

식이 지방산 및 비타민 E의 보충이 흰쥐 뇌조직 분획의 과산화정도에 미치는 영향

홍순명 · 황혜진
식품영양학전공

<요약>

불포화지방산이 풍부하고 산소 소모량이 크며 철분 등의 산화촉진 요소를 갖추고 있는 뇌조직에서는 다른 어느 조직에서보다 free radical 형성이 활발히 일어날 수 있다. 이의 예방을 위해 항산화 효소들이 작용하여 항산화 비타민들 중 비타민 E의 역할이 큰 것으로 알려졌다. 본 연구에서는 $\omega 3$ 및 $\omega 6$ 계 지방산의 질적, 양적인 변화와 비타민 E의 보충이 뇌조직의 항산화제에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 흰쥐를 대상으로 하여 $\omega 3$ 계 지방산 결핍군인 safflower oil(SO)군과 $\omega 3$ 계 지방산을 바람직한 비율로 공급한 mixed oil(MO, P/M/S ratio = 1.03: 1.45: 1, $\omega 6/\omega 3$ ratio = 6.3), 비타민 E를 보충시킨 (ME)식이로 임신되기 3-4주전부터 섭취시키고, 이로부터 출생한 제 2세대 쥐의 뇌조직을 전두피질(FC), 해마(H), 소뇌(CB), 선조체(CS)의 4부위로 나누어 비타민 E의 농도를 분석하였으며, 산폐도의 지표인 MDA(Malondialdehyde)의 농도를 분석하였다.

뇌조직의 비타민 E의 농도는 MO군과 SO군을 비교하여 볼 때 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 비타민 E를 하였을 때, 해마(H)에서만 유의적으로 증가하였고, 나머지의 부위에서는 영향을 받지 않은 것으로 나타났다. 뇌조직 부위별 비타민 E의 농도를 비교하여 보면 전두피질(FC)<소뇌(CB)~선조체(CS)<해마(H)의 순서로 나타나, 기억과 학습의 증추라고 생각되는 해마(H)에서 비타민 E가 많이 존재하는 것으로 나타났다. 또한 산폐도의 지표로 측정된 MDA의 농도는 실험군간의 차이를 나타내지 않았다.

Effect of Dietary Fatty Acid and Vitamin E Supplementation on Lipid Peroxidation in the Rat Brain.

Hong, Soonmyung, Hwang, Hyejin
Dept. of Food and Nutrition

The fact that docosahexaenoic acid(DHA ω 3) and arachidonic acid(AA ω 6) accumulate rapidly in phospholipids(PL) of cell membrane of the brain during development suggest that the availability of these fatty acids during this time is crucial. There exists differences between species in terms of the time of the maximum growth of brain. The status of lactating rat is, therefore, similar to the preterm infant. Limited accretion of DHA & AA to brain lipids is known to be related to alterations in visual response and learning ability in rat. Brain is the organ with high PUFA and the consumption of oxygen is also very high. In normal aging process, because brain is highly vulnerable to attack by oxygen free radicals, there must be efficient antioxidant systems to encounter oxidative stress.

The Sprague Dawley rats were fed the experimental diets 3-4 wks prior to the conception. Experimental diets were consisted of 10% fat(wt/wt) which were safflower oil(SO, poor in ω 3 fatty acids), Mixed oil(MO, P/M/S ratio= 1.03:1.45:1, ω 6/ ω 3 ratio = 6.3), and Mixed oil supplemented with vitamin E (+500mg/kg). At 3 and 9 weeks of age, Frontal cortex(FC), Corpus striatum(CS), hippocampus(H), cerebellum(CB) were dissected out from the whole brain.

The concentration of vitamin E appeared to be higher in ME group, and the difference was significant only in H region, generally thought to be the region of learning and memory. The concentration of vitamins appeared to be in the order of FC <CB, CS <H. The concentration of MDA were not influenced by the experiment diets.

I. 서 론

뇌조직은 지방조직 다음으로 지방함량이 많고 특히 Long chain polyunsaturated fatty acid(LCPUFA)인 docosahexaenoic acid(DHA, 22:6)과 arachidonic acid(AA, 20:4)가 많은 것이 특징이다. 이는 뇌조직 인지질의 필수성분으로 상당량 존재하고 있으며, 포유동물의 central nervous system(CNS)에서 중요한 지방산이다(1, 2). 특히 AA와 DHA는 망막과 대뇌피질의 인지질내 많이 존재하는 것으로 알려져 있으며 이를 조직 membrane내에 eicosapentaenoic acid(20:5, EPA)과 DHA가 부족하면 조직의 물리적, 기능적 특성에 변화를 초래하므로(3,4) 정상적인 뉴발달이 이루어 질 수 없으며, 여러 실험동물에서 시각구분과 학습능력에 손상을 주었다는 보고가 있다(5, 6).

