

마우스 간의 황함유 아미노산 대사에 미치는 베타인의 용량의존성 영향

김 상 겸[#]

충남대학교 약학대학, 충남대학교 형질전환 복제돼지 센터
(Received December 20, 2008; Revised January 20, 2009; Accepted February 10, 2009)

Dose-dependent Effects of Betaine on Hepatic Metabolism of Sulfur Amino Acids in Mice

Sang Kyum Kim[#]

College of Pharmacy and Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea

Abstract — Acute betaine treatment induces time-dependent changes in the hepatic glutathione (GSH), cysteine and S-adenosylmethionine (SAM) levels. Our previous study demonstrated that betaine administered 1~4 hours prior to sacrifice decreased hepatic GSH levels, but these levels were increased when measured 24 hours following the treatment. The present study was aimed to determine dose-dependent effects of betaine on hepatic metabolism of sulfur amino acid in mice. Mice were sacrificed 2.5 or 24 hours after intraperitoneal treatment with betaine at different dose levels ranging from 50 to 1000 mg/kg. The concentrations of methionine and SAM were increased by a betaine dose of 100 mg/kg, and the concentrations of GSH and cysteine were decreased by a betaine dose of 200 mg/kg at 2.5 hours. These changes were augmented with increasing doses of betaine. At 24 hours following betaine treatment, increased GSH and decreased taurine levels were observed from dose levels of 400 mg/kg. Changes in hepatic activities of cystathionine beta-synthase, gamma-glutamylcysteine ligase and cysteine dioxygenase were observed from dose levels of 200~400 mg/kg of betaine administered 24 hours prior to sacrifice.

Keywords □ betaine, sulfur amino acid, hepatic metabolism, transsulfuration

Betaine(N,N,N-trimethyl glycine)은 choline의 비가역적인 산화과정을 통하여 포유류에서 생성된다. 이 반응은 choline dehydrogenase와 betaine aldehyde dehydrogenase로 구성된 choline oxidase system에 의해 촉매되며 이 효소들의 활성은 간과 신장에서 가장 높다.¹⁾ 간에서 발현하는 betaine homocysteine methyltransferase(BHMT)는 betaine을 methyl group 공여체로 이용하여 homocysteine을 methionine으로 전환시킨다.^{2,3)} Methionine의 섭취가 제한되었을 때 간에서 BHMT의 활성이 증가하여 homocysteine의 methylation을 활성화시킴으로써 methionine의 농도를 유지하는 역할을 수행한다.⁴⁾ Betaine은 심혈관계질환을 유발하는 혈중 homocysteine의 농도를 낮추어 hyperhomocysteinemia 환자의 치료제로 사용되고 있다.⁵⁾

본 연구실에서는 betaine의 급성처리가 chloroform에 의한 간독성에 시간의존적인 변화를 유발함으로 보고하였다.⁶⁾ 16시간

동안 절식시킨 마우스에 betaine을 전처리하고 2시간 후에 0.25 ml/kg 용량의 chloroform으로 간독성을 유발하였을 경우 chloroform의 간독성은 증폭되었으며 반면 betaine을 24시간 전에 처리하였을 때에는 chloroform의 간독성이 억제되었다. 이후 수행된 기전 연구에서 betaine은 chloroform의 대사활성화를 매개하는 cytochrome P450의 활성과 함량에 변화를 유발하지 못하였으며 반면 간의 glutathione(GSH) 농도에 시간의존적인 변화를 유발하였다. Betaine에 의한 GSH의 변화는 GSH 합성의 제한 기질인 cysteine의 유용성 변화를 대표로하는 황함유 아미노산의 대사 변동에 기인한 것으로 평가되었다.⁷⁾ 즉, betaine의 급성처리는 신속하게 간에서 homocysteine의 methylation을 활성화시킴으로써 methionine의 sulfur를 cysteine으로 전달하는 transsulfuration pathway가 억제되고 혈액으로부터 간으로의 cysteine 흡수가 제한되어 간에서 GSH의 합성을 위한 cysteine의 유용성을 감소시켰다. 반면 betaine의 처리 후 24시간에는 methionine의 transsulfuration을 매개하는 cystathionine beta-synthase(CBS)와 GSH 합성의 속도결정단계를 촉매하는 gamma-glutamylcysteine ligase(GCL)의 활성이 증가하고 cysteine으로

