

# 식이엽산함량이 흰쥐의 면역세포의 엽산농도와 알칼리 처리후의 DNA 이중 나선 선 잔존율에 미치는 영향

장 남 수 · 박 정

이화여자대학교 식품영양학과

## Effects of Dietary Folate Content on Folate Concentrations and DNA Strand Breaks after Alkaline Treatment in Immune Cells

Chang, Namsoo · Park, Jung

Department of Food and Nutrition, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

### ABSTRACT

Folate, a precursor of the coenzyme tetrahydrofolate, plays an important role in DNA replication and cell proliferation, and thus could influence rapidly proliferating immune cells such as leukocytes and splenocytes. The effects of dietary folate on folate concentrations of plasma, thymus, spleen and leukocytes were investigated in rats. The animals were raised for 6 weeks on semi-purified experimental diets containing 0mg, 2mg, 4mg, 8mg folate/kg diet. Folate concentrations were determined microbiologically using *Lactobacillus casei*(ATCC 7469), and DNA strand breaks produced by alkaline treatment were analyzed fluorometrically. When compared to folate adequate diet, the folate deficient diet(0mg folate/kg diet) resulted in lowest folate levels in plasma, thymus, spleen and leukocytes, and the highest DNA strand breaks in spleen cells and leukocytes. Dietary folate levels significantly increased folate concentrations of immune tissues, leukocytes, and the plasma in a dose dependent manner, folate concentrations being highest with a diet providing 8mg folate/kg diet. The percentages of the double strand DNA remaining in the splenocytes and leukocytes after alkaline treatment were significantly increased with higher amounts of dietary folate in a dose dependent manner. Folate intakes of 8mg than 4mg/kg diet was found to be more effective in the prevention of DNA strand breaks. The results of this study suggest that increased folate intakes above the requirement level could improve DNA stabilities in immune cells. (*Korean J Nutrition* 32(6) : 654~660, 1999)

KEY WORDS: dietary folate, tissue folate concentrations, plasma, spleen, thymus, leukocytes, DNA strand breaks.

## 서 론

엽산은 체내에서 tetrahydrofolate로 환원된 후 단일탄소 전이반응의 조효소로 작용하고 purine과 thymidylate의 생합성 과정의 필수요소로서 DNA 복제와 세포분열에 영향을 미친다.<sup>1)</sup> 또한 중심적인 대사중간체의 역할을 하는 S-adenosylmethionine(SAM)의 합성에 이용됨으로써 DNA methylation에 영향을 줄 수 있다. 엽산이 결핍되면 교체율이 빠른 혈구세포의 생성에 지장이 생겨서 거대적아구성 빈혈이 나타나는 것으로 잘 알려져 있으며<sup>2)</sup> 최근 들어 엽산의 결핍이 신경관결함,<sup>3)</sup> 심혈관계질환,<sup>4)</sup> 암<sup>5)</sup> 등 다양한 질환에서 유전학적 수준의 손상과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.

유전자 손상은 정상적인 조건에서 자연적으로도 일어날 수 있지만 특정 미량영양소가 결핍되면 손상정도가 더욱 증가하여 돌연변이의 발생 빈도가 높아지게 된다. 미량영양소 중 엽산의 경우, McBurney 등<sup>6)</sup>은 연구에서 엽산을 결핍시킨 Chinese hamster ovary cells의 돌연변이를 관찰하면서 정상적인 세포의 성장과 생존능력에 필요한 엽산의 요구량을 제시한 바 있다. 엽산의 부족으로 인하여 thymidylate synthase의 활성이 저하되면 세포내에 dUMP가 증가하게 되고<sup>10)</sup> 세포내 dNTP에 균형이 깨지면 DNA로 uracil이 잘못통합되어<sup>10)</sup> 이중 나선 선 절단이 일어난다.<sup>11)</sup> 또한 thymidine은 세포내에 저장되지 않기 때문에 엽산결핍에 의해 thymidylate 합성이 저하되면 DNA 합성에 그 영향이 곧바로 나타나서 세포분열을 저해된다.<sup>11)</sup> 따라서 엽산 결핍으로 인한 thymidylate stress<sup>12)</sup>가 이중 나선 선의 절단 정도를 증가시키고 돌연변이 빈도를 증가시키며 deoxynu-

