

Linolenic acid/linoleic acid 비율이 다른 식이가 연령이 다른 흰쥐의 뇌구조지방 조성 Acetylcholinesterase 활성에 미치는 영향*

윤 군 애

동의대학교 식품영양학과

Influence of Dietary Linolenic Acid/linoleic Acid Ratio on Brain Lipid Composition and Acetylcholinesterase Activity in Different Aged Rats

Yoon, Gun Ae

Department of Food and Nutrition, Donggeui Univ. Pusan, Korea

ABSTRACT

This study was undertaken to investigate the influence of age and dietary linolenic acid content and the linolenic acid/linoleic acid (LNA/LA) ratio on the brain lipid composition and membrane-bound enzyme, acetylcholinesterase(AchE) activities. AchE was selected as a test case for the relationship between cell lipid composition and cell membrane function.

The male rats were fed diets with 0.2, 0.4, 0.6 of LNA/LA ratio within 8% LNA(H-LNA) or 4% LNA(L-LNA) of total fatty acid content for different feeding period(1, 4, 12 month). The fats used as source were sesame oil, perilla oil, soybean oil and beef tallow.

The AchE activity of brain crude synaptosomal fraction was reduced with advancing age, showing 20-30% reduction in 12 M compared with 1 M, and the P/C ratio was reduced in old rats. In 1 and 4 monthed rats, AchE activities was higher in H-LNA-0.2 and L-LNA-0.2 and 0.4 group. In accordance with rising of AchE activities, the PC/PE ratio increased in those groups. Particularly in L-LNA, the PC/PE ratio increased as the AchE activities were high within each age. These data indicate the reduction of AchE activity was responsible for decline of membrane fluidity with increasing cholesterol and decreasing P/C ratio when rats were old. Also, AchE activity increased with increasing PC/PE ratio which depended on the dietary LNA/LA ratio within each LNA content. Therefore, it is concluded that the lipid composition of cell membrane influenced the AchE activities, which was mediated by aging and the modification of dietary LNA/LA ratio.

KEY WORDS : linolenic acid(LNA) · linoleic acid(LA) · acetylcholinesterase(AchE),
phospholipid/cholesterol(P/C) · phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine (PC/PE).

채택일: 1995년 8월 29일

*본 연구는 1992년도 대우재단의 연구비지원으로 수행되었음.

서 론

실험방법 및 재료

지방은 조직을 이루는 세포막의 구성분으로서 세포의 생물학적 기능과 관련이 깊다¹⁻²⁾. 세포막은 인지지방과 콜레스테롤로 이루어진 이중층 지질구조로 구성되어 있고 구상단백질이 지질이중층 사이에 위치하고 있다. 세포막이 생물학적 기능을 할 수 있는 것은 지방과 단백질이 상호작용하기 때문이다³⁾. 지방의 주요 특성은 유동성이며 대부분의 지방은 액상 상태가 아니면 작용하지 못하게 된다. 지방의 유동성은 membrane-bound enzyme의 활성화에 영향을 주고 생체막간 수송과정을 조절하며 능동적 물질투과성을 결정하는데 중요한 역할을 한다⁴⁻⁶⁾. 이러한 유동성은 세포막을 구성하고 있는 지방 조성에 따라 영향을 받는다. 인지지방/콜레스테롤(P/C)의 비율은 세포막의 유동성과 정관계를 갖는다⁷⁻¹⁰⁾. 또한 인지지방의 head group의 크기와 모양에 따라 유동성이 달라지는데 phosphatidylethanolamine(PE)은 phosphatidylcholine(PC)에 비해 유동성을 감소시키며, 인지지방을 구성하는 지방산의 포화도와 지방산의 길이도 세포막의 유동성에 영향을 미친다¹¹⁻¹⁴⁾.

세포막의 환경유지는 정상적인 생체기능을 유지하는데 매우 중요한 것이고 따라서 세포막의 환경변화는 지방과 단백질 사이에서 세포막의 기능에 영향을 주게 된다¹⁵⁻¹⁶⁾. 많은 조직에서 지방조성은 나이가 많아지면서 변화할 뿐 아니라 식이지방조성에 의해 예민하게 반응한다는 사실은 잘 알려져 있다¹⁷⁾. 나이가 들면서 인지지방과 콜레스테롤의 증가 뿐 아니라 P/C 비율이 감소하거나 인지지방의 지방산 포화도가 증가한다. 또한 식이지방에서 공급되는 지방의 특성에 따라 세포막의 지방조성이 달라지게 된다¹⁸⁻²⁰⁾.

이에 본 연구에는 연령증가와 식이지방조성에 따른 구조지방의 변화양상을 알아보고, 이러한 변화가 membrane-bound enzyme의 활성화에 주는 영향을 보고자 뇌에서 crude synaptosomal fraction을 분리하여 뇌 세포막 기능과 관련하여 막결합효소중의 하나인 acetylcholinesterase(AchE)의 활성을 측정하였다.

1. 실험식이 및 동물 사육

이유직후의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 1주일 동안 고행배합사료로 적응시킨 후 6가지 식이군으로 구분하여 각 식이군당 6마리씩 1개월, 4개월 및 12개월간 사육하였다. 실험식의 지방함량은 총섭취열량의 20%로 하였고, 지방의 급원으로 참기름, 들기름, 콩기름 및 우지를 배합하여 식이의 지방산조성을 달리하였다. 식이는 linolenic acid(18:3n3)함량이 8%인 식이(H-LNA)와 4%인 식이(L-LNA)로 고정하고 각 식이의 LNA/LA (linolenic acid/linoleic acid)비율을 0.2, 0.4 및 0.6으로 조정하여 6종류의 식이를 공급하였다 (Table 1, 2).

2. 시료의 채취

실험기간 종료시 흰쥐를 12시간 절식시킨 후 심장에서 혈액을 채취하고 즉시 뇌를 적출하여 0.9% 식염수에 넣어서 세척한 다음, 무게를 측정하고 바로 -70℃에 보관하여 AchE의 활성 측정에 사용하였다.

