

시험관내에서 철분투여에 따른 혈액성상변화에 대한 Glutathione 및 Ascorbic acid의 방어효과

김 성 훈 · 양 기 천
제주대학교 농과대학 수의학과

Glutathione and Ascorbic Acid Protection of Iron-Induced Changes in the Blood *In vitro*

Kim, S. H, Yang, K. C.

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture Cheju National University

Abstract

The present study was conducted to evaluate the performance of glutathione and ascorbic acid antagonism of iron-induced changes on the hematological findings, RBC fragility, Phospholipid in red blood cell membranes and serum K^+ levels in vitro. Blood was collected from vena cava of 20 Sprague-Dawley male rats(10 weeks), using 0.5 mg of heparin per 10 ml of blood as anticoagulant. These blood were mixed with $Fe(OH)_3$ for oxidation and glutathione and ascorbic acid for antioxidation.

The results obtained were summarized as follows ;

1. RBC counts of glutathione or ascorbic acid mixed groups were significantly decreased than that of negative control group, however, significantly recovered than that of positive control group.
2. RBC fragility rates and K^+ levels of glutathione or ascorbic acid mixed groups were significantly increased than those of negative control group, however, significantly recovered than that of positive control group.
3. Phospholipid and vitamin E concentrations in the RBC Membranes of glutathione or ascorbic acid mixed groups were significantly recovered than those of positive control group.

서 론

철분은 자연계에 존재하는 필수 미량 원소중에서 가장 풍부한 원소의 하나이며 70Kg의 체중을 가진 정상성인의 경우 약 3~4g 정도가 체내에 함유되어 있으며^{1,2)}, 그중의 약 65%는 hemoglobin에 3% 가량

은 myoglobin에 그리고 30% 가량은 ferritin과 hemosiderin 등 유기결합체인 저장형으로 존재하고 있다.¹² 철분의 체내에서의 주요 기능으로는 hemoglobin의 구성요소로서 산소 운반이 주 임무이며 ferrous(Fe²⁺)인 상태로 위 및 소장 점막 상피세포에서 섭취되고 또 hemoglobin에 결합되어 산소 운반에 관여한다. 철분결핍에 의한 빈혈을 치료 및 예방하기 위하여 임상에서 자주 철분을 공급하고 있으며 특히 어린 돼지에게 많이 공급되고 있다.¹³ 그러나 음식물에 함유된 철분은 모두가 흡수되는 것이 아니며 위 및 소장점막 상피세포의 조절기능에 의하여 신체내의 요구에 따라 제한된 양인 필요한 만큼 흡수되고 있다.¹⁴

Melhorn 및 Samuel Gross¹⁵는 미숙영아에서 치료의 목적으로 철분을 과량투여한 결과 혈청내에 Vit-E 함량 감소, 적혈구 감소, 적혈구에 대한 과산화수소 취약성이 증가함을 관찰하였다.

Gölberg 및 Smith¹⁶는 철분을 과량 혼합한 사료를 조제하여 흰쥐에 공급한 결과 Vitamin E 결핍 및 ceroid 색소 형성이 증가한 것을 보고하였다.

다른 여러 학자들에 의해서도 과량의 철분투여는 적혈구 취약성의 증가^{15,16} 및 Vitamin E 함량 감소¹⁷ 등을 보고하였다.

생체내에서의 과량의 철분은 ferric(Fe³⁺)의 형태로 저장되거나 일부 배설된다. 이들 저장형의 철분은 생체내에서 지방질을 산화시켜서 세포막을 구성하는 인지질¹⁸ 및 Vit-E^{11,12} 감소를 초래하게 되어 적혈구의 노화 및 취약성이 증가하므로 용혈성 빈혈을 일으키게 된다.^{6,13,14}

이와같이 여분의 철분이 생체내에서 일어나는 반응과 같이 시험관내에서도 일어난다면 철분의 산화작용에 의해 적혈구 파괴가 증가되므로 Vit-E 함량^{15,16,17} hematocrit 값 및 적혈구수¹⁸의 감소를 예상하였으며 이들의 화학적 근거가 적혈구막을 구성하는 인지질의 함량 감소¹⁹를 추측하였다. 또한 적혈구막 내의 인지질 함량 감소에 따른 적혈구 취약성의 증가를 확인하는 근거로서 적혈구 막내의 K⁺ 이온 농도는 혈장에 비하여 20배 정도 높기 때문에^{18,19} 용혈에 의한 혈장내의 K⁺ 이온 농도 증가²⁰를 예상하여 시험관내에서 혈액에 철분을 직접 혼합하여 일어나는 현상을 조사하였다.

