

비타민 A 보충 식이 및 에탄올의 만성적 급여가 흰쥐의 체내 산화적 손상과 항산화체계에 미치는 영향

양 경 미

경산대학교 생명자원공학부

Effect of Dietary Supplementation of Vitamin A and Chronic Consumption of Ethanol on Oxidative Damage and Antioxidant System in Rats

Kyung-Mi Yang

Faculty of Life Resource Engineering, Kyungsan University, Kyungsan 712-715, Korea

Abstract

Alcohol is well known agent which can damage the human tissues such as liver via stimulating lipid peroxidation. On the other hand, carotenoids in addition to vitamins A, C and E play important roles in protecting these oxidative damages as well as preventing the production of free radicals. This study was carried out to investigate the effect of dietary vitamin A on lipid peroxidation and antioxidants status in ethanol-treated rats. In the experiment, male Sprague-Dawley rats weighing 160~180 g were given a liquid diet containing 36% of total calories as ethanol for 7 weeks. The pair-fed control rats received an isocaloric amount of diet containing sucrose instead of ethanol on the following day. Additionally, the liquid diet contained adequate amount of β -carotene, retinyl acetate or 13-*cis*-reinoic acid except vitamin A-deficient diet. The results obtained are as follows. The levels of plasma and hepatic lipid peroxide were increased after chronic ethanol feeding in rats. Retinyl acetate supplementation significantly reduced lipid peroxidation induced by ethanol feeding. Glucose 6-phosphatase activity was significantly reduced in rats fed vitamin A-deficient diet with ethanol and alkaline phosphatase activity was significantly induced in rats fed 13-*cis*-reinoic acid diet with ethanol. Catalase and alcohol dehydrogenase activities did not show a consistent tendency in experimental groups. The hepatic antioxidant enzyme activities were no significantly changed by chronic ethanol feeding groups. The striking decrease in conversion of β -carotene to retinol was observed in rats fed a β -carotene diet with ethanol feeding. The level of retinol and retinoic acid in plasma and liver was decreased after chronic ethanol administration. Based on this result, these data suggest that ethanol feeding enhances oxidative stress especially in those fed a vitamin A-deficient diet, and vitamin A supplementation, especially, retinyl acetate intake can prevent enhanced lipid peroxidation and related damage to some extent.

Key words: ethanol, lipid peroxide, antioxidant enzyme, vitamin A

서 론

에탄올이 생체에 미치는 영향 중 간 질환과 관련된 손상은 여러 가지 기전을 통하여 다양하게 제기되고 있는데, 에탄올 그 자체나 주 대사산물인 acetaldehyde의 직접적인 영향 또는 대사되는 과정에서 생성된 반응성이 강한 free radicals의 간접적인 산화반응에 의해서 일어난다(1). 생체가 에탄올을 급성 혹은 소량으로 섭취할 경우 alcohol dehydrogenase(ADH)나 cytochrome P₄₅₀(P₄₅₀)에 의해서 대사되지만 만성 혹은 과량일 경우에는 섭취된 에탄올의 1/2~2/3 이상이 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)에 의해서 대사된다(2). 특히 Nordmann 등(1)은 P₄₅₀이 에탄올 산화에 특이적인 활성도를 보이며 이 활성도가 증가될 경우 산소필요량의 증대로 acetaldehyde와 free radicals 형성을 증가시킨다고 하였다.

이때 에탄올이 P₄₅₀과 MEOS에 의해 대사되는 동안 생성되는 O₂⁻, H₂O₂, OH⁻의 양은 정상적인 생리조건보다 4~8배 정도 높게 나타났다. 에탄올에 의한 free radicals 생성의 또 다른 경로는 간 미토콘드리아내에서 NADH/NAD⁺비의 증가로 인한 O₂⁻의 생성 증가, 퍼록시좀에서 β -oxidation을 통한 H₂O₂ 생성, 사이토졸에서 acetadehyde와 xanthine oxidase(XO)와의 반응을 통한 O₂ 와 alkane의 생성 등이 있다. 특히 acetaldehyde는 XO의 기질로 작용하므로 acetaldehyde의 생성이 증가될 경우 free radicals의 생성은 많아지게 된다(3,4).

이렇게 형성된 free radicals와 acetaldehyde는 주로 생체 막 불포화지방산의 산화와 항산화 물질과 직접적으로 반응하여 항산화 영양소를 고갈시킬 뿐만 아니라 acetaldehyde 자체가 간 원형질막 지질 성분의 변화를 유발하고 혈장 albumin이나 적혈구의 hemoglobin과 반응하여 중합체 형성을 유

도하므로 이 물질이 에탄올 중독증의 새로운 지표로 주장되었다(5). 또한 에탄올 대사에 의해서 증가된 NADH/NAD⁺의 비로 인해서 지방산의 β -oxidation 감소로 간 내 지방을 축적하여 지방간을 유도하고 호흡, ATP 합성 및 산화·환원에 필요한 기질의 감소 현상, 정상적인 막 기능 지표 효소인 glucose-6-phosphatase(G6P)와 alkaline phosphatase(AP)나 radical scavenger 효소 활성도 변화 등으로 세포기능 저하가 나타났다(1,6). Cederbaum(7)과 Chang과 Ryu(8)를 비롯한 많은 보고에서 급·만성으로 에탄올을 급여할 경우 혈액, 간, 심장, 뇌 등 여러 조직에서 지질과산화물인 malondialdehyde(MDA), conjugated dienes 그리고 chemiluminescence의 증가와 혈장 및 간조직 내 일·이차 효소적 방어체계와 항산화 영양소로서는 비타민 A, C, E, β -carotene, 합황아미노산인 methionine과 cystine 등의 고갈현상이 나타났다. 특히 항산화 영양소인 비타민 A 활성 물질들은 적정량 뿐만 아니라 그 이상을 공급시킴에도 불구하고 에탄올 급여에 의해서 간조직 내 고갈 현상과 함께 간 손상을 보였다(5, 9). 생체내 활성 비타민 A인 retinol, 13-cis-retinoic acid, 전구체인 β -carotene은 주로 세포 분화나 생체막 성분과 기능 조절 그리고 항산화력을 통해서 생체 보호작용을 하는 것으로 알려졌으며, 이들의 체내에서 대사율과 기능이 각기 다르다(10,11). β -carotene은 다른 비타민 A에 비해서 흡수율이 낮고 소장에서 그 자체의 흡수가 일어나며 일부는 retinol로 전환된다. β -carotene의 기능은 free radicals 중 특이적인 O₂과의 반응으로 'selective scavenger'로 작용하여 지질과산화 반응의 억제와 retinol, α -tocopherol, 그리고 생체막의 불포화 지방산 산화를 감소시킨다. 이러한 항산화성은 부분적으로 암, 동맥경화, 관절염, 백내장과 같은 질병을 유발시키는 산화적 스트레스를 방어하는데 중요한 역할을 하고 있다(12,13). 또한 retinol은 주로 세포와 세포막 사이의 free radical 연쇄반응을 차단시키며 비타민 A의 최종 대사산물인 13-cis-retinoic acid는 *in vivo*와 *in vitro* 실험에서 세포분화나 그 대사산물에 의한 특유의 기능이나 retinol의 대체효과로 비타민 A의 기능 수행에 주도적인 역할을 한다(14). 그러나 실험 동물을 이용한 선행 연구(5,8-11)에서는 에탄올이 생체에 미치는 영향과 비타민 A의 항산화력에 대한 연구가 각각 활발히 이루어졌으며 에탄올과 비타민 A의 상호작용과 비타민 A 종류별 효과 비교는 거의 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구의 목적은 실험동물에게 에탄올과 비타민 A를 장기간 공급한 뒤 간조직 내의 산화적 스트레스 및 간 손상과 항산화체계에 어떠한 영향을 미치는지 조사하여 β -carotene, retinyl acetate 그리고 13-cis-retinoic acid의 작용효과를 비교·검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 식이