채택일 : 1999년 6월 22일

cleotide pools의 불균형 등의 많은 변화를 일으킬 수 있을 것이다.<sup>11)12)</sup>

DNA 복제와 세포 분화에 영향을 주는 영양소의 결핍으로 유전자 손상이 일어남으로써 면역기능이 저하되는 경우에 대한 연구로는 백혈구와 비장에 대해서는 세포에 존재하는 엽산 결합단백질의 분화와 특성에 대한 것이 있다.<sup>13-16)</sup> 본 실험실에서 실행되었던 선행연구<sup>17)</sup>에서는 비장과 흉선의 엽산 함량이 식이엽산함량에 의해 유의적으로 달라짐을 관찰할 수 있었다. 비장 조직의 엽산 함량이 엽산 섭취량에 따라서 유의적으로 달라진다는 연구는 다른 사람들에 의해 수행된 적이 있었다. 그러나 비장과 흉선, 그리고 백혈구 등 면역조직과 면역세포를 동시에 관찰하면서 이 조직의 엽산 함량이 식이 엽산 수준에 따라 변하는 지에 대해서는 이제까지 연구된 적이 없었다. 또한 엽산결핍이 비장세포와 백혈구의 DNA 안전성에 미치는 영향을 주는 유전자적 수준의 국내 연구가 없었다.

이에 본 연구는 식이엽산의 함량을 결핍, 적정, 적정량의 2배, 적정량의 4배로 제조하여 동물을 사육한 후 식이엽산 수준에 따라서 혈장, 비장, 흉선, 백혈구의 엽산 함량이 변화하는지, 또한 비장세포와 백혈구의 DNA 안전성이 달라지는지 알아보기 위하여 실행되었다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. 실험동물과 식이

Sprague-Dawley 종의 수컷 흰쥐를 3일간 고휘 배합사료(삼양사료)로 적응시킨 후 체중에 따라 난괴법으로 실험군당 6마리씩 지정하였으며 실험식이 개시당시 동물의 평균 체중은 139 ± 0.2g이었다. 실험군은 Table 1의 실험계획에 나타난 바와 같이 식이 엽산함량에 따라 결핍, 적정, 적정군의 2배, 적정군의 4배 등 4군으로 나누어 6주간 사육하였다.

실험식은 Table 1에 나타난 바와 같이 옥수수 전분, 설탕, 카제인, 대두유, 셀룰로스를 배합하여 제조하였다. 무기질믹스와 비타민 믹스는 AIN-76<sup>18)</sup>에 근거하여 직접 제조하여 사용하였다. 단 비타민 믹스 중 엽산은 식이 1kg 당 0, 2, 4, 8mg을 함유하도록 조정하였는데 2mg/kg diet 수준은 AIN-76에서 제시하는 엽산 권장량이었으며, 4mg/kg diet 수준은 권장량의 2배에 해당하는 수준이며, 8mg/kg diet 수준은 권장량의 4배에 해당하는 수준이었다.

### 2. 시료채취

사육기간이 끝난 후 8시간을 금식시키고, 에틸에테르로 마취시켜 개복한 후 3.8% sodium citrate로 미리 처리한

**Table 1.** Composition of experimental diet (g/kg diet)

Diet	
Corn starch	560
Powdered sugar	110
Casein	150
Soybean oil	100
Salt mixture <sup>1)</sup>	35
Vitamin Mixture <sup>2)</sup>	10
Groups <sup>3)</sup>	Folate content(mg/kg diet)
FD	0
FA	2
FS-2	4
FS-4	8
Choline chloride	2
DL-methionine	3
Fiber, α-cellulose	40

1) AIN Salt Mixture(g/kg salt mixture): Calcium phosphate, dibasic (CaHPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O) 500, Sodium Chloride(NaCl) 74, Potassium Citrate, Monohydrate(K<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O) 220, Potassium Sulfate(K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 52, Magnesium Oxide(MgO) 24, Manganous Carbonate(43 - 48% Mn) 3.5, Ferric Citrate(16 - 17% Fe) 6, Zinc Carbonate(70% ZnO) 1.6, Cupric Carbonate(53 - 55% Cu) 0.3, Potassium iodate(KIO<sub>3</sub>) 0.01, Sodium Selenite(Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O) 0.01, Chromium Potassium Sulfate (CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O) 0.55, Sucrose finely powdered, to make 1000g.