3. 뇌의 crude synaptosomal fraction의 분리

Crude synaptosomal fraction은 De Robertis 등의 방법으로 분리되었다²²⁻²⁴⁾. 뇌조직을 0.32M sucrose를 함유한 1mM NaH₂PO₄/0.1mM EDTA buffer pH7.4에 10%(10V/W)가 되도록 균질화하여 900×g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 취하고 남은 침전물을 2회 더 세척하여 총 3회의 원심분리에 의해 얻어진 상층액을 모아 11,500×g에서 20분간 다시 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 침전물은 재부유하여 11,500×g에서 20분간 재원심분리하여 최종적으로 crude synaptosomal fraction에 해당하는 침전물을 얻었다. 침전물은 sucrose가 없는 homogenizing buffer로 재부유하여 효소활성을 측정하기위한 시료로 삼았다.

4. 뇌의 지방추출 및 콜레스테롤과 인지지방 정량

뇌의 crude synaptosomal fraction으로 부터의 지방추출은 Bligh and Dyer법²⁵⁾을 이용하였다. 추출된

지방산 비율이 다른 식이와 Acetylcholinesterase 활성

Table 1. Composition of diet¹⁾

(g/kg Diet)

LNA content Diet Ingredients	High linolenic acid (H-LNA)			Low linolenic acid (L-LNA)		
	0.2	0.4	0.6	0.2	0.4	0.6
Corn starch	700	700	700	700	700	700
Casein	150	150	150	150	150	150
Fat	100	100	100	100	100	100
Soy oil	62	15	9	14	0	0
Sesame oil	15	20	12	24	17	8
Perilla oil	5	11	12	4	6	6
Beef tallow	18	54	67	58	77	86
Salt mixture	35	35	35	35	35	35
Vitamin mixture	10	10	10	10	10	10
Choline	2	2	2	2	2	2
DL-Methionine	3	3	3	3	3	3

1) AIN(American Institute of Nutrition)²¹⁾

지방을 chloroform에 녹인 후 일정량을 취하여 Zak방법²⁶⁾에 따라 뇌조직의 cholesterol 함량을 측정하였으며, 인지지방의 함량은 Bartlett방법²⁷⁾으로 정량하였다.

5. 인지지방의 분리

뇌의 crude synaptosomal fraction에서 추출한 일정량의 지방을 취하여 pre-coated silica gel plate(Merck silica gel TLC plates 60F₂₅₄, 20×20cm)에 인함량이 1.5-8µg/cm가 되도록 선형태로 점적 하였다. 지방혼합물을 분리하기 위해 전개용매는 methylacetate : n-propanol : chloroform : methanol : 0.25% aqueous potassium chloride=25 : 25 : 25 : 10 : 9로 구성된 용매를 사용하였고 여과지가 입혀진 conventional TLC tank에서 chromatography를 전개하였다. 인지지방의 분획은 one-dimensional system으로 분리되었다²⁸⁾. PC와 PE에 해당하는 부분을 취하여 위와 같은 방법으로 정량분석하였다.

Table 2. Fatty acid composition of diet (%)

LNA Content LNA/LA ratio Fatty acids	High linolenic acid			Low linolenic acid		
	0.2	0.4	0.6	0.2	0.4	0.6
Saturated FA	21.31	33.43	37.98	35.23	41.80	45.04
18:1	27.07	33.63	34.46	35.31	37.26	37.32
18:2	40.62	19.94	13.60	20.15	10.36	6.50
18:3	8.04	7.98	8.04	4.01	4.06	4.02
Others	2.96	5.02	5.92	5.30	6.52	7.12

6. AchE 활성 측정

AchE 활성은 Ellman과 Whittaker의 방법을 이용하여 측정하였다²⁹⁻³⁰⁾. 분리된 뇌의 crude synaptosomal fraction 0.4ml를 취하여 2.6ml phosphate buffer(pH 8.0, 0.1M)가 들어있는 cuvette에 넣고 DTNB reagent(0.01M 5 : 5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid in 0.1M phosphate buffer) 100µl를 첨가하여 410nm에서 흡광도를 영점으로 맞춘 후 20µl의 0.075M acetylthiocholine iodide substrate를 넣어 1분 동안 흡광도의 변화를 측정, 계산하였다. 단백질 함량은 Lowry법³¹⁾으로 분석하였고 효소활성의 계산은 다음과 같이 하였다.

$$\text{Mol/min/g protein} = \frac{\Delta A \times V}{1000 \times \epsilon \times d \times \Delta t \times v \times p}$$

ΔA=Change in absorbance per min

V=Vol. of assay mixture

v=Vol. of sample in assay mixture

ε=absorption coefficient(l×mmol⁻¹×mm⁻¹)

d=light path(mm) Δt=min p=protein(g/l)

AchE 활성은 포유류의 체온인 37℃와 표준실험조건 온도인 25℃의 두 온도에서 측정하였다.

7. 통계처리

실험결과는 나이, LNA함량, LNA/LA비율의 요인에 대해 3-way ANOVA로 분석하였으며, 실험군간 평균

값의 차이는 Duncan의 multiple range test($\alpha=0.05$)로 검증하였다.