또한 일반적으로 생체내에서 항산화제는 그 작용기전에 따라 free radical의 발생을 미연에 막는 system I 과 이미 생성된 free radical을 포착 제거하는 system II가 있으며, 경우에 따라서는 효소적 항산화제와 비효소적 항산화제로 대별되기도 한다.²¹ 예를 들면 ceruloplasmin, lactoferrin, transferrin, glutathione peroxidase, catalase 등은 지질과산화물이나 과산화수소로부터 지질과산화를 유도하는 free radical의 산생을 막음으로써 예방적으로 작용하는 system I 항산화제이다. vitamin E, vitamin C, uric acid, superoxide dismutase 등은 지질과산화의 유도반응을 저해하거나 지질과산화의 증폭반응을 정지시켜 일종의 radical 소거제로 작용하는 system II 항산화제이다.^{21,22,23} System I 항산화제로 알려져 있는 glutathione을 투여함으로써 철분에 의해 산화가 일어나는 현상을 어느정도 방어할 수 있는지를 확인함으로써 임상에서 사용되는 철분의 공급에서 과량 적용시 철분결핍성 빈혈은 치유될 수 있으나 용혈성 빈혈을 초래하게 되므로 이를 치유 또는 예방의 목적으로 시험관내에서 본 실험을 수행하게 되었다. 또한 ascorbic acid도 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 철분에 대한 직접적인 항산화 효과는 알려져 있지 않아 이를 확인할 목적으로 시험관내에서 항응고제가 처리된 철분투여에 따른 산화 현상을 항산화제인 glutathione 및 ascorbic acid를 투여하여 적혈구 막내의 인지질 함량, 혈장내의 Vit-E 함량, 적혈구 취약성, 혈청 K⁺ 농도 및 혈액학적 소견 등의 변화현상을 조사할 목적으로 본 실험을 수행하게 되었다.

재료 및 방법

혈액 시료의 처리 : Sprague-Dawley계 랫트 20 마리를 이용하여 ether로 마취시킨 후 후대정맥에서 채혈을 하였다. 채혈시 미리 준비된 heparin (약, 170usp unit/mg) 0.5 mg을 혈액 10ml당으로 하여 혈액의 응고를 방지하였다. 각 개체에서 채취된 혈액은 각군의 시험관에 균등히 분주하였다.

시험관의 구성 : 시험군의 구성은 Table 1에서 보는 바와 같이 Fe(OH)₃, glutathione 및 ascorbic acid (Sigma 제)를 각 농도별로 saline 용액에 용해시켜 혈액 ml 당 10 μ 씩 혼합하였다.

Table 1. Experimental Groups and Concentrations of Fe(OH)₃, Glutathione and Ascorbic Acid

Group	Fe(OH) ₃ (%)	Glutathione(%)	Ascorbic Acid(%)
I	—	—	—
II	5	—	—
III	5	1	—
IV	5	5	—
V	5	10	—
VI	5	—	1
VII	5	—	5
VIII	5	—	10

시료의 분석 : Table 1에서 보는 바와 같이 Fe(OH)₃, glutathione 및 ascorbic acid를 각각의 농도로 첨가하여 부드럽게 혼합한 후 5% CO₂ incubator에서 2시간동안 반응이 일어나게끔 방치하였다. 상기 혈액에 대해 자동혈구 계산기 (Coulter S 880, USA)를 이용하여 백혈구수, 적혈구수, 혈색소 농도 (Hgb), Hematocrit(Hct)를 측정하였다. 또한 적혈구 취약성 실험을 Gordon 등의 방법²⁰⁾에 따라 다음과 같이 수행하였다. 각군 혈액을 1% citrate 용액과 혼합하여 원심분리한 후 침전물을 saline 완충용액(0.2M potassium monophosphate + 0.2M NaOH + 0.9% NaOH + 증류수)과 혼합하여 37°C에서 15분간 반응시킨 다음, 5개의 시험관에 0.25ml씩 분주하여 1번의 시험관에는 인산완충용액, 2,3,4 및 5번의 시험관에는 2.4% 과산화수소수를 가하여 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시킨 다음, 실온에서 30~45분간 천천히 섞어 주었다. 1,3,4 및 5번의 시험관에 saline 완충용액, 2번의 시험관에 증류수를 혼합한 후 원심분리하여 1 및 2번의 시험관을 대조로 하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 파괴된 적혈구에 대한 %를 산출하였다.