2) Vitamin Mixture(mg/kg Vit. mixture): Thiamin · HCl 600, Riboflavin 600, Pyridoxine · HCl 700, Nicotonic acid(Nicotinamide is equivalent) 3,000, D-Calcium Pantothenate 1,600, Folic acid(FD 0, FA 200, FS-2 400, FS-4 800), D-Biotin 20, Cyanocobalamin(vitamin B<sub>12</sub>) 1, Retinyl palmitate or acetate(vitamin A) as stabilized powder to provide 400,000IU vitamin activity or 120,000 retinol equivalents, DL-α-tocopheryl acetate(vitamin E) as stabilized powder to provide 5,000IU vitamin E activity, Cholecalciferol 2.5(100,000IU, may be in powder form), Menaquinone(vitamin K, Menadione) 5.0, Sucrose finely powdered, to make 1,000g. 3) FD: folate deficient diet, FA: folate adequate diet, FS-2: folate supplemented diet(2 times NRC recommended level), FS-4: folate supplemented diet(4 times NRC recommended level)

10ml 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 EDTA가 들어있는 원심분리관에 담아 2, 800rpm, 4℃에서 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 혈액을 채취한 후 실험동물을 즉시 해부하여 흉선, 비장을 떼어 내어 엽산 분석에 이용하였다.

### 3. 시료의 전처리

혈장의 엽산분석을 위해서 100ml당 150mg의 ascorbic acid를 첨가한 0.05M sodium ascorbate-phosphate buffer, pH 5.7로 혈장을 7~23배 희석한 후 121℃에서 1분간 멸균하였다. 멸균된 혈장을 1.500 × G에서 5분간 원심분리시킨 후 맑은 상청액을 분석에 이용하였다. 흉선과 비장은 일정량 취하여 500mg ascorbate/100ml buffer를 첨가한 0.1M sodium ascorbate-phosphate buffer, pH 6.1로 6배 희석하여 균질화시킨 후 10분간 멸균한다. 원심분

리하여 상정액에 conjugase를 첨가하고 37°C, 항온수조에서 6시간동안 배양하였다. Conjugase 처리한 흉선과 비장 시료를 150mg ascorbate/100ml buffer를 첨가한 0.1M sodium ascorbate-phosphate buffer, pH 6.7로 2배 희석하여 엽산 분석에 이용하였다.

엽산 분석을 위한 백혈구는 채혈 즉시 3ml의 혈액에 0.87% NaCl-10mM Tris-HCl, pH 7.2(Solution A)를 9ml를 섞어 0°C에서 20~30분간 유지시켜 적혈구를 용혈시켜 얻었다. 용혈시켜 얻은 적혈구 용액을 400×G, 0°C에서 20분간 원심분리하고, 침전물에 solution A를 넣어 다시 10분간 원심분리하여 적혈구를 완전히 제거하였다. 침전물에 0.25-mesoinositol-10mM sodium phosphate-1mM MgCl<sub>2</sub> pH 7.2 2.7ml를 넣어 백혈구의 농도가 5~10×10<sup>6</sup>/ml가 되도록 희석하여 DNA 이중 나사선 절단 정도를 알아 보는데 이용하였다. 남은 혈액은 4배로 희석하여 고주파음을 통한 분해를 한 후 folate conjugase로 처리하여 150mg sodium ascorbate-phosphate buffer, pH 6.7로 2배 희석하여 엽산 분석에 이용하였다.

#### 4. 생화학적 분석

##### 1) 혈장, 흉선, 비장, 백혈구의 엽산분석

전보<sup>19</sup>와 같이 *Lactobacillus casei*(ATCC 7469)를 이용한 미생물 분석법에 의해 측정되었다. 흉선과 비장, 백혈구는 돼지 신장에서 추출 정제한 pteroylglutamate hydro-lase로 가수분해시켜 monoglutamate의 형태로 전환시킨 후 분석에 이용하였다. 준비된 혈장, 비장, 흉선, 백혈구에 0.1M sodium ascorbate-phosphate buffer, pH 6.2를 첨가한 첫 시험관에서부터 일정량씩 취하여 buffer를 첨가하면서 단계적으로 시료를 희석하였다. 준비된 시료와 standard tube에 각각 2×Folic Acid Casei Medium(Difco 회사)를 넣고 autoclave하였다. 24시간동안 배양한 *Lactobacillus casei*를 원심분리한 후 식염수로 세척하고 600nm의 파장에서 OD값 0.03이 되도록 균수를 일정하게 맞춘 후 inoculum을 1방울(50μl)씩 microdispenser를 사용하여 각 시험관에 접종하였다. 이를 36시간동안 37°C 항온기에서 배양한 후 600nm의 파장에서 흡광도를 읽어서 엽산표준 용액 곡선에 대입하여 엽산 함량을 정량하였다.