실험결과

1. 뇌의 AchE 활성

조직의 지방함량의 변화는 조직을 구성하고 있는 세포막의 유동성에 영향을 미치고 따라서 세포막의 기능도 영향을 받게 된다³²⁾. 본 연구에서는 세포막기능의 하나

로서 acetylcholinesterase(AchE)의 활성을 37℃에서 측정된 결과 나이에 따라 유의적인 차이를 보여 1개월의 효소활성에 비하여 4개월에 효소활성이 감소하였으며 12개월은 4개월과 비슷한 활성을 보였다. 식이효과는 H-LNA군이 L-LNA군에 비해 1개월과 12개월에 대체로 활성이 낮은 양상을 보였다. LNA/LA비율에 따른 차이는 0.6식이에서 활성이 낮은 경향을 보이는데, H-LNA식이가 투여된 1개월과 4개월의 연령에서 0.6비율의 식이가 0.2 및 0.4비율의 식이보다 낮은 활성을 보였

Table 3. Activities of acetylcholinesterase in brain crude synaptosomal fraction

Variables		Acetylcholinesterase activities($\mu\text{M/hr/mg protein}$)				Brain weight(g)	
		37℃		25℃		H-LNA	L-LNA
Age	Group	H-LNA	L-LNA	H-LNA	L-LNA	H-LNA	L-LNA
1M	0.2	93.52 ^{1)ab}	107.90 ^{ab2)}	77.28 ^{bc}	80.20 ^{ab}	1.99 ^c	1.90 ^c
		± 14.97	± 20.97	± 3.11	± 12.24	± 0.06	± 0.01
	0.4	117.69 ^a	120.76 ^a	52.03 ^c	96.27 ^a	1.91 ^c	1.89 ^c
		± 22.23	± 22.97	± 4.17	± 7.72	± 0.06	± 0.05
	0.6	82.22 ^{ab}	110.72 ^{ab}	55.89 ^{bc}	54.75 ^{bc}	1.93 ^c	1.86 ^c
		± 19.74	± 18.05	± 6.38	± 9.77	± 0.06	± 0.03
4M	0.2	78.41 ^{ab}	76.11 ^{ab}	97.40 ^a	64.83 ^{bc}	2.97 ^a	3.05 ^a
		± 22.53	± 17.89	± 1.72	± 4.99	± 0.04	± 0.07
	0.4	82.13 ^{ab}	75.87 ^{ab}	57.99 ^{bc}	62.73 ^{bc}	3.00 ^a	3.01 ^a
		± 8.40	± 9.19	± 9.23	± 9.99	± 0.04	± 0.01
	0.6	62.90 ^b	74.83 ^{ab}	54.60 ^{nc}	52.88 ^c	2.98 ^a	3.03 ^a
		± 12.67	± 13.49	± 9.20	± 0.13	± 0.04	± 0.04
12M	0.2	79.57 ^{ab}	94.05 ^{ab}	62.77 ^{bc}	52.84 ^c	3.05 ^a	2.42 ^b
		± 10.29	± 7.26	± 8.28	± 4.96	± 0.35	± 0.21
	0.4	74.65 ^{ab}	88.03 ^{ab}	65.25 ^{bc}	66.36 ^{bc}	2.89 ^a	2.44 ^b
		± 11.77	± 7.40	± 7.42	± 6.04	± 0.21	± 0.19
	0.6	77.84 ^{ab}	83.85 ^{ab}	68.02 ^{bc}	58.40 ^{bc}	2.74 ^{ab}	2.44 ^b
		± 4.30	± 11.38	± 8.88	± 5.27	± 0.23	± 0.20
Age		***3)		N.S.		***	
Content		N.S.		N.S.		*	
Ratio		N.S.		**		N.S.	
C×R		N.S.		*		N.S.	
C×A		N.S.		*		N.S.	
R×A		N.S.		*		N.S.	
C×R×A		N.S.		N.S.		N.S.	

1) Mean \pm S.E.

2) Values with different alphabet within one variable were significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's Test

3) Statistical significance of factors was calculated by 3-way ANOVA.

*, **, *** : significant at $\alpha=0.05$, $\alpha=0.01$, $\alpha=0.001$, respectively N.S. : not significant

4) A : age, C : linolenic acid content, R : linolenic acid/linoleic acid ratio

지방산 비율이 다른 식이와 Acetylcholinesterase 활성

다. 그러나 L-LNA식이군에서는 12개월에서만이 0.6식이의 활성이 낮게 나타났다(Table 3).

25℃에서의 AchE 활성은 나이에 의한 차이는 없으나, 각 식이요인들 사이에 교호작용을 보였다. 1개월 및 4개월에서 H-LNA, L-LNA모두 LNA/LA비가 높은 식이군에서 활성이 낮았으며, H-LNA군은 LNA/LA비가 0.2인 식이에서 그리고 L-LNA경우는 0.2, 0.4비율의 식이에서 다른 식이에 비해 뚜렷하게 효소활성이 높게 나타났다. 그러나 12개월에는 비율이 낮은 0.2식이에

서 다소 활성이 낮았다.

2. 뇌의 인지지방과 콜레스테롤의 함량

인지지방은 모든 식이군에서 연령과 함께 계속 증가되었다. 특히 H-LNA-0.6군과 L-LNA-0.2군 및 L-LNA-0.4군의 인지지방함량은 1개월에 비해 12개월에 현저하게 높았다. 인지지방 함량은 H-LNA군이 L-LNA군 보다 높았고, LNA/LA비율에 의한 차이는 거의 없으나 식이비율이 증가하면서 12개월의 H-LNA에서는 증가 하나 L-LNA에서는 감소하는 추세였다(Table 4).