한국화학연구소에서 이유한지 1주일된 Sprague-Dawley

종 숫쥐 64마리를 분양 받아서 평균체중이 160~180 g이 될 때까지 고형사료(진양사료)로 사육한 다음 8마리씩 8군으로 나누어 한 마리씩 분리·사육하였다. 실험식은 Table 1에 서처럼 미리 만들어 둔 premixture 성분에 에탄올이나 sucrose를 첨가한 다음 물로 용해시켜 만든 액체식이 형태로 공급하였으며(15), 이때 식이는 1 mL당 1 kcal 열량을 공급할 수 있도록 조제하였다. 실험설계는 Table 2와 같으며 에탄올을 함유한 비타민 A 결핍식이(FE), β -carotene 섭취식이(β

Table 1. Composition of basal liquid diet

Composition	Concentration (g/L liquid diet)
Casein	41.4
DL-methionine	0.3
L-cysteine	0.5
Corn oil	8.0
Olive oil	15.0
Sucrose ¹⁾	155.0
Mineral mixture ²⁾	9.0
Vitamin mixture ³⁾	2.55
Choline bitartrate	0.53
α -Cellulose	10.0
Xanthin gum	3.0
Ethanol	0

¹⁾Replaced by 65 g of sucrose and 50 g of ethanol in the ethanol diet.

²⁾Mineral mixture (g/kg mix) according to AIN-76: Calcium phosphate, dibasic 500.0, zinc carbonate 1.6, sodium chloride 74.0, cupric carbonate 0.3, potassium citrate, monohydrate 220.0, potassium iodate 0.01, potassium sulfate 52.0, sodium selenite 0.01, manganese carbonate 3.5, chromium potassium sulfate 0.05, magnesium oxide 24, ferric citrate 6.0, sodium fluoride 0.06, sucrose 117.

³⁾Vitamin mixture (mg/100 g mix.) according to AIN-76: Thiamin·HCl 60, D-biotin 2.0, riboflavin 60, cyanocobalamin 0.1, pyridoxine·HCl 70, α -tocopherol acetate 367.6, nicotinic acid 300, cholecalciferol 0.25, D-Ca pantothenate 160, menaquinone 0.5, folic acid 20, sucrose 95.451 g.

Table 2. Experimental design (per 2 L liquid diet)

Group ¹⁾	Vitamin A level (mg)	Ethanol administration
FE	-	+
FP	-	-
β E	110	+
β P	110	-
RE	18	+
RP	18	-
RAE	10	+
RAP	10	-

¹⁾FE: Ethanol group with vitamin A deficient diet.

FP: Pair-fed group with vitamin A deficient diet.

β E: Ethanol group with β -carotene supplemented diet.

β P: Pair-fed group with β -carotene supplemented diet.

RE: Ethanol group with retinyl acetate supplemented diet.

RP: Pair-fed group with retinyl acetate supplemented diet.

RAE: Ethanol group with 13-cis-retinoic acid supplemented diet.

RAP: Pair-fed group with 13-cis-retinoic acid supplemented diet.

E), retinyl acetate 섭취식이(RE), 13-*cis*-retinoic acid 섭취식이(RAE)와 에탄올 대신 각각 동일한 열량을 sucrose로 공급시킨 pair fed 군(FP, BP, RP, RAP)으로 나누어 7주간 실험식을 공급하였다. 식이공급은 에탄올 급여군은 무제한으로 공급시켰으며 pair fed 군은 전날 에탄올 급여군이 섭취한 양만큼 공급시켜서 에너지 섭취량 차이에서 오는 문제점을 배제하였다.

시료 준비

실험식으로 7주간 사육한 흰쥐를 12시간 절식시킨 후, 에테르로 가볍게 마취시켜 개복한 즉시 복부 하대정맥에서 헤파린으로 처리된 주사기로 채혈하였다. 그런 다음 3000 rpm에서 냉장·원심분리하여 혈장을 분리시켜서 일정량씩 나누어 분석할 때까지 -70°C 에서 냉동·보관한 후 지질과산화물과 비타민 A 함량을 정량하였다. 간조직은 1.15% KCl 완충용액으로 perfusion시켜 적출하여 여러번 세척한 다음 일부를 취해서 조직균질기(Teflon Plotter-Elvehjem Homogenizer)를 사용하여 빙냉하에서 1.15% KCl 완충용액으로 10% (w/v) 마쇄균질액을 만든 다음 미토콘드리아, 사이토졸, 마이크로솜 분획을 획득하였다. 미토콘드리아 분획은 과산화지질 함량과 catalase 그리고 GSH-Px 활성도, 사이토졸 분획은 SOD, GST, ADH 활성도 그리고 마이크로솜 분획은 G6P 활성도 측정에 사용하였고 나머지 간조직 중 일부는 retinol, β -carotene, retinoic acid 함량 측정에 이용하였다.

