 그 대사산물에 의한 간접적인 영향으로 인해 특히 지방산 합성을 증가시켜 지방간을 유발시키고 심하면 알코올성 간염이나 간경화증을 일으킬 수 있다고 보고되었다.⁴⁾ 신체의 정상적인 생리 상태에서는 ROS의 생성과 이를 방어하는 체계가 균형을 이루고 있고 이러한 균형이 깨어진 상태를 산화적 스트레스라고 한다.⁵⁾ 그러나 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase (GST)와 같은 항산화 효소체계가 ROS를 효과적으로 제거 할 수 있으며, 항산화 영양소를 섭취하였을 때에도 ROS를 제거하여 질환에 대한 예방적인 역할을 한다고 보고되었다.⁶⁾

필수지방산인 linoleic acid (C18 : 2, n-6, LA)의 이성

접수일 : 2007년 1월 11일

채택일 : 2007년 3월 6일

*Supported by the Kyung Hee University Research Fund in 2005 (KHU-20050419).

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail : hspark@khu.ac.kr

체로서 conjugated linoleic acid (CLA)의 항산화 작용에 관한 명확한 기전이 밝혀지지 않았지만 CLA가 지질 과산화물 생성을 억제시키는 효과는 α -tocopherol보다 강하며 butylated hydroxytoluene (BHT) 만큼 효과적이었다고 보고되었다.^{7,8)} 이러한 항산화 기능 이외에 CLA는 체지방량을 효과적으로 감소시킨다는 보고도 있었다.⁹⁾

그러므로 본 연구에서는 항산화 작용이 탁월한 CLA를 알코올과 같이 공급함으로써 만성적인 알코올 섭취로 유발된 간조직의 지방축적과 산화적 스트레스 및 지질과산화물 형성에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험식이

Sprague Dawley 중 수컷 쥐 60마리를 3일간 고형 사료로 적응 시킨 후 체중 (평균 체중 145~155 g)에 따라 난괴법에 의해 3군 (Control군, EtOH군, EtOH + CLA군)으로 나누어 Lieber-DeCarli liquid diet (Dyets, Inc., Bethlehem, CA, USA)를 ad libitum으로 자유롭게 4주 동안 공급하였다. 이때 사료 중 알코올 함량은 점진적으로 높이면서 적응시켜 최종적으로 사료 1,000 g 중 50 g의 알코올을 첨가한 (약 36%kcal) 사료로 사육하였다.¹⁰⁾ Table 1에서와 같이 알코올이 함유되지 않은 대조군의 사료는 알코올 대신 같은 열량의 maltose dextrin으로 대체하였다. 모든 군에서 olive oil 함량으로 총 지방량이 39.9 g이 되도록 조절하였다. 이때 각 군당 액상 사료 1 kg당 linoleic acid 함량이 4.44 g (4%kcal)이 되도록 조절하였으며, CLA첨

Table 1. Composition of experimental diet

Ingredients (g)	Control	EtOH	EtOH + CLA
	g/1,000 g diet		
Casein	41.40	41.40	41.40
DL-Methionine	0.30	0.30	0.30
L-Cystine	0.50	0.50	0.50
Maltose dextrin	115.20	25.60	25.60
Cellulose	10.00	10.00	10.00
Xanthan gum	3.00	3.00	3.00
Corn oil	3.10	3.10	3.37
CLA-rich oil*	-	-	2.33
Olive oil	36.80	36.80	34.20
Minerals-S11018	8.75	8.75	8.75
Vitamins-V10036	2.50	2.50	2.50
Choline bitartrate	0.53	0.53	0.53
Alcohol, 100%	-	50.00	50.00
H ₂ O	777.92	817.52	817.52

*CLA-rich oil contained 76.12% CLA mixture.