그러나 이러한 LCPUFA를 장기간 섭취할 경우 높은 불포화도로 인하여 free radical과 peroxide등의 지질 과산화물이 더욱 많이 생성되어 세포에 손상과 세포 기능의 장애 및 노화가 촉진되는 것으로 알려져 있다(7). 생체에는 이러한 free radical을 제거해주는 체거계(scavenging system)가 있다. 즉 superoxide dismutase(SOD), glutamate peroxidase(GSH-Px), Glutathione S-transferase(GST), catalase와 같은 효소적 방어계와(8), glutathione(GSH), 비타민 A, C, E, Selenium같은 비효소적 방어계가 있다(9). 특히 불포화도가 높은 생선 기름은 세포막의 유동성을 변화시키며 지질의 과산화 반응을 용이하게 해주므로 세포의 항산화 능력을 보존하기 위하여 비타민 E와 같은 적절한 항산화제의 보충이 요구 된다(10, 11). 즉 비타민 E의 필요량은 총 PUFA함량과 불포화도에 따라 결정되는데, 비타민 E의 식이

의 PUFA함량에 비례하여 섭취한다고 해도 조직 내에서 비타민 E의 turnover가 PUFA보다 짧아 섭취된 비타민 E는 계속적으로 조직을 보호할 수가 없다고 보고(12)되는 반면, 생체막 조직에서 비타민 E가 소량이지만 재 이용됨을 강조한 논문도 발표되었다(11).

비타민 E는 세포막의 microsome과 mitochondria에 많이 분포되어 있는 불포화지방산의 peroxidation과정에서 chain reaction의 자동산화를 방지하여 과산화물 형성을 방지함으로써 궁극적으로 생체막을 보호하여 세포의 정상적인 기능을 유지시키는데 기여한다고 알려져 있다(13). 다른 조직에서 보다 비교적 낮은 함량의 비타민 E는 효과적인 antioxidant의 역할을 수행하기 위해 뇌조직 membrane system에 단단히 결합되어 있다고 하고, Murphy 등은(14) 흰쥐의 간이나 심장조직보다는 뇌조직이 비타민 E와 매우 큰 친화력을 갖고 있으며, 이 친화력의 크기와 뇌조직에서 빠져나가는 속도는 역비례 한다고 하여 비타민 E가 뇌조직에 특수하게 결합되어 있음을 지적하기도 하였다. 비타민 E의 side chain이 세포 membrane구조에 직접 끼어 들어서 membrane 인지질의 arachidonyl group과 밀접한 상호작용을 맺으며 항산화 기능을 잘 발휘하게 되며, 이와 수반되는 membrane의 fluidity와 stability의 변화는 membrane과 관련된 효소의 활성에 영향을 줄 수 있을 것이라고 제안하였다(15).

한편 Moore(16)는 비타민 E가 비타민 A에 대해 절약효과(sparing effect)가 있다고 보고하였는데, 비타민 E가 A의 장내 흡수뿐 아니라 간에서의 비타민 A의 저장을 늘려 준다고 하였다. 자연에 있는 carotenoids는 현재까지 600여종이 밝혀졌고 그 중에서 10% 정도만이 비타민 A로 전환되며, 그 밖의 비타민 A전구체는 아니지만 lutein, lycopene, zeaxanthin 등을 포함하여 식품 중에 많은 carotenoids가 조직 중에 분포하고 있다. Carotenoids는 심혈관계 질환이나 암 같은 만성질환에 예방효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 이는 carotenoids가 singlet oxygen이나 free radical의 활성을 낮추어 지질산화의 개시 단계를 방해하거나 DNA손상을 막아주는 역할을 하기 때문으로 생각되고 있다(17, 18).

대부분의 포유동물 조직의 낮은 산소 분압에서 항산화제로 작용하는 β -carotene은 산소가 높은 농도일 때 효율적인 비타민 E의 적용과 구분되는데(19), β -carotene은 lipid peroxidation동안에 peroxy radical과 작용하여 propagating step을 억제하는 것으로 보이며 가장 효과적인 hydroxyl radical의 scavenger인 비타민 E와의 상호작용은 세포의 항산화 능력을 향상시킬 수 있다고 하였다(20). 또한 Bendich등은 β -carotene뿐 아니라 Vitamin A로 전환되지 않는 canthaxanthin 역시 free radical의 quenching과 관련되는 기전에 의해 B-lymphocyte의 반응을 증진시킬 수 있음을 보고되었다(21).

뇌조직이 다른 조직에 비해 산화적 손상이 큰 이유는 PUFA 함량이 높고 catalase 활성이 낮고, superoxide dismutase(SOD)와 glutathione peroxidase(GSH-Px)만이 moderate하게 존재하기 때문으로 여겨지나 부위별 농도의 차이에 대해서는 더 연구되어야 한다. 뇌조직이 oxygen free radical-generating system에 노출되었을 때 신경전달물질의 uptake 감소, Na⁺K⁺-ATPase 활성저하, Ca⁺⁺ 유입이 증가하며, 지질 산화에 의한 막의 유동성과 지질 구성의 변화가 초래된다(22). 특히 lipid peroxide는 신경세포막으로의 인지질의 reacylation을 저해하여 유리된 지방산을 축적시켜 영구적인 두뇌손상을 초래할 수 있다. 이런 현상은 ischemia에서 흔히 볼 수 있으며 free AA가 축적된 상태이다. Chan 등(23)은 free AA와 rat brain cortical slices를 함께 배양한 결과 지질의 과산화 반응이 증가하여 일시적으로 superoxide radical이 증가하고, 동시에 조직팽창과 세포내 Na⁺ 농도가 증가함을 관찰하였고, AA와 free radical의 상호작용에 의해 막조직이 변화하였다고 하였다.