지질과산화물 함량과 효소 활성도 측정

혈장과 간 미토콘드리아의 지질과산화물 함량은 thio-barbituric acid(TBA)와 반응하여 생성된 malondialdehyde(MDA) 양으로 나타낸 Ohkawa 등(16)의 방법을 이용하여 측정하였다. 간 마이크로솜내 G6P 활성도는 glucose-6-phosphate를 기질로 한 Kwak(17)의 방법으로 측정 후 효소의 활성도 단위는 mg당 1분 동안 방출되는 무기인의 함량을 nmol로 표기하였다. 혈장내 AP 활성도는 King과 King(18)의 방법에 의하여 조제된 아산제약 kit를 사용하여 측정한다. 다음 활성도 단위는 1 nmole의 p-nitrophenol을 생성시키는 능력을 1 unit(King Armstrong. unit)로 표기하였다. Catalase 활성도는 간 미토콘드리아 부유용액 일정량을 취해 첨가한

H_2O_2 분해에 따른 흡광도의 감소를 측정하였고(19), alcohol dehydrogenase(ADH) 활성도는 에탄올과 NAD 그리고 효소액을 가하여 340 nm에서 NADH 생성량을 측정하였다(20). Superoxide dismutase(SOD) 활성도는 ethanol:chloroform 혼합액으로 추출한 상층액을 이용하여 riboflavin의 photo-chemical 환원으로 생성된 O_2^- 에 의한 nitrobluetetrazolium(NBT)의 환원을 억제하는 정도를 측정하였다(21). 간 미토콘드리아내 glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성도는 EDTA, Na_3N , NADPH, GSH 그리고 GSSG-reductase를 첨가하여 만든 반응 혼합액을 이용하여 H_2O_2 용액을 첨가하여 반응시켜서 340 nm에서 NADPH의 흡광도 감소를 측정하였다(22, 23). 간 사이토졸내 glutathione-S-transferase(GST) 활성도는 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)을 기질로 사용하여 340 nm에서 단백질 1 mg 당 1분간 포함되는 CDNB의 nmol로 표기하였다(24).

비타민 A 정량

간조직 내 β -carotene 함량은 Shapiro 등(25)의 방법에 의하여 일정량의 간조직을 균질화시킨 후 sodium ascorbate 용액과 HPLC용 ethanol를 첨가하여 추출한 후 검화과정을 거쳤고, 혈장내 retinol 함량은 Bieri 등(26)의 방법에 의거하여 internal standard로 retinyl acetate와 HPLC용 ethanol을 가하여 잘 섞은 후 각각의 시료액을 HPLC용 hexane으로 추출하여 최종 시료액을 획득하였다. 간조직 내 retinol 함량은 Furr 등(27)의 방법에 의거하여 간조직 일정량에 수분을 제거할 목적으로 2~3배의 anhydrous sodium sulfate(w/w)를 가하여 잘 마쇄한 다음 HPLC용 dichloromethane을 가하여 원심분리한 다음 최종 추출액을 얻었고 간조직 내 retinoic acid 함량 측정을 위한 최종 추출액은 간조직 내 retinol 함량 정량을 위한 시료준비와 동일한 방법으로 실시하였다(27). 그런 다음 각각의 최종 추출액은 teflon lever의 syringe(5 mL, Hamilton, USA)를 사용하여 pore size 0.45 μm 의 membrane filter(Hamilton, USA)로 여과시킨 다음 농축시킨 β -carotene, retinol, 그리고 13-*cis*-retinoic acid 추출물은 순수 HPLC용 ethanol, diethylether-methanol, methanol로 각각 용해시킨 후 HPLC에 주입시켰으며 이때 HPLC 분석조건은 Table 3과 같다.

Table 3. HPLC conditions for the determination of vitamin A

	β -carotene	Retinol	Retinoic acid
Instrument	HPLC (Waters 6000A)	HPLC(Waters 6000A)	HPLC (Waters 6000A)
Integrator	Young-in D 520A	Young-in D 520A	Young-in D 520A
Column	μ Bondapak C ₁₈ (30 cm×3.9 mm, 10 μm)	μ Bondapak C ₁₈ (30 cm×3.9 mm, 10 μm)	μ Bondapak C ₁₈ (30 cm×3.9 mm, 10 μm)
Detector	UV 436 nm	UV 280 nm	UV 313 nm
Mobile phase	Methanol : Acetonitrile : Chloroform (47 : 42 : 11)	Methanol : H ₂ O (95 : 5)	Methanol : Phosphate buffer (pH 7.2) (98 : 2)
Flow rate	2.0 mL/min	1.5 mL/min	1.0 mL/min
Sample injection	100 μL	50 μL	100 μL
Attenuation	0.01	0.02	0.02
Chart speed	0.5 cm/min	0.5 cm/min	0.5 cm/min

통계처리

본 실험에서 얻은 data는 SAS 통계 package를 이용하여 평균치와 표준편차를 산출하였고, 각 군간의 평균치의 통계적 유의성은 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test range에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

혈장과 간조직의 지질과산화물 함량

혈장과 간 미토콘드리아내 지질과산화물 분해산물인 MDA 함량은 Fig. 1, 2에서와 같다. 혈장내 MDA 함량은 에탄올 급여군 중 비타민 A를 결핍시킨 FE군과 β -carotene을 공급한 β E군에서는 감소되지 않았으나, retinyl acetate와 13-cis-retinoic acid 공급시킨 RE군과 RAE군에서 감소되었다. 간 미토콘드리아내 MDA 함량은 에탄올 급여군 중 FE군과

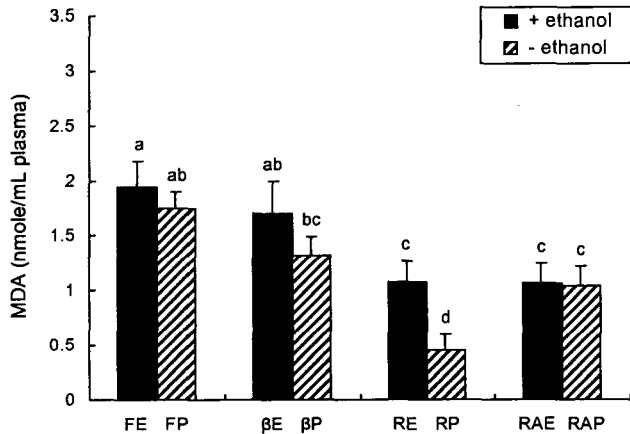


Fig. 1. Effect of vitamin A and ethanol administration on the level of plasma lipid peroxide in rats. Group: See the legend of Table 2. Values with the same superscript letter are not significantly different ($p<0.05$).

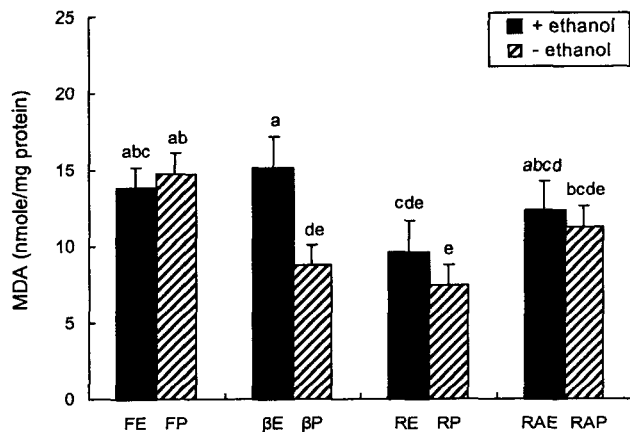


Fig. 2. Effect of vitamin A and ethanol administration on the level of liver mitochondria lipid peroxide in rats. Group: See the legend of Table 2. Values with the same superscript letter are not significantly different ($p<0.05$).