Table 4. Contents of phospholipid and cholesterol in brain crude synaptosomal fraction

Variables	Phospholipid(P) (μ M/mg protein)		Cholesterol(C) (μ M/mg protein)		P/C (ratio)	
	H-LNA	L-LNA	H-LNA	L-LNA	H-LNA	L-LNA
1M 0.2	0.68 ^{1bc} ±0.04	0.61 ^{c2)} ±0.03	0.52 ^{de} ±0.04	0.51 ^e ±0.02	1.32 ^b ±0.07	1.30 ^b ±0.10
0.4	0.71 ^{abc} ±0.04	0.61 ^c ±0.04	0.55 ^{de} ±0.04	0.51 ^e ±0.02	1.33 ^b ±0.09	1.15 ^{bc} ±0.06
0.6	0.68 ^{bc} ±0.02	0.71 ^{abc} ±0.02	0.57 ^{cde} ±0.03	0.62 ^{bcde} ±0.05	1.21 ^{bc} ±0.06	1.21 ^{bc} ±0.13
4M 0.2	0.77 ^{abc} ±0.10	0.74 ^{abc} ±0.10	0.68 ^{bc} ±0.07	0.33 ^f ±0.01	1.13 ^{bc} ±0.04	1.86 ^a ±0.08
0.4	0.79 ^{abc} ±0.09	0.71 ^{abc} ±0.10	0.64 ^{bcd} ±0.05	0.53 ^{de} ±0.06	1.22 ^{bc} ±0.09	1.12 ^{bc} ±0.16
0.6	0.83 ^{ab} ±0.09	0.69 ^{bc} ±0.06	0.69 ^{abc} ±0.03	0.60 ^{cde} ±0.01	1.20 ^{bc} ±0.09	1.16 ^{bc} ±0.07
12M 0.2	0.80 ^{abc} ±0.07	0.92 ^a ±0.06	0.68 ^{bc} ±0.03	0.81 ^a ±0.04	1.14 ^{bc} ±0.06	1.14 ^{bc} ±0.07
0.4	0.86 ^{ab} ±0.04	0.83 ^{ab} ±0.04	0.74 ^{ab} ±0.03	0.72 ^{ab} ±0.04	1.18 ^{bc} ±0.08	1.15 ^{bc} ±0.03
0.6	0.91 ^a ±0.09	0.71 ^{abc} ±0.02	0.73 ^{ab} ±0.03	0.72 ^{ab} ±0.02	1.19 ^{bc} ±0.06	0.99 ^c ±0.02
Age	*** 3)		***		**	
Content	N.S.		*		N.S.	
Ratio	N.S.		*		**	
C×A	N.S.		***		**	
R×A	N.S.		*		*	
C×R	N.S.		N.S.		***	
C×R×A	N.S.		*		**	

1) Mean ± S.E

2) Values with different alphabet within one variable were significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's Test

3) Statistical significance of factors was calculated by 3-way ANOVA.

*, **, *** : significant at $\alpha=0.05$, $\alpha=0.01$, $\alpha=0.001$, respectively N.S. : not significant

4) A : age, C : linolenic acid content, R : linolenic acid/linoleic acid ratio

윤 균 에

콜레스테롤은 연령, LNA함량, LNA/LA비의 각 요인 들 및 이들의 상호작용에 의해 영향을 받는 것으로 나타 났다. 콜레스테롤은 나이에 따라 모든 식이군에서 유의 적으로 증가하였다. 식이의 LNA/LA비율에 따른 콜레 스테롤함량은 H-LNA군내에서는 차이가 뚜렷하지 않으나, L-LNA군은 LNA/LA비율이 높아지면서 1,4개월에 함량이 증가되는데 비해 12개월에는 감소되었다.

인지방과 콜레스테롤의 함량이 12개월에 높았던데 비 해 P/C비는 1개월에서 높았고 연령이 증가되면서 낮아

졌다. 이러한 P/C 비율은 L-LNA보다 H-LNA에서 다 소 높는데 예외적으로 4개월의 L-LNA-0.2군에서 높게 나타났다. 식이 LNA/LA비가 증가함에 따른 P/C비는 H-LNA군의 경우 1개월에 감소하고 4, 12개월에 증가 했던 반면 L-LNA군은 4개월, 12개월에 감소하였다.

P/C 비율의 결과를 효소활성과 연결지어보면 37℃ 에서 H-LNA군은 각 LNA/LA비율에서 나이에 따른 효소활성의 변화가 이에 해당하는 P/C 비율의 변화양상 과 같은 경향을 나타냈다(Fig. 1). 즉 효소활성이 높은

Table 5. Contents of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in brain crude synaptosomal fraction

Variables	Phosphatidylcholine(PC) (μ M/mg protein)		Phosphatidylethanolamine(PE) (μ M/mg protein)		PC/PE (ratio)	
	H-LNA	L-LNA	H-LNA	L-LNA	H-LNA	L-LNA
1M 0.2	0.175 ^{1ab} ±0.02	0.172 ^{ab2)} ±0.02	0.171 ^{ab} ±0.01	0.172 ^{ab} ±0.02	1.030 ^{abc} ±0.07	1.030 ^{abc} ±0.09
0.4	0.175 ^{ab} ±0.01	0.176 ^{ab} ±0.01	0.175 ^{ab} ±0.01	0.152 ^{bc} ±0.01	1.017 ^{abc} ±0.09	1.086 ^{abc} ±0.07
0.6	0.175 ^{ab} ±0.02	0.176 ^{ab} ±0.01	0.183 ^{ab} ±0.01	0.178 ^{ab} ±0.01	0.960 ^{ab} ±0.09	0.983 ^{bc} ±0.01
4M 0.2	0.148 ^b ±0.01	0.165 ^{ab} ±0.01	0.140 ^{bc} ±0.01	0.140 ^{bc} ±0.01	1.056 ^b ±0.04	1.076 ^{abc} ±0.02
0.4	0.151 ^b ±0.01	0.149 ^b ±0.01	0.150 ^{bc} ±0.01	0.151 ^{bc} ±0.01	1.030 ^{abc} ±0.06	1.004 ^{abc} ±0.08
0.6	0.154 ^b ±0.01	0.150 ^b ±0.01	0.152 ^{bc} ±0.02	0.164 ^{abc} ±0.01	0.978 ^{bc} ±0.07	0.922 ^c ±0.06
12M 0.2	0.154 ^b ±0.01	0.194 ^a ±0.02	0.127 ^c ±0.01	0.207 ^a ±0.02	1.046 ^{abc} ±0.05	1.046 ^{abc} ±0.01
0.4	0.166 ^{ab} ±0.01	0.176 ^{ab} ±0.01	0.156 ^{bc} ±0.02	0.156 ^{bc} ±0.01	1.043 ^{abc} ±0.06	1.211 ^a ±0.05
0.6	0.166 ^{ab} ±0.01	0.164 ^{ab} ±0.01	0.125 ^c ±0.01	0.159 ^{bc} ±0.01	1.093 ^{abc} ±0.07	1.082 ^{abc} ±0.03
Age	*** ³⁾		***		*	
Content	N.S.		N.S.		N.S.	
Ratio	N.S.		N.S.		N.S.	
C×A	N.S.		*		N.S.	
R×A	N.S.		N.S.		N.S.	
C×R	N.S.		N.S.		N.S.	
C×R×A	N.S.		N.S.		N.S.	