가 군에서는 CLA-rich oil (CLA mixture 76.12%) (HK Biotech, Co., Ltd., Gyeongnam, Republic of Korea)을 1 kg 당 2.33 g 첨가하여 순수 CLA mixture가 1.77 g/kg이 되도록 하였다. EtOH군의 동물이 섭취한 사료량을 기준으로 대조군의 동물을 pair-feeding 하였고, 본 연구에 사용된 Lieber-DeCarli liquid diet는 가루 상태로 구입한 후 매일 아침 사료 공급 전 가루 상태에 증류수를 첨가하여 액상 상태로 만들어 사료 1 ml 당 1 kcal가 되도록 제조하였다. 동물 사육실은 온도 22 ± 1°C, 상대습도 50 ± 5%, 12 hr dark-light cycle로 조절하였으며, 매일 같은 시간에 액상 상태로 식이를 공급하였기 때문에 사료 섭취량은 mL로 측정하였고, 체중은 일주일에 한번 같은 시간에 측정하였다.

2. 시료채취

4주간의 실험기간이 끝난 후 동물을 overnight fasting 상태에서 ethyl ether로 마취시킨 후, 복부를 절개하여 간을 적출하여 부착되어있는 지방을 깨끗이 제거한 다음 0.15 M NaCl로 세척 후 여과지로 물기를 제거하였다. 채취한 간의 총 무게를 측정 후 CYP2E1, CuZn-SOD, GSH-Px, GST 효소의 단백질 발현 수준을 측정하기 위해 즉시 전처리를 하였고, 총지방량, 중성지방 (triglyceride), 2-thio-barbituric acid reactive substances (TBARS) 와 α -tocopherol 수준을 측정하기 위해 간 1 g씩 나누어 -80°C에서 저장하였다.

3. 분석방법

1) Total lipids와 triglyceride (TG)

간조직에서 Folch 등¹¹⁾의 방법으로 지질을 추출하여 Frings와 Dunn¹²⁾의 방법으로 total lipid를 정량하였으며, standard로 olive oil (Dyets, Inc., Bethlehem, USA)을 사용하였다. 간 조직의 TG 함량은 지질을 같은 방법으로 추출한 후 Fletcher¹³⁾의 방법으로 정량하였으며 standard로 triolein (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

2) 2-Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)와 α -Tocopherol 함량 측정

간 조직은 isotonic potassium chloride buffer (pH7.4)를 사용하여 10% homogenate를 만든 후 지질과산화물 함량은 thiobarbituric acid (TBA)를 이용한 Ohkawa 등¹⁴⁾의 방법으로 측정하였다. 표준물질로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 시료의 TBARS의 농도를 계산하였다. α -Tocopherol 함량은 같은 방법으로 만든 10% homogenate

에서 Desai¹⁵⁾의 방법으로 정량하였으며, 표준물질로 α -tocopherol (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

3) CYP2E1, CuZn-SOD, GSH-Px, GST 단백질 발현측정

Western blot analysis에 의해서 단백질 발현 정도를 측정하기 위해서 간 조직을 1 g 취하여 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X-100와 protease inhibitor를 함유한 lysis buffer (pH7.34)로 10% (w/v) 균질액을 만들었다. Protein inhibitor로는 20 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml antipain, 10 μ g/ml leupeptin, 5 mM benzamide HCl, 1 mM PMSF를 사용하였다. 균질액을 원심 분리 (15,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C)하여 Bradford¹⁶⁾방법으로 단백질을 정량한 후 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리하여 nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 단백질을 이동시켰다. 그리고 blocking solution (5% skim milk/T-TBS: 0.1% Tween-20 in Tris buffer saline, pH 7.5)에서 overnight하고 각각 CYP2E1 (Stressgene Bioreagents, Victoria, BC, Canada), CuZn-SOD (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA), GSH-Px (Abcam Ltd, Cambridge, UK), GST (Zymed Laboratory, CA, USA)의 primary antibody를 1시간 동안 incubation 시킨다. 그 다음 T-TBS로 세척 후 각각의 primary antibody에 대항하는 anti-rabbit 또는 anti-goat horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody (ZYMED Laboratories, CA, USA)로 1시간 동안 incubation 시키고 T-TBS로 세척한다. McKimm-Breschkin¹⁷⁾ 방법에 의해 3,3',5,5'-tetra methylbenzidine (TMB) substrate kit (Vector Laboratories, Ltd., CA, USA)를 사용하여 감광하였으며 Scion Image (PC version of Macintosh compatible NIH Image) software를 사용하여 정량하였다. 각 단백질의 발현수준은 β -Actin (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA)에 맞추어 표준화 하였으며, 결과는 대조군의 수준을 100%로 간주하고 그 함량 (%)을 계산하였다.