β E군에서 높은 함량을 보인데 반해 RE군과 RAE군에서는 낮은 수준을 보였다. 에탄올 비급여군인 pair-fed 군중에서는 비타민 A를 결핍시킨 FE군에 비해 β -carotene과 retinyl acetate를 각각 공급한 β P와 RP군의 MDA 함량은 감소하였는데 반해 retinoic acid를 공급한 RAP군의 MDA 수준은 차이를 보이지 않았다. 따라서 지질과산화물 함량은 만성적 에탄올 투여시 비타민 A 활성물질 중에서도 retinyl acetate의 보충급여가 지질과산화반응에 대하여 방어효과가 큰 것으로 나타났으나 pair-fed 군 수준에는 미치지 못했다.

급·만성 에탄올 급여는 체내 여러부위에 산화적 손상을 주며 이때 에탄올 공급방법에 따라서 그 정도는 차이를 보이는데 증류수와 함께 희석된 수용성 상태의 에탄올 공급은 지질과산화물 생성은 그다지 높지 않은 것으로 보고되었다(28). 그 이유는 액체 식이나 급성투여에 의한 에탄올 공급방법보다는 에탄올과 식이를 자유롭게 섭취하며 스트레스를 많이 받지 않기 때문이라고 하였다. 이에 반해 액체식을 통한 에탄올 공급방법은 식이와 동시에 에탄올을 섭취해야만 하므로 많은 스트레스와 많은 양의 에탄올을 섭취함으로써 저영양상태를 일으키기 쉽다는 것이다. 그래서 Lieber와 Decarli (15)는 액체식에 에탄올을 첨가할 때 탄수화물과 지방 함량을 조정하고 비타민 A, E, B₁₂, folic acid, choline 그리고 methionine과 같은 특정 영양소를 보강하여 에탄올이 간 손상에 미치는 영향 중 저영양 상태 문제점을 보정시켰다. 본 실험에서는 액체식 중 에탄올을 급여하고 동시에 비타민 A를 결핍시킨 군에서 지질과산화물 함량이 증가되었으므로 액체식 내 특정 영양소 결핍은 지질과산화 반응을 일으키는 것으로 추측할 수 있다.

에탄올은 β -carotene의 섭취량에 따라서 그 정도는 다르지만 이들의 상호작용에 의해 독성이 있는 것으로 확인되었다. 갖 이유시킨 쥐의 경우 β -carotene과 알코올의 동시 투여에 의해 높은 사망률을 보였고 알코올 중독자와 정상인을 비교했을 때 알코올 섭취량이 많을수록 간조직 내 β -carotene 함량 증가현상이 관찰되었다. 그 원인은 에탄올이 lipoprotein lipase(LPL) 활성도를 억제시켜서 지질대사와 연루된 β -carotene 대사가 방해받아서 retinol로 전환되는데 문제가 있다는 것이다(28). 뿐만 아니라 Leo 등(29)은 baboon에게 50% 에탄올 액체식과 β -carotene을 1000 kcal 당 30~45 mg을 2~5년 동안 공급시킨 결과 3 mg을 섭취한 군보다 혈액과 간조직에서 β -carotene의 clearance가 지연되었고 이것 때문에 간 독성을 가중시키게 된다는 것이다. 위의 보고와 본 실험 결과를 비교해 보면 에탄올과 동시에 β -carotene을 섭취한 군에서 지질과산화물 함량 증가와 함께 조직내 β -carotene 함량 증가가 나타났으므로 이러한 결과는 에탄올과 β -carotene의 상호작용으로 체내에서 β -carotene이 소화·흡수되는 과정에서 에탄올이 β -carotene의 이동이나 흡수를 방해한 것으로 추측할 수 있다. 뿐만 아니라 β -carotene은 기능면에서 O₂를 포획하는 능력을 통하여 강력한 항산화력을 나

타낸다고 하지만 에탄올에 의한 지질과산화물 생성은 O_2^- 의 생성증가 외에 다른 복합적인 요인에 기인된다는 것을 암시한다.

Retinyl acetate는 체내에서 retinol로 전환된 후 세포내 free radical 연쇄반응을 차단시켜서 지질과산화물 생성을 저하시키며 이러한 효과는 β -carotene보다 더 큰 것으로 보고되었다(30). Cheng과 Wilkie(31)는 효모배양액에 retinol을 처리했을 때 세포내 독성이 저하되는 현상을 관찰하였고, 또한 간조직 내 retinol 함량은 급성 부패증이 진행되는 과정 중에서 생성된 free radical의 제거속도와 비례해서 감소되었다고 Tomkins와 Hussey(32)는 보고하였다. Seifert 등(33)은 CCl_4 로 처리된 간조직의 섬유화는 retinyl acetate가 결핍된 상태에서 심한 반면에 retinyl acetate를 섭취시킨 상태에서는 그 정도가 약화되었으므로 retinyl acetate가 간 질환을 예방하는데 필수 영양소임을 밝혔다. 뿐만 아니라 retinol은 체내에서 glutathione(GSH)이나 비타민 E와 C 같은 항산화 영양소의 소모를 막아 항산화 영양소의 절약작용을 통해서 암을 예방하는 것으로 나타났다(34). 또한 *in vitro* 실험에서 13-*cis*-retinoic acid는 ascorbate와 $ADP-Fe^{2+}$ 에 의해 유도된 쥐 간 마이크로솜의 지질과산화 반응을 억제시키는 것으로 보고되고 있는데(17), 본 실험의 13-*cis*-retinoic acid 공급군에서는 혈장과 간 미토콘드리아내에서 에탄올의 급여유무와 상관없이 지질과산화물 함량에는 차이를 보이지 않았고 혈장에서는 비타민 A 결핍군에 비하여 낮은 함량을 보이고 있어서 에탄올에 대한 지질과산화 반응에 대하여 다소 보호효과가 있는 것으로 여겨진다.

혈장과 간조직의 항산화 효소 활성화 측정

간 손상 정도를 나타내는 지표효소인 AP와 G6P 활성화도는 Table 4와 같다. 혈장내 AP 활성화도는 에탄올과 함께 β -carotene과 retinoic acid를 공급시킨 군에서 각각의 pair-fed 군에 비하여 높은 활성도를 보였다. 간 마이크로솜내 G6P 활성화도는 에탄올 급여군 중 비타민 A 결핍군만 pair-fed 군에 비해 유의적으로 감소되었으며 비타민 A를 보충시켰을 때에

는 활성화도가 증가되었다. 에탄올의 만성 중독과 체내 비타민 A가 결핍 혹은 과잉될 경우 bilirubin과 AP 활성화도가 현저히 증가되며 간 손상이 심하여 간세포 괴사가 있을 때에는 glutamate dehydrogenase가 증가된다(35). 이외에도 Kwak(17)은 쥐의 간 마이크로솜을 이용하여 지질과산화 반응을 유도시킨 결과 막 부착 효소 중 G6P 활성화도 저하가 일어난다고 밝혔으며, 이와 관련하여 Lieber(36)는 에탄올성 간 손상 지표로서 G6P 활성화도 변화를 설정하였다. 본 실험에서는 지질과산화물 함량이 높은 FE군에서 G6P가 가장 낮은 활성도를 보였고 비타민 A를 보충시켰을 때는 G6P 활성화도가 증가하였으며, 이는 에탄올을 급여하고 동시에 비타민 A가 결핍된 상태 가장 심한 손상을 나타낸다는 것으로 추측할 수 있다.