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5930 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) sangkim@cnu.ac.kr

부터 taurine으로의 비가역적인 산화반응을 촉매하는 cysteine dioxygenase(CDO)의 활성이 감소함으로써 GSH의 농도가 증가하였다. 또한 betaine을 반복적으로 공급할 경우 급성치리와 동일하게 간에서 S-adenosylmethionine(SAM), S-adenosylhomocysteine(SAH)과 methionine의 농도는 증가하였으나 반면 GSH의 감소는 발생하지 않았다.⁸⁾ 이 결과는 betaine의 반복 공급에 의해 황함유 아미노산 대사에서 적응반응이 발생하였음을 시사하며 실제로 cysteine의 비가역적인 산화반응을 매개하는 CDO의 활성과 taurine의 함량이 반복적인 betaine 공급에 의해 감소하였다. 이상의 결과는 betaine이 간의 황함유 아미노산 대사서 조절자로 기능함을 보인다.

본 연구에서는 betaine의 급성치리에 의한 황함유 아미노산의 대사 변동에서 용량의존성을 마우스에서 평가하는 것을 목표로 하였다. 이를 위하여 betaine을 50, 100, 200, 400과 1000 mg/kg 용량으로 처리하고 2.5와 24시간 후에 betaine에 의해서 변동한 황함유 아미노산과 대사체 농도 그리고 transsulfuration 반응을 매개하는 효소의 활성과 단백질 발현을 측정하였다.

실험 방법

실험동물

중앙 실험동물에서 몸무게가 25g 내외의 웅성 ICR 마우스를 구입하여 2주간 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. 특별한 언급이 없는 한 실험동물은 자유롭게 사료와 물을 섭취하였다. 절식을 시킬 경우 사료를 제거하고 깔짚과 배설물의 섭취를 막기 위해 철망을 깔았다.

시약

Betaine anhydrous, SAM, SAH, amino acid 표준품, taurine, NADPH, GSH, 2-mercaptoethanol, ninhydrin과 O-phthalaldehyde는 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그 외에 분석에 필요한 모든 시약은 reagent grade 또는 그 이상의 품질이었다.

Assays

마우스를 약 16시간 동안 절식시킨 후 betaine을 주사용 증류수에 녹여 50, 100, 200, 400과 1000 mg/kg 용량으로 복강투여하였다. Betaine을 처리한 후 2.5와 24시간에 마우스를 처사시키고 간을 절취하여 황함유 아미노산과 대사체 그리고 관련 효소의 활성과 단백질 발현의 변화를 측정하였다. 마우스를 처사시킬 때까지 절식 상태를 유지하였다.

황함유 아미노산 및 대사체 측정을 위하여 마우스를 ether로 마취를 시키고 심장에서 전혈을 취하고 간을 절취하였다. 간을 ice-cold 1 M perchloric acid 또는 1.15% KCl 용액에서 분쇄하

였다. SAM, SAH, GSH와 cysteine은 perchloric acid를 처리하고 원심분리하여 얻은 상등액을 시료로 사용하였으며 methionine과 taurine은 1.15% KCl 조직분쇄액을 methanol로 재단백하고 원심분리하여 얻은 상등액을 시료로 사용하였다. 자세한 분석 방법은 이전 보고를 따랐다.^{7,8)}

Cysteine의 함량을 측정하기 위해 시료를 10분간 100°C에서 100 μ l의 산성 ninhydrin 용액, 100 μ l의 acetic acid와 100 μ l의 시료를 반응시킨 후 즉시 얼음물로 식혔다. 95%의 ethanol 0.67 ml를 가하여 안정화시키고 20~30분 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

GSH의 함량은 GSH reductase를 이용한 enzyme recycling 방법을 사용하였다. Eppendorf tubes에 0.3 mM NADPH 용액 0.7 ml, 6 mM 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 용액 0.1 ml, 검체 또는 GSH 표준액 0.2 ml를 가하여 잘 섞은 후 상온에서 4분간 방치하였다. 반응액에 12 units/ml 농도의 GSH reductase를 가하고 잘 섞은 후 412 nm에서 약 2분간 흡광도의 변화를 측정하여 linear 한 1분간의 기울기 변화를 구하고 검량선으로부터 GSH의 농도를 계산하였다.

