碩士學位論文

흰쥐에서 비타민 E 와 C의 항산화작용

濟州大學校 大學院

獸 醫 學 科

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

宋 昊 哲

2000年 2月

흰쥐에서 비타민 E 와 C의 항산화작용

指導敎授 박 전 홍

宋 昊 哲

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

1999年 12月

宋昊哲의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 이 문한

委 員 이 영 재

委 員 박 전 홍

濟州大學校 大學院

2000年 2月

초 록

흰쥐에서 비타민 E 와 C의 항산화작용

(지도교수: 박전홍)

송 호 철

제주대학교 대학원
수의학과

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

비타민 E와 C를 병용함이 철 기인성 지질과산화를 효과적으로 억제하는지는 아직 명확히 알려지지 않았다. 본 실험에서는 지질과산화에 대한 비타민 E와 C의 협동작용을 알기 위해 철을 투여한 대조군, 철과 비타민 E를 투여한 비타민 E군, 철과 비타민 C를 투여한 비타민 C군, 철과 비타민 E 및 C를 투여한 비타민 E+C군으로 실험군을 나누고 철분 투여로 유도된 흰쥐 혈액의 Malondialdehyde (MDA)와 글루타치온, 철 그리고 구리 등을 측정하였다.

혈액 내 MDA 농도는 철을 단독으로 투여한 대조군에서는 5.34±1.33 nmol/ml였고 비타민 E군에서는 0.78nmol/ml의 MDA가 덜 발생하였다. 비타민 C군에서는 1.36nmol/ml의 MDA가 더 발생하였고 비타민 E와 C를 병용한 군에서는 4.22±0.22nmol/ml로 비타민 E군보다 0.34 nmol/ml의 MDA가 적게 발생했다. 혈장 내 글루타치온 농도는 비타민 E와 C를 병용한 군에서 70.86±17.29mg/dℓ cells였으며, 가장 낮은 수준이었다. 비타민 E군과 비타민 E+C군에서 대조군과 비타민 C군보다 평균적혈구혈색소량과 평균적혈구혈색소농도가 정상범위 내에서 높은 수준이었고, 대조군에서 평균적혈구용적이 다른 군에 비해 정상범위 내에서 비교적 높은 수준이었다. 비타민 C군의 간 내 철 농도가 가장 높았고 ($p<0.05$) 반면 근육 내 농도는 낮았다. 비타민 C군에서의 비장 내 구리농도는 대조군에 비해 낮았고 ($p<0.05$) 비타민 E+C군에서 더욱 낮았다 ($p<0.05$). 결론적으로 비타민 E와 C의 병용은 흰쥐의 혈액에서 철 투여로 유도된 지질과산화를 억제함에 있어

비타민 E의 단독사용보다 효과적이었다.

중심어 : 비타민 E, 비타민 C, 지질 과산화, MDA, 글루타치온, 철, 구리

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

서 론

철 결핍성 빈혈을 치료하기 위해 철을 과량 투여하면 오히려 평균 혈색소 농도가 낮아지고 혈장과 적혈구막의 비타민 E와 인지질 농도가 현저하게 떨어진다 (Braughler *et al*, 1987, Sheard, 1994, Livrea *et al*, 1996, 김 등, 1985).

체내에서 합성되지 않는 지용성의 필수 영양소 비타민 E는 생체 내 세포막에 주로 존재하며 가장 오래 알려진 생체의 항산화제로서 인지질, 단백질, 호르몬, 효소활성 등 각종 물질대사에 광범위하게 관여한다. 특히 세포막내에 지질과산화 라디칼을 가장 효과적이고 양적으로 가장 많이 억제하며 (Steinberg와 Chait, 1998, Brigelius-Flohe와 Traber, 1999), 지용성 복합체와 수용성 요소들의 산화를 억제하는 중요한 요소이다 (Waldeck와 Stocker, 1996). 비타민 E는 지질과산화 라디칼을 환원시키고 이로 인해 tocopheryl 라디칼로 산화되는데 글루타치온과 비타민 C 등에 의해 수소전자를 공여받고 재 환원되어 본래의 항산화 기능을 가질 수 있다 (May, 1999, 김 등, 1997)

비타민 C는 혈색소에 의한 지질과산화를 막아주고 세포막내 비타민 E 라디칼을 재생시켜주지만 (Berger *et al*, 1997) 철 킬레이터가 결여된 철분과다증 환자에게는 비타민 C가 과산화제로 작용하기 때문에 투여가 금지되고 있다 (Halliwell, 1994). 비타민 E도 구리와 같이 있을 경우 산화적 DNA 손상을 유발시킬 수 있으므로 (Yamashita et al, 1998) 비타민 E와 C의 항산화기능은 체내 철과 구리의 농도에 비추어 고려되어져야 한다.

육류 보관 시 비타민 E와 C를 동시에 처리한 경우에는 비타민 E 단독투여보다 더 나은 지방산 산화 억제효과를 보였으며 (김 등, 1997), 사람의 적혈구 막 등에서 철기인성 지질과산화를 억제할 수 있으나 (Glascott et al, 1996, Vatassery, 1996, Rifici 와 Khachadrian, 1996, Barroso *et al*, 1997) 아직 그 기전이 정립되지 않았다. 본 실험에서는 철이 과량 투여된 흰쥐에 비타민 E와 C를 동시에 투여하였을 때 비타민 E를 단독으로 투여하는 것보다 적혈구막의 지질과산화를 효과적으로 억제하는지 확인하였다.

또한, 비타민 E와 C의 복강 내 주사로 인한 혈액 및 장기 내 철 함량과 장기 내 구리 함량의 변화가 있는지 확인하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

재료 및 방법

흰쥐(5주령, Sprague-Dawely, 수컷, 대한실험동물센타) 20마리를 철을 투여한 양성 대조군, 철과 비타민 E를 투여한 비타민 E군, 철과 비타민 C를 투여한 비타민 C군, 철과 비타민 E 그리고 비타민 C를 병용 투여한 비타민 E + C군으로 각각 5마리씩 4개의 군으로 나누었다. 사료와 물은 자유급여 하였으며 사료 섭취량과 체중은 매일 기록하였고 실험 하루 전에는 사료와 물의 급여를 중지하였다.

대조군은 $Fe(OH)_3$(프로롱갈, 바이엘 코리아)을 3일마다 양쪽 대퇴부에 교대로 30㎎/100g $_{bw}$씩 투여하였다. 비타민 E(비간톨, 바이엘 코리아)는 매일 5 IU/100g $_{bw}$씩 복강 내로 주사하였으며(허 등, 1991) 비타민 C(비타민C 주사액, 제일제약)는 매일 1㎎/100g $_{bw}$씩 복강 내로 주사하였다.