에탄올 가수분해 효소인 catalase와 ADH 활성화도 결과는 Table 4에서 제시한 바와 같다. 간 미토콘드리아내 catalase 활성화도는 에탄올 급여군과 pair-fed 군 사이에 유의적인 차이가 없었고 간 사이토졸내 ADH 활성화도는 에탄올 급여군 중 13-*cis*-retinoic acid 공급군만이 pair-fed 군에 비해서 높게 나타났다. 섭취된 에탄올은 주로 위장과 소장에서 흡수되어 간조직에서 acetaldehyde로 산화된 후 최종적으로 물과 탄산가스로 분해되며 이 과정 중 catalase와 ADH는 일차적 산화반응에 관여한다(5). 일반적으로 급성으로 에탄올을 투여할 경우에는 catalase와 ADH 활성화도가 증가되며 이때 에탄올에 의해 유도된 catalase 활성화도는 지질과산화물 분해에 이용되기보다는 초기 에탄올의 대사과정에서 acetaldehyde로 전환시키는 산화효소로 작용한다. 그러나 만성적인 에탄올 급여로 혈중 에탄올 농도가 높아질 때는 간 소포체에 있는 MEOS의 활성화도가 증가되는 것으로 보아서 알코올 산화에 대한 이 효소의 기여도가 높은 것으로 보고되었다(37,38). 따라서 본 실험에서는 장기간의 에탄올 급여로 catalase나 ADH 활성화도가 큰 영향을 받지 않은 것으로 여겨진다.

항산화 효소계는 Table 5에서 제시한 바와 같다. 간 사이토졸내 SOD 활성화도는 에탄올 급여와 함께 비타민 A를 결핍시킨 군에 비해 13-*cis*-retinoic acid를 공급시킨 군이 가장

Table 4. Effects of vitamin A and ethanol administration on plasma and liver alkaline phosphatase, glucose-6-phosphatase catalase and alcohol dehydrogenase activities in rats

Group ¹⁾	AP	G6P	Catalase	ADH
	unit/mL plasma	nmole/mg protein	unit/mg protein	nmole/min/mg protein
FE	78.2 ± 8.8 ^{2)ab3)}	53.5 ± 7.7 ^c	10.5 ± 5.0 ^b	13.4 ± 1.5 ^a
FP	75.4 ± 9.2 ^{abc}	75.4 ± 11 ^{ab}	14.2 ± 2.2 ^{ab}	11.5 ± 2.7 ^a
β E	76.6 ± 9.5 ^{ab}	73.3 ± 8.8 ^{ab}	15.7 ± 3.4 ^a	13.1 ± 2.6 ^a
β P	52.3 ± 9.0 ^c	76.5 ± 11.1 ^{ab}	12.7 ± 5.2 ^{ab}	14.5 ± 4.3 ^a
RE	70.6 ± 8.9 ^{bcd}	73.6 ± 12.3 ^{ab}	17.1 ± 4.1 ^a	12.1 ± 1.1 ^a
RP	59.7 ± 7.9 ^{cdc}	89.8 ± 12.8 ^a	13.1 ± 1.1 ^{ab}	11.7 ± 3.7 ^a
RAE	90.8 ± 13.0 ^a	66.6 ± 8.8 ^{bc}	13.1 ± 6.2 ^{ab}	13.3 ± 9.4 ^a
RAP	55.8 ± 11.8 ^{dc}	64.3 ± 9.1 ^{bc}	16.4 ± 6.8 ^a	7.5 ± 1.2 ^b

¹⁾See the legend of Table 2.

²⁾Means ± SD (N = 8).

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

Table 5. Effects of vitamin A and ethanol administration on liver SOD, GSH-Px, and GST activities in rats

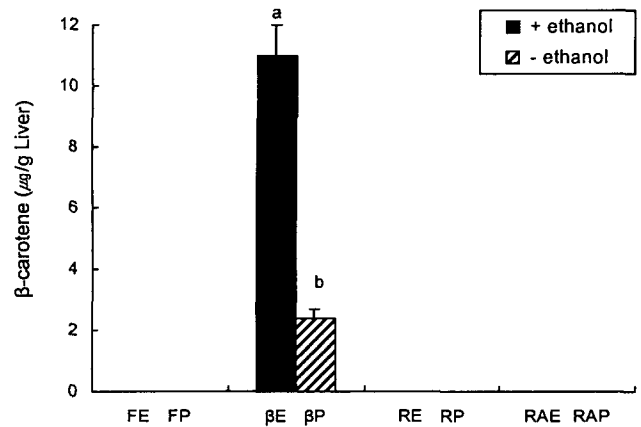
Group ¹⁾	SOD	GSH-Px unit/mg protein	GST
FE	14.4 ± 5.6 ²⁾³⁾	28.2 ± 5.5 ^a	131.5 ± 35.5 ^{ab}
FP	17.4 ± 4.4 ^{bc}	19.7 ± 2.6 ^c	120.8 ± 22.2 ^{abc}
βE	13.5 ± 2.0 ^c	22.1 ± 5.5 ^{bc}	146.7 ± 30.4 ^d
βP	20.0 ± 4.7 ^b	20.6 ± 3.9 ^{bc}	110.4 ± 32.8 ^{bc}
RE	18.4 ± 5.3 ^{bc}	25.9 ± 8.3 ^{ab}	109.5 ± 19.9 ^{bc}
RP	25.6 ± 4.3 ^a	20.6 ± 4.8 ^{bc}	95.4 ± 17.8 ^c
RAE	20.9 ± 6.0 ^{ab}	18.4 ± 5.1 ^c	132.1 ± 45.6 ^{ab}
RAP	13.4 ± 4.3 ^c	22.0 ± 5.9 ^{bc}	93.9 ± 29.6 ^c

¹⁾See the legend of Table 2.²⁾Means ± SD (N=8).³⁾Values with a same superscript letter within the same column are significantly different (p<0.05).