따라서 본 연구에서는 생체에 필수적인 $\omega 3$ 계 지방산은 불포화도가 높아 산패되어 독성을 나타낼 수 있으므로 흰 쥐의 임신, 수유기 동안 식이 $\omega 3$ 계/ $\omega 6$ 계 지방산 조성과 비타민 E 첨가 수준에 따라 제 2세대 흰쥐의 뇌조직의 vitamin E의 농도와 산패도의 지표인 Malondialdehyde(MDA)의 농도를 측정함으로써, 뇌조직의 항산화체계의 변화를 알아보고자 함이 그 목적이이다.

II. 연구내용 및 방법

1. 실험동물 및 실험기간

Sprague Dawley strain을 이용하여 3일간 시판 배합사료를 주어 환경에 적응시킨 뒤 임신 3-4 주 전부터 실험 식이를 공급한 뒤 교배시켰다. 각 이미로 부터 출생한 새끼쥐는 어미로부터 공급되는 영양을 조절하기 위해 출생 3일 후 8-10마리로 조절한다. 출생 후 3주와 9주에 각각 회생시킨 뒤 두뇌를 적출하여 분석에 이용하였다.

2. 실험식이 조성

어미의 실험 식이 조성은 Table 1과 같이 탄수화물: 단백질: 지방의 비율은 중량을 기준으로 하여 65: 18: 10으로 구성하였다. (탄수화물: 단백질: 지방의 비율은 열량을 기준으로 하여 볼 때 62: 17: 21으로 구성되어 있다).

지방 수준은 전체 부재의 10%로서, $\omega 3$ 계 지방산을 결핍시킨 군(Safflower Oil : SO)과 $\omega 3$ 및 $\omega 6$ 계 지방산을 적절한 비율로 공급한 군(Mixed Oil : MO), 비타민 E를 보충한 군(MO+비타민 E)으로 분류하였다. $\omega 3$ 와 $\omega 6$ 계 지방산의 비율을 적절히 조절시키기 위해서는 여러 종류의 기름의 지방산 조성을 computer에 입력하여 P/M/S 비율을 1.03: 1.45: 1, $\omega 6/\omega 3$ 비율은 6.28로 하면서, AA를 총지방산의 0.6%, AA/DHA 비율을 1.37로 하는 조건을 만족시켜 주는 기름의 배합 비율을 계산한 뒤 이중에서 배합되는 기름의 종류가 비교적 적은 것을 선택하였다. 따라서 $\omega 3$ 및 $\omega 6$ 계 지방산의 비율을 조절한 군에서는 corn(삼양사): soy: palm: canola(주식회사 농심): menhaden(Zaphata, USA): arachidonic acid의 비율을 18: 5: 45: 25: 5: 2로 혼합하였고, 비타민 E의 수준은 모든 군에 50mg α -tocopherol acetate/kg diet을 기본적으로 첨가하였고, 비타민 E를 보충한 군(MO+비타민 E)에서는 500mg α -tocopherol acetate/kg diet을 더 보충하였다. 비타민 mixture와 무기질 mixture는 AIN-76(Japan)을 사용하였다.

Table 1. Composition of Experimental Diets (%)

Ingredient	Experimental Groups		
	Safflower oil (SO)	Mixed oil (MO)	MO + Vit E
Carbohydrate ¹	65.0	65.0	65.0
Protein : Casein	17.9	17.9	17.9
DL-Met	0.1	0.1	0.1
Fat : safflower oil	10		
corn oil		1.8	1.8
soy bean oil		0.5	0.5
palm oil		4.5	4.5
canola oil		2.5	2.5
menhaden oil		0.5	0.5
arachidonic acid		0.2	0.2
Salt mixture ²	4	4	4
Vitamin Mixture ³	1	1	1
CMC ⁴	2	2	2
α -tocopherol acetate supplementation (mg/Kg diet)	-	-	500
Peroxidatibility Index	98.3	103.3	103.3

1. Starch: sucrose = 80: 20

2. AIN-76 vitamin mix: g/kg of mix: Thiamin HCl 0.6 riboflavin 0.6, pyridoxine HCl 0.7, nicotinic acid 3, D-calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D-biotin premix(1%) 2, cyanocobalamin(0.1%) 1, retinyl palmitate (vitamin A) pre-mix(250,000 IU/gm) 1, cholecalciferol(400,000 IU/g) 0.25, menaquinone 0.05, sucrose 990, α -tocopherol 0.053. AIN-76 mineral mix : g/kg of mix: CaHPO₄, 500 ; NaCl, 74; K₂H₆O₇H₂O, 220; K₂SO₄, 52 ; MgO, 24 ; MnCO₃, 3.5 : FeC₆H₅O₇, 6; CuCO₃, 0.3 : Na₂SeO₃ · 5H₂O, 0.01; KIO₃, 0.01 ; CrK(SO₄)₂ · 12H₂O, 0.55 : sucrose, finely powdered, 118.03.

4. Carboxymethyl cellulose sodium salt

3. 실험동물의 체중 및 두뇌무게의 측정

각 실험 동물은 임신 3주 전부터 매주 같은 시각에 체중을 관찰하였다. 각 어미의 새끼 쥐들은 9주의 실험 기간동안에 출생 2일과 그 이후부터는 일주일 간격으로 같은 시각에 체중을 측정하였다. 출생 후 3주, 9주의 각각의 실험 동물을 회생시켜 두뇌를 제거한 뒤 0.9% NaCl 용액에 씻어내어 물기를 뺀 다음 wet weight를 측정하였다.