투약한지 20일이 경과된 후 에테르로 마취하여 심장채혈 후 헤파린 튜브(Becton Dickinson Vacutainer systems, USA)에 혈액을 모았다. 혈액을 4° C에서 1000g로 5분 간 원심분리 (VS-5500CF, Vision Scientific C. Ltd)한 후 혈장을 분리하고 -20℃에서 보관하였다.

제주대학교 중앙도서관

혈액 중 Malondialdehyde(MDA) 농도는 Yagi(1976)의 방법으로 측정하였다. 즉 전혈 100㎕를 1/12 N 황산 4㎖와 반응시키고 10% phosphotungstic acid 0.5㎖를 첨가하였다. 5분간 실온에서 반응시킨 후 원심(4000rpm, 10min)시키고 침전물에 1/12N 황산 2㎖와 10% phosphotungstic acid 0.3㎖를 다시 첨가하였다. 이를 다시 원심분리한(4000rpm, 10min) 침전물에 증류수 4㎖를 혼합한 후 thiobarbituric acid용액(0.67% thiobarbituric acid 수용액 + 차가운 아세트산, 1:1, v/v) 1㎖와 혼합 후 끓은 물에서 60분 동안 반응시켰다. 흐르는 물에서 식힌 다음 n-부탄올 5㎖로 색소를 추출하여 여기파장 515nm와 발산파장 553nm에서 흡광도를 측정하였다(LS-5, Perkin-Elmer). MDA의 표준시약으로 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 이용하여 정량하였다.

혈액 중 글루타치온 농도는 흡광도법을 이용하여 분석하였다(Beutler *et al*, 1963). 전혈 30㎕를 270㎕의 증류수와 혼합한 후 450㎕의 메타인산용액을 첨가하여 원심시켰다(9,000rpm, 10분간). 상층액 500㎕에 0.3M의 인산완충액 2000㎕와

250㎕의 5,5′-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)용액을 혼합한 1분 후 412nm에서 흡광도를 측정하였다. 글루타치온의 농도는 Beutler 등이 제시한 방법(1963)을 이용하여, 즉 ㎎/dℓ cells = 420nm에서의 흡광도 값/13,600 × 307 × 100 × 750/30 × 750/500 × 2,750/500 × 100/PCV로 환산하였다.

철과 구리의 농도는 비장, 간, 대퇴근, 그리고 변을 습식분해한 후 흡광도를 측정하였다 (Spectra AA 220, Varian).

혈장 비타민 C의 농도는 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)법을 이용하여 측정하였다(Roe와 Kuethler. 1943). 즉 혈액을 4℃에서 원심분리한(1000g, 10분간) 다음 0.5㎖의 혈장과 2㎖의 10% 메타인산을 혼합하였다. 이것을 원심분리한(900g에서 10분간) 다음 상층액 1.2㎖와 0.4㎖의 2,4-dinitrophenylhydrazine 용액(0.027 ㏖/ℓ copper sulfate 5㎖ + 0.66 ㏖/ℓ thiourea 5㎖ + 0.01 ㏖/ℓ 2,4-dinitrophenylhydrazine)을 혼합하고 37℃의 항온수조에서 3시간 동안 반응시켰다. 10분간 얼음 속에서 식힌 후 차가운 12M 황산용액 2㎖를 첨가한 다음 520nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

적혈구수(RBC), 적혈구용적비(HCT), 혈색소량(Hb), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC)등은 자동 혈구계산기(h5 · m/hema1, SEAC)를 이용하여 분석하였다. 그리고 적혈구 취약성검사는 흡광도법으로 측정하였다(Bauer, 1982) 즉 잘 혼합한 혈액 20㎕를 10가지 다른 농도의 NaCl에 희석한(0.85, 0.65, 0.60, 0.55, 0.50, 0.45, 0.40, 0.35, 0.30 및 0.0% NaCl) 후 실온에 20분간 정치하였다. 원심(2000rpm, 5분간) 후 540nm에서 흡광도를 측정하여 취약 정도를 비교하였다(HP8453, Hewlett Packard).

통계처리는 ANOVA분석을 한 후 사후검정으로 군간의 통계적 차이를 최소유의차검정(LSD)으로 분석하였다. P값이 5%이내에 있을 때를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 해석하였고, 모든 통계분석은 SAS(SAS Institute Inc, 1985) 프로그램을 이용하여 실시하였다.

결 과

MDA농도는 각각 대조군 5.34±1.33, 비타민 E군 4.56±0.36, 비타민 C군 6.70±1.36, 비타민 E+C군 4.22±0.22 nmol/mℓ로서 비타민 C군은 대조군에 비해 1.36nmol/mℓ이 증가(p <0 05)하였고 비타민 E군에 비해 2.14nmol/mℓ이 증가(p <0.05)하였으며 비타민 E+C군에 비해서는 2.48nmol/mℓ이 증가(p <0.05)하였다. 비타민 E군은 대조군에 비해 MDA가 감소하였으며 비타민 E+C군은 비타민 E군에 비해 0.34nmol/mℓ 감소했으나 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(Fig. 1).

혈액 내 글루타치온 농도는 각 군별로 대조군 90.12±19.50, 비타민 E군 97.62±36.17, 비타민 C군 96 28±18.46mg/dℓ cells 이었고 비타민 E+C군이 70.86±17.29mg/dℓ cells로 가장 낮은 수준이었다(Fig. 2).

비장, 간, 대퇴근 그리고 변에서 철농도(Fig. 3)와 구리농도(Fig. 4)를 측정하였다. 비장의 철농도는 각 군별로 대조군 2610.6±437.7, 비타민 E군 2642.5±731.7, 비타민 C군 3234.3±951.4, 비타민 E+C군 2513.6±637.7μg/g이었고 간의 철농도는 대조군 3576.6±697.5, 비타민 E군 4076.1±239.7, 비타민 C군 4090.8±380.7, 비타민 E+C군 2890.1±452.8μg/g이었다. 비장, 간, 대퇴근 그리고 변의 철농도에서는 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았고 혈색소 농도도 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 비록 각각의 편차의 범위가 컸지만, 근육 내 철농도는 비타민 C의 투여에 의해 감소되었고 비장, 간 그리고 변 중의 철농도는 증가되었으며, 비타민 E+C군에서는 비타민 E군과 C군보다 철농도가 낮았다 ($p<0.05$).

비장 내 구리농도는 각각 대조군 4.7±3.1, 비타민 E군 3.5±1.8, 비타민 C군 1.6±0.7, 비타민 E+C군 1 4±0.9μg/g이었고 대조군에 비해 비타민 C군과 비타민 E+C군에서 유의하게 낮았다 ($p<0.05$). 비타민 E+C군의 근육 내 구리농도는 대조군과 비타민 E군에 비해 낮았으며 ($p<0.05$), 비타민 C군은 비타민 E군 보다 다소 낮았다 비타민 C군에서의 비장과 근육 내 구리농도는 감소하였다. 분변내의 구리농도는 비타민 투여에 의하여 감소하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 보이지 않았다.