##### 2) 비장세포와 백혈구의 DNA strand break analysis<sup>20)</sup>

비장은 핀셋으로 잘게 잘라 medium 199(Gibco)로 섞어 세포를 긁어낸 후, medium 199에서 210 gauge의 주사기로 빨아들였다. 이렇게 얻은 비장세포와 전처리를 통해 얻은 백혈구 세포를 10 × 10<sup>6</sup>/ml가 되도록 농도를 맞추었

다. Total sample(T), blank sample(B), Partial sample(P)의 15ml 시험관을 각각 4개씩 12개를 준비하고 시료를 0.2ml씩 나누어 담았다. 각각의 시험관에 9M urea-10mM NaOH-2.5mM cyclohexanediaminetetraacetate-0.1% sodium dodecyl sulfate(solution C)를 0.2ml씩 넣고 0°C에서 10분간 배양했다. T 시험관에 먼저 1M glucose-14mM mercaptoethanol을 0.4ml 넣은 후, 각각의 시험관에 0.20N NaOH와 Solution C를 0.55 : 0.45로 섞은 용액과 0.20N NaOH와 Solution C를 0.6 : 0.4로 섞은 용액을 0.1ml씩 천천히 넣고나서 0°C에서 30분간 다시 배양했다. B 시험관을 1~2초간 고주파음에 의한 분해를 하고, 모든 시험관을 15°C에서 60분간 배양했다. 0°C에서 식힘으로써 DNA 변성을 정지시킨 후, B 시험관과 P 시험관에 1M glucose-14mM mercaptoethanol을 0.4ml씩 넣었다. 각각의 시험관을 짧게 고주파음에 의해 분해하여 균질화시키고, ethidium bromide 6.7μg/ml~13.3mM NaOH 1.5ml를 넣어 희석했다. 실온에서 형광계로 비장세포는 excitation 523nm, emission 605nm, 백혈구세포는 excitation 520nm, emission 590nm에서 흡광도를 읽었다. 세포 부유액에 남아있는 Percentage double-strand DNA (D)의 값은 「Percent D = (P-B) ÷ (T-B) × 100」에 대입하여 구하였는데, T의 값은 세포내 이중 나사선 DNA와 그외의 모든 잔여물이 함께 존재할 때의 흡광도이며, B의 값은 실험초기의 고주파음에 의한 분해와 뒤이은 알칼리 처리에 의해 DNA 이중 나사선이 모두 제거되고 남은 잔여물들의 흡광도이고, P의 값은 알칼리 처리후 남아있는 DNA 이중 나사선과 잔여물의 흡광도이다. 따라서(T-B)는 세포내 존재하는 이중 나사선 DNA의 값이고(P-B)는 알칼리 처리후 남아있는 이중 나사선 DNA의 값이므로 이를 통해 Percent D를 구하였다.

#### 5. 자료의 처리 및 분석

모든 실험결과는 평균치와 평균오차로 나타내었고, 식이 엽산함량에 따른 영향을 p < 0.05 수준에서 one-way ANOVA로 분석하였다. 각 실험군의 평균치들간의 유의성은 p < 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였다. 모든 통계적 분석은 SAS program을 사용하였다.

### 실험 결과 및 고찰

#### 1. 식이섭취량, 체중변화와 장기무게

실험동물의 1일 체중 증가량은 식이 엽산 함량에 따라 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 1일 식이 섭취량은 엽산 결

평균(0mg folate/kg diet)이 유의적으로 적었고, 엽산 적정군(2mg folate/kg diet)이 유의적으로 많았다. 그러나 식이 효율은 식이 엽산 함량에 따른 유의적인 차이가 없었다. 따라서 제공된 식이에 의해 엽산 영양상태와 DNA 이중 나선선에 나타난 효과가 식욕부진이나 성장장애에 의한 것이라기보다는 실험식이의 엽산함량에 의한 것으로 볼 수 있다.