4. 두뇌의 부위별 분획

뇌조직은 마취없이 단두하여 두뇌를 적출한 다음, 얼음 위에서 부위별로 해부하여 전두
피질(FC), 해마(H), 선조체(CS), 소뇌(CB)의 4부위를 구하였다.

5. 뇌조직부위의 비타민 E의 측정

각 부위별 뇌조직(40% homogenate)에 internal standard인 tocol을 $150\mu\text{l}$ 넣고, absolute ethanol 2.5ml를 가하여 잘 섞은 후, 70°C water bath에서 2분간 가열한다. 이 혼합액에 항산화 영양소인 25% Na-ascorbate 0.5ml과 5% NaOH 1 ml을 가한 후 70°C water bath에서 30분간 가열한다.

가열이 끝나면 다시 차게 하여 중류수 0.5 ml과 hexane 5 ml을 가하고 2분간 세개 vortex한다. 4°C, 2500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액(hexane층)을 모았다. 상층액 3.5 ml을 취하여 vacuum evaporator를 이용해 40°C에서 건조시킨다.

건조시켜 얻은 비타민 추출액을 HPLC grade ethanol $100\mu\text{l}$ 을 가하여 vortex mixer로 잘 섞은 후 그 중 $50\mu\text{l}$ 을 HPLC system에 주입하여 292nm에서 분석하였다(24). HPLC의 조건은 Table 2와 같다.

Table 2. Instrument and Operating Conditions of High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Instrument: Hewlett Packard 6890A GC

Integrator: Hewlett Packard 3365A series III Chemstation

Column : OmegawaxTM 250

Detector: Flame Ionization Detector(FID)

Carrier gas: He

Column flow rate : 0.8 ml/min

Split ratio : 10:1

Injection pot temperature : 280°C

Detection port temperature : 280°C

Oven temperature : 180°C hold(for 5 min) 2°C/min until 210°C

Fatty acid methyl ester standard:

GLC reference standards(#GLC-87A)

OmegawaxTM test min(#4-8576),

PUFA-2(#4-7015), Supelco, Bellefonte, PA, USA.

Sample injection volume: 1 μl

6. 뇌조직 부위의 MDA농도의 측정

Buckingham(25)의 방법을 이용하여 뇌조직 0.1g에 4배의 0.1M Na₂PO₄ buffer(pH 7.4)를 가하여 3분간 균질화시킨 후, 이 균질액(20% homogenate) 50 μl에 1/12N H₂SO₄ 4ml과 10% phosphotungstic acid 0.5 ml을 가하여 혼합한 후 실온에서 5분간 방치한다. 이 혼합액을 원심분리(4000rpm, 10분간)한 후 침전물을 1/12N H₂SO₄ 2ml과 10% phosphotungstic acid 0.3 ml을 가한 후 강하게 섞어 주었다. 이 혼합액을 강하게 원심분리(4000rpm, 10분간)하고, 침전물에 중류수 5ml과 1% thiobarbituric acid(TBA 1.5g를 10ml의 c-NaOH에 용해시킨 후 50ml의 중류수를 첨가하고 perchloric acid로 pH 7.4로 맞추고 중류수로 100ml까지 채운 다음 7% perchloric acid 50ml를 가한 용액) 2ml을 가한 후 90~95°C에서 20분간 incubation시켰다. 이를 냉각시킨 후 n-butanol 5 ml을 가한 후 vortex하여 원심분리(4000 rpm, 10분간)하여 상층의 butanol층을 luminescence spectrophotometer(Amico Bowman series)을 이용하여 excitation 500nm, emission 553nm에서 fluorescence intensity를 측정한 후 표준용액과 비교하여 비색 정량하였다.

7. 통계 분석

본 연구의 실험 결과는 Statistical Analysis System(SAS)을 이용하여 분석하였고, Mean±S.E.M.으로 표시하였으며, 각 실험군간의 비교, 뇌조직 부위별 통계적 유의성은 LSD(Least significant difference)로 ANOVA test를 실시하여 비교 분석하였다.

III. 실험 결과

1. 실험 동물의 체중과 두뇌무게의 변화

지방산 수준과 비타민 E를 첨가한 식이를 공급하여 생후 0, 1, 3, 6, 9주에 체중을 측정하여 이의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 출생 후 3주째에 SO<MO< ME군의 순으로 나타났고, 이 경향이 9주까지 지속되었으나 유의적인 차이를 보이지 않았다. 생후 3주와 생후 9주에 측정한 두뇌 무게도 실험 군간에 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

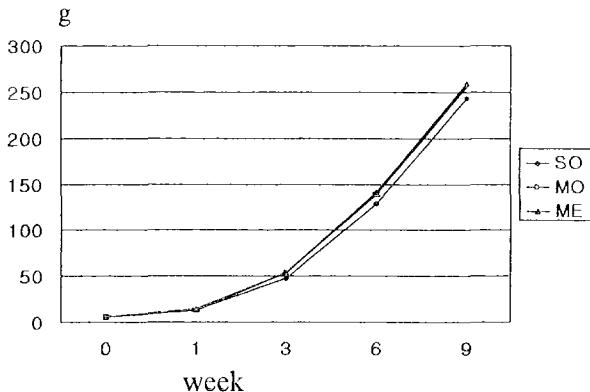


Fig. 1. Changes of body weight during experimental periods
(SO: Safflower Oil, MO: Mixed Oil, ME: MO+Vitamin E).