혈액학적 변수에서는 평균적혈구용적의 경우 대조군 60.28±0.76, 비타민 E군

57.50±2.38, 비타민 C군 57.80±2.95, 비타민 E+C군 57.23±1.98fℓ으로 대조군에 비하여 비타민 투여군의 평균적혈구용적이 낮은 수준이었으며, 평균적혈구혈색소농도는 대조군 33.28±6.50, 비타민 E군 36.62±8.31, 비타민 C군 33.60±5.50, 비타민 E+C군 35.35±2.34g/dℓ, 평균적혈구혈색소량은 각각 대조군 20.09±4.15, 비타민 E군 21.12±5.27, 비타민 C군 19.33±2.42, 비타민 E+C군 20.18±0.79pg으로 비타민 E군과 비타민 E+C군에서 평균적혈구혈색소농도와 평균적혈구혈색소량에서 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았으나 높은 수준을 보였다. 그리고 적혈구수, 적혈구용적비, 혈색소량 및 백혈구수는 처리군간에 유의한 변화를 보이지 않았다(Table 1).

적혈구 취약성검사에서는 실험군 사이에 차이를 보이지 않았고(Fig. 5), 혈장내 비타민 C의 농도는 각각 대조군 0.16±0.01, 비타민 E군 0.15±0.02, 비타민 C군 0.13±0.02, 비타민 E+C군 0.14±0.01μg/g으로서 각 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 6).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

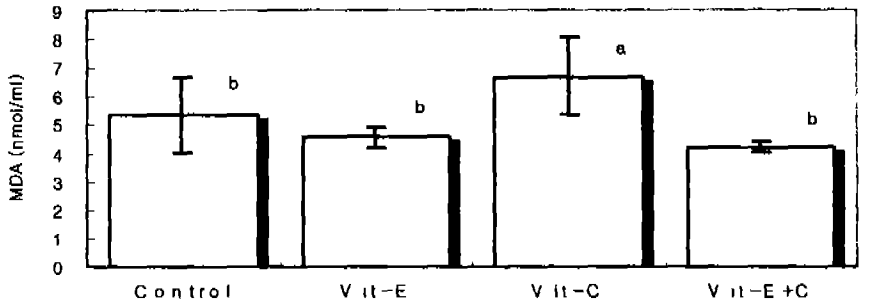


Fig. 1. Effects of Vitamin E (Vit-E) and Vitamin C (Vit-C) on the whole blood malondialdehyde concentrations in rats overdosed with iron.

* Different alphabets mean a difference ($P<0.05$) between experimental groups.
* Control: 30 mg/100 g $_{bw}$ $Fe(OH)_3$,
  Vit-E: 30 mg/100 g $_{bw}$ $Fe(OH)_3$ + 5 IU(5 mg)/100 g $_{bw}$ Vit-E,
  Vit-C: 30 mg/100 g $_{bw}$ $Fe(OH)_3$ + 1 mg/100 g $_{bw}$ Vit-C,
  Vit-E+C: 30 mg/100 g $_{bw}$ $Fe(OH)_3$ + 5 IU (5 mg)/100 g $_{bw}$ Vit-E + 1 mg/100 g $_{bw}$ Vit-C.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

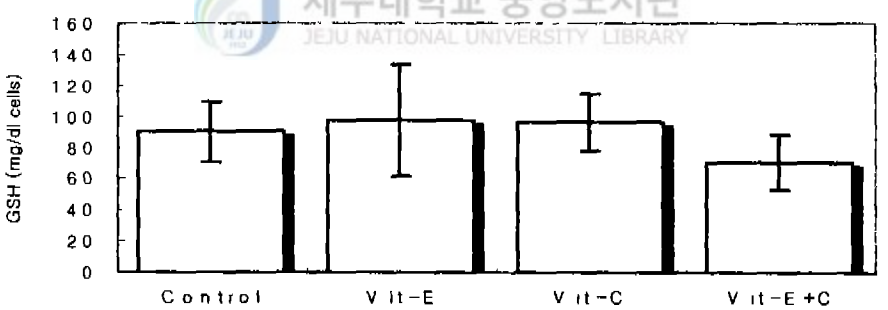


Fig. 2. Effects of Vit-E and Vit-C on the whole blood glutathion concentrations.

* Iron and vitamins were administered as in Fig. 1.