측정된 장기무게도 식이엽산 수준에 따른 유의적인 차이가 없었다. 이는 식이엽산 함량을 0mg, 2mg, 8mg/kg diet로 달리한 실험식을 제공하여 4주, 7주, 10주동안 사육하였을 때 장기무게가 식이엽산 수준에 의해 유의적인 차이를 보이지 않았다는 선행연구<sup>19)</sup>의 결과와 일치하였다. 그러나 단위체중당 장기무게로 나타내었을 때 간무게의 경우 엽산 결핍군이 8mg folate/kg diet를 제공한 군보다 유의적으로 높았다. 이는 간에서 중성지방의 방출에 필요한 메티오닌의 합성이 엽산 결핍으로 인하여 저해됨으로써 지방의 방출이 억제되어 나타난 것이라고 보여진다.<sup>21)</sup>

**2. 혈장, 비장, 흉선, 백혈구의 엽산 농도**

실험동물의 각 장기에서의 엽산농도는 Table 2에 나타나 있다.

혈장 엽산 농도는 식이 엽산 함량이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였다(p < 0.001). 엽산 결핍군(0mg folate/kg diet)은 적정 식이군(2mg folate/kg diet)의 17% 수준으로 낮았고, 4mg 엽산 제공군과 8mg 엽산 제공군은 각각 2mg 식이군의 1.7배, 2.5배 수준으로 높았다. 6주간 엽산 결핍식이와 적정식이를 제공한 Kim 등의 연구<sup>1)</sup>와 아미노산 정제식이를 제공하면서 식이 엽산을 0, 8mg folate/kg diet로 공급한 Kim 등의 연구,<sup>20)</sup> 그리고 weanling C57BL/6 female mice에게 엽산을 0, 2mg folate/kg diet 수준으로 제공한 연구<sup>22)</sup>에서 엽산 수준이 증가함에 따라 혈장 엽산 수준이 증가하는 동일한 결과가 나타났다.

비장의 엽산 수준도 식이의 엽산 함량이 증가할수록 유의적으로 증가되었다(p < 0.0001). 실험기간인 6주가 지났을 때, 엽산 결핍군의 비장 엽산 함량은 적정 식이군의 43.3% 수준으로 낮았고, 4mg과 8mg 엽산 제공군은 2mg 식이군의 각각 1.2배, 1.6배 수준이었다. 이는 25일동안 아미노산 정제식이와 0, 0.125, 0.5, 1, 2, 4mg folate/kg diet 각각을

흰쥐에게 공급한 연구<sup>20)</sup>의 식이엽산수준이 증가함에 따라 비장의 엽산함량이 증가한 결과와 일치하였다. 이 연구에서 2mg 엽산제공식이의 비장엽산수준은 4mg 엽산제공식이의 엽산수준과 유의적인 차이를 보이지 않았는데, 본 실험에서도 2mg 식이와 4mg 식이간에 유의적인 차이가 없었다.

흉선의 엽산함량도 혈장, 비장과 마찬가지로 식이엽산함량이 증가할수록 유의적으로 증가하였다(p < 0.0001). 결핍 식이군의 흉선엽산함량이 적정 식이군의 51.6%로 낮았고, 4mg 엽산제공군은 적정식이군의 흉선엽산함량의 1.5배, 8mg 엽산제공군은 적정식이군의 2.3배로 증가하였다. 흉선의 엽산 수준에 대해서는 이제까지 연구되지 않았고, 본 연구에서 처음으로 제시되었다. 따라서 본 연구 결과에서 나타난 식이엽산 수준에 따른 흉선의 엽산 수준의 변화는 엽산이 면역기관에 영향을 미친다는 것을 뒷받침한다고 할 수 있다. 또한 흉선조직에 대한 연구가 앞으로 더욱 이루어져야 한다는 필요성에 대한 근거도 제공한다.

백혈구의 엽산함량은 일정한 수의 백혈구에 함유된 엽산의 함량을 분석함으로써 알아보았다. 백혈구의 엽산 함량은 식이엽산함량에 의해 유의적인 영향을 받았다(p < 0.0001). 엽산결핍군의 백혈구 엽산함량은 적정식이군의 53.8%에 불과하였다. 식이엽산함량이 증가할수록 백혈구의 엽산함량이 증가하여 4mg 제공군은 2mg 군의 1.5배, 그리고 8mg 제공군은 2.1배로 높아졌다. 식이의 엽산 수준에 의해서 백혈구 세포내 수준이 민감하게 영향을 받는다는 본 연구 결과를 볼 때, 세포분화가 빠르게 일어나는 면역세포인 백혈구에서 엽산이 결핍되면 이로 인하여 백혈구의 DNA 분화나 세포분열에 이상이 일어남으로써 백혈구의 정상적인 기능이 이루어지지 못하게 되지 않을까 생각해 볼 수 있다.