SAM과 SAH은 1-heptanesulfonic acid sodium salt를 사용하여 ion pair시키고 역상 column(3.5 μ m Symmetry C18 column; Waters, Milford, MA, USA)과 UV 검출기(UV-975 UV/VIS detector, Jasco Co., Tokyo, Japan)를 장착한 HPLC system에서 분리 및 정량하였다. 이동상은 18% methanol을 함유한 40 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 와 8 mM 1-heptanesulfonic acid sodium salt의 용액을 사용하였으며 column oven을 이용하여 35°C에서 분석하였다.

Methionine과 taurine의 정량을 위해 O-phthalaldehyde을 이용하여 유도체화하고 역상 column(3.5 μ m Symmetry C18 column; Waters, Milford, MA, USA)과 fluorometric 검출기(RF-10A fluorescence detector, Shimadze, Tokyo, Japan)를 장착한 HPLC를 사용하였다. 0.1 M sodium acetic acid(pH=7.2)와 3%(v/v)의 tetrahydrofuran을 함유한 methanol을 이동상으로 사용하였으며 농도구배를 주기위해 2개의 pump(model LC-10AT, Shimadze, Tokyo, Japan)를 이용하였다.

CBS, GCL과 CDO 활성의 평가를 위하여 전체 간을 절취하여 3배 부피의 homogenizing buffer(1 mM의 EDTA와 50 mM의 Tris-HCl을 포함하는 0.154 M KCl 용액, pH 7.4)에 가하고 테프론 페슬을 이용하여 분쇄하였다. 분쇄한 후 4°C, 10,000 g의 조건에서 high speed centrifuge(Model J2,-MC, Beckman Instruments Inc., California, USA)로 20분간 원심분리하고 상등액을 취하였다. 상등액을 4°C, 105,000 g에서 1시간 동안 ultracentrifuge(Model L80, Beckman Instruments Inc., California, USA)로 초원심분리하고 여기서 얻은 상등액을 시료로 사용하였다.

CBS는 cystathionine, GCL은 gamma-glutamylcysteine 그리고 CDO는 cysteine sulfinic acid의 생성량을 정량하여 측정하였다. Cystathionine과 cysteine sulfinic acid는 *O*-phthaldialdehyde을 이용하여 유도체화하고 역상 column과 fluorometric 검출기를 장착한 HPLC로 분리 정량하였다. Gamma-glutamylcysteine은 monobromobimane을 이용하여 유도체화하고 역상 column과 fluorometric 검출기를 장착한 HPLC로 분리 정량하였다.

Immunoblot 분석을 15 µg의 단백질을 loading buffer에 희석시킨 후 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기연동하고 nitrocellulose membrane(Bio-Rad, Inc., Hercules, CA)로 이동시켰다. 단백질이 결합된 nitrocellulose membrane을 2시간 동안 5% non-fat milk powder를 함유하는 phosphate-buffered saline(pH 7.4)에서 반응시키고 각각의 일차 항체를 가한 후 상온에서 16시간 동안 반응시켰다. 일차 항체가 결합된 nitrocellulose membrane을 3시간 동안 horseradish peroxidase 포함되어 있는 이차 항체와 반응시키고 enhanced chemiluminescence 시약과 Kodak X-OMAT film(Sigma-Aldrich)을 이용하여 단백질을 검출하였다. 검출된 단백질을 정량하기 Molecular Dynamics scanning laser densitometer와 ImageQuant analysis program(Amersham Biosciences, Inc.)을 사용하였다.

통계처리

실험군 사이의 통계적 차이는 ANOVA 후 Dunnett's test로 검사하였다. 모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였다.

실험결과 및 고찰

Betaine에 의해 간의 GSH 농도가 감소한 2.5시간에서 50, 100, 200, 400과 1000 mg/kg 용량의 betaine이 methionine, SAM, SAH, GSH 및 cysteine 함량에 미치는 영향을 마우스에서 측정하였다(Table I). Betaine의 처리는 100 mg/kg 용량부터 methionine, SAM과 SAH의 농도를 증가시켜 betaine이 homocysteine의 methylation 반응을 활성화시켰다. 반면 GSH와 cysteine 농도는 betaine 200 mg/kg 용량에서 유의적으로 감소하였다. 이 결과는 급성적인 betaine의 처리가 간에서 homocysteine으로부터 cysteine으로의 transsulfuration을 억제하였음을 시사한다.

