

식이 철 수준과 커피 섭취가 흰쥐의 산화스트레스와 항산화효소 활성화에 미치는 영향

김혜영[§] · 정현선

용인대학교 식품영양학과

Effect of Dietary Iron and Coffee Intake on Oxidative Stress and Antioxidative Enzyme Activities of Rats

Kim, Hye Young P.[§] · Chung, Hyeon Seon

Department of Foods and Nutrition, Yongin University, Kyonggi 449-714, Korea

ABSTRACT

Iron deficiency is a severe nutritional problem in the world. Coffee intake of the people is increasing every year and it can increase the loss of several essential body minerals including iron. Either iron deficiency or coffee intake may increase the oxidative stress of the body. However, the effect of iron deficiency and/or coffee intake on peroxidation have not been studied much. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of coffee intake on oxidative stress and antioxidative enzyme activities of iron-deficient rats. Forty-eight male rats of Sprague-Dawley strain were divided into two groups by dietary iron levels. Iron deficient group were fed 5 ppm iron diet and iron-sufficient group were fed 50 ppm iron diet. Each iron group were divided into three sub-groups by coffee levels (0%, 1%, 4%) included in the experimental diet. The experimental diets were fed for 4 weeks. The hemoglobin level was significantly low in iron deficient group and the level was exacerbated by high coffee intake. The malondialdehyde concentration of the plasma and liver were not affected by iron or coffee level in this study. However, plasma aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase, the indicator of the liver damage, were increased by high coffee intake. The erythrocyte and liver superoxide dismutase (SOD) activities were elevated in iron deficient groups. Coffee intake increased erythrocyte SOD activity in iron sufficient groups. Glutathione peroxidase and catalase activities were not influenced much by either iron or coffee intake. In conclusion, high coffee intake in iron deficiency may not only increase the anemia symptoms, but also may increase the oxidative stress of the body. (*Korean J Nutrition* 35(9) : 919~925, 2002)

KEY WORDS: iron, coffee, oxidative stress, antioxidative enzymes.

서론

커피는 전 세계인의 기호 음료로 우리 나라에서도 일상 생활의 기호음료로 자리잡아서 가정이나 직장 또는 심지어 거리의 자판기에서도 늘 쉽게 접할 수 있다. 커피의 카페인(1,3,7-trimethyl xanthine)은 alkaloid계 화합물로 이노 작용, 흥분 작용, 각성 효과 등 생체에서 여러가지 생리적 작용을 갖고 있다.^{1,2)} 카페인은 체내에 흡수되어 oxidation, demethylation의 대사과정을 거쳐 주요 대사물인 1-methylxanthine, 1-methyluric acid, 1,7-dimethyl-

xanthine, 7-methylxanthine, 1,3-dimethyl uric acid 또는 카페인 그 자체로 소변을 통해 배설된다.^{3,4)}

커피를 섭취하면, 카페인의 이노 작용과 함께 철분을 비롯한 여러 무기질의 배설이 증가될 수 있다. 건강한 여대생에게 카페인을 공급했을 때 뇨중 칼슘, 인, 나트륨, 칼륨 및 철분의 배설량이 높게 나타났다는 보고도 있다.⁵⁾ 특히, 식후의 커피 섭취는 철분 흡수율을 현저히 떨어뜨린다고 보고되었다.⁶⁾

인체의 철 함량은 건강한 성인 남자에서는 평균 3.8 g, 여자에서는 2.3 g 정도이며,⁷⁾ 체내 철의 분포는 헤모글로빈 철로 67%, 저장철로 27%, 미오글로빈 철로 3.5%, 나머지는 효소철과 운반철로 존재한다.⁸⁾ 체내 철 함유 화합물은 크게 두 종류로 나누어지는데, 한 종류는 헤모글로빈, 미오글로빈, 시토크롬 등의 헴 단백질이며 다른 종류는 저장철

접수일: 2002년 10월 17일

채택일: 2002년 10월 29일

[§]To whom correspondence should be addressed.

(페리틴, 헤모시더린)로 간장, 비장, 골수에 존재하고 저장 철의 양은 성, 연령, 철의 손실과 섭취상태 등에 의해 크게 영향을 받는다. 이 외에 소량의 철이 혈액 중의 운반단백질인 트랜스페린에 결합되어 순환된다.⁹⁾ 한편, 철분은 자유 라디칼 유도물질의 산화제로서 지방질의 과산화작용을 촉진시키기도 한다.