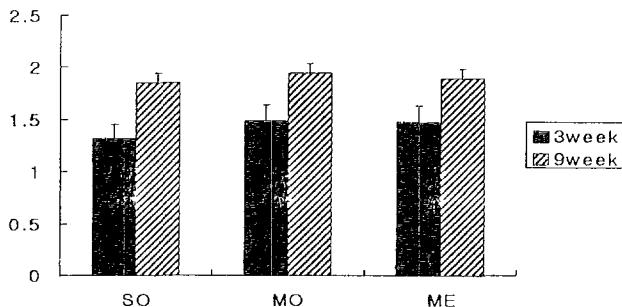


Fig. 2. Comparison of brain weight between 3 & 9 week.
(SO: Safflower Oil, MO: Mixed Oil, ME: MO+Vitamin E).

2. 뇌조직의 비타민 E의 농도

각 식이의 불포화도(Peroxidatibility Index)는 Table 1에 나타내었듯이 SO식이는 98.3, MO식이는 103.3으로 큰차이로 나타내지 않음을 알 수 있었다. 따라서 생후 9주된 뇌조직 부위별 항산화 비타민 E 농도는 SO군과 MO군을 비교하여 보았을 때, 모든 뇌조직 부위

에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

비타민 E의 첨가한 ME군에서 MO보다 전두피질(FC) 선조체(CS), 해마(H)에서 증가되는 경향을 나타내었는데, 특히 해마(H)에서 유의적인 수준을 나타내었다(Fig. 3).

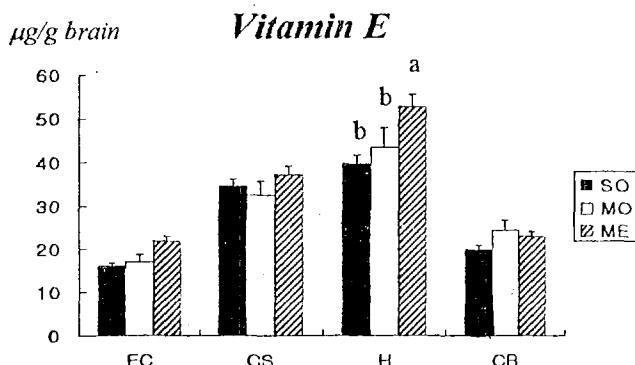


Fig. 3. Effect of Dietary Fat and Vitamin E Supplementation on vitamin E in the Rat Brain Regions at the Age of 9 weeks.

(FC: Frontal Cortex, CS: Corpus Striatum, H: Hippocampus, CB: Cerebellum)

Values with different letters are significantly different from others.(p<0.05)

(SO: Safflower Oil, MO: Mixed Oil, ME: MO+Vitamin E).

뇌조직 부위별로 비교한 비타민 E의 농도는 전두피질(FC)<소뇌(CB)~선조체(CS)<해마(H)의 순서로 모든 실험 군에서 유의적인 차이를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effect of Dietary Fat and Vitamin E Supplementation on the Antioxidant Vitamins in the Rat Brain Regions at the Age of 9 weeks.(Unit: μg/g)

Vitamin E	FC	CS	H	CB
SO	16.00±2.83 ^b	34.46±7.61 ^{ab}	39.7±5.38 ^a	19.92±3.73 ^b
MO	17.04±1.11 ^b	32.52±1.67 ^b	43.52±3.16 ^a	24.29±2.75 ^b
ME	21.85±5.78 ^b	37.32±9.94 ^{ab}	52.70±5.95 ^a	22.87±3.33 ^b

Values are mean±S.E.M.

Values with the different letters are significantly different from the others within the same row (p<0.05)

FC: Frontal cortex, CS: Corpus striatum, H: Hippocampus, CB: Cerebellum

SO: Safflower Oil, MO: Mixed Oil, ME: MO+Vitamin E

3. MDA 농도의 변화

지방산 수준이 다른 식이 섭취와 비타민 E의 첨가에 따라 생후 3주와 생후 9주의 뇌의 부위별 MDA의 수준을 Fig. 4에 나타내었는데, 식이 지방산의 종류와 관계없이 실험 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