4. 통계분석

결과는 Statistical Analysis Systems (SAS) Statistical software package version 8.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA)를 사용하여 분석하였다. One-way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 Duncan's multiple range test로 분석하였다. 모든 값은 mean \pm SEM으로 표시하고 그 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 식이효율 및 간지표

EtOH군이 섭취한 사료량을 기준으로 pair-feeding 하였기 때문에 사료 섭취량은 모든 군에서 비슷한 수준을 보였으나 체중 증가량은 대조군이 EtOH군과 EtOH + CLA군의 체중보다 유의하게 높았다 (Table 2). 이때 식이 효율을 비교해 보면 대조군에 비해서 알코올을 섭취한 EtOH군과 EtOH + CLA군에서는 유의하게 더 낮았다. 이러한 결과는 사료 섭취량의 감소에 의한 영양결핍을 배제하기 위해 알코올을 열량의 36%를 쥐에게 투여한 후 알코올 투여군과 pair-feeding한 대조군을 비교한 결과 알코올 섭취에 의해 체중 감소와 함께 여러 가지 병리 현상이 나타났다는 보고와도 일치하였다.¹¹⁾ 이러한 체중 감소는 알코올 섭취 시 알코올의 직접적인 독성 효과로 소화율이 감소하고 영양소의 흡수가 저하되어 원활한 영양공급이 이루어 지지 못하기 때문이며 또한 과량의 알코올 섭취는 열 발생을 통해 에너지 소모가 증가되었기 때문이라고 하였다.¹⁸⁾ 본 연구에서 체중 100 g당 간의 무게가 얼마인지를 비교한 간 지표를 보면 대조군에 비하여 알코올을 섭취한 EtOH군과 EtOH + CLA군의 간 지표는 유의하게 더 높았다. 이러한 결과는 다른 연구^{19,20)}에서와 마찬가지로 알코올을 섭취한 쥐의 간 중량이 증가되었다는 보고와 일치하였다. 이러한 간 비대화 현상은 만성적인 알코올 섭취 시에 나타나는 초기 증상의 하나로 간 조직에 지방, 수분, 단백질의 축적으로 인해 세포 용적이 증가된 결과로 보고되었다.²¹⁾

Table 2. Effect of CLA on food efficiency ratio and liver index in chronically ethanol-treated rats

	Control	EtOH	EtOH + CLA
Food intake (ml/day)	58.4 \pm 3.4	60.6 \pm 5.5	58.4 \pm 5.9
Weight gain (g/day)	4.2 \pm 0.5 ^a	3.6 \pm 0.7 ^b	3.7 \pm 0.9 ^b
Food efficiency ¹⁾	0.072 \pm 0.006 ^a	0.059 \pm 0.007 ^b	0.063 \pm 0.011 ^b
Liver index ²⁾	2.80 \pm 0.18 ^b	3.75 \pm 0.30 ^a	3.82 \pm 0.32 ^a

Mean values of each row with different alphabet are significant at $p < 0.05$ (Mean \pm SEM for $n = 20$ per group)

¹⁾g weight gain per ml food intake

²⁾g liver weight per 100 g body weight

Table 3. Effect of CLA on hepatic levels of total lipids and triglyceride in chronically ethanol-treated rats