최근 우리 나라 사람들의 철분 결핍 실태를 살펴본 조사에 의하면, 헤모글로빈 수준을 기준으로 3~6세 소아에서¹⁰⁾ 4%의 결핍빈도, 10~11세 아동에서는¹¹⁾ 21%, 그리고 여자 성인에서는^{12,13)} 12~16%로 보고되고 있어서 철분결핍성 빈혈이 문제시되고 있다. 또한, 철분결핍은 일어나 운동 수행 능력, 면역기능, 카테콜아민과 갑상선 호르몬 대사 등에 유해한 영향을 준다고 보고되었다.¹⁴⁾

철분 결핍은 전 세계적으로 가장 문제가 심각한 영양문제로 볼 수 있는데, 사람들의 기호 음료에 대한 관심의 증가로 커피 등의 음용량도 증가하고 있는 추세이다. 커피의 다량 음용은 체내 과산화를 증가시키는 요인이 될 수 있을 것으로 생각되나 이에 대한 연구는 별로 없는 상태이며, 커피 섭취와 함께 철분 섭취량도 부족한 경우 체내의 산화 스트레스와 항산화 작용에 어떤 영향을 미치는가에 대한 연구도 거의 없는 편이다. 따라서, 본 연구에서는 철분의 섭취량이 부족하면서, 커피를 다량 음용할 경우 체내 과산화물 및 항산화 효소 활성에 미치는 영향을 살펴보고자 수행되었다.

실험 방법

1. 실험동물 및 식이조성

실험동물은 생후 6주된 Sprague-Dawley 종 수컷 흰쥐로, 실험시작 전 1주일동안 고형배합사료 (삼양사료)로 적응시키고 체중에 따라 난괴법 (randomized complete block design)에 의해 8마리씩 6군으로 나누었다. 실험시작시 실험동물의 평균체중은 133.5 ± 7.2 g 이었다. 실험동물은 한 마리씩 stainless steel cage에 격리하여 사육하였다. 사육조건은 온도 23 ± 2℃, 상대습도 55 ± 7% 이내로 조절하였다. 본 실험에서는 식이 철분 (5 ppm)이 부족하면서 커피를 0%, 1%, 4% 첨가한 세 군 (FDC0, FDC1, FDC4)과 식이 철분 (50 ppm)이 충분하면서 커피를 0%, 1%, 4% 첨가한 세 군 (FSC0, FSC1, FSC4)으로 나누어서 6군으로 분리하였다. 실험 식이의 단위 열량당 커피의 함량 (0.25 g/100 kcal)을 고려할 때, 1% 커피 식이는 2,500 kcal를 섭취하는 성인이 하루에 6 g (약 2 잔)의 커피를 음용하는 것으로 추정할 수 있다. 흰쥐의 성장과 최대 헤모글로빈 유지를 위한 식이의 철분 요구량은 35 ppm으로,¹⁵⁾ 본

실험에서는 요구량의 143%인 50 ppm을 철분이 충분한 식이로 하고, 요구량의 14%인 5 ppm을 철분이 부족한 식이로 하여서 흰쥐를 사육하였다. 실험동물은 실험 식이로 4주간 사육하였고, 식이와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 실험식은 AIN-76를 기본 식이로 공급하였으며, 본 실험에서 사용한 식이의 구성은 Table 1과 같다. 실험동물의 체중은 1주일당 1회씩 측정하였으며, 식이 섭취량은 1주일당 2회씩 측정하였다.

2. 혈액 및 장기의 채취

실험동물의 혈액은 실험기간 종료 전 15시간 절식시킨 실험동물을 마취하여 심장관자법으로 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였다. 채취된 전혈의 일부는 바로 헤마토크리트, 헤모글로빈 및 혈당 분석에 이용하였고, 나머지 혈액은 EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetate)가 들어있는 원심분리관과 들어있지 않은 원심분리관의 두 곳에 나누어 담아 3000 rpm에서 20분간 원심분리 하였고, 적혈구와 혈장, 또는 혈청을 얻은 후 생화학적 분석을 위해 -20℃에서 냉동보관 하였다. 혈액을 채취한 후, 즉시 간을 분리하여 생리식염수에 세척한 후 무게를 측정하고, 분석 때까지 -20℃에 냉동보관 하였다.

Table 1. Composition of experimental diet* (g/kg diet)

Ingredients	0% Coffee (C0)	1% Coffee (C1)	4% Coffee (C4)
Corn Starch	560	550	520
Casein	200	200	200
Sugar	100	100	100
Soybean oil	70	70	70
Cellulose	20	20	20
Mineral mixture ¹⁾	35	35	35
Vitamin mixture ²⁾	10	10	10
DL-methionine	3	3	3
Choline	2	2	2
Coffee	0	10	40
Total	1000	1000	1000

*Fe-deficient (FD, Fe 5 ppm) diet included 0.03 g FeSO₄/kg diet ; Fe-sufficient (FS, Fe 50 ppm) diet included 0.25 FeSO₄/kg diet.