높은 활성도를 보였으며 pair-fed 군 중에서는 retinyl acetate 공급군에서 가장 낮은 높은 활성도를 보였다. 간 사이토솔내 GSH Px 활성도는 에탄올 급여군과 pair-fed 군 사이에 일정한 경향은 없었으며 간 사이토솔내 GST 활성도는 에탄올 급여군 중 β-carotene과 retinyl acetate 공급군이 각각의 pair-fed 군에 비해 증가되었다. 산화성이 강한 O₂를 H₂O₂로 만드는 일차 항산화 효소인 SOD 활성도는 만성적으로 하루 체중 1 kg당 5 g의 에탄올을 섭취한 쥐와 급성으로 투여한 경우 모두 높은 활성도가 유도되었고(39), 본 실험에서처럼 지질과산화물 함량이 높은 에탄올 급여군에서 낮은 활성도를 보인다는 것은 이를 소거하는데 민감하게 반응하여 소모가 많았던 것으로 여겨진다. H₂O₂를 O₂로 만드는 이차항산화 효소인 GSH-Px 활성도는 다른 효소에 비해서 에탄올에 의해 민감한 반응을 보이는 것으로 보고되고 있는데, 쥐에게 체중 1 kg당 5 g의 에탄올을 급여한 군과 5% 에탄올 액체식을 만성적으로 공급한 모든 군에서 혈청내 GSH Px 활성이 감소되었다(38). 그러나 본 실험의 경우 위의 결과와는 상반되게 에탄올 급여시 비타민 A를 결핍시킨 FE군이 pair-fed 군에 비해 오히려 높은 활성도를 보이며 이러한 결과는 생체내 에탄올에 대한 방어작용으로 추측된다. GST는 막에 결합된 지질과산화물을 효과적으로 제거시켜서 생체막을 보호하는데 glutathione(GSH)의 -SH기에 의존적이지만 매우 민감하게 반응한다. 특히 에탄올 대사산물인 acet aldehyde가 thiazolidine 복합체를 형성하기 위해서 -SH기와 결합하므로 -SH기의 감소는 GST 활성도에 영향을 미치게 된다(40).

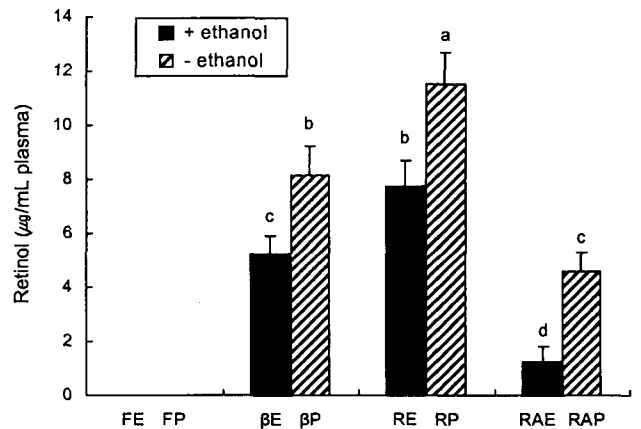
혈장과 간조직의 비타민 A 함량

간조직 내 β-carotene 함량은 Fig. 3에서 제시한 바와 같이 β-carotene를 섭취시킨 군에서만 검출이 되었고 에탄올 급여군이 pair-fed 군에 비해 6배 정도 높은 함량을 보였다. Retinol의 함량은 Fig. 4, 5에 제시한 바와 같이 비타민 A를 결핍시킨 군에서는 검출되지 않은 반면에 혈장과 간조직에서는 동일하게 에탄올 급여군이 pair-fed 군에 비해 유의적으로 낮았고 에탄올 급여군 중에서는 retinyl acetate 공급군

**Fig. 3. Effect of vitamin A and ethanol administration on the level of liver β-carotene in rats.**

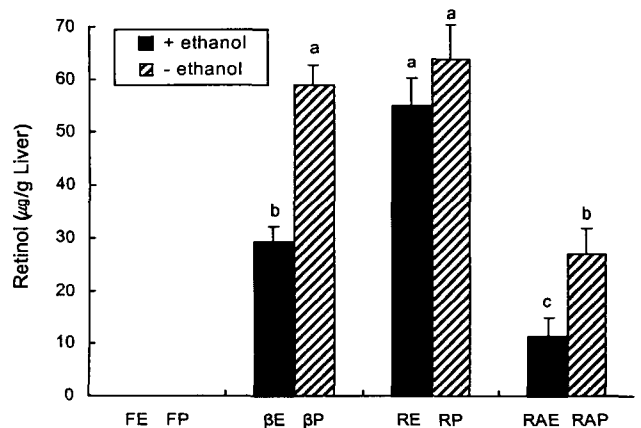
Group: See the legend of Table 2.

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

**Fig. 4. Effect of vitamin A and ethanol administration on the level of plasma retinol in rats.**

Group: See the legend of Table 2.

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

**Fig. 5. Effect of vitamin A and ethanol administration on the level of liver retinol in rats.**

Group: See the legend of Table 2.

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

에서 가장 높은 함량을 보였다. 간조직 내 retinoic acid 함량은 Fig. 6에서 제시한 바와 같이 비타민 A를 결핍시킨 군에서는 검출되지 않았으며 에탄올 급여로 유의적으로 현저한 함량 저하현상이 일어났다. 그러나 13-*cis*-retinoic acid 공급군만이 에탄올 급여유무와 상관없이 가장 높은 함량을 보였다.

에탄올성 지방간, 간섬유화나 간괴사를 일으킨 쥐와 알코올 섭취 후 간 손상을 받은 사람의 간조직과 혈액 내 α -tocopherol이나 β -carotene 함량은 지질과산화물의 증가와 더불어 감소현상이 관찰되었다(30). 본 실험에서 β -carotene을 공급시킨 군에서 간조직의 지질과산화물 함량의 증가와 동시에 β -carotene 함량도 높았으며 이는 β -carotene 자체가 에탄올에 의한 지질과산화 반응에 이용되기보다는 앞서 설명한 Ahmed 등(28)과 Leo 등(29)의 보고처럼 에탄올이 β -carotene 대사에 미친 영향으로 여겨진다.

임상실험에서 알코올 섭취자들은 조직내 retinol 함량이 감소되는데 Halsted(41)는 이러한 현상이 비타민 A의 섭취 저하 때문이라고 하였다. 그러나 Leo와 Lieber(42)은 에탄올과 함께 retinyl acetate를 AIN 권장량의 5~10배 보충시켜서 공급하더라도 정상식이군보다도 2.5배나 빠르게 간조직 내 총 비타민 A 고갈현상이 일어난다고 밝혔다. 에탄올에 의한 조직내 retinol 함량 저하는 에탄올이 비타민 A 대사에 영향을 미쳐서 나타나는 데 Lieber(43)는 에탄올이 쥐의 간 마이크로솜에서 P450 분비를 유도하여 retinol 함량을 감소시킨다고 하였다. 뿐만 아니라 에탄올에 의한 간 리소솜의 손상으로 인해 혈액내 비타민 A 이동 매개물인 lipoprotein 분해가 촉진되어 비타민 A의 고갈이 가속화된다는 것이다. 그리고 Rosenblum 등(44)은 에탄올에 의해 생성되는 지질과산화물로 총 비타민 A 함량의 저하가 일어난다고 하였다. 본 실험의 경우도 지질과산화물 함량이 높은 에탄올 급여군에서 retinol 함량이 저하되었으며, retinyl acetate의 보충공급으로 retinol 고갈현상을 상쇄시킬 수 있었다.

