

식이성 비타민 E가 사염화탄소를 투여한 흰쥐의 체내지질성분에 미치는 영향

송가현 · 조수열 · 박미리

영남대학교 식품영양학과

Effect of Dietary Vitamin E on the Lipid Composition of Rats Treated with Carbon Tetrachloride

Ga-Hyun Song, Soo-Yeul Cho and Mi-Lee Park

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyungsan, 713-749, Korea

Abstract

This experiment was conducted to study the effect of dietary vitamin E on the lipid composition of rats treated with carbon tetrachloride. Rats were divided into five groups, i. e., C(soybean oil with vitamin E(40mg/kg diet)), EF(CCl₄ with vitamin E deficient diet), 40E(CCl₄ with vitamin E(40mg/kg diet)), 400E(CCl₄ with vitamin E(400mg/kg diet)), 800E(CCl₄ with vitamin E(800 mg/kg diet)). Body weight gain, and food efficient ratio were not observed significant differences. The liver weight was significantly increased in the CCl₄ treated groups, but the liver weight of 800E group was significantly lower than that of EF group. In EF and 40E groups, kidney weights were significantly higher compared to that of C group. The content of total lipid in liver of 40E and 400E groups were significantly higher than that of control group, but in 400E and 800E groups the contents were significantly lower compared with that of EF group. The content of triglyceride in liver was significantly higher in the CCl₄ treated groups, and the content of cholesterol was significantly higher in the EF and 40E groups, but those of 800E group were significantly lower compared with those of EF group. In CCl₄ treated groups, arachidonic acid and docosahexaenoc acid in fatty acid composition of liver were lower compared to those of control group, but these decreases were modified by dietary supplementation of vitamin E. Activities of ALT and AST in serum of CCl₄ administration groups were significantly higher than those of control group, and 400E and 800E groups were significantly lower than those of EF group.

서 론

산업현장에서 노출의 기회가 많은 사염화탄소는 소화기관과 호흡기관을 통해 주로 흡수되어, 점막에 염증을 일으키고 중추신경계 기능을 억

제하며, 특히 간 조직의 기능장애와 형태학적 변화를 일으킨다¹⁾.

사염화탄소의 독성은 그 자체보다 간조직의 endoplasmic reticulum에서 생성되는 대사산물인 trichloromethyl free radical에 의한 지질과산화로

인해 일어난다^{2,3)}.

비타민 E는 항산화기능을 가지므로 지질과산화에 의한 사염화탄소의 독성을 저하시킬것으로 생각되며⁴⁾, 여러연구에서 식이중의 비타민 E가 사염화탄소에 의한 치사율, 간중의 지질축적, 간괴저 및 다가불포화지방산 손실등에 대해 방어효과가 있음이 밝혀졌다⁵⁻⁷⁾. 그러나 이러한 비타민 E의 방어효과에 대한 연구는 거의 사염화탄소를 1회 투여했을때의 급성중독 실험이며 또한 비타민 E로 전처리했을때의 결과였다.

이에 본 연구에서는 5주간 사염화탄소를 주2회 복강으로 투여함과 동시에 식이로 비타민 E의 함량을 달리하여 급여했을 때, 흰쥐의 체지질 성분의 변화를 측정 고찰함으로써 식이성 비타민 E가 사염화탄소 중독에 미치는 영향을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물은 Sprague-Dawley계 숫쥐를 2주간 기본식으로 적응시킨 후 체중에 따라 9마리씩 5군으로 나누어 임의배치법에 의해 5주간 사육하였다. 실험식은 AIN-76에 의거한 기본식이⁸⁾에 표1과 같이 비타민 E를 dl- α -tocopheryl acetate 형태로 식이 kg당 0, 40, 400 및 800mg을 공급시켰으며 사염화탄소는 콩기름에 희석한 20% 용액을 주2회 복강으로, C군을 제외한 실험군에 체중 kg당 1.5ml를 주사하였고 C군에는 콩기름을 동일하게 주사하였다.

Table 1. Experimental diet

Group	Vitamin E(mg/kg-diet)	CCl ₄
C	40.0	-
EF	0.0	+
40E	40.0	+
400E	400.0	+
800E	800.0	+

CCl₄ was given i.p. as 20% (v/v) solution in soybean oil at a dose of 1.5ml solution/kg (0.3ml of pure CCl₄/kg). C group was given i.p. as soybean oil at a dose of 1.5ml/kg.