1) Mineral mixture: AIN-76 mineral mixture without iron (g/kg Mix). Calcium phosphate, dibasic 500.00; Sodium chloride 74.00; Potassium citrate, monohydrate 220.00; Potassium sulfate 52.00; Magnesium oxide 24.00; Manganous carbonate 3.50; Zinc carbonate 1.60; Cupric carbonate 0.20; Potassium iodate 0.01; Sodium selenite 0.01; Chromium potassium sulfate 0.55; Sucrose, finely powdered 1000 g

2) Vitamine mixture: AIN-76 vitamin mixture(mg/kg Mix). Thiamin. HCl 600.0; Riboflavin 600.0; PyridoxineHCl 700.0; Nicotinic acid 3000.0; D-Calcium pnatohenate 1600.0; Folic acid 200.0; D-Biotin 20.0; Cyanocobalamin (Vitamin B-12) 1.0; Retinyl palmitate or acetate (Vitamin A) 1 g; dl-α-Tocophoryl acetate 4 g; Colecalciferol (Vitamin D₂); Menaquinone (Vitamin K)⁶, 5000.0; Sucrose, finely powdered 1000 g

3. 실험동물의 혈액 및 장기 분석

실험동물의 혈액을 채취한 후 바로 전혈에서 헤마토크리트와 헤모글로빈 농도를 측정하였다. 헤마토크리트 (적혈구 용적비)는 11000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 전혈에 대한 적혈구층의 높이를 읽어 %로 표시하였고, 헤모글로빈의 분석은 cyanmethemoglobin법 (영동제약, 한국)을 이용하여 측정하였다.

혈장 과산화물은 Yagi법¹⁶⁾을 이용하여 TBARS (thiobarbituric acid reactive substance)의 양을 분석하였고, 간의 TBARS는 Buckingham법¹⁷⁾을 변형하여 측정하였다. 혈장 alanine amino-transferase (ALT)와 aspartate amino-transferase (AST)의 측정은 혈액분석기인 DTSC (Johnson & Johnson, U.S.A)를 사용하여 측정하였다. 혈장 단백질은 alkaline biuret 시약 (영동제약)을 사용하여 정량하였다.

적혈구과 간의 superoxide dismutase는 Winterbourn 등¹⁸⁾의 방법을 변형하여 xanthine과 xanthine oxidase에 의한 ferricytochrome C의 환원을 방해하는 정도를 측정함으로써 분석하였다. Cytochrome C의 환원을 50% 방해하는 것을 1 unit으로 하였다. Glutathione peroxidase (GPx)는 Paglia와 Valentine의 방법¹⁹⁾으로 분석하였다. GPx 1 unit은 1분간 1 μmol의 NADPH가 소모되는 것을 기준으로 하였다. Catalase는 Johansson과 Hankan의 방법²⁰⁾을 이용하여 분석하였다. Catalase 1 unit은 1분간 1.0 μmole의 H₂O₂가 사라지는 것을 기준으로 하였다.

4. 통계처리

모든 분석결과는 SAS program을 이용하여 각 군의 평균과 표준 편차를 계산하였다. 철분과 커피 수준에 따른 차이는 two-way analysis of variance (ANOVA)로 분석하였고, 각 실험군 간의 평균치 비교는 Duncan's multiple range test를 이용했으며, 유의성 검정은 p < 0.05 수준에서 행하였다.

결과 및 고찰

1. 실험동물의 체중증가량, 일일 식이섭취량 및 식이 효율

실험동물의 체중증가량 및 일일 식이섭취량은 식이 철분 및 커피의 영향을 받지 않았다 (Table 2). 그러나, 식이 효율은 식이 철분이 부족한 군에서 커피 1%를 섭취했을 때 유의적으로 감소하다가 커피 4%를 섭취할 때 증가했고, 식이 철분이 충분한 군에서는 커피 1%를 섭취했을 때 유의적으로 증가하다가 커피 4%를 섭취했을 때 감소하였다.

Cunnane 등²¹⁾의 연구와 Roughead 등²²⁾의 연구에서도 철분 수준이 실험 쥐의 체중에 큰 영향을 미치지 않았다는 보고가 있어서 본 연구 결과와 일치하였다. 한편, 커피 첨가가 체중에 미치는 영향에 관한 연구에서는 커피의 첨가 정도에 따라 식이섭취량과 식이 효율이 영향을 받는다는 보고도 있으나,²³⁾ 쥐의 체중 증가에 별 영향을 주지 않는다는 보고도 있었다.²⁴⁾

2. 실험동물의 헤마토크리트와 헤모글로빈 농도

실험동물의 헤마토크리트와 헤모글로빈 농도는 Fig. 1과 2에 제시하였다. 헤마토크리트는 식이내 철분이 부족한 군에서 유의적으로 낮았고, 커피의 수준이 증가할수록 감소하였다. 헤모글로빈 농도도 헤마토크리트와 유사한 경향을 보여서 식이 철분이 부족한 군에서는 모두 현저한 빈혈 수치 (8.0~8.9 g/dl)를 보였으며, 식이내 철분이 충분한 경우에는 커피 수준이 증가할수록 헤모글로빈의 농도가 감소하여서, 커피 함량이 식이의 4%였을 때에는 평균치가 11.7 g/dl로 빈혈 수치에 근접하였다. Mock 등²⁵⁾은 커피의 섭취가

Table 2. Body weight gain, diet intake and feed efficiency ratio (FER) of the rat