	Control	EtOH	EtOH + CLA
Total lipids (g/100 g liver)	5.52 ± 0.04 ^a	7.25 ± 0.18 ^b	7.12 ± 0.08 ^b
Triglyceride (g/100 g liver)	4.85 ± 0.04 ^a	6.70 ± 0.18 ^b	6.62 ± 0.18 ^b

Mean values of each row with different alphabet are significant at $p < 0.05$ (Mean ± SEM for $n = 7$ per group)

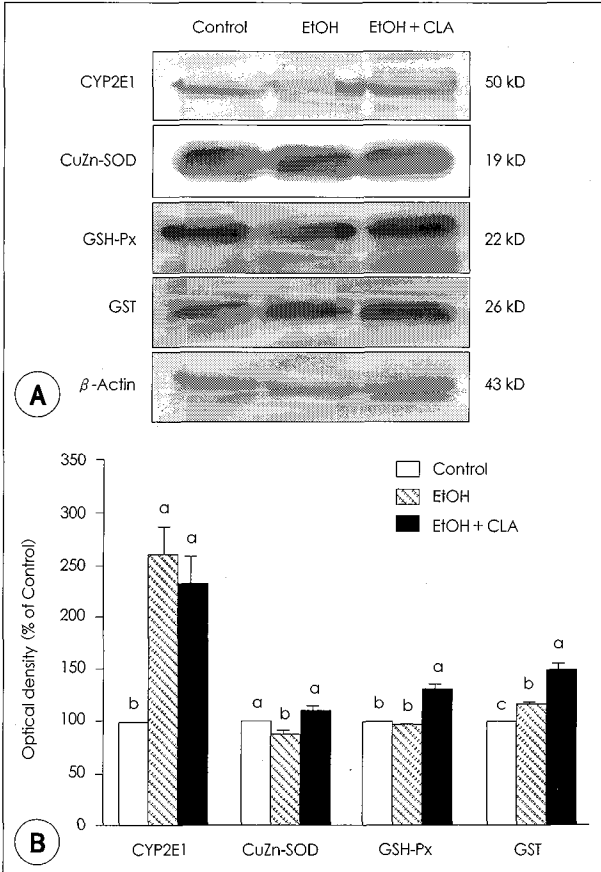


Fig 1. Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on the level of CYP2E1, CuZn-SOD, GSH-Px and GST proteins in the liver of chronically ethanol-treated rats. A: Representative Western blot analysis for CYP2E1, CuZn-SOD, GSH-Px, GST and β -Actin proteins. B: All samples were normalized by comparing them to the respective protein expression level of β -Actin and the control level was set at 100%. Bars with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ (Mean ± SEM for $n = 6$ per group).

2. 간 조직의 총지방량과 중성지방량

일반적으로 다량의 알코올 섭취 시 간질환의 초기증세로 간조직 내 지방이 축적되어 5%가 넘는 경우에 지방간 (fatty liver)이라고 판정하였다.²²⁾ 본 연구에서도 중성지방 축적이 대조군과 비교하여 알코올 섭취에 의해 6.7%로 유의하게 증가되어 알코올성 지방간 상태를 나타내었지만 CLA 처리에 의해서도 축적된 지방량이 감소되는 효과를 보이지는 않았다 (Table 3). 이때 간조직에서 수분과 단백질 등의 다른 요소는 측정하지 않았지만 중성 지방을 측정함으로써 만성적인 알코올 섭취에 의해서 지방간이 유발될 수