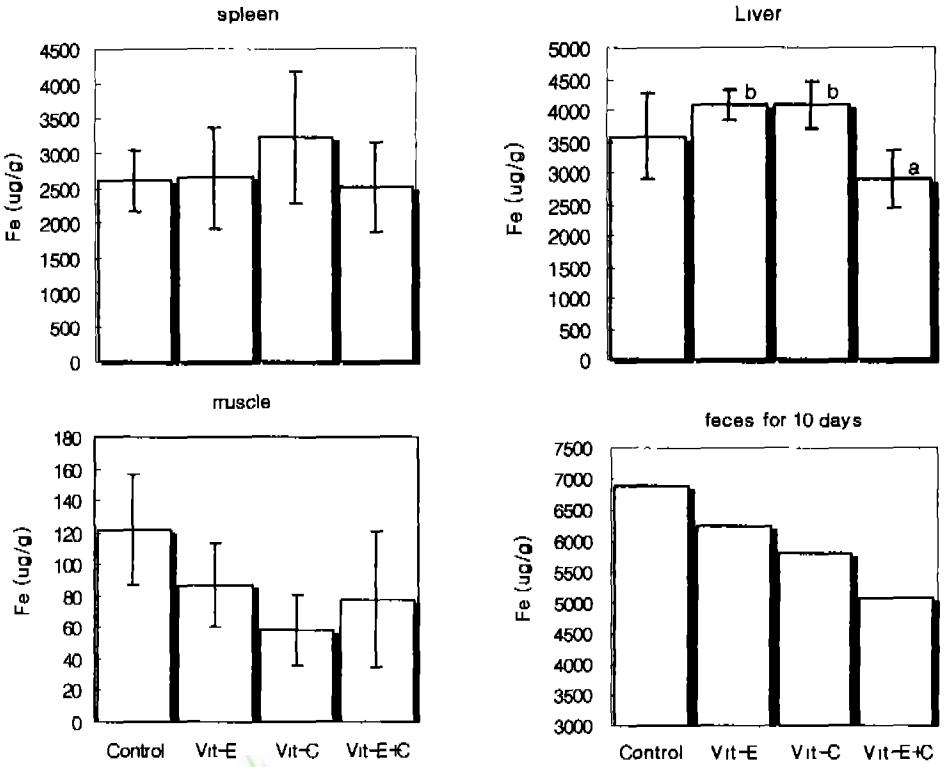
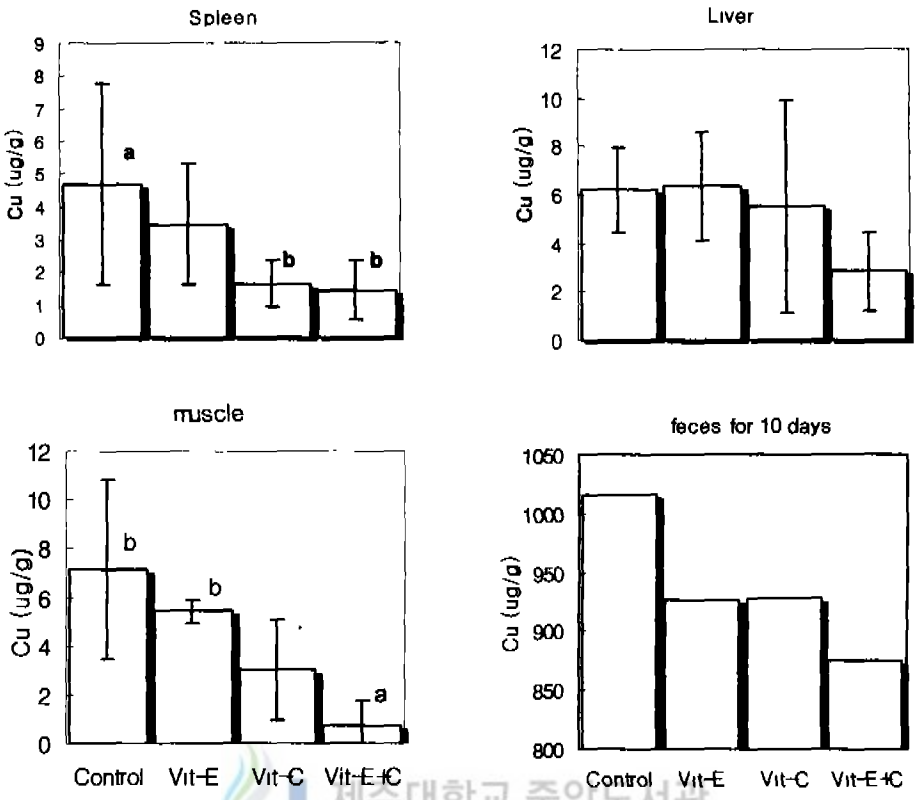


Fig. 3. Effects of Vit-E and Vit-C on the total Fe concentrations in spleen, liver, feces and hind limb muscle.

* Different alphabets mean a difference($P<0.05$) between experimental groups.

* Iron and vitamins were administered as in Fig. 1.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY



제주대학교 중앙도서관

Fig. 4. Effects of Vit-E and Vit-C on the total Cu concentrations in spleen, liver, feces and hind limb muscle.

* Different alphabets mean a difference ($P<0.05$) between experimental groups.
* Iron and vitamins were administered as in Fig. 1.

Table 1. Effects of Vit-E and Vit-C on hematological parameters of rats by overdosed iron

Groups	Control	Vit-E	Vit-C	Vit-E+C
RBC ($10^6/\mu\ell$)	9.23±1.94	8.78±1.97	9.43±1.36	8.88±0.32
HCT (%)	55.6±11.3	55.1±11.1	48.8±9.0	54.0±3.6
MCV (fl)	60.28±0.76	57.50±2.38	57.80±2.95	57.23±1.98
WBC ($10^3/\mu\ell$)	4.23±0.73	6.88±2.21	7.03±2.18	5.10±1.27
Hb (g/dl)	17.95±0.64	17.83±1.66	18.00±1.27	17.90±0.48
MCHC (g/dl)	33.28±6.50	36.62±8.31	33.60±5.50	35.35±2.34
MCH (pg)	20.09±4.15	21.12±5.27	19.33±2.42	20.18±0.79

* Iron and vitamins were administered as in Fig. 1.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

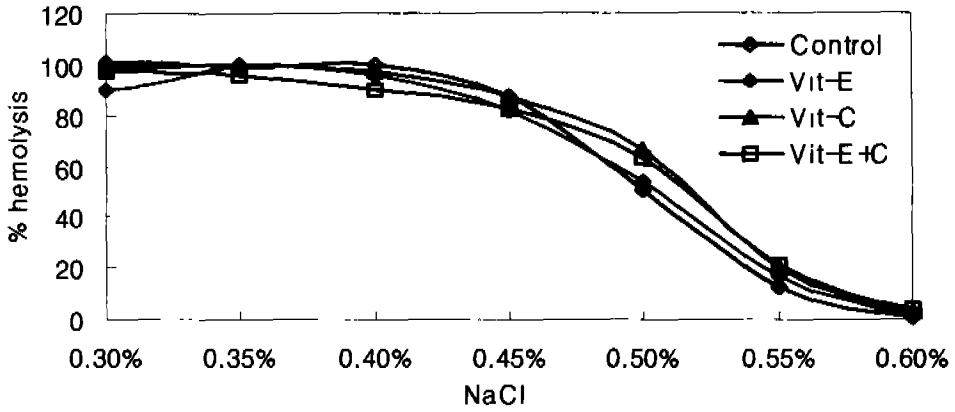
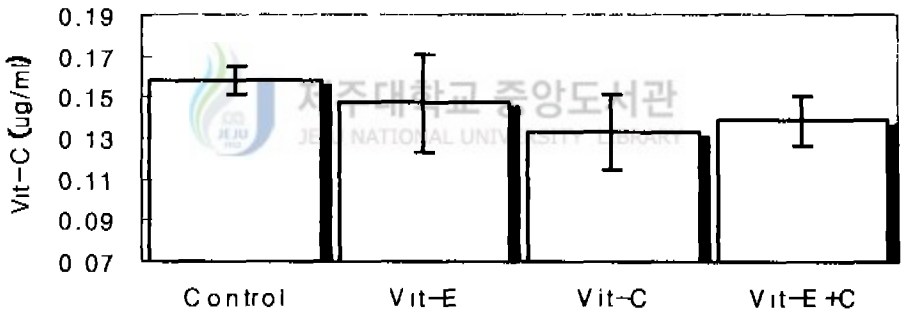


Fig. 5. Effects of Vit-E and Vit-C on the erythrocyte fragility.

* Iron and vitamins were administered as in Fig. 1.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 6. Effects of Vit-E and Vit-C on the plasma Vit-C concentration.

* Iron and vitamins were administered as in Fig. 1.