	BW Gain/day (g)	Diet intake (g/day)	FER ¹⁾
FDC0	4.3 ± 0.8 ²⁾	14.9 ± 2.1	0.045 ± 0.007
FDC1	4.6 ± 1.2	18.3 ± 1.9	0.034 ± 0.006
FDC4	4.4 ± 0.5	17.3 ± 3.4	0.041 ± 0.009
FSC0	4.4 ± 1.2	18.8 ± 2.0	0.041 ± 0.007
FSC1	5.0 ± 1.3	17.4 ± 4.3	0.047 ± 0.012
FSC4	4.9 ± 0.7	18.3 ± 3.7	0.040 ± 0.006
ANOVA ³⁾	NS	NS	F*C

- 1) F.E.R. = $\frac{\text{Body weight gain for experimental period (g)}}{\text{Food intake for experimental period (g)}}$
- 2) Mean ± Standard Deviation
- 3) Statistical significance of dietary factors by 2-way ANOVA (p < 0.05)
- NS: Not significantly different
- F*C: Effect of interaction between dietary iron and coffee

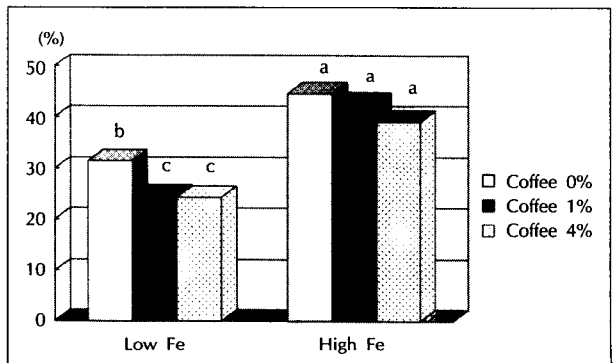


Fig. 1. Hematocrit (%) of the rat. Values with different alphabet are significantly different by Duncan's multiple range test (p < 0.05)

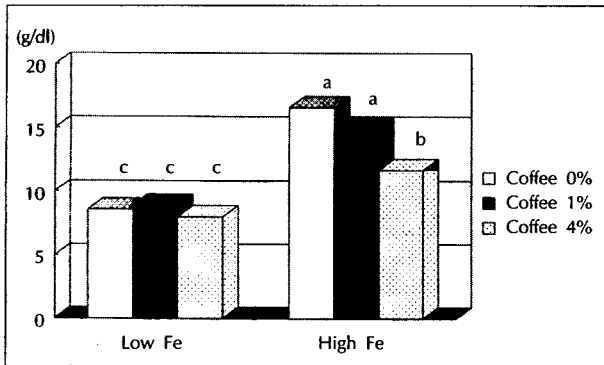


Fig. 2. Hemoglobin level (g/dl) of the rat. Values with different alphabet are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

Table 3. Malondialdehyde (MDA) concentrations of the rat

	Plasma MDA (nmol/ml)	Liver MDA (nmol/g)
FDC0	39.3 ± 13.8 ¹⁾	562.5 ± 214.2
FDC1	29.4 ± 8.0	391.1 ± 131.4
FDC4	29.6 ± 9.3	551.4 ± 136.7
FSC0	49.6 ± 16.2	514.4 ± 223.6
FSC1	35.1 ± 10.9	490.6 ± 215.8
FSC4	39.3 ± 9.1	603.2 ± 229.8
ANOVA ²⁾	NS	NS

1) Mean ± Standard Deviation
 2) Statistical significance of dietary factors by 2-way ANOVA
 NS: Not significantly different at $p < 0.05$

철분의 흡수율을 현저히 감소시킨다고 보고한 바가 있으며, Park과 Sung의 연구²⁶⁾에서 정상 쥐에게 카페인을 투여하는 경우 헤마토크리트와 헤모글로빈 수치가 감소하여서 본 연구 결과와 유사하게 나타났다. 따라서, 본 연구의 결과로 볼 때, 철분 섭취가 충분하지 않은 환경에서 카페인을 섭취할 경우, 빈혈 증상이 더욱 악화될 소지가 있는 것으로 보인다.

3. 과산화 지질 농도와 간 손상 지표의 변화

혈장과 간의 과산화지질의 농도는 Table 3에 나타내었는데, 본 연구에서 사용한 커피와 철분 수준은 쥐의 과산화 지질 농도에 영향을 주지 않은 것으로 나타났다. Do²⁷⁾는 흰쥐에게 카페인 (25 mg/kg) 만 투여한 경우에는 malondialdehyde (MDA)에 영향을 주지 않으나, caffeine (25 mg/kg)에 철분 (25 mg/kg)을 보충 투여한 경우에는 유의적으로 혈장과 간의 과산화지질의 함량이 증가하였다고 보고하였다. 이는 과다한 철분 투여시 다불포화지방산의 지나친 과산화로 인해 지질과산화물 생성이 증가할 수 있음을 시사한다고 하였다. Roughhead 등²⁸⁾도 식이 철분 함량이 매우 높을 경우 간의 MDA를 증가시키지만, 권장량의 10배의 섭취량까지는 뚜렷한 산화스트레스를 가져오지 않는다