5주간 사육한 흰쥐를 에테르로 마취시켜 개복하여 복부대동맥으로 부터 채혈한 후 즉시 간과 신장을 적출하였다. 적출한 간 1g을 glass teflon homogenizer를 사용하여 0.15M 식염수로써 10% (w/v) 마쇄액을 만든 후, Folch법⁹⁾에 따라 지질을 추출하고 간중의 총지질 함량은 Frings와 Dunn의 방법¹⁰⁾, 트리글리세리드 함량은 Muller호소법에 의한 kit(Einken Co.)를 사용하여 측정하였고 총 콜레스테롤 함량은 Zak-Henly방법¹¹⁾으로 측정하였으며 지방산 조성은 Gas chromatography를 이용하였고 그 조건은 표2와 같다.

Table 2. Instrument and operating conditions of gas chromatography

Instrument	Hitachi 163
Detector	F. I. D.
Column support	20% DEGS
Column size	3mm×1m
Column temp.	180-210°C(5°C/min.)
Injection temp.	250°C
Detector temp.	250°C
Carrier gas	Nitrogen(30ml/min.)
Chart speed	10mm/min.
Attenuation	32×10 ²

각 지방산 조성은 chromatogram의 각 peak면적을 총 면적에 대한 백분율로 나타내었다.

혈청 aminotransferase 활성도는 Reitman과 Frankel의 방법¹²⁾에 준해 조제된 Kit(Eiken Co.)을 사용하여 측정하였다.

본 실험에서 얻어진 결과는 평균±표준편차로 표시하였고, 각 군간의 평균치의 통계적 유의성은 Duncan's new multiple range test¹³⁾를 이용하여 5% 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

체중증가량 및 사료효율

체중증가량과 사료효율은 표3과 같다.

체중증가량과 사료효율은 유의한 차이가 없었다. Richard등¹⁴⁾은 쥐에게 50% 사염화탄소 용액을 6주간 주2회 1ml/kg투여시 대조군에 비해

Table 3. Net weight gain and food efficiency ratio

Groups	Net weight gain(g)	F E R
C	90.71± 19.89 ^{N.S.}	0.17± 0.02 ^{N.S.}
EF	75.39± 25.61	0.12± 0.03
40E	85.82± 32.01	0.15± 0.05
400E	87.09± 33.94	0.15± 0.06
800E	87.76± 27.75	0.15± 0.03

Mean± S.D.(n=9).

N.S. : non significant.

체중이 유의하게 감소하였다고 했으며, Trivedi와 Mowat¹⁵⁾도 생후 13일된 쥐에 사염화탄소를 75일간 주2회 0.25ml~0.5ml/kg 투여시 체중증가가 유의적으로 감소하였다고 하였다. 이러한 보고는 본 연구와 일치하지 않았는데, 이는 투여한 사염화탄소의 수준과 실험기간의 차이에 기인한 것이라 사료된다.

간 및 신장중량

간 및 신장중량은 표4와 같다.

간무게(%)에 있어서는 C군에 비해 사염화탄소 투여군에서 유의하게 높았고 EF군에 비해 800E군의 경우 유의하게 낮았다. 사염화탄소를 투여한 군에 있어 간의 중량이 높은 것은 사염화탄소 투여로 인한 간 손상으로 간 세포막 투과성이 증가하여 간성 cytoplasm에서의 부종과 출혈이 유발¹⁶⁾되고, 심한 지방변성으로 간내의 지질성분이 현저하게 축적¹⁷⁾되어 일어난 것으로 사료된다. 또 비타민 E를 공급시킨 군에 있어 간무게가 낮은것은 항산화제인 비타민 E가 지질과산화물의

Table 4. Liver and Kidney weight (%)

Groups	Liver	Kidney
C	2.91± 0.30 ^a	0.65± 0.04 ^a
EF	3.92± 0.78 ^c	0.78± 0.12 ^b
40E	3.57± 0.53 ^{bc}	0.74± 0.07 ^b
400E	3.53± 0.36 ^{bc}	0.71± 0.08 ^{ab}
800E	3.43± 0.23 ^b	0.70± 0.06 ^{ab}

Mean± S.D.(n=9).