이전 연구에서 1000 mg/kg의 betaine 처리는 24 시간 후에 간에서 GSH의 농도를 증가시켰다.^{6,7} 본 실험에서는 GSH와 taurine의 농도 그리고 CBS, GCL과 CDO의 활성을 측정하여 betaine 용량에 따른 황함유 아미노산의 대사변화를 평가하였다(Table II). Betaine의 처리는 400 mg/kg 용량부터 간의 GSH를 증가시키고 taurine의 농도를 감소시켰다. Betaine에 의한 GSH와 taurine의 변화는 1000 mg/kg의 betaine 처리에 의해 더욱 증가하였다. 간에서 CBS의 활성은 200 mg/kg 용량에서 유의적으로 증가하였으며 반면 CDO의 활성은 200 mg/kg 용량의 betaine 처리에 의해 감소하였다. 또한 GCL의 활성은 400 mg/kg의 betaine에 의해 유의적으로 증가하였다. 이들 효소의 활성 변화는 전반적으로 betaine의 용량 증가에 의존적인 양상을 보였다.

Table I – Changes in hepatic concentrations of methionine, SAM, SAH, GSH and cysteine in mice treated with various doses of betaine 2.5 hours prior to sacrifice

	Methionine (nmole/g)	SAM (nmol/g)	SAH (nmol/g)	SAM/SAH	GSH (µmol/g)	Cysteine (nmol/g)
Control	48.2±4.2	79.1±4.9	31.7±4.4	2.5±0.4	4.56±0.30	145.2±10.0
Betaine (50 mg/kg)	50.1±4.2	86.9±7.1	40.8±8.1	2.1±0.4	4.47±0.60	146.7±7.1
Betaine (100 mg/kg)	55.2±3.4*	92.2±3.4*	48.8±4.6**	1.9±0.1*	4.52±0.47	147.5±14.4
Betaine (200 mg/kg)	58.2±3.2**	92.1±5.7*	40.9±3.5	2.3±0.3	3.52±0.36*	124.4±9.7*
Betaine (400 mg/kg)	57.2±2.1**	94.9±7.4**	45.6±3.8**	2.1±0.1	3.54±0.22*	120.0±3.6*
Betaine (1000 mg/kg)	60.2±3.1**	100.4±7.1**	44.8±7.1**	2.3±0.2	3.17±0.34**	121.7±9.1**

Each value represents the mean±S.D. for 4~6 mice. *,**Significantly different from the control group at $P<0.05$ or $P<0.01$, respectively (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

Table II – Changes in hepatic concentrations of GSH and taurine, and activities of CBS, GCL and CDO in mice treated with various doses of betaine 24 hours prior to sacrifice

	GSH (µmol/g)	Taurine (µmol/g)	CBS (µmol/min/g liver)	GCL (µmol/min/g liver)	CDO (µmol/min/g liver)
Control	3.55±0.34	18.2±1.2	20.2±2.1	3.81±0.31	0.40±0.02
Betaine (50 mg/kg)	3.41±0.21	19.2±1.1	21.3±0.8	3.67±0.27	0.42±0.02
Betaine (100 mg/kg)	3.61±0.31	16.2±2.1	18.1±1.3	3.71±0.21	0.44±0.03
Betaine (200 mg/kg)	3.77±0.20	15.3±3.1	24.2±2.3**	4.12±0.16	0.32±0.07*
Betaine (400 mg/kg)	4.44±0.31*	13.2±1.4**	26.2±1.7**	4.52±0.27**	0.29±0.02*
Betaine (1000 mg/kg)	4.85±0.86**	11.2±0.9**	28.2±1.2**	4.77±0.21**	0.22±0.04**

Each value represents the mean±S.D. for 5~6 mice. *,**Significantly different from the control group at $P<0.05$ or $P<0.01$, respectively (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