Table 4. Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities of the rat plasma

	AST (U/L)	ALT (U/L)
FDC0	113.2 ± 42.7 ^{1)2c}	45.0 ± 4.6 ^b
FDC1	108.0 ± 17.7 ^c	34.4 ± 4.3 ^b
FDC4	192.0 ± 163.4 ^{bc}	48.0 ± 25.2 ^b
FSC0	92.5 ± 36.5 ^c	33.7 ± 7.2 ^b
FSC1	238.8 ± 87.8 ^b	38.7 ± 16.0 ^b
FSC4	409.5 ± 64.2 ^a	71.5 ± 13.2 ^a
ANOVA ³⁾	F**, C**, F*C**	C**

1) Mean ± Standard Deviation
 2) Values with different alphabet within the same column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)
 3) Statistical significance of dietary factors by 2-way ANOVA
 F: Effect of dietary iron, C: Effect of coffee
 F*C: Effect of interaction between dietary iron and coffee
 : $p < 0.05$, *: $p < 0.001$

고 하였다. 이 밖에 Jaarsveld 등²⁹⁾은 식이 철분 수준이 150 mg/kg 이상인 경우, 간과 혈장의 비타민 E와 비타민 C의 농도가 감소하고 혈장의 nitrite 농도는 증가하여서, 고 철분이 쥐의 혈액과 간에 산화적 변화를 야기한다고 보고하였다. Ibrahim 등²⁹⁾도 비타민 E가 부족한 환경에서 식이에 철분을 보충할 경우 산화스트레스의 증가로 TBARS가 증가하였다고 하였다. 한편, Knutson 등³⁰⁾은 심각한 철분 결핍과 철분 보충이 둘 다 쥐의 지질 과산화를 증가시킬 수 있다고 언급하고, 철분 보충시 3일에 한 번 정도씩의 보충을 해 줌으로써 지질 과산화를 낮출 수 있다고 하였다.

간 손상 지표로 많이 쓰이는 혈장 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 농도는 Table 4에 나타내었다. 혈장 AST와 ALT는 커피 섭취의 영향을 많이 받아서 커피 섭취량이 증가할수록 현저히 증가하는 것으로 나타났다. Do²⁷⁾의 연구에서도 caffeine을 투여할 때, AST와 ALT 효소의 활성도가 증가하였다고 보고하여서 본 연구의 결과와 일치하는 것으로 나타났다. 이는 caffeine이 간과 중추신경계에 미치는 자극으로 인하여 대사 활동이 증가하여서³¹⁻³³⁾ AST, ALT의 활성도가 증가하는 것으로 사료된다.

4. 혈액과 간의 단백질 농도와 항산화 효소 활성

혈액 및 간의 단백질 농도는 Table 5에 나타내었다. 혈장 단백질은 식이 철분 섭취의 영향을 받지 않았으나, 적혈구와 간 단백질은 식이 철분의 영향을 크게 받아서 철분이 부족한 식이를 섭취한 군에서 적혈구와 간의 단백질 수준이 유의적으로 낮게 나타났다. 이는 철분 부족으로 인한 빈혈로 인해 혈액의 산소 공급이 원활하지 않아 체내 단백질 축적에 영향을 받았기 때문으로 사료된다.

Table 5. Plasma, erythrocyte and liver protein of the rat

	Plasma (mg/dl)	Erythrocyte (mg/ml)	Liver (mg/ml)
FDC0	6.4 ± 0.6 ¹⁾	25.6 ± 7.7 ²⁾	9.1 ± 1.7 ^b
FDC1	6.5 ± 0.6	24.2 ± 10.4 ^b	11.4 ± 2.0 ^{ab}
FDC4	7.0 ± 1.6	32.5 ± 5.8 ^{ab}	11.3 ± 1.7 ^{ab}
FSC0	6.7 ± 1.6	43.1 ± 12.1 ^a	13.1 ± 2.7 ^a
FSC1	6.9 ± 0.5	30.1 ± 14.1 ^{ab}	10.9 ± 2.3 ^{ab}
FSC4	6.7 ± 1.1	32.1 ± 18.9 ^{ab}	13.3 ± 2.7 ^a
ANOVA ³⁾	NS	F*	F*, F*C*

1) Mean ± Standard Deviation
 2) Values with different alphabet within the same column are significantly different by Duncan's multiple range test (p < 0.05)
 3) Statistical significance of dietary factors by 2-way ANOVA
 F*C: Effect of interaction between dietary iron and coffee, F: Effect of dietary iron, *: p < 0.05