Means in the same column not sharing a common superscript letters are significantly different(p<0.05).

축적을 막는 한편 세포막 투과성이 억제됨으로써 부종이 감소되고 또한 트리글리세리드 분해 및 콜레스테롤이 저하¹⁸⁾됨에 의한 것으로 사료된다.

신장은 C군에 비해 EF군과 40E군에서 유의하게 높았고 EF군에 비해서는 비타민 E공급이 증가할수록 낮아지는 경향이였다. 이것은 사염화탄소에 의한 조직손상으로 신장무게가 증가하고¹⁵⁾ 비타민 E에 의해 사염화탄소로 인한 지질과산화가 저하됨으로써 조직손상이 어느정도 완화된 것으로 사료된다.

간 중의 지질 함량

간중의 지질함량은 표5와 같다.

간중의 총지질함량은 C군에 비해 EF, 40E 및 400E군에서 유의하게 높았고 EF군에 비해 400E, 800E군에서 유의하게 낮았다. 트리글리세리드함량은 C군에 비해 사염화탄소 투여군에서 유의하게 높았고 EF군에 비해 800E군에서 유의한 감소를 보였으며, 총콜레스테롤함량은 C군에 비해

Table 5. Contents of total lipid, triglyceride, and total cholesterol in liver (mg/g of wet tissue)

Groups	Total lipid	Triglyceride	Total cholesterol
C	47.59± 10.22 ^a	28.69± 7.70 ^a	2.50± 0.93 ^a
EF	75.13± 18.85 ^c	53.66± 7.43 ^c	3.97± 0.84 ^c
40E	67.06± 17.97 ^{bc}	52.06± 1.04 ^{bc}	3.54± 1.04 ^{bc}
400E	58.04± 5.89 ^b	49.36± 4.91 ^{bc}	3.38± 1.17 ^{abc}
800E	54.63± 11.86 ^{ab}	44.13± 5.21 ^b	2.87± 1.00 ^{ab}

Mean± S.D.(n=9).

Means in the same column not sharing a common superscript letters are significantly different(p<0.05).

Table 6. Fatty acid composition of total lipid in rat liver

(%)

Fatty acid	Groups				
	C	EF	40E	400E	800E
14 : 0	1.16	1.86	1.23	1.21	1.22
16 : 0	28.17	30.20	29.20	28.86	26.90
18 : 0	27.69	33.39	29.12	26.43	25.20
18 : 1	8.26	10.06	10.04	8.77	8.54
18 : 2	17.89	16.40	17.67	18.35	20.94
20 : 4	7.63	5.01	5.30	6.64	6.97
22 : 6	3.32	tr	0.72	2.89	3.13
Unknown	6.05	3.29	6.73	6.85	7.20
Total	100.17	100.21	100.21	100.00	100.10

tr : trace.

EF, 40E군에서 유의하게 높았고, EF군에 비해 800E군에서 유의하게 낮았다. 이는 흰쥐에 50% 사염화탄소 옥수수기름 용액을 3일간 1ml/kg 투여했을 때 간장내의 트리글리세리드, 콜레스테롤 및 총지질의 현저한 축적이 유발된다는 보고¹⁹⁾와, 사염화탄소를 체중100g당 250ml로 투여전에, 단위체중당 250mg의 비타민 E를 공급함으로써 트리글리세리드축적을 어느정도 억제했다는 결과²⁰⁾와 유사하다. 또한 콜레스테롤은 담즙산염으로 전환되어 체외로 배설되는데 Carini 등²¹⁾에 의하면 사염화탄소를 단일 투여한 결과 담즙분비가 현저히 억제되고 비타민 E의 전처리로 사염화탄소에 기인한 과사의 유발 및 담즙분비억제가 감소되었다고 하였는데, 이는 본 실험결과와 유사하였다.

간중의 지방산 조성

간중의 지방산 조성은 표6과 같다.