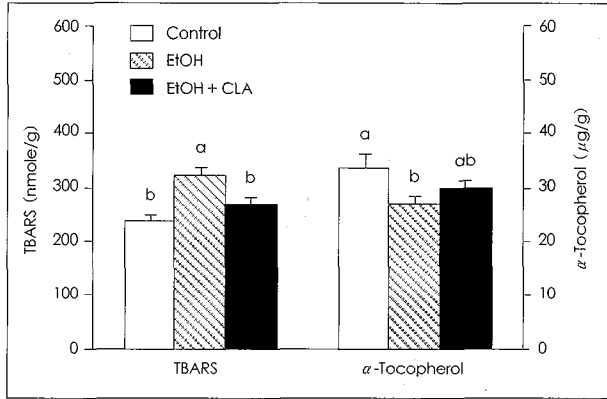


Fig 2. Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on the levels of TBARS and α -tocopherol in the liver of chronically ethanol-treated rats. Bars with different alphabet are significantly different at $p < 0.05$ (Mean ± SEM for $n = 7$ per group).

있었다는 것을 관찰하였으며, 알코올과 함께 CLA를 섭취하여도 지방축적을 억제할 수는 없었다.

3. 항산화 효소계의 단백질 발현 수준

과량의 알코올 섭취로 인해 CYP2E1 단백질 발현 수준이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였고 CLA첨가에 의해 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1). 또한 TBARS 수준이 알코올 섭취에 의해 유의하게 증가되었고 CLA첨가에 따라 유의하게 감소되어 대조군 수준을 유지하였다 (Fig. 2). CYP2E1 단백질 발현은 알코올에 의해 유도되고 이는 알코올에 의한 superoxide anion 등의 ROS 형성과 지질과산화물 형성에 주되게 작용한다고 보고되었다.²³⁾ 최근 연구에서 CYP2E1-knock out mice에 알코올을 처리하였더니 알코올에 의한 산화적 스트레스와 간조직 손상이 wild type mice 보다 적게 나타났음이 보고되었다.²⁴⁾ 이것으로 보아 알코올에 의해 유도된 CYP2E1이 ROS 생성을 촉진하여 간조직 손상 과정에서 주되게 작용한다고 사료된다. 본 연구에서의 알코올 섭취에 따라 증가한 TBARS 수준은 CYP2E1 단백질 발현 수준 증가와 관련있다고 사료된다. Yun과 Park²⁵⁾의 보고에 의하면 CLA는 조직에서 어유 같은 불포화도가 높은 지방을 섭취하여 조직 내 TBARS 생성이 높았을 때는 CLA에 의하여 조직 내 TBARS 함량이 감소되는 항산화작용을 보였으나 쇠기름 같은 지방을 섭취하여 TBARS 생성이 낮았을 때는 CLA를 첨가하여도 항산화 효과를 전혀 보이지 않았다고 하였다. 또한 기