Table 6. Antioxidant enzyme activities of the rat erythrocyte per mg protein

	SOD ¹⁾ (U/mg)	GPx ²⁾ (U/mg)	Catalase (IU/mg)
FDC0	18.76 ± 5.19 ^{3)ab}	1.05 ± 0.42	111.5 ± 45.1 ^{bc}
FDC1	16.78 ± 7.13 ^a	1.11 ± 0.51	191.3 ± 90.3 ^a
FDC4	16.01 ± 3.93 ^{ab}	0.80 ± 0.31	86.6 ± 41.6 ^c
FSC0	9.71 ± 4.32 ^b	0.65 ± 0.17	100.1 ± 63.0 ^{bc}
FSC1	14.72 ± 4.92 ^{ab}	0.85 ± 0.34	170.9 ± 85.1 ^{ab}
FSC4	18.77 ± 8.89 ^a	0.85 ± 0.52	88.0 ± 36.9 ^c
ANOVA ⁴⁾	F*C*	NS	C**

1) SOD: superoxide dismutase
 2) GPx: glutathione peroxidase
 3) Mean ± Standard Deviation
 4) Values with different alphabet within the same column are significantly different by Duncan's multiple range test (p < 0.05)
 5) Statistical significance of dietary factors by 2-way ANOVA
 F*C: Effect of interaction between dietary iron and coffee
 C: Effect of coffee, NS: Not significant, *: p < 0.05, **: p < 0.01

적혈구의 항산화 효소활성은 Table 6에 제시하였다. Superoxide dismutase (SOD)의 활성은 철분이 부족한 군에서 활성도가 높았으며, 철분이 충분한 군에서는 커피의 섭취가 많을수록 활성도가 증가하였다. Glutathione peroxidase (GPx)의 경우에는 철분이나 커피의 섭취가 GPx의 활성에 영향을 미치지 않았고, catalase의 경우에는 커피의 수준이 식이의 1% 였을 때 catalase 활성이 유의적으로 증가하였으나, 4% 식이에서는 다시 감소하는 것으로 나타났다. 한편, Rossowska 등³⁴⁾의 연구에서 caffeine (20 mg/kg BW)을 쥐에게 섭취시켰을 때, 쥐 심장의 SOD 활성도가 증가하고, GPx 활성도는 caffeine 섭취의 영향을 받지 않았다고 하여 본 연구 결과와 유사한 경향을 보였다.

간의 항산화 효소들의 활성은 Table 7 (U/mg protein)과 Table 8 (U/liver)에 제시하였다. 1 mg 단백질당으로 볼 때 (Table 7), SOD의 경우 적혈구와 마찬가지로 철분

Table 7. Antioxidant enzyme activities of the rat liver per mg protein

	SOD ¹⁾ (U/mg)	GPx ²⁾ (U/mg)	Catalase (IU/mg)
FDC0	33.87 ± 5.49 ^{3)ab}	0.48 ± 0.09	82.19 ± 16.36
FDC1	28.64 ± 5.02 ^{bc}	0.37 ± 0.12	64.99 ± 14.83
FDC4	30.55 ± 4.94 ^{ab}	0.39 ± 0.12	53.70 ± 12.93
FSC0	26.31 ± 6.99 ^{bc}	0.41 ± 0.12	65.04 ± 21.90
FSC1	25.08 ± 3.25 ^c	0.56 ± 0.18	65.17 ± 13.11
FSC4	24.17 ± 4.47 ^c	0.40 ± 0.13	66.37 ± 33.34
ANOVA ⁵⁾	F**	NS	NS

1) SOD: superoxide dismutase
 2) GPx: glutathione peroxidase
 3) Mean ± Standard Deviation
 4) Values with different alphabet within the column are significantly different by Duncan's multiple range test (p < 0.05)
 5) Statistical significance of dietary factors by 2-way ANOVA
 F: Effect of dietary iron, NS: Not significant, **: p < 0.01

Table 8. Antioxidant enzyme activities of the total liver

	SOD ¹⁾ (U/liver)	GPx ²⁾ (U/liver)	Catalase (IU/liver)
FDC0	2300.5 ± 279.8 ³⁾	32.9 ± 6.7 ^{ab}	5572.1 ± 1003.5 ^{ab}
FDC1	2537.1 ± 375.2	32.8 ± 10.7 ^b	5814.8 ± 1530.4 ^{ab}
FDC4	2711.9 ± 151.4	34.6 ± 6.8 ^b	4738.4 ± 720.0 ^b
FSC0	2709.0 ± 633.9	41.6 ± 9.5 ^{ab}	6688.0 ± 2051.3 ^a
FSC1	2221.0 ± 461.0	44.8 ± 7.0 ^a	5462.1 ± 1280.8 ^{ab}
FSC4	2581.6 ± 370.2	41.4 ± 8.8 ^{ab}	6770.9 ± 1732.3 ^a
ANOVA ⁵⁾	NS	F**	F*

1) SOD: superoxide dismutase
 2) GPx: glutathione peroxidase
 3) Mean ± Standard Deviation
 4) Values with different alphabet within the column are significantly different by Duncan's multiple range test (p < 0.05)
 5) Statistical significance of dietary factors by 2-way ANOVA
 F: Effect of dietary iron, NS: Not significant, *: p < 0.05, **: p < 0.01

이 부족한 군에서 SOD의 활성이 더 높았고, GPx와 catalase의 활성은 철분과 커피의 영향을 받지 않은 것으로 나타났다. 한편, 간의 총 항산화 효소의 활성도 (Table 8)를 살펴보면, 총 SOD 활성도 (U/liver)는 식이의 영향을 받지 않았으나, 총 GPx와 catalase의 활성도는 철분이 부족한 군에서 현저하게 낮은 것으로 나타났다. 이는 체내 철분영양상태가 나쁠 경우, 간의 총 단백질 수준이 현저히 감소하기 때문에 단백질의 한 부분인 효소의 양도 감소한 것으로 보인다.