1) Mean ± S.E

2) Values with different alphabet within one variable were significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's Test

3) Statistical significance of factors was calculated by 3-way ANOVA.

*, **, *** : significant at $\alpha=0.05$, $\alpha=0.01$, $\alpha=0.001$, respectively N.S. : not significant

4) A : age, C : linolenic acid content, R : linolenic acid/linoleic acid ratio

지방산 비율이 다른 식이와 Acetylcholinesterase 활성

1개월에서 P/C 비율이 높았고 효소활성이 감소하는 4개월과 12개월에서는 상대적으로 P/C 비율이 낮았다. 그러나 LNA군은 이러한 양상을 보이지 않았으며, 또한 식이지방산 조성에 따른 효소활성 변화와 P/C 비율 사이에서도 상관성을 볼 수 없었다.

3. Phosphatidylcholine과 phosphatidylethanolamine 함량

본 실험에서 인지방을 분리 PC와 PE로 분리, 정량하여 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein으로 표시하였다. Table 5에서 보듯

이 PC함량은 1개월에서 가장 높고 4개월에 감소된 후 12개월에 다시 증가하였다. LNA/LA비율의 증가시 PC함량은 1개월을 제외한 연령의 H-LNA에서는 증가하나 L-LNA에서는 감소하였다. PE함량은 1개월에서 높고 4개월과 12개월에서 낮았으며, LNA/LA비율의 증가시 1개월과 4개월의 H-LNA, L-LNA군 모두에서 PE함량이 증가되었다.

PC/PE 비율은 연령증가에 따라 증가하여 12개월에 높은 수치를 보였다. H-LNA, L-LNA 모두에서 1개월

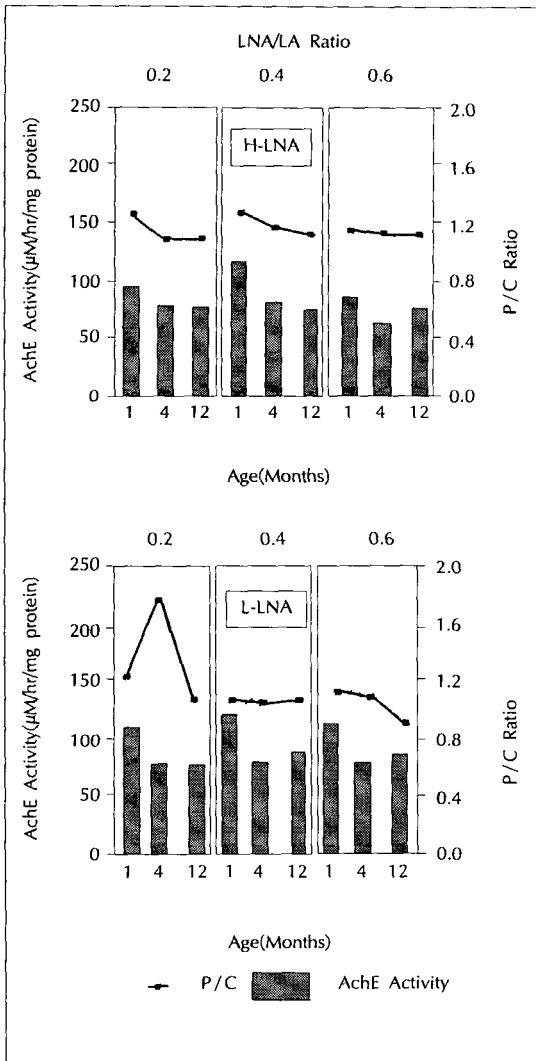


Fig. 1. Acetylcholinesterase activity at 37°C and the ratio of phospholipid to cholesterol.

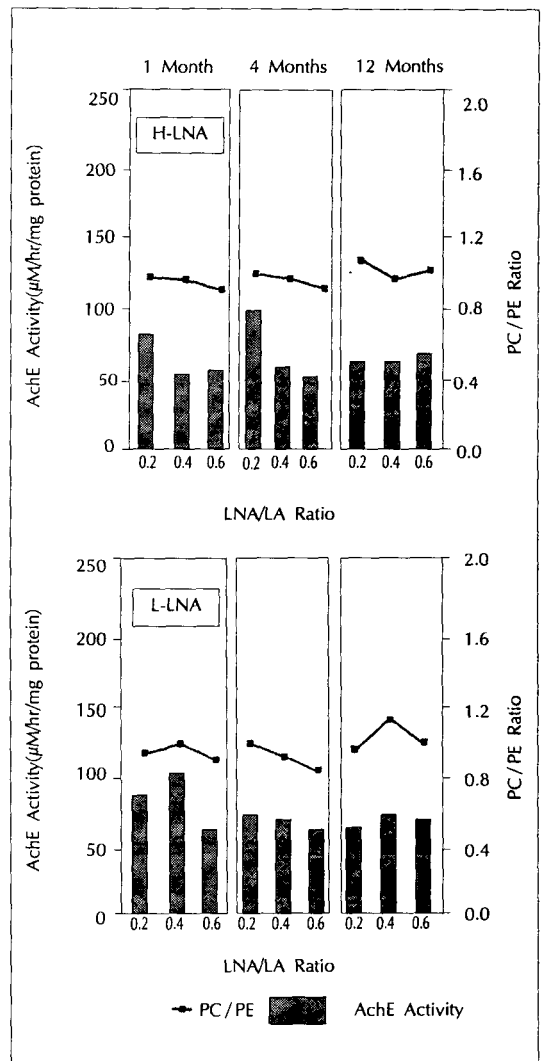


Fig. 2. Acetylcholinesterase activity at 25°C and the ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine.