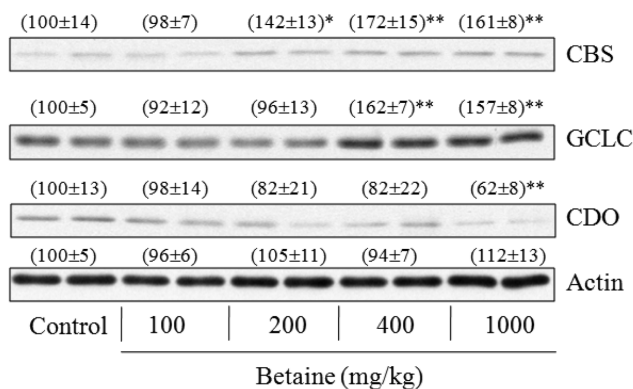


Fig. 1 – Immunoblot analysis of hepatic CBS, CDO, GCLC and actin protein levels in mice treated with various doses of betaine 24 hours prior to sacrifice. Values given in parentheses are percentages of each protein levels monitored in control mice (100%). Each value represents the mean±S.D. for 5~6 mice. *,**Significantly different from the control group at $P<0.05$ or $P<0.01$, respectively (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

CBS, GCL과 CDO의 활성 변화가 단백질의 발현변화에 의해 매개되었는가를 확인하기 위해 이들 단백질의 항체를 이용하여 immunoblot analysis를 수행하였다(Fig. 1). CBS의 발현은 betaine 200 mg/kg 용량부터 증가하였으며 GCL catalytic subunit (GCLC)의 발현은 400과 1000 mg/kg의 betaine에 의해 증가하였다. 반면 CDO의 발현은 1000 mg/kg 용량에서만 유의적으로 감소하여 활성에 비하여 둔감한 반응성을 보였다. 이상의 결과는 betaine에 의한 이들 효소의 발현 변화가 활성의 변화를 매개하였음을 시사한다.

Betaine은 1970년대 말까지 단순한 choline의 배설형으로 평가되었으나 1980년대부터 다양한 활성이 보고되고 있다.⁹⁾ 초기의 연구에서 betaine은 homocysteine의 제거에 기여하는 것으로 보고되어 CBS 등의 유전자 결손에 의한 hyperhomocysteinemia 환자의 치료제로 사용되고 있다.¹⁰⁾ 또한 betaine은 신장과 간에서 삼투압 조절에 관여하는 organic osmolyte로서 작용한다.¹¹⁾ 특히, betaine은 Kupffer 세포의 활성화를 조절하며 lipopolysaccharide 처리나 허혈-재관류에 의한 과도한 염증반응을 억제하여 세포손상을 경감시키는 것으로 보고되었다.^{11,12)} Barak 등은¹³⁾ betaine의 처리가 황함유 아미노산의 대사를 조절하여 ethanol에 의한 독성을 억제함을 보고하였으며 Kaplowitz 등은¹⁴⁾ betaine이 endoplasmic reticulum stress를 억제하여 다양한 원인에 의한 간손상을 억제할 가능성을 제안하였다. 이상의 연구 결과는 betaine이 간독성의 예방 또는 치료의 목적으로 사용될 수 있음을 시사한다.

선행 연구에서 betaine의 반복적인 공급은 설치류에서 chloroform에 의한 급성 간괴사,⁸⁾ alpha-naphthylisothiocyanate에 의한 cholestasis¹⁵⁾ 그리고 lipopolysaccharide에 의한 염증매

개성 간독성을¹²⁾ 억제함을 보고하였다. Betaine 공급에 의한 간보호 효과의 기전은 불분명하나 유허함유 아미노산의 대사를 조절하여 SAM의 농도를 증가시키는 것과 관련이 있는 것으로 제안되고 있다.¹³⁾ 그러나 급성적인 betaine의 처리는 랫트와 마우스의 간에서 GSH 농도를 감소시켜 세포의 항산화체계에 변동을 유발하였으며 결과적으로 산화적 손상에 간세포가 민감하게 반응할 가능성을 시사한다.⁷⁾ 본 연구에서 100 mg/kg 용량의 betaine은 GSH와 cysteine의 감소 없이 효과적으로 SAM과 methionine의 농도를 증가시켰다. 이 결과는 급성적인 투여 조건에서 100 mg/kg 용량이 betaine의 간보호활성 평가에 적절한 용량임을 시사한다. 또한 현재의 연구결과는 betaine의 처리가 약 200 mg/kg 용량에서 간의 GSH 농도를 감소시키며 이 농도는 몸무게 60 kg 성인 기준으로 12 g에 해당된다. Hyperhomocysteinemia 환자에게서 betaine의 치료 용량이 일일 6~9 g임을 고려할 때 GSH의 변화를 유발한 betaine의 용량은 임상적인 적용용량에 근접한다.¹⁶⁾ 이상의 결과는 betaine이 간장질환이나 hyperhomocysteinemia 환자에게 치료의 목적으로 사용될 수 있으나 초기 betaine의 투여 용량의 설정에서 주의가 필요함을 시사한다.