Palmitic acid(C_{16:0}), stearic acid(C_{18:0}), linoleic acid(C_{18:2}), oleic acid(C_{18:1}), arachidonic acid(C_{20:4}), docosahexaenoic acid(C_{22:6})의 순으로 구성되어있다. 흰쥐에 사염화탄소 투여시 불포화지방산중 다가불포화지방산인 20 : 4와 22 : 6이 감소하였고, 비타민 E 공급에 따라 감소가 억제되었다. Mark 등²²⁾은 대조군과 과산화된 군의 microsomal 지방산 조성을 비교했을 때

다가불포화지방산중 20 : 4와 22 : 6이 감소하고 shorter chain fatty acid가 증가한다고 하였고 Dean 등²³⁾은 비타민 E의 전처리로 사염화탄소를 투여했을 때 ω-3 unsaturated fatty acid의 자동산화물인 ethane의 발생이 18% 정도로 감소되었다고 했다. 이러한 보고는 본 실험의 결과와 유사하다.

혈청 aminotransferase 활성도

혈청 ALT(alanin aminotransferase), AST(aspartate aminotransferase), 활성은 표7과 같다.

혈청 ALT와 AST활성은 C군에 비해 사염화탄소를 공급한 모든 군에서 유의하게 높았고 EF군에 비해 비타민 E공급에 따라 낮아졌으며 특히 400

Table 7. Activities of aminotransferases in serum (Karmen unit/ml of serum)

Groups	A L T	A S T
C	14.00± 3.97 ^a	39.67± 4.00 ^a
EF	60.33± 12.50 ^c	68.11± 10.91 ^c
40E	46.88± 18.68 ^b	61.78± 16.80 ^{bc}
400E	40.78± 19.04 ^b	56.22± 12.18 ^b
800E	44.00± 13.89 ^b	57.89± 6.19 ^b

Mean± S.D.(n=9).

Means in the same column not sharing a common superscript letters are significantly different(p<0.05).

E와 800E군에서는 유의하게 낮았다. ALT와 AST는 간세포에 많이 존재하는 효소로서, 사염화탄소에 의한 간손상으로 세포막 투과성이 항진되어, 세포외로 유출됨으로써 혈중에 증가²⁴⁾되고 비타민 E는 세포막의 산화적 손상을 방어하므로 비타민 E 무첨가군인 EF군의 경우 그 활성이 더욱 증가된 것으로 사료된다.

요 약

콩기름에 희석한 20% 사염화탄소 용액을 흰쥐에 5주간 복강으로 투여하는 동시에 비타민 E를 식이로 체중kg당 0, 40, 400 및 800mg을 투여하였을때 생체내 지질성분의 변화를 관찰하였다.

간 중량은 대조군인 C군에 비해 사염화탄소 투여군에서 유의하게 높았고 비타민 E 무첨가군인 EF군에 비해 800E군에서 유의하게 낮았으며 신장중량은 C군에 비해 EF군과 40E군에 있어 유의하게 높았고, EF군에 비해서는 비타민 E공급이 증가할수록 낮아지는 경향이였다. 간중의 총지질 함량은 대조군에 비해 EF, 40E, 400E군에서 유의하게 높았고, EF군에 비해 400E, 800E군에서 유의하게 낮았으며, 트리글리세리드함량은 대조군에 비해 사염화탄소 투여군에서 유의하게 높았고, EF군에 비해 800E군에서 유의하게 낮았다. 총콜레스테롤 함량은 EF, 40E군이 대조군에 비해서 유의하게 높았고, EF군에 비해 800E군에서 유의한 감소를 보였다. 간의 지방산 조성은 다가불포화지방산인 arachidonic acid와 docosahexaenoic acid가 사염화탄소 투여군에서 감소하였고, 비타민 E 공급이 증가할수록 감소가 억제되었다. 혈청 aminotransferase 활성은 사염화탄소 급여군에서 유의하게 증가되었고, EF군에 비해 400E와 800E군에서는 유의하게 낮았다.