과 4개월에 LNA/LA비율이 0.2와 0.4인 식이에 비해 0.6일 때 PC/PE 비율이 낮아졌다. 또한 1개월, 4개월에 PC/PE 비율은 H-LNA의 0.2식이에서 가장 높았으나 12개월은 0.6비율의 식이에서 높았고, 이에 비해 L-LNA에서는 0.4식이일 때 PC/PE 비가 가장 높았으나 4개월에는 0.2 LNA/LA식이에서 0.4, 0.6비율의 식이에 비하여 PC/PE 비율이 높았다.

PC/PE의 비를 AchE 활성과 비교하여 보면 37°C에서 효소활성 측정시 1개월과 4개월의 H-LNA에서 효소활성이 높았던 0.2, 0.4비율의 식이에서 PC/PE의 비가 높게 나타났고, AchE 활성이 낮은 0.6식이에서는 PC/PE 비가 낮았다. L-LNA군의 경우는 이러한 양상을 보이지 않았다. 25°C에서의 AchE 활성은 H-LNA군의 1개월과 4개월에 H-LNA-0.2에서 활성이 높으면 PC/PE 비도 상승하는 경향이였다(Fig. 2). L-LNA군도 H-LNA군과 같은 양상을 보여 1개월, 4개월은 L-LNA-0.2와 0.4식이에서 그리고 12개월은 0.4식이에서 효소활성이 높았을 때 PC/PE 비가 증가하는 추세였다. 특히 L-LNA군은 모든 연령에서 PC/PE 비율이 높아지면 효소활성도 상승되고 PC/PE가 낮아지면 효소활성이 저하되는 것으로 나타났다.

고 찰

조직의 지방조성은 환경에 따라서 변화되며 이러한 변화는 인지방, 콜레스테롤의 증가 뿐 아니라 지방산의 포화도 증가 등을 포함한다. 이러한 지방조성의 변화는 세포막의 환경변화를 의미하며 세포막의 환경은 세포의 기능 유지에 중요하다³³⁻³⁶⁾.

AchE 활성은 1개월에서 가장 클 뿐 아니라 LNA/LA비율에 따른 효소활성의 변화도 1개월의 나이에서 가장 크게 나타났다. 즉 어린 실험동물이 식이에 더 민감하며 나이가 들면서 예민도가 떨어지는 것으로 보인다.

본 실험에서 콜레스테롤과 인지방은 모두 나이에 따라 증가하였으나 인지방/콜레스테롤(P/C)의 비율은 나이가 많아지면서 저하되었고, 이와 일치하여 AchE 활성도 낮아짐으로써 효소활성과 나이 및 P/C 비율사이에 상관관계가 있음을 시사한다. PC와 PE 함량도 나이에 따라 변화하는데 나이가 많아질 수록 PE가 증가하고, PC가

감소한다는 보고가 있으나 본 실험에서는 1개월, 4개월에 비해 12개월에 PC/PE 비가 높게 나타났다. 그러나 식이에 따라서는 LNA/LA 비율이 낮을 때 PC/PE 비가 증가하는 경향을 보여 H-LNA에서는 0.2 LNA/LA 식이에서, L-LNA에서는 0.6에 비해 0.2 및 0.4식이에서 PC/PE 비가 증가하였고 이와 상응하여 효소활성 또한 높았다. 따라서 AchE활성과 PC/PE 비율의 변화가 비슷한 추이를 보임으로써 PC/PE 비와 효소활성간에 상호 관련성이 있는 것으로 볼 수 있고 이는 식이지방산 조성과 유관한 것으로 생각된다.

인지방은 서로를 연결하는 화학적 결합이 없어 각 분자들이 독립적으로 움직일 수 있으므로 유동성을 부여하는 반면에 콜레스테롤은 지방산사슬의 움직임을 방해하여 유동성을 감소시킨다. 따라서 P/C 비는 유동성의 변화를 좌우하는 중요한 결정인자로 지적되고 있다¹⁰⁾. Ethinyl estradiol같은 화학물질은 세포막에서 콜레스테롤을 증가시켜 P/C 비를 감소시키고 이에 따라 세포막의 유동성이 저하되면서 Na^+, K^+ -dependent adenosine triphosphatase의 활성을 저하시킨다. 또한 식이조절로 P/C 비를 증가시킬 때 유동성이 유의적으로 증대되고 효소활성이 상승되었다³⁷⁾.

Yechiel 등에³⁸⁾ 따르면 여러 조직의 지방조성은 나이가 들면서 인지방, 콜레스테롤이 증가하고 P/C 비가 감소한다. P/C 비의 감소는 동물의 나이가 많을 수록 더욱 뚜렷해지며 이러한 지방조성의 차이는 세포막을 구성하는 단백질과 지방의 작용에 변화를 주어 세포의 생물학적 특성과 유관하다고 보고한 바 있다. 따라서 본 실험에서 나이가 많아지면서 효소활성이 저하되었던 것은 세포막을 구성하는 P/C 비가 낮아지면서 생길 결과로 해석되며 나이에 따라 세포막 기능이 퇴화된다는 사실을 보여 주었다.

세포막을 구성하는 인지방 중에 PE는 PC에 비해 구조적으로 좁은 공간에서 밀집될 수 있어 유동성을 저하시키는 특성이 있으므로 PC/PE 비 또한 세포막의 유동성을 조절하는 인자로서 인식되고 있다¹¹⁾¹³⁾.