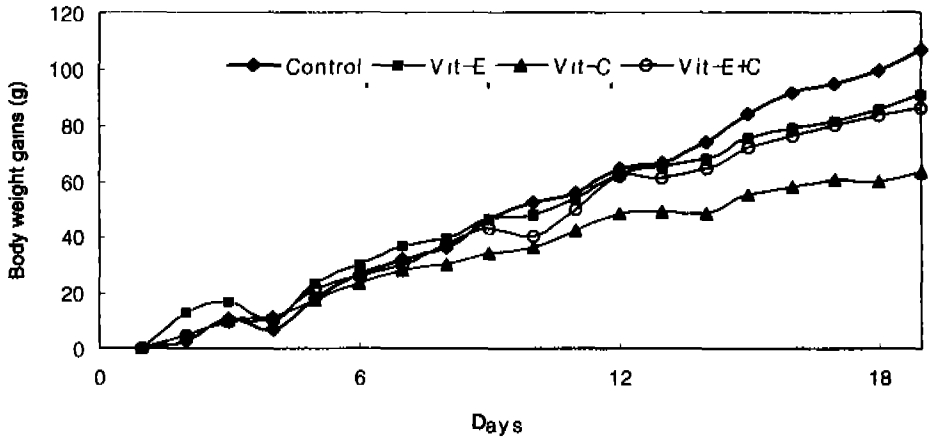
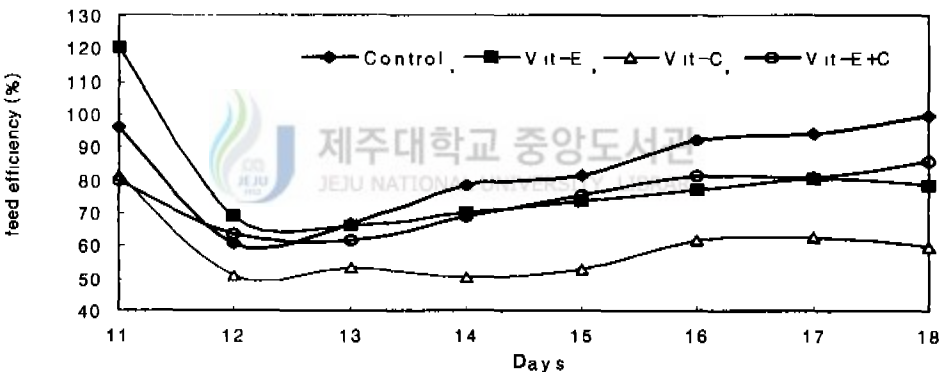


Fig. 7. Effects of Vit-E and Vit-C on body weigth gains

* Iron and vitamins were administered as in Fig. 1.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 8. Effects of Vit-E and Vit-C on feed efficiency

* Iron and vitamins were administered as in Fig. 1.

고 찰

체내에 철이 부족하면 혈색소 농도가 감소하여 소구성 저혈색소성 빈혈이 발생되며 특히 임산부나 성장기의 자돈에서 자주 발생될 수 있다. 철은 혈색소의 구성 이외에도 호흡연쇄반응에 관여하는 cytochrome의 구성에 관여하며 peroxidase, dehydrogenase, xanthine oxidase, aconitase 등과 같은 여러 가지 효소의 조인자로 이용된다. 성장기 동물에서 철결핍은 성장장애는 물론 심한 경우 폐사를 유발시킬 수 있다. 과량의 철을 흰쥐에 투여하였을 경우 비타민 E가 감소되고 아울러 myosin과 actomyosin이 감소되어 증체량이 떨어졌으며, 철과 비타민 E를 투여한 군에서는 철을 단독으로 투여한 군보다 증체량이 높았다(허 등, 1991) 비타민 E와 C를 경구로 병용투여할 경우 human immunodeficiency virus 억제제인 3′- azidothymidine, 3′-azido-2′,3′-dideoxy hymidine에 의해 발생된 골격근 미토콘드리아의 산화적 손상을 억제하였다(Delaasuncion *et al*, 1998).

실험 시작 후부터 투약 마지막 날인 19일까지의 증체량을 비교하였을 때 대조군이 106.3g 비타민 E군이 90.8g 비타민 C군이 62.9g 비타민E와 C의 병용군이 86g으로써 비타민 C군이 가장 낮았다($p<0.05$). 비타민 C군과 비타민 E+C군이 대조군과 비타민 E군 보다 낮아 비타민과 철분을 동시 투여할 경우 증체량이 억제되는 것으로 나타났다.

하지만 철을 단독으로 투여한 대조군의 증체량이 허 등(1991)과 도 등(1996)의 결과와는 달리 가장 높은 증체를 보였다(Fig. 7). 사료섭취량과 사료효율(Fig. 8)을 비교하였을 때 다른 실험군의 사료섭취량이 비슷하였고 대조군의 사료섭취량과 사료효율이 높은 경향을 보였는데 자유급여에 의한 본 실험의 결과로는 원인을 알 수 없었다.

철 이온은 체내에서 아주 짧은 시간 동안 과산화수소를 수산라디칼($OH^{\cdot}$)로 분해시킬 수 있으며 철의 투여로 비타민 E가 결핍되고 인지질 농도가 감소되고 (McCord, 1996), 적혈구 막 및 세포막 지질의 주요 구성성분인 인지질에 결합된

긴 사슬의 불포화지방산이 비효소성 과산화작용을 받아 2중 결합부분이 절단되어 짧은 사슬의 MDA 등의 산화적 분해 산물이 생긴다(김 등, 1985). 적혈구 유령세포를 이용한 실험에서 ferricyanide 등의 산화적 요인을 제거하기 위해 적혈구막 외의 비타민 C와 막내의 비타민 E가 협동작용을 하였으며(May *et al,* 1996), 유전적으로 괴혈병을 일으킨 흰쥐의 조직(Tanaka *et al,* 1997)과 혈장 인지질을(Bisby *et al,* 1994) 산화적 요인에 노출시킬 때 비타민 E와 C가 항산화제로서 협동작용이 있음이 증명되었다. 본 실험에서도 비타민 E와 C를 함께 투여한 실험군에서는 비타민 E를 단독으로 투여한 실험군에 비해 MDA가 감소하여 비타민 E를 단독으로 투여하는 것보다 항산화 효과가 뛰어남을 알 수 있다. 이는 지질 라디칼을 환원시킴으로써 전자를 소요한 tocopheryl 라디칼로 부터 비타민 C가 수소전자를 하나 전달하여 비타민 E로 다시 환원시켜 항산화제로서 역할을 충분히 하기 때문으로 생각된다. 비타민 C군의 MDA 농도가 대조군에 비해 증가한 것은 비타민 C를 과량 투여하였을 경우의 과산화 효과를 나타낸 것으로 추정된다(이 등, 1997). 본 실험에서 사용한 비타민 C의 농도는 흰쥐의 체내 평균 비타민 C 함량인 0.5㎎/100㎎ $_{bw}$ 보다 2배 많은 용량을 투여한 것으로 MDA의 결과와 비교하여 볼 때 철분과 동시투여 시 과산화를 유발하기 충분한 양임을 보여준다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