에탄올에 의한 조직내 13-*cis*-retinoic acid 함량 변화는 S.D.계 쥐에게 36% 에탄올 액체식이를 한달 동안 공급시킨 결과 폐, 신장, 그리고 식도에서는 증가된 반면 간 조직에서는 현저히 감소되었으며 이는 간조직에서 에탄올에 의해 유도된 P450에 의해서 retinoic acid 분해가 촉진되어 일어난 결과로 보고되었다(45). 그러나 *in vitro* 실험에서 retinoic acid는 Fe^{2+} 와 ascorbic acid에 의해 생성된 지질과산화물을 retinoic acid가 억제시켰고 그 결과 조직내 retinoic acid 함량이 감소되었다(17)고 하였으나 Alam 등(46)은 *in vivo* 실험에서 retinoic acid 공급으로 오히려 지질과산화 함량을 증가시켰다고 밝혔다. 본 실험에서도 에탄올과 함께 retinoic acid를 공급한 RAE군의 간조직 내 지질과산화물 함량이 다른 군에 비하여 비타민 A를 결핍시킨 군과 함께 유의적으로 높았으므로 retinoic acid 저하현상은 지질과산화물 함량과 관련되기보다는 에탄올에 의해 유도되는 P₄₅₀과 높은 관련성이 있는 것으로 추측되며, 에탄올에 의한 retinoic acid 감소현상은 본 실험의 경우 retinoic acid의 보충공급으로 간조직 내 retinoic acid 수준 저하 현상을 보호할 수 있었다.

요 약

본 연구는 에탄올을 급여하는 동안 일어나는 지질과산화에 의한 간 손상과 이에 대하여 β -carotene, retinyl acetate, 13-*cis*-retinoic acid의 효과를 비교·검토하고자 실시되었다. 혈장내 MDA 함량은 에탄올 급여군 중 비타민 A를 결핍시킨 FE군과 β -carotene을 공급한 β E군에서는 감소되지 않았으나, retinyl acetate와 13-*cis*-retinoic acid 공급시킨 RE군과 RAE군에서 감소되었다. 간 미토콘드리아내 MDA 함량은 에탄올 급여군 중 FE군과 β E군에서 높은 함량을 보인데 반해 RE군과 RAE군에서는 낮은 수준을 보였다. 에탄올 비급여군인 pair-fed 군중에서는 비타민 A를 결핍시킨 FP군에 비해 β -carotene과 retinyl acetate를 각각 공급한 β P와 RP군의 MDA 함량은 감소하였는데 반해 retinoic acid를 공급한 RAP군의 MDA 수준은 차이를 보이지 않았다. 혈장내 AP 활성도는 에탄올과 함께 β -carotene과 retinoic acid를 공급시킨 군에서 각각의 pair-fed 군에 비하여 높은 활성도를 보였으며 간 마이크로솜내 G6P 활성도는 에탄올 급여군 중 비타민 A 결핍군만 pair-fed 군에 비해 유의적으로 감소되었으며 비타민 A를 보충시켰을 때에는 활성도가 증가되었다. 간 사이토졸내 SOD 활성도는 에탄올 급여와 함께 비타민 A를 결핍시킨 군에 비해 13-*cis*-retinoic acid를 공급시킨 군이 가장 높았으며 pair-fed 군 중에서는 retinyl acetate 공급군에서 가장 낮은 높은 활성도를 보였다. 간 사이토졸내 GSH-Px 활성도는 에탄올 급여군과 pair-fed 군 사이에 일정한 경향은 없었으며 간 사이토졸내 GST 활성도는 에탄올 급여군 중 β -carotene과 retinyl acetate 공급군이 각각의 pair-fed 군에 비해 증가되었다. 간조직 내 β -carotene 함량

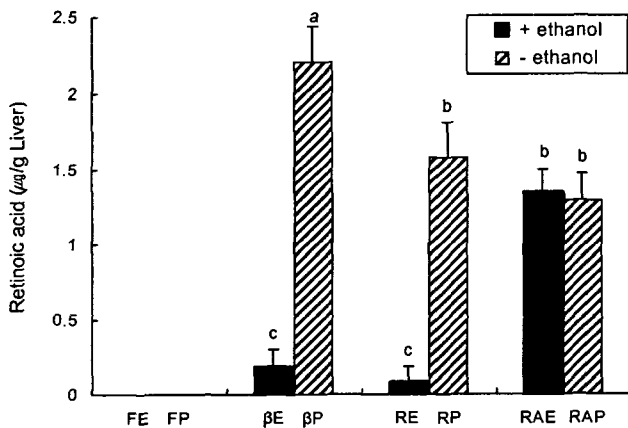


Fig. 6. Effect of vitamin A and ethanol administration on the level of liver retinoic acid in rats. Group: See the legend of Table 2. Values with the same superscript letter are not significantly different ($p < 0.05$).

은 β -carotene, 공급군에서만 검출되었고 에탄올 급여군이 pair-fed 군에 비해 6배 정도 높은 함량을 보였으며 혈장과 간 조직 내 retinol 함량은 에탄올 급여로 낮은 함량을 보였으나 비타민 A 형태 중 retinyl acetate 공급군이 가장 높았다. 간 조직 내 retinoic acid 함량은 에탄올 급여군 중 β -carotene과 retinyl acetate 공급군이 각각의 pair-fed 군에 비해 유의적인 감소를 보였다. 상기 연구 결과를 보면 에탄올 급여로 지질과 산화물 함량이 증가되고 관련 항산화 효소계의 활성도 변화로 보아 간 손상에 지질과산화 반응이 관여된 것으로 보이며 에탄올의 영향에 대한 비타민 A의 효과에는 retinyl acetate가 항산화제로 작용하여 간조직의 급격한 손상을 효율적으로 경감시킬 수 있는 것으로 나타났다.