간의 항산화 효소의 활성도를 종합해보면, 간의 총 항산화 효소 활성은 철분이 충분한 군에서 간 단백질량의 증가와 함께 GPx와 catalase 활성도도 높게 나타났다. 한편, 간의 1 mg 단백질당의 항산화 효소 활성은 식이의 영향을 크게 받지 않았으나, 식이 철분이 부족한 군에서는 SOD의 활성도가 증가한 것으로 나타났는데, 그 이유가 철분 부족

으로 인한 과산화 작용의 증가 때문인지는 앞으로 좀 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

결론 및 제언

철분 결핍은 전세계적으로 가장 문제가 심각한 영양문제로 생각하고 있으며, 사람들의 기호 음료에 대한 관심의 증가로 커피의 음용량도 증가하고 있는 추세이다. 커피를 많이 섭취하는 경우 체내 철분 배설에 영향을 미친다는 보고가 있으며, 또한 심한 철분 부족이나 과도한 커피 섭취는 둘 다 체내의 과산화를 증가시키는 요인이 될 수 있다고 보고 있다. 식이 철분의 섭취량이 부족하면서 커피를 많이 음용할 경우에 체내의 과산화 및 항산화 실태에 미치는 영향에 대해서는 연구가 전무한 실정인바, 본 연구에서는 철분의 섭취량이 부족하면서, 커피를 다량 음용할 경우 체내 과산화와 항산화 효소에 미치는 영향을 살펴보고자 수행되었다.

헤마토크리트 농도와 헤모글로빈 수준은 식이내 철분이 부족할수록, 그리고 커피의 섭취량이 증가할수록 높아지는 것으로 나타났다. 따라서, 식이로 섭취하는 철분의 섭취량이 부족하면서 커피를 많이 섭취하는 경우에는 철분 결핍으로 인한 빈혈증상이 더 심해질 것으로 사료된다. 사람의 경우, 특히 성인 여자들에게서 철분 섭취량이 부족하면서, 커피를 즐겨 마시는 사람들이 많을 것으로 생각되므로, 앞으로 이에 대한 임상 또는 역학 연구가 더 필요하다고 하겠다.

본 연구에서 이용한 식이 철분 수준이나 커피 섭취는 체내 과산화지질 수준에서는 차이를 나타내지 않았으나, 커피의 섭취 수준이 식이의 4%로 높은 경우에는 간 손상지표인 혈장 AST와 ALT 수치가 증가하는 것으로 나타났다. 한편, 식이 철분과 커피가 체내 항산화 효소의 활성에 미치는 영향은 쥐의 조직에 따라서 다르게 나타났다. 적혈구의 경우 커피 섭취의 영향을 많이 받아서 커피 섭취량이 많을 때 SOD의 활성도가 높았고, 간의 경우에는 식이 철분이 부족할 때 SOD의 활성도가 올라간 것으로 나타났다. 따라서, 철분 결핍이면서 커피의 섭취량이 증가하는 경우, 빈혈 증상에 더불어 체내의 산화 스트레스의 증가로 인해 SOD 효소의 활성이 현저하게 증가하는 것으로 사료된다. 항산화 효소들 중에서 특히 SOD 효소의 활성이 민감한 영향을 받은 것으로 나타났는데, SOD 효소의 작용에는 아연, 구리, 망간 등의 무기질들이 관여하므로 앞으로 이들 무기질과 철분이 항산화 효소의 작용에 미치는 영향에 대해서도 좀 더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Literature cited