적혈구 막내의 인지질 함량 측정은 적혈구를 수집²¹⁾한 후 허 등의 방법²²⁾에 따라 수집된 적혈구막에 지질추출용매 (ethyl ether : ethanol=3 : 1)로 총지질을 추출한 후 용매를 증발시킨 다음, 냉각 acetone 으로 인지질을 침전분리하고 toluene에 녹여 copper reagent 로써 cu염을 형성시켜 분리한 후 발색제 (Sodium-diethyldithiocarbamate)로 발색시켜 440nm에서 흡광도를 측정하였다.

또한 혈장내 K⁺ 이온 농도의 측정을 위해 각군 혈액의 일부를 채취하여 1000g에서 10분간 원심분리하여 혈장을 채취한 후 flame photometer(IL, 943, Instrumentation Laboratory)를 이용하여 측정하였다.

적혈구 막내의 vit-E 함량측정은 Nair 및 Magar의 방법²³⁾에 따라서 다음과 같이 처리하였다. 혈액 1ml를 시험관에 취하고 3ml의 0.9% NaCl 용액을 첨가하여 조용히 조심하면서 흔들어 섞은후 2,500rpm에서 5분간 원심분리하였다. 혈장성분인 상층액을 버리고 다시 생리식염수 3ml를 첨가한 후 같은 방법으로 처리하여 상층의 수용액 부분을 버리는 작업을 3번 반복하였다. 여기에 증류수 5ml를 첨가하여 강하게 교반한 후 3,000rpm에서 10분간 원심시켜 불은색의 증류수를 버렸다. 적혈구 막에 0.5ml의 5% NaOH용액을 첨가하여 6시간 실온방치하고 증류수 5ml와 석유ether 3ml를 가하여 2번 추출하였다. 이들 추출액에 phenolphthalein용액 2-3방울을 가하여 alkali성분이 없어 질때까지 씻은 후 증발시키고 phosphomolybdic acid 1ml를 첨가하고 5분후에 ethanol 3ml를 가하여 725nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계학적 분석 : 각 군의 결과를 Student t-test를 이용하여 음성 및 양성대조군과 처치군 사이에 1% 및 5% 수준에서 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

철분투여에 따른 혈액학적 소견의 변화에 대한 glutathione 및 ascorbic acid의 방어 작용 : Table 2에서 보는 바와 같이 정상혈액(Ⅰ군)의 백혈구 수와 철분투여에 따른 백혈구 수의 변화는 통계학적 유의성이 인정되지 않았으며 기타 항산화제(glutathione과 ascorbic acid) 투여군들 사이에서도 유의성이 인정되지 않았다. 그러나 적혈구 수에 있어서는 Ⅰ군에 비하여 철분투여군(Ⅱ군)에서는 유의한(p<0.01) 감소를 나타내었으며 철분+1% 및 5% glutathione 투여군들(Ⅲ 및 Ⅳ군)에서도 유의한(p<0.01) 감소를 나타

Table 2. Glutathione and Ascorbic Acid Protections of Iron-Induced Changes on the Hematological findings

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
WBC($\times 10^3$)	16.74 \pm 3.42	15.78 \pm 3.33	15.93 \pm 4.02	16.98 \pm 3.97	16.32 \pm 5.06	15.92 \pm 3.31	16.03 \pm 4.21	15.84 \pm 4.09
RBC($\times 10^6$)	7.19 \pm 0.50	5.32 \pm 0.34**	5.70 \pm 0.44**	6.64 \pm 0.49**	6.92 \pm 0.54**	5.43 \pm 0.28**	5.41 \pm 0.26**	5.66 \pm 0.39**
			**	**				**
Hgb(g/dl)	14.59 \pm 0.60	14.60 \pm 0.54	14.17 \pm 0.64**	15.01 \pm 0.66*	14.38 \pm 0.66	14.33 \pm 0.54	15.14 \pm 0.54**	14.44 \pm 0.61
							**	
Hct(%)	44.89 \pm 3.21	33.23 \pm 2.63**	5.36 \pm 3.19**	41.47 \pm 3.32**	43.18 \pm 4.42**	33.90 \pm 3.17**	33.78 \pm 4.09**	35.34 \pm 3.62**
			*	**				*

I : negative control(saline solution 20 μ l), II : positive control(5% Fe(OH)₃ 10 μ l + saline solution(10 μ l)

III : 5% Fe(OH)₃ 10 μ l + 1% glutathione 10 μ l, IV : 5% Fe(OH)₃ 10 μ l + 5% glutathione 10 μ l

V : 5% Fe(OH)₃ 10 μ l + 10% glutathione 10 μ l, VI : 5% Fe(OH)₃ 10 μ l + 10% ascorbic acid 10 μ l

VII : 5% Fe(OH)₃ 10 μ l + 5% ascorbic acid 10 μ l, VIII : 5% Fe(OH)₃ 10 μ l + 10% ascorbic acid 10 μ l

* : Significantly different from negative control value at p<0.05 (** : p<0.01)

: Significantly different from positive control value at p<0.05 (## : p<0.01)

Table 3. Glutathione and Ascorbic Acid Protections of Iron-Induced Changes on the RBC Fragilities(%)

ID	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	3.20	11.21	10.42	7.92	3.14	16.33	11.42	17.43
2	3.74	14.84	11.93	8.41	6.32	15.17	18.33	15.41
3	3.61	19.17	9.37	6.33	3.11	10.42	17.52	13.21
4	3.48	15.44	8.16	10.19	2.42	20.33	19.27	10.35
5	3.16	22.92	14.44	11.42	5.19	14.17	16.43	19.33
6	3.48	18.16	7.17	5.14	10.33	18.44	10.52	15.21
7	2.50	17.91	10.33	7.44	2.31	17.22	19.18	19.37
8	2.54	17.44	11.21	8.31	1.94	15.33	18.42	12.18
9	1.45	16.14	7.74	9.17	1.87	16.19	16.43	11.88
10	1.64	19.21	8.92	3.42	3.17	15.42	16.94	15.84
11	2.98	18.47	13.17	8.04	3.42	18.24	15.17	12.92
12	1.80	13.94	17.92	8.47	2.93	16.17	14.44	17.93
M \pm SD	2.80 \pm 0.80	17.07 \pm 3.01**	10.90 \pm 3.11**	7.86 \pm 2.14**	3.85 \pm 2.42**	16.12 \pm 2.47**	16.17 \pm 2.85**	15.07 \pm 3.00**
			**	*				*

I : negative control(saline solution 20 μ l), II : positive control(5% Fe(OH)₃ 10 μ l + saline solution(10 μ l)

III : 5% Fe(OH)₃ 10 μ l + 1% glutathione 10 μ l, IV : 5% Fe(OH)₃ 10 μ l + 5% glutathione 10 μ l

V : 5% Fe(OH)₃ 10 μ l + 10% glutathione 10 μ l, VI : 5% Fe(OH)₃ 10 μ l + 10% ascorbic acid 10 μ l

VII : 5% Fe(OH)₃ 10 μ l + 5% ascorbic acid 10 μ l, VIII : 5% Fe(OH)₃ 10 μ l + 10% ascorbic acid 10 μ l

* : Significantly different from negative control value at p<0.05 (** : p<0.01)

: Significantly different from positive control value at p<0.05 (## : p<0.01)

Table 4. Glutathione and Ascorbic Acid Protections of Iron-Induced Changes on the Phospholipid concentration in the RBC Membranes(mg/dl)

ID	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	121.4	100.4	76.8	120.9	119.3	82.3	85.6	81.5
2	135.1	84.3	109.2	104.1	100.6	93.7	89.7	95.4
3	109.4	90.0	106.3	110.2	121.2	91.2	98.3	86.7
4	114.4	84.2	100.3	104.6	106.7	109.3	73.5	92.1
5	116.3	68.7	95.7	88.3	110.1	83.1	100.4	112.3
6	123.7	93.9	93.5	113.5	116.3	99.7	105.4	75.6
7	130.9	77.1	109.9	97.2	120.8	79.2	74.6	106.2
8	112.4	79.3	84.5	98.1	120.9	81.6	110.7	100.6
9	120.9	84.5	100.9	103.7	104.7	94.5	93.4	73.7
10	130.4	90.4	83.1	111.4	99.2	78.8	85.2	90.1
11	142.7	103.2	100.3	120.6	120.7	105.3	96.6	96.4
12	105.2	70.8	103.7	93.1	123.5	77.6	80.4	90.4
M±SD	121.9±11.2	85.6±10.7**	97.0±10.7***	105.5±10.3**	113.7±8.9***	89.7±10.9**	91.2±11.8**	91.7±11.5**
			*	**				

I : negative control(saline solution 20 μℓ), II : positive control(5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + saline solution(10 μℓ)
 III : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 1% glutathione 10 μℓ, IV : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 5% glutathione 10 μℓ
 V : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 10% glutathione 10 μℓ, VI : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 10% ascorbic acid 10 μℓ
 VII : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 5% ascorbic acid 10 μℓ, VIII : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 10% ascorbic acid 10 μℓ
 * : Significantly different from negative control value at p<0.05 (** : p<0.01)
 # : Significantly different from positive control value at p<0.05 (## : p<0.01)

Table 5. Glutathione and Ascorbic Acid Protections of Iron-Induced Changes on the Serum K⁺ Levels (mmol/l)

ID	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	4.21	15.21	13.32	13.17	5.31	17.33	15.42	15.67
2	5.38	18.33	15.21	11.33	5.93	15.36	16.98	14.98
3	5.71	17.93	14.32	12.38	6.17	16.42	17.88	16.21
4	5.34	18.38	18.88	14.42	7.23	14.98	17.84	17.33
5	4.19	15.21	17.21	10.92	5.62	15.44	17.92	15.28
6	4.42	22.23	13.17	10.33	6.28	19.33	16.42	16.86
7	4.69	19.92	14.32	13.21	5.42	18.21	15.57	14.28
8	5.33	19.69	18.52	12.33	4.72	19.37	18.93	15.92
9	4.29	15.38	16.44	11.98	6.33	18.63	18.62	17.37
10	5.04	16.22	17.23	12.37	7.17	15.21	17.17	16.32
11	4.70	17.93	16.33	11.23	5.42	16.39	16.94	15.17
12	4.98	18.08	14.92	12.11	4.99	15.98	17.82	16.72
M±SD	4.86±0.52	17.88±2.13**	15.82±1.91**	12.15±1.12**	5.89±0.80***	16.89±1.63**	17.29±1.10**	16.01±0.97**
			**	**	*			

I : negative control(saline solution 20 μℓ), II : positive control(5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + saline solution(10 μℓ)
 III : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 1% glutathione 10 μℓ, IV : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 5% glutathione 10 μℓ
 V : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 10% glutathione 10 μℓ, VI : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 10% ascorbic acid 10 μℓ
 VII : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 5% ascorbic acid 10 μℓ, VIII : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 10% ascorbic acid 10 μℓ
 * : Significantly different from negative control value at p<0.05 (** : p<0.01)
 # : Significantly different from positive control value at p<0.05 (## : p<0.01)

Table 6. Glutathione and Ascorbic Acid Protections of Iron-Induced Changes on the Vitamin E Concentrations in RBC Membranes(mg/dl)

ID	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	18.21	9.81	9.56	11.18	15.48	8.54	9.25	10.98
2	17.35	10.87	8.23	12.29	14.88	7.22	10.69	11.16
3	14.98	6.89	7.88	12.38	12.28	9.33	8.53	9.53
4	17.25	8.44	9.26	11.98	17.18	7.58	7.84	8.59
5	16.63	7.21	6.86	11.35	16.35	8.87	11.29	9.67
6	18.54	9.44	11.18	10.87	12.27	7.35	6.59	10.26
7	16.29	7.39	10.97	12.56	14.13	6.89	7.88	10.67
8	19.65	9.25	12.86	13.53	18.11	9.45	8.93	9.26
9	15.83	10.08	8.55	14.19	15.32	9.66	10.77	8.65
10	13.81	6.39	10.08	10.27	14.69	6.52	7.57	9.17
11	18.67	5.51	10.86	15.25	15.35	6.22	10.39	9.26
12	12.81	5.33	7.10	11.19	17.07	8.89	9.87	9.59
M±SD	16.67±2.05	8.05±1.85**	9.45±1.18***	12.25±1.46***	15.26±1.18***	8.04±1.21**	9.13±1.49**	9.73±0.86***

I : negative control(saline solution 20 μℓ), II : positive control(5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + saline solution(10 μℓ)

III : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 1% glutathione 10 μℓ, IV : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 5% glutathione 10 μℓ

V : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 10% glutathione 10 μℓ, VI : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 10% ascorbic acid 10 μℓ

VII : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 5% ascorbic acid 10 μℓ, VIII : 5% Fe(OH)₃ 10 μℓ + 10% ascorbic acid 10 μℓ

* : Significantly different from negative control value at p<0.05 (** : p<0.01)

: Significantly different from positive control value at p<0.05 (## : p<0.01)

내었다. 그러나 철분 + 10% glutathione 투여군(V군)에서는 I군에 비해 유의성이 인정되지 않았다. 이는 glutathione 투여용량이 증가함에 따라 적혈구의 수가 증가함을 의미한다. 즉, 철분에 의한 적혈구 수의 감소가 항산화제인 glutathione의 방어효과가 생각된다. Melhorn 및 Samuel Gross⁹⁾의 보고에서 미숙영아의 철분결핍성 빈혈을 치료할 목적으로 철분을 과량투여한 결과 혈청내의 Vit-E 함량감소, 적혈구 수의 감소, 적혈구 취약성의 증가를 보고한 바 있다. Golberg 와 Smith, 및 William 등도 적혈구 막의 취약성에 대한 영향에 대해서는 철분투여로 vitamin E가 산화되며 이로 인해 tocopherylquinone으로 불활성화된다고 보고한 바 있다.

이와같은 여러 학자들의 보고에서 보는 바와 같이 철분의 과량투여는 적혈구막을 구성하는 vitamin E를 불활성화시키고 세포막을 구성하는 인지질의 함량을 감소시켜 세포의 노화를 초래하게 하고 이로 인한 적혈구 취약성이 증가하는 것으로 생각된다. 본 연구의 결과에서도 정상혈액군에 비해 철분투여군에서 적혈구 수가 유의한 감소를 나타낸 것은 상기 여러 학자들의 보고와 같은 맥락이라 생각된다.

한편 glutathione 투여군들에서는 glutathione 농도 증가에 따른 적혈구수의 증가가 인정되었다. 항산화제로 작용하는 glutathione이 철분에 반응하여 감소된 산화제의 영향으로 적혈구에 미치는 영향의 감소로 인한 영향이라 생각된다. 여러학자들^{8,9)}의 보고에서 철분의 과량투여는 항산화제인 vit-E 함량 감소를 초래한다고 하였다. 즉, vit-E의 공급에 의해 철분과량투여에 따른 부작용을 치유할 수 있는 것이라 하였다. 이와같은 관점에서 볼때 system I 항산화제인 glutathione 과 system II 항산화제인 ascorbic acid에 의해 적혈구에 미치는 철분의 독성작용에 방어적인 역할을 한 것으로 생각된다.

Hematocrit치에 있어서 I군과 다른 군들 사이의 유의차 검정은 적혈구수에서 나타난 결과와 동일하

여 적혈구수 감소에 의한 hematocrite치의 변화라 생각된다.

철분투여에 따른 적혈구 용혈성에 대한 glutathione 및 ascorbic acid의 방어작용 : Table 3에서 보는 바와 같이 I군에 비해 II, III 및 IV군에서 유의한(p<0.01) 증가를 나타내었다. 또한 ascorbic acid 투여군에서도 유의한(p<0.01) 증가를 나타내었다. 그러나 10% glutathione 투여군(V군)에서는 유의성이 인정되지 않았다. 이들로 보아 정상혈액에 비해 철분투여군에서 적혈구 용혈율이 크게 증가되었다. 이는 Table 2에서 나타난 적혈구 수의 감소가 적혈구 용혈의 증가가 원인이된 것임을 알수 있다. 특이할 점은 가장 높은 농도의 glutathione 투여군에서는 정상 혈액군과 같은 정도의 용혈율을 나타낸 것으로 보아 철분산화제에 대한 항산화제인 glutathione의 방어효과가 있는 것으로 생각된다. 이는 여러학자들의 보고^{2,5,6,7)}에서 과량의 철분투여는 적혈구 취약성이 증가 한다는 결과와 동일하였다.

철분투여에 따른 적혈구막 내의 인지질함량 변화에 대한 glutathione 및 ascorbic acid의 방어작용 : Table 2와 Table 3에서 나타난 철분투여에 따른 적혈구수의 감소 및 용혈율의 증가원인이 산화제에 의한 적혈구막의 인지질 함량 감소에 있는 것으로 생각되어 적혈구막을 수집하여 인지질 함량을 분석한 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 I군에 비해 철분투여군인 II군에서 유의한 감소를 나타내었다. 이는 DeLuca¹⁰⁾ 및 김 등⁶⁾도 과량의 철분은 ferric(Fe³⁺)의 형태로 저장되거나 일부 배설된다. 이들 저장형의 철분은 생체내에서 지방질을 산화시켜서 세포막을 구성하는 인지질 함량의 감소를 초래하게 되어 적혈구의 노화 및 취약성을 증가시키는 것으로 보고한 바 있다.

철분투여에 따른 적혈구막 내의 철청K⁺ 이온 농도변화에 대한 glutathione 및 ascorbic acid의 방어작용 : Table 2에서 나타난 적혈구수의 감소, Table 3에서 나타난 용혈율의 증가, Table 4에서 나타난 적혈구막 인지질 함량의 감소 등은 적혈구의 파괴가 일어났다는 결과에서 나온 것이라 생각된다. 이를 뒷바침하기 위하여 적혈구막내의 K⁺ 이온 농도는 혈장에 비하여 20배 정도 높기 때문에^{18,19)} 적혈구 파괴가 확실한 원인이라면 혈장내의 K⁺ 이온 농도 증가할 것으로 추측되어 수행한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 정상혈액군의 4.86%에 비해 다른 모든 군들에서 유의한 (p<0.01) 증가를 나타내었다. 한편, 철분투여군(II군)에 비해 glutathione투여군에서는 유의한 감소를 나타내었다. 이들의 결과는 산화제에 의한 glutathione의 방어효과가 있는 것으로 생각된다. ascorbic acid 투여군에서는 방어효과는 인정되었으나 glutathione의 방어효과에 비해 다소 떨어지는 결과를 얻었다.

상기의 결과로 보아 철분투여에 의하여 철분결핍성 빈혈은 치유될수있으나 과량의 투여에 의해서는 용혈성 빈혈을 초래하게 되므로 이를 치유 또는 예방의 목적으로 glutathione 및 ascorbic acid의 공급은 철분에 대한 항산화 효과가 있는 것으로 추측된다.

철분투여에 따른 적혈구막내의 Vit-E 함량변화에 대한 glutathione 및 ascorbic acid의 방어작용 : Binder 등^{8,9)} Golberg 및 Smith⁴⁾, Melhorn 및 Samuel Gross³⁾, Rose 및 Gyorgy^{11,12)}, Kim 등⁶⁾은 생체내에서 과량의 철분공급은 세포막의 vit-E 함량을 감소시키 것으로 보고한 바 있다.

본 연구에서도 나타난 적혈구수의 감소, 용혈율의 증가, 적혈구막 인지질 성분의 감소 및 혈장 K⁺ 이온 농도의 증가 등으로 미루어 볼때 적혈구막내에 있는 vit-E 함량이 감소할 것으로 추측되어 시험관내에서 수행한 결과 Table 6과 같은 결과를 얻었다. 정상혈액군의 경우 16.67mg/dl 농도에 비해 철분투여군에서는 8.05mg/dl의 농도로 유의한 (p<0.01) 감소를 보였다. 물론 glutathione 투여군에서는 I군에 비해서는 감소되었으나 II군에 비해서는 유의한 증가가 있는 것으로 보아 glutathione에 의한 방어작용이 나타난 것이라 생각된다. ascorbic acid 투여군들에서도 I군에 비해 감소 경향이 보였으나 II군과의 비유에서는 크게 방어작용을 하는 것으로 생각되지는 않는다.

이상의 결과로 미루어보아 시험관내에서 정상혈액에 철분을 투여한 군에서는 적혈구파괴에 의한 적혈구수의 감소, 용혈율의 증가, hematocrit치의 감소, 적혈구막 인지질 함량 감소, 적혈구막 vit-E 함량 감소 등을 초래하게 되었다. 이와같은 산화제 철분에 대한 방어작용이 있을 것으로 생각되는 항산화제

인 glutathione 및 ascorbic acid를 철분과 함께 동시 투여한 결과는 정상혈액 군 보다는 다소 철분에 의한 산화영향을 받았으나, 철분투여군에 비해서는 현저한 방어작용이 있는 것으로 생각된다. glutathione 및 ascorbic acid 사이의 방어효과에서는 ascorbic acid에 비해 glutathione의 방어효과가 우수한 것으로 인정되었다.

참 고 문 헌

1. Kaneko JJ. (1980) : Clinical biochemistry of domestic animals, 3rd ed, Academic Press. 649~669.
2. Martin DW, Mates PA. and Ridwell VW. (1983) : Haper's review of biochemistry, 18th ed., Lange Medical Pub., 559~581.
3. Melhorn DK. and Samuel Gross MA. (1971) : Vitamin E dependent anemia in the premature infant. 1, Effect of large doses of medicinal iron. J. Ped., 79 : 569~580.
4. Golberg L. and Smith JP. (1960) : Vitamin A and E deficiencies in relation to iron overloading in the rat. J. Pathol Bacteriol., 80 : 173~180.
5. Ritche JH, Fish MB, McMasters V. and Grossman M. (1975) : Edema and hemolytic anemia in premature infants. New Engl. J. Med. 292 : 887~890.
6. Sung-Hoon Kim, Rhin-Sou Huh, Hang-Kyun Park, Jae-Chul Do and Young-Ho Lee (1985) : Effect of Administration of iron on the lipid concentrations in the RBC membrane and plasma, 수의학회지. 25(2) : 125~132.
7. Williams ML, Shott RJ, O'neal PL. and Oski FA. (1975) : Role of dietary iron and fat on vitamin E deficiency anemia of infant. New. Engl. J. Med. 292 : 887~890.
8. Binder HJ, Herting DC, Hurst V, Finch SC. and Spiro HM. (1965) : Tocopherol deficiency in man. New Engl. J. Med. 273 : 1289~1296.
9. Binder HJ, Spiro HM, and Finch SC. (1966) : Autohemolysis in tocopherol deficiency secondary to steatorrhea. Am. J. Med. Sci. 90 : 685~688.
10. DeLuca HF. (1978) : Handbook of lipid research. 2. The fat-soluble vitamins, Plenum press, New York. p. 141.
11. Rose CS. and Gyorgy P. (1950) : Tocopherol requirements of rats by means of the hemolytic test. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74 : 411~415.
12. Rose CS. and Gyorgy P. (1952) : Specificity of hemolytic reaction in vitamin E deficient erythrocytes. Am. J. Physiol. 168 : 414~420.
13. Mengel CE, Kann HE, Heyman A. and Metz E. (1965) : Effect of in vivo hyperoxia on erythrocytes. 2. Hemolysis in human after exposure to oxygen under high pressure. Blood 25 : 822~828.
14. Oski FA. and Barness LA. (1967) : Vitamin E deficiency : A previously unrecognized cause of hemolytic anemia in the premature infant. J. Ped. 70 : 211~220.
15. Bunyan J, Green J, Edwin EE. and Diplock AT. (1960) : Studies on vitamin E. 5. Lipid peroxidation in diaphoric acid-induced hemolysis of vitamin E-deficient erythrocyte. Biochem. J. 77 : 47~52.
16. Marvin HN, Dinning JS. and Day PL. (1960) : Erythrocyte Survival in Vitamin E deficient monkeys. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 105 : 473~475.

17. Nitowsky HM, Cornblatch M. and Gordon HH. (1956) : Studies of tocopherol deficiency in infants and children. 3. Plasma tocopherol and erythrocyte hemolysis in hydrogen peroxide. *Am. J. Dis. Child.* 92 : 164~174.
18. Sung-Hoon Kim, Hwa-Seon Hwang, Shin-Woo Cha, Sang-Seop Han and Jung-Koo Roh(1993) : The effect of captafol on the hematological value, erythrocyte membrane and plasma biochemical value in vitro, 대한 수의학회지. 33(3) : 507~511.
19. Kumar SS, Sikka HC, Saxena J. and Zweig G. (1975) : Membrane in human erythrocyte caused by captan and captafol. *Pesticide Biochemistry and Pysiology*, 5 : 338-347.
20. 정해영(1991) : 활성산소, 암, 노화, 의학총설, 2(4) : 25~53.
21. 정명희(1990) : 산소는 언제나 유익한 것인가. 의학총설, 1(2) : 24~41.
22. Tappel AL. (1970) : Bioloical antioxidant protection against lipid peroxidation damage, *Am, J. Clin. Nutr.*, 23(8) : 1137~1139.
23. Tappel AL. (1980) : Vitamin E and selnium protection from in Vivo likpid kperoxidation, *Ana, N, Y, Acad, Sci*, 1980, 355 : 18~31.
24. Gordon HH, Nitowsky HM. and Corblath M. (1955) : Studies of tocopherol deficiency in infants and children. 1. Hemolysis of erythrocytes in hydrogen peroxide. *Am. J. Dis. Child.* 90 : 669~681.
25. Nair PP, and Magar NG. (1956) : Determination of Vitamin E in blood. *J. Biol Chem.*, 220 : 157~159.
26. Huh RS, Kim SH, Mo KC. and Park HK. (1984) : A simple colorimetric method of determining phospholipids in serum and red cell membrane. *Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl. Univ.* 2 : 73~77.