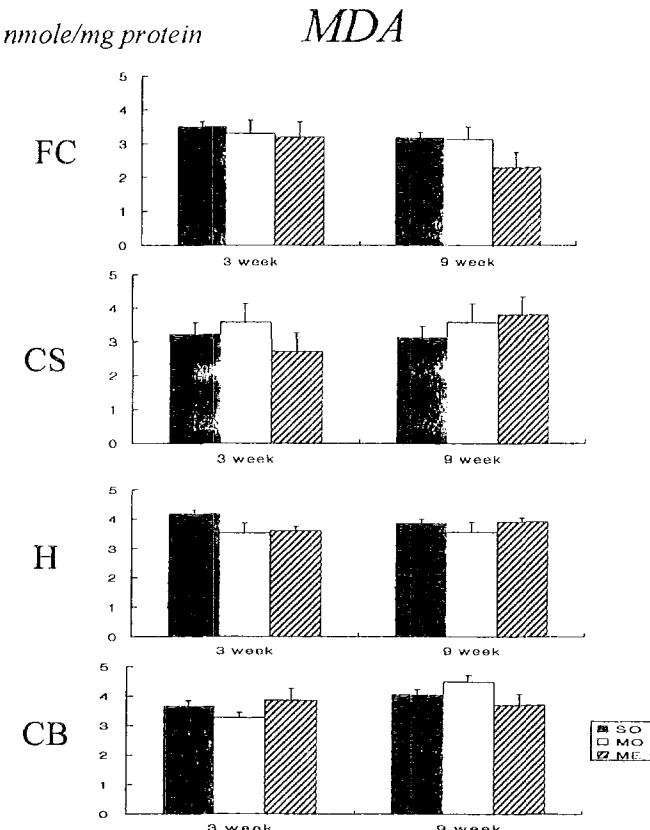


Fig. 4. Effect of Dietary Fat and Vitamin E Supplementation on Malondialdehyde in the Rat Brain Regions at the Age of 3 & 9 weeks.
(FC: Frontal Cortex, CS: Corpus Striatum, H: Hippocampus, CB: Cerebellum)
(SO: Safflower Oil, MO: Mixed Oil, ME: MO+Vitamin E)

IV. 고 칠

1. 실험 동물의 체중과 두뇌 무게의 변화

실험동물의 신체적 발달 정도를 나타내는 체중의 변화는, 실험기간동안 $\omega 3/\omega 6$ 계 지방산의 비율이 바람직한 식이(MO)를 섭취한 어미에게서 출생한 새끼쥐의 경우 linoleic acid가 많은 safflower oil 식이(SO)를 섭취한 어미에게서 출생한 새끼쥐의 경우에 비하여 증가되는 정도가 낮게 나타나, SO<MO<ME 순으로 나타났고, 이 경향이 9주까지 지속되었으나 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 김(26)과 정(27)등의 연구에서도 체중은 식이 지방에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다는 결과를 보였고, 두뇌 무게도 생후 3주와 생후 9주에 큰 차이가 없었다. 이는 실험 기간을 통해 볼 때, 두뇌 무게와 함께 DNA 함량은 수유기가 끝나는 시기인 생후 3주경에 가장 높게 나타나, 이 시기에 두뇌 발달이 최고에 이른다는 연구 결과(28)와 일치하는 것이다. 즉, 동물에 따라 두뇌의 발달이 가장 빠른 growth spurt 기간은 상이한데, 쥐의 경우에는 수유기에 두뇌의 성장이 가장 활발하다는 것을 잘 입증하여 주었다. Karlsson 등(29)도 쥐의 경우, 출생 후 4-10일 사이에 두뇌 무게가 빠르게 증가하고, 그 후 21일까지 완만하지만 계속적인 증가를 보이다가 21일 이후에는 큰 변화가 없이 일정한 경향을 보였다고 보고한 바 있고, 세포 분열 시기에 영양 불량이 되면, 세포 수가 감소하여 회복하기 어렵다고 하였다(30).

2. 비타민 E의 농도의 변화

비타민 E의 첨가시에 두뇌의 부위별 비타민 E의 농도는 혈마(H)에서만 유의적으로 증가되었고, 전두피질(FC), 선조체(CS)에서는 증가되는 경향은 있었으나 유의적인 차이를 보이지 않아 두뇌의 비타민 E는 산폐에 비교적 안정한 ester를 이루는 것으로 나타났다. 본 연구결과와 같이 뇌조직의 비타민 E 농도가 식이 지방산과 비타민 E의 첨가에 따라 뚜렷한 차이를 보이지 않음은 뇌조직의 비타민 E uptake가 다른 신체조직과는 상당한 차이가 있기 때문이라 할 수 있다. Blood-Brain-Barrier(BBB)를 통한 뇌조직으로 비타민 E 이동 기전은 아직까지 밝혀진 바 없고, 비타민 E가 매우 부족한 경우에만 그 부족증을 나타내어 다른 조직에 비하여 비타민 E의 turn over가 느리다고 하였다(15). 뇌조직의 비타민 E가 다른 조직에 비해 적게 함유되어 있어도 효과적으로 항산화작용을 수행할 수 있음은 α -tocopherol side chain의 -CH₃기가 소수성이어서 membrane의 구조적 단백질과 밀접한 상호 작용을 할 수 있게 되며, 결과적으로 비타민 E가 세포로부터 빠져나가기 어렵게 되어 항산화제의 역할을 보다 효율적으로 수행할 수 있다고 하였다(31).

따라서 비타민 E는 세포막 대사에서 항산화제로서의 역할 뿐 아니라 안정성에도 직접 관여할 것이라고 제시되었다. 또한 뇌조직에는 비타민 E 수준이 다른 조직에 비해 낮아도 여러 항산화 체계(32), 예를 들면 glutathione, retinol, vitamin C, urate 및 단백질내의 -SH기 등이 존재하여 DHA와 같은 LCPUFA가 많이 함유되어 있으므로 인해 초래하기 쉬운 과산화과정을 방어해 줄 것으로 사료 된다.