존의 항산화제와 비교하였을 때 CLA의 항산화 능력은 α -tocopherol보다 peroxide 생성을 억제시키는 효과가 더 강력하였으며, BHT 만큼 항산화작용이 효과적이었다.⁷⁾ 이와 같이 알코올로 인해 증가된 지질과산화물을 CLA가 효율적으로 제거하였을 것이라고 본다. 한편, 알코올의 독성 측면에서의 연구를 보면,²⁶⁾ CuZn-SOD knock out mice에서 지질과산화물과 nitrotyrosine 축적이 증가되어 간조직에서 necrosis와 inflammation이 증가되었다. 본 연구에서는 알코올에 의해 CuZn-SOD 단백질 발현이 유의하게 감소되었으나 알코올과 CLA를 함께 공급하였을 때는 유의하게 증가되어 대조군과 같은 수준이었다 (Fig. 1). 이는 과량의 알코올 섭취로 증가된 CYP2E1 단백질에 의해서 superoxide anion 생성이 촉진되고 이에 따라 superoxide anion을 제거하기 위해 CuZn-SOD이 소모됨으로써 조직 내 발현된 단백질량이 더 낮았을 것이라고 사료된다. 그러나 알코올에 CLA를 첨가함으로써 superoxide anion 함량이 낮아졌고 CuZn-SOD이 절약되어 그만큼 단백질 수준이 높았을 것이다. 이것은 Lee와 Chyun²⁷⁾의 연구에서 열량의 36%를 알코올로 공급하면서 β -carotene 첨가 시 얻어진 결과와 유사하였다. Superoxide anion이 CuZn-SOD에 의해 H₂O₂로 대사되면 GSH-Px에 의해 H₂O로 전환된다.²⁸⁾ 본 연구의 결과에 의하면 알코올 섭취에 의해 GSH-Px 단백질 발현은 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1). GST는 지질 과산화물을 제거하는데 작용하는 효소로써²⁹⁾ 알코올 섭취로 인해 GST 단백질 발현은 유의하게 증가되었다 (Fig. 1). 알코올과 CLA를 같이 섭취하였을 때는 GST 단백질 발현은 유의하게 더욱 유도되어 TBARS를 좀더 효율적으로 제거하여 대조군 수준으로 감소시켰다. 그리고 간 조직 내 α -tocopherol 수준은 알코올 섭취에 의해서 유의하게 감소되었는데 이것은 알코올 섭취로 인해 증가된 ROS를 제거하기 위해 α -tocopherol이 소모되었을 것이라고 사료된다. 또한 알코올과 CLA를 함께 공급하였을 때는 CuZn-SOD, GSH-Px, GST 효소들이 모두 증가하여 α -tocopherol 함량에는 영향을 미치지 않았다고 본다. 그러므로 알코올과 CLA를 함께 섭취하면 항산화 효소체계가 향상되어 증가된 ROS를 좀 더 효과적으로 제거함으로써 만성적인 알코올 섭취로 인해 유도된 산화적 스트레스와 알코올 독성으로부터 간조직을 보호할 수 있다고 사료된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 Sprague Dawley 중 수컷 쥐에게 만성적으로 알코올을 과량 섭취시킴으로서 간조직에서 알코올로

인해 유도된 산화적 스트레스가 CLA를 처리함으로써 간조직 내 항산화 효소계의 단백질 발현 및 지질과산화물 형성에 어떠한 영향을 미치는지를 비교 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 알코올 섭취에 의해 사료효율과 체중 증가량 (g/day)이 유의하게 감소되었고 이는 CLA를 함께 섭취함에도 불구하고 유의한 결과가 나타나지 않았다. 간지표는 알코올 섭취로 인해 유의하게 증가하였으며 CLA 첨가에 의해서도 유의하게 감소되지는 않았다.
- 2) 알코올로 인해서 간 조직 내에 중성지방 축적이 유의하게 증가하여 (6.7%) 지방간을 유발 시켰고, CLA를 첨가하여도 중성지방량이 감소되지는 않았다.
- 3) 알코올 섭취로 인해 CYP2E1 단백질 발현이 유의하게 증가되었고 이에 따라 TBARS 수준이 유의하게 증가되었다. CLA 첨가에 의해서 CYP2E1 단백질 수준에는 유의한 변화를 볼 수 없었으나 TBARS 수준은 유의하게 감소되었다.
- 4) 과량의 알코올 섭취에 따라 CuZn-SOD 단백질 발현이 유의하게 감소되었으며 GSH-Px 단백질 발현에는 유의한 변화가 없었다. 그러나 GST 단백질 발현은 유의하게 증가되었다. 알코올과 CLA를 함께 섭취하였을 때는 CuZn-SOD, GSH-Px, GST 단백질 발현이 모두 유의하게 증가되었다.

전체적으로, 본 연구에서는 알코올과 CLA를 함께 섭취함으로써 항산화 효소 체계가 향상되어 알코올로 인해 증가된 free radical을 좀 더 효과적으로 제거하여 산화적 스트레스와 알코올성 독성으로부터 간을 보호할 수 있었으나 간에 축적된 중성지방량을 감소시키지는 않았다.