문 헌

- Nordmann R, Ribiere C, Rouach H. 1992. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Rad Bio Med* 12: 219-248.
- Lieber CS. 1994. Alcohol and the liver. *Gastroenterology* 106: 1085-1105.
- Bailey SM, Cunnighm CC. 1998. Acute and chronic ethanol increase reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh, isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 28: 1318-1326.
- Kato S, Kawase T, Alderman J, Inatomi N, Lieber CS. 1990. Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology* 98: 203-210.
- Lieber CS. 1990. Interaction of ethanol with drugs, hepato toxic agents, carcinogens and vitamins. *Alcoholism* 25: 157-176.
- Yamada S, Mak KM, Lieber CS. 1985. Chronic ethanol consumption alters rat liver plasma membranes and potentiates release of alkaline phosphatase. *Gastroenterology* 88: 3364-3371.
- Cederbaum AI. 1989. Introduction: Role of lipid peroxidation and oxidative stress in alcohol toxicity. *Free Rad Bio Med* 7: 537-539.
- Chang NS, Ryu SM. 2001. Antioxidative effects of green tea powder diet against ethanol-induced oxidative damage in rat brain regions. *Kor Nutr Soc* 34: 525-531.
- Mates JM, Perez C, Castro I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32: 595-603.
- Wolf G. 1994. Vitamin A and health disease. *Am J Clin Nutr* 60: 796-800.
- Wang XD, Krinsky NI, Benott PN, Russell RM. 1994. Bio-synthesis of 9-cis-retinoic acid from 9-cis- β -carotene in human intestinal mucosa *in vitro*. *Arch Biochem Biophys* 313: 150-155.
- Krinsky NI. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Rad Bio Med* 7: 617-635.
- Joh SH, Cho MH, Lee SH, Woo KM, Chang YJ, Kim CS. 1997. The effects of β -carotene on the enzyme activities in ethanol-administered rats. *J Soonchunhyang Med Coll* 3: 325-335.
- Samokyszyn VM, Marnett LJ. 1990. Inhibition of liver microsomal lipid peroxidation by 13-cis-retinoic acid. *Free Rad Bio Med* 8: 491-496.
- Lieber CS, Decarli LM. 1986. The feeding of ethanol in liquid diets. *Exp Res* 10: 550-553.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-361.
- Kwak CS. 1991. Effect of dietary fats on lipid peroxidation, drug-metabolizing enzyme activities and eicosanoid productions in 2-acetylaminofluorene-treated rats. *PhD Thesis*. Seoul National University.
- King PRN, King ET. 1954. Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolyzed with amino antipyrine. *J Clin Pathol* 7: 332-339.
- Aebi H. 1974. Catalase. In *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer HU, ed. Verlag Chemie, Academic Press, USA, p 673-684.
- Koivula T, Koivusalo M. 1975. Different from of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochem Biophys Acta* 397: 9-16.
- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brain M, Carrell RW. 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 85: 337-344.
- Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Lab Clin Med* 70: 158-169.
- Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Comm* 71: 952-958.
- Habig WH, Pabst MJ, Jabby WB. 1974. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step mercapturic acid formation. *J Bio Chem* 249: 7130-7139.
- Shapiro SS, Mott DJ, Machlin LJ. 1984. Kinetic characteristics of carotene uptake and depletion in rat tissue. *J Nutr* 114: 1924-1933.
- Bieri JG, Tolliver TJ, Catilgnani GL. 1979. Stimulation de-termination of tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatograph. *J Clin Nutr* 32: 2143-2149.
- Furr HC, Amedee-Manesme O, Olson JA. 1984. Gradient reversed phased high-performance liquid chromatographic separation of naturally occurring retinoids. *J Chromato* 309: 299-307.
- Ahmed S, Leo MA, Lieber CS. 1994. Interactions between alcohol and β -carotene in patients with alcoholic liver disease. *Am J Nutr* 60: 430-436.
- Leo MA, Kim CI, Lowe N, Lieber CS. 1992. Interaction of ethanol with β -carotene: Delayed blood clearance and enhanced hepatotoxicity. *Hepatology* 15: 883-870.
- Seifter E, Mendecki J, Holtzman S, Jakob D, Kanofsky JD, Friedenthal E, Davis L, Weinzweig J. 1988. Role of vitamin A and β -carotene in radiation protection: relation to antioxidant properties. *J Nat Can Inst* 41: 357-368.
- Cheng LL, Wilkie D. 1991. Mitochondrial activity and cytotoxicity of vitamin A (retinol) in yeast and human cell cultures.: Protective effect of antioxidant. *Biochem Pharma* 42: 1237-1244.
- Tomkins A, Hussey G. 1989. Vitamin A, immunity and infection. *Nutr Rev* 2: 17-25.
- Seifert W, Bosma A, Brouwer A, Hendricks HFJ, Rogoll JM, Leeuwen REW, Thiel-ruiter CF, Seifert-Bock I, Knool DL. 1994. Vitamin A deficiency potentiates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Hepatology* 19: 193-201.
- Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidant, and human disease: curiosity cause or consequence? *Lancet* 344: 721-730.
- Chedido A, Mendenhall CL, Gartside P, French SW, Chen T, Robin L. 1991. Progestic factors in alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterology* 86: 210-218.
- Lieber CS. 1991. *Medical and nutritional complications of alcoholism: mechanism and management* Plenum. Med. Book.

- Com., New York, USA. p 512.
37. Mihas AA, Lavassoli M. 1991. The effect of ethanol on the uptake, binding and desialylation of transferrin by rat liver endothelium : Implications in the pathogenesis of alcohol-associated hepatic siderosis. *Am J Med Sci* 301: 299-306.
 38. Aykac G, Uauai M, Yalcin S, Kocak-toker N, Suvas A, Oz H. 1985. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 36: 70-81.
 39. Rieber C, Sinaceur J, Nordmann JA, Nordmann R. 1985. Discrepancy between the different subcellular activities of rat liver catalase and superoxide dismutase in response to acute ethanol administration. *Alcohol & Alcoholism* 20: 13-21.
 40. Speisky H, Macdonald A, Giles G, Orrego H, Israel Y. 1985. Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. *Biochem J* 225: 565-574.
 41. Halsted CH. 1980. Alcoholism and malnutrition introducing to the symposium. *Am J Clin Nutr* 33: 2705-2713.
 42. Leo MA, Lieber CS. 1983. Interaction of ethanol with vitamin A. *Alcoholism: Clin Exp Res* 7: 15-22.
 43. Lieber CS. 1994. Alcohol and the liver. *Gastroenterology* 106: 1085-1094.
 44. Rosenblum ER, Gavaler JS, Van Thiel DH. 1987. Vitamin A at pharmacologic doses ameliorates the membrane lipid peroxidation injury and testicular atrophy that occurs with chronic alcohol feeding in rats. *Alcohol & Alcoholism* 22: 241-250.
 45. Lieber CS, Garro A, Leo MA, Mak KM, Worner T. 1986. Alcohol and cancer. *Hepatology* 6: 1005-1014.
 46. Alam BS, Brown LR, Alam SQ. 1990. Influence of dietary fats and vitamin E on plasma and hepatic vitamin A and β -carotene levels in rats fed excess β -carotene. *Nutr Can* 14: 111-119

(2002년 12월 10일 접수; 2003년 2월 21일 채택)