3. MDA 농도의 변화

비타민 E의 첨가시에 MDA는 식이 지방산과 비타민 E의 첨가에 관계없이 각 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 불포화도가 매우 높은 대구 간유를 섭취함에 따라 MDA 배설량이 증가하였다는 보고(33)도 있고, 비타민 E와 P/S비율이 다양한 식이로 16주간 사용한 쥐 실험(25)에서 40mg α -tocopheryl acetate/Kg diet 이상에서는 식이 지방의 P/S비율에 상관없이 일정한 MDA농도를 보여주었다. 본 연구의 기본 식이내의 비타민 E 첨가 수준은 50mg/Kg diet로, 식이 지방의 종류와 비타민 E 수준에 따른 MDA 농도변화가 관찰되지 않았다.

실제로 생체내에서는 lipid peroxidation에 의한 MDA의 형성이 감지될 수 있을 만큼 과도하게 일어나지 않으므로 실험식이간의 차이를 알아보기 위해서는 Fe⁺⁺으로 lipid peroxidation을 유도하여 실험군간의 상대적인 비교하기도 한다. 그러나 in vitro에서 lipid peroxidation에 의해 유도된 TBARS(Thiobarbituric acid reactant substances)를 측정한 결과, 청어유를 섭취할 때에는 35 IU/Kg diet보다는 180 IU/Kg diet가 TBARS를 유의하게 낮추어 준다는 보고도 있다(34).

지용성 비타민 중 과량 섭취에 따른 독성의 효과가 가장 적게 알려져 있는 비타민 E도 과량 섭취시에 간조직의 비타민 A수준의 저하, 비타민 K 작용 방해, 갑상선 호르몬 및 갑상선 조직의 손상(35)등이 보고되었다. 따라서 지질 과산화 반응과 관련하여 PUFA와 α -tocopherol의 적정 비율에 대한 과제는 더 연구되어야 할 분야이다.

V. 요약 및 제언

본 연구에서는 ω 3계 지방산 결핍군인 safflower oil(SO)군과 ω 3계 지방산을 바람직한 비율로 공급한 mixed oil(MO, P/M/S ratio = 1.03: 1.45: 1, ω 6/ ω 3 ratio = 6.3), 비타민 E를 보충시킨 (ME)식이로 임신되기 3-4주전부터 섭취시키고, 이로부터 출생한 제 2세대 쥐의 뇌조작을 전두피질(FC), 해마(H), 소뇌(CB), 선조체(CS)의 4부위로 나누어 생후 9주의 vitamin E의 농도와 생후 3주, 9주의 MDA농도를 분석하였다.

본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 실험 동물의 체중의 변화는, 실험기간동안 ω 3/ ω 6계 지방산의 비율이 바람직한 식이 (MO)를 섭취한 어미에게서 출생한 새끼쥐의 경우 linoleic acid가 많은 safflower oil 식이(SO)를 섭취한 어미에게서 출생한 새끼쥐의 경우 증가되는 정도가 낮게 나타나, SO<MO<ME 군의 순으로 나타났고, 이 경향이 9주까지 지속되었으나 유의적인 차이를 보이지 않았다.
2. 뇌조작의 비타민 E의 농도는 MO군과 SO군을 비교하여 볼 때 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 비타민 E를 보충하였을 때, 해마(H)에서만 유의적으로 증가하였고, 나머지의 부위에서는 영향을 받지 않은 것으로 나타나 뇌조작의 비타민 E는 다른 조직에 비해 소량 존재하지만 막조작에 단단히 결합되어 효과적으로 항산화 기능을 담당함을 알 수 있었다.

뇌조직 부위별 비타민 E의 농도를 비교하여 보면 전두피질(FC)<소뇌(CB)~선조체(CS)<해마(H)의 순서로 나타나, 기억과 학습의 중추라고 생각되는 해마(H)에서 비타민 E가 많이 존재하는 것으로 나타났다.

3. 산폐도의 지표로 측정된 MDA의 농도는 실험군간의 차이를 나타내지 않아 본 연구의 기본 식이에 첨가된 비타민 E의 수준인 50mg α -tocopherol acetate/kg diet는 LCPUFA의 산폐를 막을 수 있는 충분한 양으로 사료된다.

본 연구에서 식이지방산 및 비타민 E의 보충식이에 의해 뇌조직에서는 크게 민감한 반응을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 뇌조직과 신경조직에 풍부한 ω 3계와 ω 6계 지방산의 섭취가 장기간 계속될수록 높은 불포화도로 인하여 지질의 과산화가 유리되어 free radical의 형성을 통해 세포막의 손상과 세포 기능의 장애 및 노화가 촉진되는 사실이 알려짐에 따라 불포화 지방산 및 포화지방산의 비율 및 ω 3계와 ω 6계 지방산의 균형, 지질의 과산화 반응, 그리고 이로 인한 질병의 유발 및 항산화 영양소에 관한 연구가 광범위하게 이루어져야 하겠다. 특히 다른 뇌조직 부위에 비해 기억과 학습의 중추라고 알려진 해마(H)에서 항산화비타민인 비타민 E가 가장 많이 존재하는 것으로 나타나, 아직 알려지지 않은 뇌조직 항산화계와 membrane system과 밀접하게 연관되어 작용하는 neurotransport system에 대한 영양 생화학적, 생리학적 연구가 요구된다.