글루타치온은 글라이신, 글루타민산 그리고 시스테인의 세가지 아미노산로 구성되어 있고, 혈액에서 대부분의 환원형 글루타치온은 적혈구 내에서 발견되어진다(Ernest *et al,* 1963) 글루타치온은 분자량이 작은 프리 라디칼들을 억제할수 있으며, 스스로 glutathione peroxidase의 기질이 되어 지방산 과산화물을 알콜로 변환시킴으로써 다양한 형태의 프리 라디칼을 제거할 수 있다(Halliwell, 1994). 본 실험에서 비타민 E와 C를 동시에 투여한 군에서 가장 낮은 글루타치온 농도가 보였다. 본 실험의 결과로서는 이를 설명할 수 없고 글루타치온이 산화되어 나타나는 형태인 산화형 글루타치온(GSSG)을 분석한 후 글루타치온 산화환원비 [100×(GSSG)/(GSH+GSSG)] 등을 검토하고, 글루타치온에 의한 과산화수소의 환원을 촉매시키는 glutathione peroxidase, glutathione reductase 등의 관련 효소를 측정하여 검토하며, 시스테인 생성에 관여된 메티오닌이나 글루타치온 수송에 관여된 나

트륨 등에 미치는 영향을 검토해야한다(김 등, 1997).

철은 지구상에 가장 많은 원소들 중 하나이지만 70kg의 성인에는 단지 3-4g 만이 함유되어있다. 그 중 거의 65%가 혈색소에 들어있고 3%가 근색소에 그리고 30%가 저장형으로 ferritin과 혈철소이다(May *et al*, 1996). 철의 흡수는 철 결핍성 빈혈이나 갑작스런 출혈이 있는 경우 조혈인자가 자극되어 증가되고, 일반적으로는 체내의 요구에 의해 거의 정량적으로 이루어지고 흡수된 철은 transferrin에 의해 혈청 내로 이동된다. 만약 transferrin의 결합능력을 초과한 용량의 철이 투여되면 혈청 내 철 농도가 급격히 상승하고, 간은 비장처럼 많은 양의 철을 저장하게 된다. 사람의 경우 일일 철 소실량은 소변으로 약 0.1㎎, 피부로 0.2-0.3㎎ 그리고 변으로 0.6㎎정도 이루어지고 그중 0.14㎎정도가 담즙과 탈락된 세포에 의한 것이다(Bothwell, 1995, May *et al*, 1996). 일반적으로 체내 철 함량을 측정할 때는 혈청 ferritin을 측정하지만 본 실험에서는 비타민의 투여에 따른 철과 구리의 체내 위치별 변동량을 보기 위해 비장, 간, 대퇴근 그리고 변에서 측정하였다.

대부분의 동물에서 구리는 소장을 통해 흡수되어진다. 철이나 구리의 흡수는 소장 내에 산도와 관련되어 있는데 병아리와 돼지 그리고 토끼의 경우 비타민 C의 경구투여에 의해 소장의 pH가 낮아져 구리흡수가 억제된 후 구리결핍증이 일어났고, 사료에 비타민 C 0.5%를 첨가하여 투여하였을때 간의 구리농도를 감소시켰으며 대동맥 협착으로 인한 치사율을 높였다(Hunt *et al*, 1970). 돼지에서는 사료 중 2.5%의 비타민 C를 첨가하여 투여했을 경우 구리결핍의 증세를 보였다. 본 실험에서는 비타민 E와 C의 복강내 투여 또한 장기 내 철과 구리의 함량과 배설량에 영향을 끼칠 수 있는지 확인하기 위해 실시되었다. 비타민 C의 투여에 의해 장기 내 철 농도가 높았고 반면 근육 내 철 농도는 낮았다. 그리고 비타민 C를 투여한 군에서 구리농도가 전반적으로 낮았다. 비타민 E와 C의 협동작용에서는 근육 내 철 농도는 비타민 C만 투여한 군보다 더 증가하는 경향을 보였고 장기 내 철 농도와 구리농도는 더 감소하였다. 이때 구리 농도는 Lominadze 등(1996)이 구리결핍 사료로 유도한 Sprague-Dawely계 수컷 흰쥐의 간 내 구리농도인 18±2㎍/g 보다 높지만 비교적 낮은 수준이었다. 이중 농도 수준이 가장 높은 철과 구리의 10일간 총 배설량을 보면 비타민 E와 C를 동시

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

에 복강 내로 투여하였을 때가 가장 적은 배설량을 보였다. 따라서 복강 내로 투여된 비타민 E와 C는 철과 구리의 장기 내 함량에 변화를 주었고, 철이나 구리 결핍 시 비타민 E와 C를 주사하는 것은 배설로 인한 손실을 줄일 수 있을 것이다.

철의 체내 상태를 확인할 경우 혈색소량과 적혈구용적비는 중요한 요소로서 나이, 성별, 개인별, 지역별로 그 정상범위의 차이가 있으므로 고려해야 한다(Beard *et al*, 1996). 과량의 철이 투여되면 용혈성 빈혈과 수종이 일어나며 MCHC는 낮아진다(Braughler *et al*, 1987; Sheard, 1994; Livrea *et al*, 1996; 김 등, 1985). 혈액학적 변수들은 각 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나 비타민 E 투여군과 비타민 E와 C의 병용 투여군에서의 평균적혈구혈색소량과 평균적혈구혈색소농도가 철 단일 투여군과 비타민 C 투여군보다 높은 양상을 보였고, 대조군에서는 평균적혈구용적이 다른 군에 비해 비교적 높은 양상을 보였다(표 1). 평균적혈구혈색소농도의 감소는 적혈구 용적의 평균에 대해 상대적으로 혈색소가 감소된 경우를 의미하고 평균적혈구용적의 증가는 급성 출혈이나 용혈같은 정구성 빈혈에서 나타난다. 즉 철 과량 투여시 정구성 빈혈이 유발될 수 있으며 평균적혈구혈색소량 및 평균적혈구혈색소농도는 떨어지는 양상을 보였고, 비타민 E와 C의 병용투여는 철의 과량 투여로 인해 발생된 평균적혈구용적의 증가와 평균적혈구혈색소량 및 평균적혈구혈색소농도의 감소를 억제할 수 있었다.