Literature cited

- 1) 한국의 사회지표. 서울 통계청, 2004
- 2) Lieber CS. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcohol Clin Exp Res* 15 (4) : 573-592, 1991
- 3) Lieber CS. The influence of alcohol in nutritional status. *Nutr Rev* 46 (7) : 241-254, 1988
- 4) Purohit V, Brenner DA. Mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis: a summary of the Rom Thurman Symposium. *Hepatology* 43 (4) : 872-878, 2006
- 5) Lawrence JC, Jill SG, Eric PD, Joyce AD, Donald DL, Mark AY. Effects of antioxidant treatment of streptozotocin induced diabetic rats in endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *Diabetes* 50 (8) : 1927-1937, 2001
- 6) Archer MC. Cancer and diet. Present Knowledge in nutrition 7th ed. ILSI 482-487, 1996-

- 7) Ha YL, Storkson J, Pariza MW. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 50(4): 1097-1101, 1990
- 8) Ip C, Scimeca JA, Thompson H. Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutr Cancer* 24(3): 241-247, 1995
- 9) Park Y, Alright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32(8): 853-858, 1997
- 10) Lieber CS, DeCarli LM. The feeding of ethanol in liquid diet. *Alcohol Clin Exp Res* 10(5): 550-553, 1986
- 11) Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Bio Chem* 226(1): 497-509, 1957
- 12) Frings CS, Dunn RT. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Am J Clin Path* 53: 89-91, 1970
- 13) Fletcher MJ. A Colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin Chim Acta* 22(3): 393-397, 1968
- 14) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2): 351-358, 1979
- 15) Desai ID. Vitamin E analysis methods for animal tissues. *Method Enzymol* 105: 138-147, 1984
- 16) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72(7): 248-254, 1976
- 17) Mckimm-Breschkin JL. The use of TMB for solid phase immunoassays. *J Immunol Methods* 135(1-2): 277-280, 1990
- 18) Rya SY, Kim JH. Effect of chronic alcohol feeding and 2-Acetylaminofluorene treatment on hepatic mitochondrial ATPase activity and membrane lipid composition in rats. *J Korean Soc Food Nutr* 24(6): 867-873, 1995.
- 19) Yamada S, Wilson JS, Lieber CS. The effects of ethanol and diet on hepatic and serum γ -glutamyl transpeptidase activities in rats. *J Nutr* 115(10): 1285-1290, 1985
- 20) Lieber CS, Jones DP, Decarli LM. Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite adequate diets. *J Clin Invest* 44: 1009-1021, 1965
- 21) Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 34(1): 9-19, 2004
- 22) Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 257(1): 59-84, 1997
- 23) Seo JS. Alcohol metabolism and nutritional effect. *Food Ind Nutr* 4(1): 13-19, 1999
- 24) Kono H, Bradford BU, Yin M, Sulik KK, Koop DR, Peters JM, Gonzalez FJ, McDonald T, DiKalova A, Kadiiska MB, Mason RP, Thurman RG. CYP2E1 is not involved in early alcohol-induced liver injury. *Am J Physiol* 277(6): G1259-G1267, 1999
- 25) Yun KM, Park HS. Conjugated linoleic acid supplemented to dietary fat has an antioxidant activities, but it depends on the type of fat in diet. *Korean J Nutr* 34(8): 858-864, 2001
- 26) Kessova IG, Ho YS, Thung S, Cederbaum AI. Alcohol-induced liver injury in mice lacking CuZn-superoxide dismutase. *Hepatology* 38(5): 1136-1145, 2003
- 27) Lee EH, Chyun JH. Effects of β -carotene supplementation on lipid peroxide levels and antioxidative enzyme activities in alcoholic fatty liver rats. *Korean J Nutr* 38(5): 289-296, 2005
- 28) Zidenberg-Cherr S, Keen CL, Lonnerdal B, Hurley LS. Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in the rat: developmental correlations affected by manganese deficiency. *J Nutr* 113(12): 2498-2504, 1983
- 29) Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30(6): 445-600, 1995