- Munoz L, Keen CL, Lonnerdal B, Dewey K. Coffee intake during pregnancy and lactation in rats: maternal and pup hematological parameters and liver iron, zinc, and copper concentration. *J Nutr* 116: 1326-1333, 1986
- Graham DM. Caffeine-its identity, dietary sources, intake and biological effects. *Nutr Rev* 36(4): 97-102, 1978
- Harthley R, Smith LJ, Cookman JR. Improved HPLC method for the simultaneous determination of caffeine and its N-demethylated metabolites in plasma using solid-phase extraction. *J Chromatogram* 342: 150-117, 1985
- Scotl NR, Chakraborty J, Marks V. Determination of the urinary metabolites of caffeine and the ophilline by HPLC. *J Chromatogram* 375: 321-329, 1986
- Im SA, Rho SN. Macro mineral responses to caffeine in serum and urine of healthy young females (I). *Korean J Nutr* 26(9): 1118-1128, 1993
- Mork TA, Lynch SR, Cook JD. Inhibition of iron absorption by coffee. *Am J Clin Nutr* 37: 416-420, 1983
- Bothwell TH, Finch CA. Iron in man. In: Blix G, ed. Occurrence, causes and prevention of nutritional anemias. Symposium of the Swedish Nutrition Foundation. VI. Almqvist and Wiksell, Uppsala, pp.104-114, 1968
- Fairbanks VF. Iron in medicine and nutrition. In: Shils ME, ed. Modern nutrition in health and disease. 8th ed. Lea & Febier. pp.186-190, 1994
- Fairbanks VS, Klee GG. Biochemical aspects of hematology. In: Tietz NW, ed. Textbook of clinical chemistry. Philadelphia, Saunders W, 1986
- Son SM, Park SH. Nutritional status of iron, zinc and copper of preschool children residing in low-income area of seoul. *Korean J Community Nutr* 1(1): 3-9, 1999
- Son SM, Jung HY. The effect of iron supplementation on the hematological iron status and Pb and Cd levels in erythrocyte, hair and urine of subjects with suboptimal iron status. *Korean J Nutr* 31(7): 1165-1173, 1998
- Lee KH, Kim EK, Kim MK. Iron nutritional status of female students in Kangnung National University. *Korean J Community Nutr* 2(1): 23-32, 1997
- Hong SM, Kim EY, Kim SR. A study on iron status and anemia of female college students of Ulsan city. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28(5): 1151-1157, 1999
- Cook JD, Lynch SR. The liabilities of iron deficiency. *Blood* 68: 803-809, 1986
- National Research Council. Nutrient Requirements of Laboratory Animals, No 10, 3rd ed., National Academy of Sciences, Washington DC, 1978.
- Yagi K. Assay for blood plasma or serum. In: Method in enzymology. *Academic Press* 105: 328-33, 1984
- Buckingham KW. Effect of dietary polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and dietary vitamin E on lipid peroxidation in the rat. *J Nutr* 115: 1425-1435, 1985
- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 35: 337-341, 1975

- 19) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70(1): 158-169, 1967
- 20) Johansson LH, Hankan Borg LA. A spectrophotometric method of determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochem* 174: 331-336, 1988
- 21) Cunnane SC, McaDoo KR. Iron intake influences essential fatty acid and lipid composition of rat plasma and erythrocytes. *J Nutr* 117: 1514-1519, 1987
- 22) Roughhead ZK, Johnaon LK, Hunt JR. Dietary copper primarily affects antioxidant capacity and dietary iron mainly affects iron status in a surface response study of female rats fed varying concentrations of iron, zinc copper. *J Nutr* 129(7): 1368-1376, 1999
- 23) Lee HW. Effect of different dietary protein level and source with supplemental coffee on lipid metabolism of rats. Master's thesis. Ewha Womans University, 1984
- 24) Jung JI. Effect of different dietary fat level and source with supplemental coffee on lipid metabolism of rats. Master's thesis. Ewha Womans University, 1984
- 25) Mock TA, Lynch SR, Cook JD. Inhibition of food iron absorption by coffee. *Am J Clin Nutr* 37: 416-420, 1983
- 26) Park SJ, Sung CJ. Effects of caffeine intake levels on iron metabolism in male and female rats. *Korean J Nutr* 29(7): 713-720, 1996
- 27) Do JC. Changes in lipid and protein composition of rat blood, liver tissue, and cultured cells with supplemental feeding of caffeine, iron and vitamin E. Master's thesis. Kyungbook National University, 1995
- 28) van Jaarsveld H, Schulenburg DH. Dietary iron alters liver, erythrocyte and plasma antioxidant and nitrite levels and also sensitizes the heart to ischemia/reperfusion. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 97(3): 347-360, 1997
- 29) Ibrahim W, Lee US, Yeh CC, Szabo J, Bruckner G, Chow CK. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E, and iron. *J Nutr* 127(7): 1401-1406, 1997
- 30) Knutson MD, Walter PB, Ames BN, Viteri FE. Both iron deficiency and daily iron supplements increase lipid peroxidation in rats. *J Nutr* 130: 621-628, 2000
- 31) James EF. The extra pharmacopoeia, 29th ed. The pharmaceutical press, London, pp.1521-1524, 1989
- 32) Lopes JM, Aubier M, Jardim J, Aranda V, Macklem PT. Effect of caffeine on skeletal muscle function before and after fatigue. *J Appl Physiol* 54(5): 1303-1305, 1983
- 33) Scott NR, Chakraborty J, Marks V. Determination of the urinary metabolites of caffeine and theophylline by HPLC. *J Chromatogram* 375: 321-329, 1986
- 34) Rosso MJ, Ghanaei P, Nakamoto T. Effect of dietary caffeine and zinc on the activity of antioxidant enzymes, zinc, and copper concentration of the heart and liver in fast-growing rats. *Biol Trace Elem Res* 50(3): 229-236, 1995