적혈구 취약성 검사는 정상 적혈구와 비정상 적혈구의 용량과 표면적의 관계를 평가하는 요인으로 많이 사용된다. 적혈구의 표면적이 증가하거나 적혈구막 인지질이 감소하게 되면 적혈구막은 취약해 지고, 과량의 철에 의해 비타민 E가 결핍되면 적혈구 막 인지질 중 다불포화지방산이 소실되어 dialuric acid와 과산화수소(H_2O_2)에 의한 산화작용에 민감해진 결과 적혈구막이 약화되어 용혈이 잘 생긴다(김 등, 1985; 조종후와 박상열, 1999.). 본 실험은 MDA측정에서 유의한 결과가 나올 것으로 예상된 20일 째에 실시했으나, 실험군 간의 차이를 보이기 위한 기간으로는 충분하지 않았다. 따라서 김 등(1985)의 실험결과를 비추어 볼

제주대학교 중앙도서관

때 60일 정도의 실험기간이면 MDA 뿐만 아니라 취약성 검사에서도 군간의 유의한 차이를 볼 수 있었을 것이다.

혈장 내 비타민 C의 농도는 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았고 비록 각 군의 편차가 컸으나 비타민 E를 투여한 실험군의 혈장 내 비타민 C의 농도는 다른 군에 비해 높은 경향을 보였다. 철과 비타민 C를 투여한 군에서 혈장 비타민 C의 농도가 가장 낮았는데 이는 비타민 E가 충분치 않은 상태에서 체내 생리적 수준을 넘어선 비타민 C에 의해 지질이 과산화되고 비타민 C가 소실된 것으로 보여진다.

결론적으로 비타민 E와 C의 병용은 흰쥐의 철로 유도된 지질과산화를 억제함에 있어 비타민 E의 단독사용 보다 효과적이었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

참고 문헌

Barroso, M.P., Gomex-Diaz, C., Lopez-Lluch, G., Malagon, M.M., Crane, F.L. and Navas, P. 1997. Vitamin C and vitamin E prevent apoptosis induced by serum removal independent of Bcl-2. *Arch. Biochem. Biophys.* 343(2). 243-248.

Bauer, J.D. 1982. Laboratory investigation of hemoglobin. pp.105-106. In: Clinical laboratory methods. The C .C. Mosby company, ST. Louis.

Beard, J.L., Dawson, H., Pinero D.J. 1996. Iron Metabolism: A Comprehensive Review. *Nutr. Rev.* 54(10). 295-317

Berger, T.M., Polidori, M.C., Dabbagh, A., Evans, P.J., Halliwell, B., Morrow, J D., Roberts, L.J. and Frei, B. 1997. Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma. *J. Biol. Chem.* 272(25) 15656-15660.

Beutler, E., Duron, O. and Kelly, B.M. 1963. Improved method for the determination of blood gluthathione *J. Lab. Clin. Med.* 614 · 882-888.

Bisby, R.H. and Parker, A.W. 1995. Reaction of ascorbate with the alpha-tocopheroxyl radical in miceller and bilayer membrane systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 317 : 170-178.

Bothwell, T.H. 1995. Overview and mechanisms of iron regulation. *Nutr. Rev.* 53(9). 237-245.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Braughler, J.M., Chase, R.L. and Pregenzer, J.F. 1987. Oxidation of ferrous iron during peroxidation of lipid substrates. *Biochim Biophys Acta.* 921(17). 457-464.

Brigelius-Flohe, R. and Traber, M.G. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB Journal.* 13(10). 1145-1155.

Delaasuncion, J.G., Delolmo, M.L., Sastre, J., Millan, A., Pellin, A., Pallardo, F.V. and Vina, J. 1998. AZT treatment induces molecular and ultrastructural oxidative damage to muscle mitochondria: prevention by antioxidant vitamins. *J. Clin. Invest.* 102(1). 4-9.

Gershoff, S N. 1993. vitamin C: new roles, new requirement. *Nutr. Rev.* 51(11). 313-326.

Glascott, P.A, Gilfor, E. and Farber, J.L. 1995. Relationship of the metabolism of vitamin C and vitamin E in cultured hepatocytes treated with tertbutyl hydroperoxide. *Molecular Pharmacology.* 48(1). 80-88.

Glascott, P.A., Gilfor, E., Serroni, A. and Farber, J.L. 1996. Independent antioxidant action of vitamin E and vitamin C in cultured rat hepatocytes intoxicated with allyl alcohol. *Biochem. Pharmacol.* 52(8). 1245-1252.

Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants. A personal view. *Nutr. Rev.* 52(8). 253-265.

Hunt, C.E., Landesman, J. and Newberne, P.M. 1970. Copper deficiency in chicks: Effects of vitamin C on iron, copper, cytochrome oxidase activity, and aortic mucopolysaccharides. *Brit. J. Nutr.* 24 : 607-614.

Ibrahim, W., Lee, U.S., Yeh, C.C., Szabo, J., Bruckereza, G. and Chow, C.K. 1997. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: Effects of dietary lipid, vitamin E and iron. *J. Nutr.* 127(7). 1401-1406.

John, L.B., Harry, D.B.S., Domingo, J. and Pinero, M.S. 1996. Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr. Rev.* 54(10). 295-317.

Livrea, M.A., Tesoriere, L., Pintaudi, A.M., Calabrese, A., Maggio, A. Freisleben, H.J., D'Arpa, D., D'Anna, R. and Bongiorno, A. 1996. Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. *Blood.* 88(9). 3608-3614.

Lominadze, D.G., Saari, J.T., Miller, F.N., Catalfamo, J.L., Justus, D.E. and Schuschke, D.A. 1996 Platelet aggregation and adhesion during dietary copper deficiency in rats. Thrombosis & Haemostasis. 75(4). 630-634

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Lopez-Bote, C.J., Rey, A.I., Sanz, M., Gray, J.I. and Buckley, D.J. 1997. Dietary vegetable oils and alpha-tocopherol reduce lipid oxidation in rabbit muscle. *J. Nutr.* 127(6). 1176-1182.

May, J.M., Qu, Z.C. and Morrow, J.D. 1996. Interaction of vitamin C and vitamin E in resealed human erythrocyte ghosts. *J. Biol. Chem.* 271(18). 10577-10582.

May, J.M. 1999, Is vitamin C an antioxidant for the plasma membrane? *FASEB J.* 13(9). 995-1006.

Meydani, S.N., Meydani, M., Blumberg, J.B., Leka, L.S., Pedrosa, M., Diamond, R. and Schaefer, E.J. 1998. Assessment of the supplementation with

different amount of vitamin E in healthy older adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 68 : 311-318.

McCord, J.M. 1996. Effects of positive iron status at a cellular level. *Nutr. Rev.* 54(3). 85-88.

Osweiler, D.O., Carson, T.L., Buck, W.B. and Van, G.A. 1985. Metals and metalloides. pp.87-106. Clinical and diagnostic v :terinary toxicogy. Kendall/Hunt publishing company (in the United stats of America).