결 론

본 연구에서 betaine의 처리는 용량의존적으로 간의 황함유 아미노산 대사에 변화를 유발하였다. 특히, 간에서 GSH 농도는 200 mg/kg 용량의 betaine에 의해 감소되었으며 이 용량은 hyperhomocysteinemia 환자의 임상적인 적용용량에 근접하였다. 간에서 methionine과 SAM의 농도는 betaine 100 mg/kg 용량부터 유의적으로 증가하여 GSH에 비하여 민감하게 반응하였다. Betaine의 처리는 200~400 mg/kg 용량부터 간의 CBS, GCL과 CDO의 활성에 변화를 유발하였으며 이들 효소의 단백질 발현변화가 효소활성의 변화를 매개하였다. 종합적으로 betaine은 간에서 황함유 아미노산의 대사를 조절하며 betaine의 효과는 약 1 g/kg 용량까지 용량의존적이었다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 형질전환복제돼지 ERC 프로그램(grant R11-2002-100-00000-0)의 지원을 받았다.

참고문헌

- 1) Zeisel, S. H. : Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Annu. Rev. Nutr.* **1**, 95 (1981).
- 2) Mato, J. M., Martínez-Chantar, M. L. and Lu, S. C. : Methionine metabolism and liver disease. *Annu. Rev. Nutr.* **28**, 273 (2008).

- 3) Finkelstein, J. D. : Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin. Chem. Lab. Med.* **45**, 1694 (2007).
- 4) Finkelstein, J. D., Harris, B. J., Martin, J. J. and Kyle, W. E. : Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary methionine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 344 (1982).
- 5) Craig, S. A. : Betaine in human nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 539 (2004).
- 6) Kim, S. K., Kim, Y. C. and Kim, Y. C. : Effects of singly administered betaine on hepatotoxicity of chloroform in mice. *Food Chem. Toxicol.* **36**, 655 (1998).
- 7) Kim, S. K., Choi, K. H. and Kim, Y. C. : Effect of acute betaine administration on hepatic metabolism of S-amino acids in rats and mice. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1565 (2003).
- 8) Kim, S. K. and Kim, Y. C. : Effects of betaine supplementation on hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids in mice. *J. Hepatol.* **42**, 907 (2005).
- 9) Barak, A. J. and Tuma, D. J. : Betaine, metabolic by-product or vital methylating agent? *Life Sci.* **32**, 771 (1983).
- 10) Lawson-Yuen, A. and Levy, H. L. : The use of betaine in the treatment of elevated homocysteine. *Mol. Genet. Metab.* **88**, 201 (2006).
- 11) Häussinger, D. : Neural control of hepatic osmolytes and parenchymal cell hydration. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **280**, 893 (2004).
- 12) Kim, S. K. and Kim, Y. C. : Attenuation of bacterial lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity by betaine or taurine in rats. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 545 (2002).
- 13) Barak, A. J., Beckenhauer, H. C. and Tuma, D. J. : Betaine, ethanol, and the liver: a review. *Alcohol.* **13**, 395 (1996).
- 14) Kaplowitz, N., Than, T. A., Shinohara, M. and Ji, C. : Endoplasmic reticulum stress and liver injury. *Semin. Liver Dis.* **27**, 367 (2007).
- 15) Kim, Y. C., Jung, Y. S. and Kim, S. K. : Effect of betaine supplementation on changes in hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids and experimental cholestasis induced by alpha-naphthylisothiocyanate. *Food Chem. Toxicol.* **43**, 663 (2005).
- 16) Refsum, H., Ueland, P. M., Nygård, O. and Vollset, S. E. : Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu. Rev. Med.* **49**, 31 (1998).