노화시 세포막을 구성하는 인지방의 조성이 변화하여 PC의 함량이 감소하게 된다. 그러나 나이가 다른 쥐들(newborn, 1개월, 18개월)에서 취한 PC함량에 차이가 있는 heart cell을 배양할 때 PC liposome을 첨가한 결

과 18개월된 쥐에서 얻은 세포의 creatinine phosphokinase활성이 갓태어난 쥐와 비슷한 정도로 회복됨으로써 PC/PE 비가 세포막의 기능에 영향을 준다는 사실을 보고하였다³⁸⁾.

앞서 언급했듯이 본 실험결과 나이에 따라 P/C 비가 감소하면서 AchE활성이 저하되었던 것으로 보아, P/C 비에 따라 세포막 기능이 달라진 것이라 할 수 있다. 또한 나이에 따른 PC/PE 비의 변화 양상은 이들의 보고와는 달랐으나 식이에 따라 효소활성이 높을 때 PC/PE 비율이 높았고, 특히 L-LNA식은 각 연령내에서 PC/PE 비의 상승시 효소활성의 증가를 보임으로써 PC/PE 비에 따라 세포막의 기능이 변화되었음을 제시한 것이라 할 수 있다.

효소활성의 차이가 P/C 비 및 PC/PE 비의 변화양상에 따라 다르게 나타난다는 사실이 명확하게 규명되어 있지는 않지만, 대체로 membrane-bound enzyme의 활성은 세포막의 적당한 유동성 뿐 아니라 특정의 인지방을 요구하는 것으로 알려져 있다³⁹⁻⁴¹⁾. 특히 synaptic membrane은 나이의 함께 콜레스테롤 함량이 크게 증가함에 따른 유동성의 저하가 관찰되었다⁴²⁾. 그러므로 세포가 처한 조건에 따라 세포의 지방조성에 변화가 생기고 그 결과 세포막의 유동성이 변하거나 세포막이 기능하는데 필요한 환경을 변화시킴으로써 세포막의 기능에 영향을 미치는 것이라고 하겠다.

이러한 점들로 미루어 보아 AchE 활성은 P/C 비 및 PC/PE 비의 변화에서 오는 세포막의 유동성 저하에 의해 영향을 받게 되는 것이며, 이와 같이 세포막을 구성하는 지방 조성의 변화는 나이나 식이지방산의 조절에 의해 야기될 수 있음을 유추할 수 있다.

요약 및 결론

본 연구는 식이내 linolenic acid(LNA)와 linoleic acid(LA)의 함량과 비율을 달리하여 1, 4 및 12개월동안 흰쥐를 사육하여 연령과 식이지방산조성이 뇌구조지방의 조성과 세포막기능에 주는 영향을 보고자 뇌에서 crude synaptosomal fraction을 분리하여 구조지방의 함량과 membrane-bound enzyme인 AchE 활성을 측정하였다.

효소활성은 37°C에서 나이가 증가하면서 1개월의 흰쥐에 비해 20-30% 정도의 활성이 저하되었고 LNA/LA비가 0.6인 식이에서 비율이 낮은 0.2와 0.4의 식이보다 활성이 낮은 경향을 보였다. 25°C에서 H-LNA경우는 1개월과 4개월 모두 LNA/LA비가 0.2인 식이가, L-LNA에서는 0.2와 0.4인 식이가 AchE 활성이 높았다.

이와 같은 AchE활성 변화를 구조지방과 비교하여 보면 연령에 의한 차이를 보였던 37°C에서의 활성이 나이가 많아지면서 저하됨과 함께 P/C비율이 유의적으로 감소하였다. 25°C에서 효소활성과 식이사이의 교호작용이 나타났는데 1개월과 4개월의 H-LNA-0.2와 L-LNA-0.2 및 0.4식이에서 활성이 높으면서 PC/PE의 비도 높았고, 특히 L-LNA식이의 경우 모든 연령에서 효소활성의 상승시에 PC/PE 비도 확실히 증가했음을 볼 수 있었다.

결과적으로 효소활성은 나이와 식이에 의해 변화가 야기되는데 노화되면서 그리고 식이내 n3/n6 비가 높을 때 P/C 비 및 PC/PE 비가 저하되어 구조지방의 조성이 달라짐에 따라 세포막의 유동성이 감소하고, 효소활성에 필요한 환경이 변화됨으로써 membrane-bound enzyme인 AchE 활성이 저하되는 것으로 생각된다. 따라서 세포막의 퇴화는 식이내 지방산조성을 조절함으로써 지연시킬 수 있으리라 본다.

Literature cited

- 1) Thilo L, Trable H, Overath P. Mechanistic interpretation of the influence of lipid phase transitions on transport functions. *Biochemistry* 16 : 1283-90, 1988
- 2) McMurchie EJ, Raison JK. Membrane lipid fluidity and its effect on the activation energy of membrane-associated enzymes. *Biochim Biophys Acta* 554 : 364-74, 1979
- 3) Schachter D. Fluidity and function of hepatocyte plasma membranes. *Hepatology* 4 : 140-151, 1984
- 4) Less RS. Impact of dietary fat on human health. In: Less RS and Karel M eds. Omega-3 fatty acids in health and disease. pp1-38, Marcel Dekker Inc,