문 헌

1. Edward, J. C. : *Nutrition and Environmental Health*, 555(1980)
2. Raymond, F. B., James, M. L. and Kyledeep, P. : *Relationship of oxygen and glutathione*

in protection against CCl₄-induced hepatic microsomal lipid peroxidation and covalent binding in the rat. *The American Society for Clinical Investigation*. Inc. 74, 1996(1984)

3. Wolf, C. R., Willard, G. H. Jr., Wolfgang, M. N., Richard, M. P., Kalyanaraman, P. B. and Roland, P. M. : Metabolism of carbon tetrachloride in hepatic microsomes and deconstituted monooxygenase systems and its relationship to lipid peroxidation. *Mol. Pharmacol.*, 18, 553(1980)
4. Hove, E. L. : Interrelation between α -tocopherol and protein metabolism. III. The protective effect of vitamin E and certain nitrogenous compounds against CCl₄ poisoning in rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 17, 467(1948)
5. Hove, E. L. and Hardin, J. : Effect of vitamin E, B₁₂, and folacin on CCl₄ toxicology and protein utilization in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 78, 858(1951)
6. Gallagher, C. M. : The effects of antioxidants on poisoning by carbon tetrachloride. *Aust. J. Exp. Biol.*, 40, 241(1961)
7. Francesco, P. C., Sivana, V., Anna, M., Kevin, H. C. and Trevor, F. S. : Lipid peroxidation and molecular damage to polyunsaturated fatty acids in rat liver. Recognition of two classes of hydroperoxides formed under conditions in vivo. *Biochemical. Pharm.*, 34(1), 397(1985)
8. American Institute of Nutrition : Ad. Hoc. Committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, 107, 1340(1977)
9. Folch, J., Lees, M. and Stanley, G. H. S. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497(1957)
10. Frings, C. S. and Dunn, R. T. : A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phosphovanillin reaction. *Am. J. Clin. Path.*, 53, 89(1970)
11. Zak, B. and Dickeman, R. C. : Rapid estimation of free and total cholesterol. *Am. J. Clin. Pathol.*, 24, 1307(1954)
12. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, 28, 56(1957)
13. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. : *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill Book Co., New York.(1980)

14. Richard, A. P., Glaug, M. R., Greco, R. S., Mackenzie, J. W., Boyd, C. D. and Deak, S. B. : Increased procollagen mRNA levels in carbon tetrachloride induced liver fibrosis in rats. *J. Biol. Chem.*, **262**(4), 1652(1987)
15. Trivedi, P. and Mowat, A. P. : Carbon tetrachloride induced hepatic fibrosis and cirrhosis in the developing rat : An experimental model of cirrhosis in childhood. *Br. J. Exp. Path.*, **64**, 25(1983)
16. Masako, O., Furuya, E. and Takako, K. Function of reticuloendothelial system on CCl₄ induced liver injury in mice. *Japan. J. Pharmacol.*, **39**, 503(1985)
17. Siegers, C. P., Paul, V., Korb, G. and Younnes, M. : Hepato protection by malotilate against carbon tetrachloride. Alcohol induced liver fibrosis. *Agents and Action.*, **18**, 516(1986)
18. Machlin, L. J. : *Vitamin E, A comprehensive treatise.*, Marcel Dekker Inc, New York, (1980)
19. 윤종국, 이방자, 김석환 : 저단백식으로 성장한 흰쥐에 사염화탄소 투여가 간 손상에 미치는 영향. *과학논집.* **9**, 159(1983)
20. Benedetti, A., Ferral, M., Chiel, E. and Comporti, M. : A Study of the relationships between CCl₄-induced lipid peroxidation and liver damage in rats pretreated with vitamin E. *Chem. Biol. Interactions.*, **9**, 117(1974)
21. Carini, R., Chiarpotto, E., Biasi, F., Leonarduzzi, G., Conoglio, A., Carpi, C. and Polic, G. : Relation between liver necrosis and intrahepatic cholestasis in rats poisoned with CCl₄. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **63**(3), 273(1987)
22. Mark, J., Gilfor, C. D. and John, A. F. : Lipid peroxidation increase the molecular order of microsomal membranes. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **235**(2), 644(1984)
23. Dean, G. H. and William, G. H. : Protection against carbon tetrachloride induced lipid peroxidation in the rat by dietary vitamin E, selenium and methionine as measured by ethane evolution. *J. Nutr.*, **107**, 656(1977)
24. Bursch, W., Schulte, H. R. : Cytoprotective effect of the prostacyclin derivative Hoprost against liver cell death induced by the hepatotoxins CCl₄ and bromobenzene. *Klin. Wochenschr.*, **47**(1986)

(1990년 4월 4일 접수)