VI. 참고문헌

1. Neuringer M and Conno WE, n-3 fatty acid in the brain and retina; Evidence for their essentiality, *Nutr Rev*, 44:285-294, 1986
2. Simopoulos AP, ω 3 fatty acid in growth and development and in health and disease, *Nutr Today* 23:10-19, 1988
3. Lamptey MS and Walker BL, A possible role for dietary linoleic acid in the development of the young rat, *J Nutr*, 106: 86-93, 1976
4. Wheeler TG, Benolken RM and Anderson RE, Visual membrane; Specificity of fatty acid precursors for the electrical response to illumination, *Science* 188:1312-1314, 1975
5. Wainwright PE, Do essential fatty acids play a role in brain and behavioral development, *Neurosci Biobehav Rev* 16:193-205, 1992
6. Suarez A, Faus MJ, Gil A, Dietary supplementation with long chain polyunsaturated fatty acids increases susceptibility of weanling rat tissue lipids to in vitro lipid peroxidation, *J Nutr Biochem* 7:252-260, 1996
7. Hu M-L, Frakel EN, Leibovitz BE, Tappel AL, Effect of dietary lipids and vitamin E on in vitro lipid peroxidation in rat liver and kidney homogenates, *J Nutr* 119:1574-1582, 1989
8. Boppart GJ, Prevot DS, Bascands JL, Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and s-transferase activity: Application to cisplatin-induced toxicity, *Clin Biochem* 23:501-504, 1990
9. Adams JJD, Lauenburg BH, Mitchell JR, Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat : regulation and response to oxidative stress, *J Pharmacol Exp Ther* 227(3):749-753, 1983
10. Wiseman H, Dietary influences on membrane function: Importance in protection: Importance in protection against oxidative damage and disease, *J Nutr Biochem* 7:2-15, 1996
11. Packer L, Vitamin E: Biological activity and health benefits: Overview in vitamin E in health and disease, Ed by L. Packer and J. Fuchs, Marcel Dekker, Newyork, USA, 1993
12. Bieri JG, Everts RR, Tocopherols and polyunsaturated fatty acids in human tissues, *Am J Clin Nutr* 29:717-720, 1975
13. Panganamala RV, Cornwell DG, The effect of vitamin E on arachidonic acid metabolism, *Ann NY Acad Aci* 393:376-393, 1982
14. Murphy DJ, Marvis RD, Membrane transfer of alpha-tocopherol ; influence of soluble alpha-tocopherol binding factors from the liver, lung, heart and brain of the rat, *J Biol Chem* 256:10464-10468, 1981
15. Giasuddin ASM, Diplock AT, The influence of vitamin E on membrane lipids of mouse fibroblasts in culture, *Arch Biochem Biophys* 210:348-362

16. Moore T, The Effect of vitamin E deficiency on the vitamin A reserves of the rat, J Biochem 34:1321-1325, 1940
17. Kohlmeier L, Hastings S, Epidemiologic evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention, Am J Clin Nutr 62 (suppl): 1370s-1376s, 1995
18. Poppel G, goldbohm RA, Epidemiologic evidence for β -carotene and cancer prevention, Am J Clin Nutr 62(suppl):1393s-1402s, 1995
19. Burton GW, Antioxidant action of carotenoids, J Nutr 119:109-111, 1989
20. Krinsky NI, Effects of carotenoids in cellular and animal systems, Am J Clin Nutr, 53:238s-246s, 1991
21. Bendich A, Shapiro SS, Effect of β -carotene and canthaxanthin on the immune response of the rat, J nutr 116:2254-2262, 1986
22. Zaleska MH, Wilson DF, Lipid hydroperoxides inhibit reacylation of phospholipids in neuronal membranes. J Neurochem 52:255-260, 1989
23. Chan PH, fishman RA, Reductions of GABA and glutamate uptake and (Na^+K^+)-ATPase activity in brain slices and synaptosomes by arachidonic acid, J Neurochem 40: 309-316, 1983
24. McCreham WA, Determination retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by liquid chromatography, Methods in Enzymol 189:172-181, 1990
25. 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
26. 이양자, 김미경, ω 3계 지방산의 장기투여와 행동발달에 대한 연구, Yonsei J Human Ecology 9: 19-27, 1995
27. 정은정, 이경운, 빙혜련, 김경환, 김진수, 이양자, 식이성 ω 3/ ω 6계 지방산 식이가 혈관 뇌조직의 신경전달 물질에 미치는 영향, 대한 신경과학회지 11(4):952-963, 1993
28. Pike RL an Brown ML, Nutrition, An Integrated approach, 3rd ed., John Wiley & Sons, 1984
29. Karlsson I and Svennerholm L, Biochemical development of rat forebrains in severe protein and essential fatty acid deficiency, J Neurochem 31:657-662, 1978
30. Dobbing J and Sands J, The quantitative growth and development of human brain, Arch Dis Child 48:757-767, 1973
31. Tinberg HM, Barber AA, Studies on vitamin E action : Peroxidation inhibition in structural protein-lipid micelle complex derived from rat liver microsomal membranes, J Nutr 100:413-418, 1970
32. Das NP, Effects of vitamin A and its analogues on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria, J Neurochem 52:585-588, 1989
33. Draper HH, Malondialdehyde and n-3 polyunsaturated fatty acids, Am J Clin Nutr 54:429~430, 1991
34. Leibovitz BE, Hu M-L and Tappel AL, Lipid peroxidation in rat tissue slices : effect of dietary vitamin E, corn oil-lard and menhaden oil, Lipids 25:125-129, 1990
35. Marshall CW, Vitamin E supplementation, Am J Clin Nutr(letter):718, 1988