- NY and Basel, 1990
- 5) Kimelberg HK, Papahadjopoulos D. Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transition and cholesterol on $(Na^+ + K^+)$ activated stimulated ATPase. *J Biol Chem* 249 : 1071-80, 1974
 - 6) Brasitus TA, Schachter D. Lipid dynamics and lipid-protein interactions in rat enterocyte basolateral and microvillus membranes. *Biochemistry* 19 : 2763-2769, 1980
 - 7) Cooper RA, Arner EC, Wiley JS. Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. *J Clin Invest* 55 : 115-126, 1975
 - 8) Borochoy H, Abbott RE, Schachter D. Modulation of erythrocyte membrane proteins by membrane cholesterol and lipid fluidity. *Biochemistry* 18 : 251-255, 1979
 - 9) Van Blitterswijk WJ, Van Hoesven RP, Van der Meer BW. Lipid structure order parameters (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from steady-state fluorescence polarization measurements. *Biochim Biophys Acta* 644 : 323-332, 1981
 - 10) Shinitzky M, Inbar M. Differences in microviscosity induced by different cholesterol levels in surface membrane lipid layer of normal lymphocytes and malignant lymphoma cells. *J Molec Biol* 85 : 603-615, 1974
 - 11) Shinitzky M, Henkart P. Fluidity of cell membranes : current concepts and trends. *Int Rev Cytol* 60 : 121-147, 1979
 - 12) Ladbroke BD, Chapman D. Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes : a review and summary of some recent studies. *Chem Phys Lipids* 3 : 304-356, 1969
 - 13) Lentz BR, Barenholz Y, Thompson TE. Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers 2. Two-component phosphatidylcholine liposomes. *Biochemistry* 15 : 4529-4537, 1976
 - 14) Christopher DS, Anthony DS. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta* 779 : 89-137, 1984
 - 15) Martha N, William EC, Don SL, Louise B, Steven L. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal n3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 4021-25, 1986
 - 16) Borlenholz Y. Physiology of Membrane fluidity. Ed Shinitzky M. Vol.1 pp1-51 CRC Press, Boca Raton, 1984
 - 17) Borlenholz Y. Sphingomyelin-lecithin balance in membranes : composition, structure, and function relationships. In : Shinitzky M ed. Physiology of membrane fluidity, vol.1, pp131-173, CRC Press, Boca Raton, 1984
 - 18) Sheila MI, Michael TC. Dynamic modulation of mitochondrial innermembrane lipids in rat heart by dietary fat. *Biochim J* 193 : 155-167, 1981
 - 19) Dugald FM, Robert O, Betty IR. Effect of dietary lipid on the acyl group composition of glycerophospholipids of brain endothelial cell in the developing rat. *J Neurochem* 36 : 2073-79, 1981
 - 20) Marian F, Tony FC, Michael TC. Influence of dietary fat on the lipid composition of rat brain synaptosomal and microsomal membranes. *Biochim J* 208 : 631-40, 1982
 - 21) American Institute of Nutrition. Report of the American institute of nutrition Ad Hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107 : 1340-1349, 1977
 - 22) Chan AC and Leith MK. Decreased prostacyclin synthesis in vitamin E-deficient rabbit aorta. *Am J Clin Nutr* 34 : 2341-2347, 1982
 - 23) Robertis D. Cholinergic and noncholinergic nerve endings in rat brain(I). *J Neurochem* 9 : 23-35, 1962
 - 24) Gurd JW, Jones LR, Mahler HR, Moore WJ. Isolation and partial characterization of rat brain synaptic plasma membranes. *Neurochem* 22 : 281-290, 1974
 - 25) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37 : 911-917, 1959
 - 26) Zak B. Total and free cholesterol. In : standard method of clinical chemistry. pp79-89, New York Acad press Inc, 1968

지방산 비율이 다른 식이와 Acetylcholinesterase 활성

- 27) Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 234 : 466-468, 1959
- 28) Vitiello F, Zanetta JP. Thin-layer chromatography of phospholipid. *J Chromatography* 166 : 637-640, 1979
- 29) Ellman GL, Courtney KD, Andres V. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7 : 88-95, 1961
- 30) Whittaker M. Cholinesterase In : Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis* 3rd ed. Vol.3, pp52-63, Verlag Chemie, Weinheim, 1983
- 31) Lowry OH. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biolchem* 193 : 265-275, 1951
- 32) Story JA, Aging and Lipid Metabolism. In : Ordy JM, Harman D, Alfin-slater RB eds. *Nutrition in Gerontology*. Vol.26, pp77-86, Raven Press, New York, 1984
- 33) Michaelson DM, Barkai G, Barenholz Y. Asymmetry of lipid organization in cholinergic synaptic vesicle membranes. *Biochem J* 211 : 155-162, 1983
- 34) Innis SM, Clandinin MT. Dynamic modulation of mitochondrial membrane physical properties and ATPase activity by diet lipid. *Biochem J* 198 : 167-175, 1981
- 35) Conroy DM, Stubbs CD, Belin J, Pryor CL, Smith AD. The effects of dietary(n-3) fatty acid supplementation on lipid dynamics and composition in rat lymphocytes and liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* 457 : 462, 1986
- 36) Beguinot F, Tramontano D, Duilio C, Formisano S, Beguinot L, Mattioli P, Mancini M, Aloj SM. Alteration of erythrocyte membrane lipid fluidity in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 60 : 1226-1230, 1985
- 37) Davis RA, Kern F, Showalter R. Alteration of hepatic Na⁺, K⁺-ATPase and bile flow by estrogen:effect on liver surface membrane lipid structure and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 75 : 4130-4134, 1978
- 38) Yechiel E, Barenholz Y. Cultured heart cell reagggregates : A model for studying relationship between aging and lipid composition. *Biochim Biophys Acta* 859 : 105-109, 1986
- 39) Gazzotti P, Bock HG, Fleischer S. Role of lecithin in β -hydroxy butylate dehydrogenase function. *Biochem Biophys Res Commun* 58 : 309-315, 1974
- 40) Santiago E, Lopez-Moratalla N, Segovia JL. Correlation between losses of mitochondrial ATPase activity and cardiolipin degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 53 : 439-445, 1973
- 41) Zuniga ME, Lokesh BR, Kinsella JE. Effect of dietary n6 and n3 polyunsaturated fatty acids on composition and enzyme activities in liver plasma membrane of mice. *Nutr Res* 8 : 1051-1059, 1988
- 42) Hitzemann R. Developmental regulation of phospholipid methylation in rat brain synaptosomes. *Life Sciences* 30 : 1297-1303, 1982