Rifici, V.A. and Khachadurian, A.K. 1996. Effects of dietary vitamin C and vitamin E supplementation on the Copper mediated of HDL and HDL mediated cholesterol efflux. *Atherosclerosis.* 127 : 19-26.

Roe, J.H. and Kuether, C.A. 1943. The determination of vitamin C in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydrovitamin C. *J. Biol. Chem.* 147 : 399-407.

Sheard, N.F 1994. Iron deficiency and infant development. *Nutr. Rev.* 52(4). 137-146.

Anonymous. 1985. pp.58-82. SAS/STAT guide for personal computers. SAS Institute Inc. North Carolina.

Scarpa, M., Rigo, A., Maiorino, M., Ursini, F. and Gregolin, C. 1984. Formation of alpha-tocopheryl radical and recycling of vitamin E by vitamin C during peroxidation of phosphatidylcholine liposomes: an electron paramagnetic resonance study. *Biochim. Biophys. Acta.* 801(2). 215-219.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Steinberg, F.M. and Chait, A. 1998. Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smoker. *Am. J. Clin. Nutr.* 68 : 319-327.

Tanaka, K., Hashimoto, T., Tokumaru, S., Iguchi, H. and Kojo, S. 1997. Interaction between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. *J. nutr.* 127(10). 2060-2064.

Van Den Berg, G.J., Yu, S., Lemmens, A.G. and Berynen, A.C. 1994. Dietary vitamin C lowers the concentration of soluble copper in the small intesinal luman of rats. *Brit. J. Nutr.* 71 · 701-707.

Vatassery, G.T. 1996. Oxidation of alpha-tocopherol, vitamin C and thiols in rat brain synaptosomes by peroxynitrite *Biochem. Pharmacol.* 52(4). 579-586.

Waldcck, A.R. and Stocker, R 1996. radical-initiated lipid peroxidation in low density lipoproteins: insights obtained from kinetic modeling. *Chem. Res. Toxicol.* 9(6). 954-964.

Yagi, K. 1976. A simple florometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15 : 212-216.

Yamashita, N., Mureta, M., Inoue, S., Burkitt, M.J., Milne, L. and Kawanishi, S. 1998. vitamin E induces oxidative damage to DNA in the presence of Cu(II) ions. *Chem. Res. Toxicol.* 11 : 855-86.

곽재욱. 1998. 메가비타민 입문. 신일상사, 서울. 279-281 pp. 39. 김성훈, 허린수, 박항균, 도재철, 이영호. 1985. 철분투여가 적혈구내막 및 혈장내의 지질함량에 미치는 영향. 대한수의학회지. 25(2). 125-132.

김수민, 이신호, 성삼경. 1997. Vitamin C와 Vitamin E 처리가 한우육의 육색 및 지방산화에 미치는 영향. 한국축산학회지. 39(3). 267-274.

김영곤, 김영표. 1997. 프리라디칼. 여문각. 서울. 461-465 pp.

도재철, 허린수. 1996. Caffeine, 철분 및 vitamin E 혼합투여 시 rat의 혈액과 간조직 내에서 혈액화학성분과 지질 및 단백질 구성성분의 변화. 대한수의학회지. 36(3). 577-598.

이정원, 김소영, 곽충실. 1997. 비타민 C의 만성적 과량투여가 흰쥐의 혈액과 간의 지질성상, 과산화상태 및 혈소판 thromboxane A_2 생성에 미치는 영향. 한국영양학회지. 30(6). 639-647.

조종후, 박상열 1999. 시험관내 소 적혈구 지질 과산화 유도시 생성되는 형광의 특성과 적혈구 안정성의 변화. 한국수의공중보건학회지. 23(3). 213-218

허린수, 김영홍, 도재철, 최연식, 정정원. 1991. Vitamin E가 철분 투여로 인한 rat의 지질과산화에 미치는 영향. 대한수의학회지. 31(3). 265-270.

제주대학교 중앙도서관

Vitamin E and C reduced lipid peroxidation in rat overdosed iron

Hochul Song

Department of Veterinary Medicine
Graduate School
Cheju National University

(Supervised by professor Jun Hong Park)

Abstract

Antioxidant effect of vitamins E and C on the Fe-dependant lipid peroxidation was a controversial issue yet. To fine the cooperative action of vitamins E and C in the protection against Fe-dependent lipid peroxidation of rat erythrocyte membranes and effects on mineral Fe and Cu concentrations in body organs, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), Fe, and Cu were determined in rats overdosed iron with vitamin supplementation. Control group was treated with Fe, Vit-E group was treated with Fe and Vit-E, Vit-C group was treated with Fe and Vit-C, Vit-E+C group was treated with Fe + Vit-E + Vit-C.

Blood MDA concentrations of control group were 5.34±1.33 ㎚㏖/㎖. The MDA concentrations was reduced by 0.78 ㎚㏖/㎖ in Vit-E group compared with control group, further reduced by 0.34 ㎚㏖/㎖ in compared with Vit-E group. Blood GSH concentrations of Vit-E+C group (70.86±17.29㎎/㏈ cells) were lower than other groups. MCH and MCHC of Vit-E and Vit-E+C groups were lower than other groups in normal range. MCV of control group

제주대학교 중앙도서관
Jeju National University Library

were higher than other groups in normal range. Liver Fe concentrations of Vit-C group were higher than other groups ($p<0.05$) and muscle Fe concentrations of Vit-C group were lower than other groups. Spleen Cu concentrations of Vit-C group were lower than control group ($p<0.05$). Spleen and muscle Cu concentrations of Vit-E+C group were lower than control groups ($p<0.05$). In this result, vitamins E and C had a cooperative antioxidant effect compared with vitamins E on the Fe-dependant lipid peroxidation.

Keyword : vitamin E, vitamin C, lipid peroxidation, MDA, glutathion, Fe, Cu

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

감사의 글

부족함이 너무나 많은 저에게 학문적 가르침과 현명하게 세상을 보는 법을 넓은 마음으로 지도해 주신 박전홍 교수님께 감사드립니다. 또한 바쁘신 가운데 정성으로 논문을 다듬어주신 이문한 교수님, 이영재 교수님께 감사드립니다. 학부 때부터 훌륭한 수의사의 덕망을 가르쳐 주신 신태균 교수님, 임윤규 교수님, 위명복 교수님을 비롯한 모든 교수님께 감사드립니다.

실험하는 동안 많은 도움을 주신 실험실 동료이자 후배 고은아 선생과 정훈, 원근, 은주, 일룡 등께도 감사드리며 할머님, 동생 호정, 군선에게도 감사드립니다. 그리고 이 못난 아들을 어려운 환경 속에서도 하늘과 같은 사랑으로 키워주시고 격려해 주신 부모님께 이 작은 결실을 바칩니다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY