

セレン投与がエタノール摂取ラットの血漿と 精巣の抗酸化酵素系におよぼす影響

金 天 浩, 金 甲 秀

(江原大学校動物資源科学大学獣医学科, Korean Equine Center*)

Effects of Selenium Supplementation on Antioxidative Enzyme Systems of Plasma and Testis in Ethanol-treated Rats

Cheon-Ho, KIM and Gap-soo, KIM

*Department of Veterinary Medicine, College of Animal Resources Science,
Kangwon National University, Korean Equine Center*

The effects of supplementation of selenium on antioxidative systems of plasma and testis in ethanol-ingested rats were investigated. Sprague-Dawley rats weighing 190-200g were divided into four groups, according to the types of supplementation, the control, 4ppm selenium supplemented group, 4ppm selenium supplemented and 10% ethanol group, 10% ethyl alcohol administered group. The activities of antioxidant enzymes including glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase, superoxide dismutase (SOD) and contents of selenium in plasma and testis after ethanol-ingestion for 6 weeks were decreased than control, but those levels were slightly increased by selenium supplementation. These results suggest that selenium supplementation might prevent the ethanol-induced lipid peroxidation in plasma and testis.

必須微量元素であるセレンは生体内において老化を防止したり、ストレスにたいする抵抗力を維持するなどの重要な役割を果たしていることが報告されている¹⁻³⁾。また最近では生殖器官におけるセレンの役割に関する研究が多数おこなわれている^{4,5)}。亜セレン酸を添加した飼料で動物を飼育した場合、相当量のセレンが精巣に蓄積され⁶⁾、ラットまたは雄牛においては投与したセレンが特異的なセレン蛋白質の形態として精子のミトコンドリアの外層膜に存在することが明らかになった⁷⁾。一方、エタノールの酸化は alcohol dehydrogenase, catalase, microsomal ethanol oxidizing system によっておこなわれ、その毒性

*所在地：大韓民国江原道春川市孝子2洞 192-1 (〒200-701)

としては中間代謝過程で生成された活性酸素による細胞膜の脂質過酸化、酵素蛋白質中のアミノ酸残基の非可逆的不活性化などの酸化的ストレスなどが知られている。このような生体内におけるアルコールの毒性は生体内に存在する抗酸化酵素系および glutathione (GSH) やセレンの非酵素系防御システムによって抑制され、このような防御機能がある外的要因によって減少した場合、細胞の酸化的損傷が加重されることが報告されている⁸⁾。最近、活性酸素種による精子機能障害と抗酸化酵素系の役割に対する報告が多数行なわれている^{9,10)}。本研究では、実験動物としてラットを用い、アルコール投与が生体内抗酸化系、特に精巣におけるセレン含量の変化およびセレン酵素である GSH peroxidase (GSH-Px) をはじめ、抗酸化酵素の活性におよぼす影響について検討した。

実験方法

生後8-10週齢の体重200-250gのSprague-Dawley系ラットを4群に分け、市販固型飼料を与えて飼育した。エタノール摂取群とセレン投与群はエタノールとセレンを各々10%および4ppmの濃度で溶解した蒸留水を6週間自由飲用させた。エタノールとセレン混合投与群は10%エタノールと4ppmのセレンを混合して6週間自由飲用させた。なお、セレンは亜セレン酸ナトリウムを用いた。実験開始6週間後、エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血した後、精巣を摘出して生理食塩水で洗浄し、分析に供した。血漿中のGOT、GPT活性はReitman-Frankel法¹¹⁾に準じて調製された市販用kitで測定し、血漿と精巣のセレン含量とGSH-Px、Catalase、SODなどの抗酸化酵素活性、蛋白質含量などは既存の方法¹²⁻¹⁶⁾を使用して測定した。

Table 1. Experimental design

Experimental Groups ¹⁾	Selenium ²⁾	EtOH ³⁾
C	-	-
A	-	+
S	+	-
SA	+	+

¹⁾C; control group, A; Alcohol administered group for 6 weeks, S; Selenium administered group for 6 weeks, SA; Selenium-alcohol administered group for 6 weeks

²⁾4 ppm Selenium added as sodium selenite in distilled water

³⁾10% Ethanol in distilled water

結果と考察

実験開始6週後のエタノール投与群、セレン投与群、エタノールとセレンの混合投与群における血漿成分の比較をTable 2に示した。血漿中のGOT、GPT活性はセレン-エタノール混合投与群がエタノール投与群に比べて有意に低い値をしめし (Table 2)、エタノールの肝毒性に対するセレンの抑制作用の可能性を示唆した。血漿中のセレン含量はセレン投与群が対照群およびエタノール投与群にくらべ有意に

Table 2. Effects of selenium supplementation in plasma of alcohol-ingested rats

	C	A	S	SA
GOT (karmen U)	81.9 ± 9.4 ^c	136.6 ± 11.3 ^a	98.1 ± 6.4 ^{b,c}	119.3 ± 8.7 ^{a,b}
GPT (karmen U)	36.6 ± 2.7 ^b	57.6 ± 5.9 ^a	35.1 ± 4.1 ^b	45.3 ± 3.2 ^b
Selenium content (ppm)	0.12 ± 0.06 ^{b,c}	0.12 ± 0.07 ^c	0.15 ± 0.06 ^a	0.14 ± 0.05 ^{a,b}
Catalase activity (U/mg protein)	1.72 ± 0.28 ^a	1.31 ± 0.31 ^a	3.05 ± 0.28 ^b	1.48 ± 0.17 ^a
Mn-SOD activity (U/mg protein)	8.38 ± 0.70 ^a	7.44 ± 0.69 ^a	7.73 ± 0.86 ^a	7.58 ± 0.76 ^a
GSH-Px activity (U/mg protein)	0.36 ± 0.03 ^a	0.27 ± 0.01 ^b	0.43 ± 0.03 ^c	0.37 ± 0.04 ^a

Values are mean ± S.E.M. of 6 rats.

Values with a row not followed by the same letters are significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan's multiple range test

高い値を示し、セレン-エタノール混合投与群の場合にもセレン投与群にくらべて低かったがエタノール投与群に比べては有意に高い値を示した。抗酸化酵素系においては catalase の場合、セレン投与群が有意な増加が認められ、エタノール投与群およびセレン-エタノール混合投与群も対照群に比べて減少する傾向を示したが、有意差はなかった。Superoxide dismutase (SOD) の活性は本実験でエタノール投与によって減少する傾向が認められ、セレン投与によってその活性がやや回復する傾向を示したがいずれの場合にも有意差はなかった。この結果はセレンの投与がエタノール投与によって生成される活性酸素の増加を抑制する役割をあらわすことであると考えられるが明確なメカニズムに対しては持続的な検討が必要であると思われる。含セレン蛋白質酵素として抗酸化作用をもっている GSH-Px の活性はセレン投与群で有意に高い値を示し、セレン-エタノール混合投与群の場合にもエタノール投与群に比べて有意な増加が認められた。雄の精子生成器官である精巣における各群間のセレン含量および抗酸化酵素活性の比較を Table 3 に示した。精巣中のセレン含量はセレン投与群で有意に高い値を示し、エタノール投与群では対照群およびセレン-エタノール混合投与群に比べて減少する傾向が認められた。また、セレンを活性中心とする抗酸化酵素である GSH-Px の活性の場合においても類似な傾向をあらわした。このような結果は亜セレン酸を飼料に添加し成熟期ラットに与えた場合肝臓、筋肉およびほかの組織にくらべ、精巣中のセレン含量と GSH-Px 活性が著しく増加したという結果と一致する¹⁷⁾。一方、精巣中の Catalase 活性はエタノール投与群において有意に減少し、セレン投与群とセレン-エタノール混合投与群の間では有意差はなかったがセレン投与群の方が高い値を示した。精巣中の SOD 活性はエタノール投与群だけで低い値をあらわしたが各群間の有意差は認められなかった。Glutathione (GSH) を基質とする GSH-Px はエタノール摂取による組織損傷に対して強い保護作用をあらわすことが知られていて¹⁸⁾、特に Yoshida ら¹⁹⁾ はアルコール摂取による肝組織損傷の場合の GSH-Px 活性増加は代償作用として GSH の合成能力の増加によると報告しているが、本実験ではエタノール投与群において GSH-Px の活性は減少を示し、セレン-エタノール混合投与群と対照群との間では差が認められなかった。SOD および cata-

Table 3. Effects of selenium supplementation in testis of alcohol-ingested rats

	C	A	S	SA
Testis weight (g%)	1.19 ± 0.11 ^{a)}	1.01 ± 0.13 ^{a)}	1.18 ± 0.12 ^{a)}	1.14 ± 0.15 ^{a)}
Selenium content (ppm)	1.93 ± 0.96 ^{b,c)}	1.81 ± 0.24 ^{c)}	2.22 ± 0.29 ^{a)}	1.94 ± 0.87 ^{a,b,c)}
Catalase activity (U/mg protein)	43.76 ± 5.82 ^{a,b)}	30.78 ± 3.20 ^{c)}	43.38 ± 7.29 ^{a,b)}	32.22 ± 2.20 ^{b,c)}
Mn-SOD activity (U/mg protein)	19.54 ± 3.60 ^{a)}	15.81 ± 1.46 ^{a)}	18.59 ± 3.51 ^{a)}	18.05 ± 3.71 ^{a)}
GSH-Px activity (U/mg protein)	0.28 ± 0.04 ^{a)}	0.25 ± 0.05 ^{b)}	0.40 ± 0.03 ^{c)}	0.27 ± 0.03 ^{a)}

laseのばあいでも GSH-Pxの場合と類似の様相を示めした。このような結果はアルコール摂取による GSH, α -tocopherolなどの生体内抗酸化因子の含量変化に起因するのではないかと推測されるがその明確な原因に対しては持続的な検討が必要であると思われる。以上の結果より適量のセレンの投与はアルコールによって惹起される生体内抗酸化系の活性低下および雄の生殖機能障害の防止できる可能性が示唆された。今後、性成熟課程におけるアルコール摂取による精巣中のセレン含量, GSH-Px活性の変化および各種抗酸化因子の生体内挙動に対して持続的な検討が必要であると考えられる。

文 献

- 1) Hornsby, P. J., Pearson, D. W., Autor, A. P., Aldern, K. A., and Harris, S. E. (1985) *J. Cell Physiol.*, 38 : 123
- 2) Ip, C. and Ganther, H. E. (1993) In "Selenium in Biology and Human Health" (Burk, R. F., Ed.) : 171, Springer Verlag, New York
- 3) Swecker W. S. Jr., Thatcher, C. D., Eversole, D. E., Blodgett, D. J., Schurig, G. G. (1995) *Am. J. Vet. Res.*, 56 (4) : 450
- 4) Behne, D., Hofer-Bosse, T. (1984) *J. Nutr.*, 114 : 1289
- 5) Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Mariorino, M., Roveri, A., Wissing, J. and Flohe, L. (1999) *Science*, 285 : 1393
- 6) Calvin, H. I., Cooper, G. W. and Wallace, E. (1981) *Gamete Res.*, 4 : 139
- 7) Pallini, V. and Bacci, E. (1979) *J. Submicrosc. Cyto.*, 11 : 165
- 8) Liber, C. S. (1991) *Medical and nutritional complications of alcoholism.*, Plenum, New York, p.512
- 9) Alvarez, J. G. and Storey, B. T. (1989) *Gamete Res.*, 23 : 77
- 10) Kovalski, N. N., de Lamirande, E. and Gagnon, E. (1992) *Fertil Steril*, 58 : 809
- 11) Reitman, S. and Frankel, S. (1963) *Am. J. Clin. Pathol.*, 28 : 56
- 12) Watkinson, J. H. (1966) *Anal. Chem.*, 38 : 92
- 13) Lowry, O. H., Roserbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193 : 265

- 14) Aebi, H. (1974) In "Methods of enzymatic analysis", Academic Press, New York, Vol. II : 673
- 15) Crapo, C. H., McCord, J. M. and Fridovich, I. (1978) In "Methods in enzymol" Fleischer, S. and Packer, L. (eds.), 3rd ed., Verlag chemic, 3 : 273
- 16) Paglia D. E. and Valentine W. N. (1967) J. Lab. Clin. Med., 70 : 158
- 17) Dietrich, B., Mariha, D. and Walter, E. (1986) J. Nutr., 116 : 1442
- 18) Choi, O. H., Yoon, H. J. and Kim, J. H. (1995) J. Korean Soc. Food. Nutr., 24 : 859
- 19) Yoshida, M., Fukunga, T., Iwami, K. and Yasumoto, K. (1984) J. Biochem., 96 : 1391