**3. 비장과 백혈구의 DNA 이중 나선선 절단 정도**

엽산 결핍에 의해서 면역세포의 유전자 수준에 손상이 일어나는지 알아보기 위하여 비장과 백혈구의 DNA를 추출하여 알칼리 처리를 한 후 이중 나선선 절단정도를 알아보았다.

비장세포에 남아있는 이중 나선선 DNA의 잔존율은 식이엽산 수준에 따라 유의적인 차이가 있었다(p < 0.0001, Table 3). 식이엽산수준이 증가함에 따라서 비장세포내 이

**Table 2.** Plasma, spleen, thymus, and WBC folate levels of rats on experimental diets

Diet groups(mg folate/kg diet)	Plasma(ng/ml)	Spleen(µg/g tissue)	Thymus(µg/g tissue)	WBC(ng/5 - 10 <sup>6</sup> cells)
0	<sup>1)</sup> 7.09 ± 0.60 <sup>a2)</sup>	<sup>1)</sup> 0.144 ± 0.01 <sup>a2)</sup>	0.143 ± 0.23 <sup>a</sup>	<sup>1)</sup> 31.18 ± 0.86 <sup>a2)</sup>
2	41.70 ± 6.24 <sup>b</sup>	0.332 ± 0.39 <sup>b</sup>	0.277 ± 0.30 <sup>b</sup>	57.96 ± 2.11 <sup>b</sup>
4	72.04 ± 6.59 <sup>c</sup>	0.393 ± 0.26 <sup>b</sup>	0.417 ± 0.46 <sup>c</sup>	84.34 ± 4.12 <sup>c</sup>
8	102.4 ± 9.41 <sup>d</sup>	0.532 ± 0.79 <sup>c</sup>	0.628 ± 0.16 <sup>d</sup>	123.4 ± 4.64 <sup>d</sup>

1) Mean ± S.E. 2) Values with different alphabets are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

**Table 3.** The percentage dsDNA remaining in spleen cell and WBC(%)

Diet groups (mg folate/kg diet)	Spleen cell	Leukocytes
0	<sup>1)</sup> 11.65 ± 1.87 <sup>2)</sup>	10.52 ± 1.25 <sup>a</sup>
2	30.30 ± 4.28 <sup>b</sup>	31.97 ± 2.58 <sup>b</sup>
4	33.01 ± 3.93 <sup>b</sup>	37.51 ± 3.32 <sup>bc</sup>
8	53.20 ± 5.52 <sup>c</sup>	46.53 ± 2.20 <sup>c</sup>

1) Mean ± S.E. 2) Values with different alphabets are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

중 나사선 DNA의 절단정도가 유의적으로 감소하였다. 그러나 식이 엽산을 적정수준의 2배로 증가시킨 식이를 주었을 때는 적정식이군과 유의적인 차이가 나타나지 않았다. James 등의 연구<sup>25)</sup>에서는 엽산, 베타오닌, 콜린이 만성적으로 결핍된 식이를 주어 암 발생과정을 알아보았는데, 정상수준의 엽산식이를 주었을 때 비장세포에 남아있는 이중 나사선 DNA의 잔존율이 33%로 본 실험의 결과와 유사하였으며, 엽산과 베타오닌, 콜린이 함께 결핍되었을 때 DNA 손상이 더욱 심하게 나타났다.

백혈구 세포의 DNA 이중결합 잔존율도 식이 엽산 수준에 따라 유의적으로 영향을 받았다( $p < 0.001$ ). 엽산결핍군의 DNA 이중 나사선 잔존율은 엽산 적정군의 33% 수준이었고, 엽산을 2배 증가시켰을 경우에는 적정 식이군의 1.2배, 4배 증가시켰을 때는 1.5배로, 식이엽산수준을 4배까지 증가시켰을 때 DNA 이중 나사선 절단이 적게 일어남을 알 수 있었다. 그러나 백혈구도 비장세포와 마찬가지로 적정수준의 2배수준에서는 첨가효과가 나타나지 않고 4배 증가시켰을 때 효과를 볼 수 있었다. 본 연구결과에서 나타난 백혈구의 이중 나사선 DNA의 잔존율은 사람을 대상으로 수행했던 Birnboim 등의 연구<sup>26)</sup>의 결과보다 낮은 수준으로 나타났다. 즉 적정식이군의 이중 나사선 DNA 빈도를 비교하였을 때 본 연구에서는 31.97%였지만 Birnboim 등의 연구에서는 60%였다. 이는 부분적으로는 대상에 따른 차이에 의해 나타난 것으로, 사람의 DNA가 쥐의 DNA보다 더 안정하기 때문일 것으로 생각된다.

DNA 이중 나사선 절단의 증가로 인한 질병발생에 대한 연구 중 최근 거대적아구성 빈혈<sup>27-29)</sup>과 암발생<sup>11)2)29)30)</sup>에 관해 많이 연구되고 있다. 거대적아구성 빈혈은 DNA 합성이 방해되어 나타나는 질환으로, DNA 합성에서 필요한 네 가지 dNTP 전구체가 부족하거나 DNA polymerase가 방해를 받을 때 일어난다.<sup>31)</sup> dNTP 중 dTTP는 조효소인 5,10-methylene tetrahydrofolate가 부족하여 thymidylate synthase의 활성이 저하되면 공급이 줄어들는데,<sup>31)32)</sup> 거대적아구성 빈혈은 DNA polymerase의 활성 저하보다는 이러한 dNTP의 불균형으로 인한 DNA의 손상에 의해 영향을 많

이 받는다. 이러한 DNA 손상 기전은 본 연구의 면역기관에서도 동일하게 나타났다. 또한 김 등의 연구<sup>1)</sup>에서는 암의 발생과 가장 빈번하게 관련되는 유전자인 p53 suppressor gene 내에서 엽산 결핍의 영향을 알아보았는데, 엽산이 결핍되었을 때 DNA hypomethylation과 DNA 이중 나사선 절단율이 증가하였다.

엽산결핍의 영향이 나타나는 주된 기전은 DNA hypomethylation,<sup>33)34)</sup> 혹은 세포의 교체율의 증가,<sup>33)35)</sup> 또는 자유기의 생성,<sup>36)37)</sup> 또는 면역기능의 저하<sup>38)</sup> 등으로 제안되고 있다. 식이에서 엽산 이외의 메틸공여체인 methionine과 choline이 결핍되었을 때도 엽산결핍증세가 나타날 수 있다.<sup>35)</sup> 이는 체내의 주요 대사적 메틸공여체인 SAM의 세포내 수준을 유지하기 위하여 체내에서 methionine을 재합성하는 엽산-의존 경로가 활성화되기 때문이다. 세포내 SAM의 감소와 S-adenosyl-homocysteine에 대한 S-adenosyl-methionine의 비율(SAM/SAH)의 감소에 의해서 5,10-methylene tetrahydrofolate(THF) reductase가 자극되고 5,10-methyl THF가 5-methyl THF로 전환된다. 이 때 5-methyl THF의 메틸기가 methyl-B12를 거쳐 monocysteine으로 옮겨짐으로써 methionine의 재합성이 일어나고 결국 SAM이 생성된다.<sup>35)</sup> 이렇듯 식이의 methionine이 결핍되며 methionine의 재생산을 위해 세포내 엽산 요구량이 증가함으로써 thymidylate 합성을 위해 사용되어야 할 메틸기가 부족되는 것이다.

이와 같은 연구들에 비하여, 면역기관에서 엽산 결핍에 의한 유전자적 수준의 연구는 활발하게 이루어지지 않았다. 세포매개성 면역을 담당하는 T cell의 경우 흉선에서 분화되고, 비장은 노화된 적혈구와 granulocytes, 그리고 혈소판을 제거함과 동시에 이들의 응급 급원이 되며, T 세포와 B 세포를 생성해내는 장기이기도 하다.<sup>39)</sup> 따라서 이들 장기의 세포에서 DNA 온전성이 깨짐으로써 면역세포들의 생성이 저하된다면, 여러 가지 면역질환을 일으키는 환경인자와 독성물질에 대한 인간의 방어능력이 저하될 것이다.

본 연구의 결과로써 식이엽산함량에 의해서 혈장과 비장, 흉선, 백혈구의 엽산수준이 영향을 받음을 알 수 있었다. 이러한 영향이 유전자 수준에서 DNA 잔존율에 영향을 주었는지 알기 위해서 비장과 백혈구의 DNA 이중 나사선 절단 정도를 알아보았을 때, 엽산결핍시 DNA의 온전성이 유지되지 않았다. 따라서 엽산이 결핍되면 유전자적 수준에서 손상이 일어남을 알 수 있다.

또한 본 연구에서는 식이엽산 첨가의 적정 수준을 동물실험을 통해서 알아보았다. 엽산을 2배 수준인 4mg folate/kg diet로 제공하였을 때는 적정식이군과 유의적인 차이가 나

타나지 않으나 4배 수준인 8mg folate/kg diet로 제공해 주었을 때는 적정식이군보다 DNA의 손상이 유의적으로 적게 일어났다. 따라서 권장량의 2배 제공 시보다는 4배로 제공하였을 때 실제적으로 면역세포의 유전자 손상이 감소하였다고 할 수 있다. 그러나 이번 연구는 동물을 대상으로 한 것이었기 때문에 사람에게서도 동일한 결과가 나타나리라고 확신할 수는 없으며 실험에서 사용된 8mg보다 더 높은 수준의 엽산 보충이 면역세포의 DNA 안전성을 더욱 증가시킬지도 모른다.

식이에 함유되어야 하는 적절한 엽산 수준에 대한 연구들이 아직 수행되지 못해서 사람의 DNA 손상을 최소화하기 위해 제공되어야 하는 엽산 수준은 아직 규명되지 않았다. 과거 10여년 동안의 연구결과를 보면, 엽산을 RDI 이상으로 섭취했을 때 neural tube defects가 최소화되었다고 하며,<sup>40)</sup> 최근의 연구에서도 엽산 보충에 의해서 돌연변이 발생비율이 감소했다고 한다.<sup>41)</sup> 따라서 사람의 식이엽산의 적절한 수준을 결정하기 위해서는 사람을 대상으로 한 연구가 필요하다고 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 엽산섭취량이 증가함에 따라 면역기관의 엽산함량이 증가하며 DNA의 온전성이 증가하는 일관성있는 결과가 나타났다. 또한 권장량 이상으로 엽산을 섭취했을 때에는 권장량의 2배(4mg folate/kg diet)를 섭취했을 때보다 4배(8mg folate/kg diet)를 섭취했을 때 면역 조직과 세포의 엽산함량을 증가시키고 DNA 온전성을 향상시키는데 효과적이었다.

### 요약 및 결론

식이 엽산 함량이 혈장과 면역 조직의 엽산 농도에 미치는 영향과, 비장과 백혈구 DNA를 알칼리로 처리했을 때 이중 나사선 절단 정도에 차이가 있는지 알아보기 위하여 실험식이 1kg당 0mg, 2mg, 4mg, 8mg으로 엽산수준을 달리한 식이를 Sprague-Dawley 종 수컷 흰쥐에게 6주간 공급하여 실험한 결과는 다음과 같다.

엽산 결핍 식이군(0mg folate/kg diet)의 혈장, 비장, 흉선, 백혈구의 엽산 수준이 적정 식이군(2mg folate/kg diet)보다 유의적으로 낮았고, 4mg folate/kg diet를 제공한 군과 8mg folate/kg diet를 제공한 군의 혈장, 비장, 흉선, 백혈구의 엽산 수준은 적정 식이군보다 유의적으로 높았다 ( $p < 0.05$ ).

식이 엽산 함량이 면역 조직 내의 엽산 수준을 저하시킴으로써 면역 세포의 DNA 이중 나사선 잔존율에 어떠한 영향을 주는지 알기 위해서 세포내에 남아 있는 이중 나사선

DNA의 잔존율을 각 군별로 살펴보았을 때, 비장 세포에 남아있는 이중 나사선 DNA의 잔존율은 식이엽산 함량이 증가할수록 11.65%<sup>a</sup>, 30.30%<sup>b</sup>, 33.01%<sup>b</sup>, 63.2%<sup>c</sup>로 유의적으로 증가하였다. 백혈구의 DNA 이중결합 잔존율도 식이 엽산 수준에 따라 유의적으로 영향을 받아서 식이내 엽산 수준이 높을수록 세포의 DNA 이중 나사선 잔존율이 10.52%<sup>a</sup>, 31.97%<sup>b</sup>, 37.51%<sup>b</sup>, 46.53%<sup>c</sup>로 높게 나타났다. 따라서 식이엽산수준을 8mg까지 증가시켰을 때 식이엽산 수준이 증가할수록 DNA 이중 나사선 절단이 적게 일어남을 알 수 있다.

이상의 결과로 보아, 식이 엽산 함량이 결핍되었을 때, 면역기관과 혈장의 엽산 함량이 저하되며 면역기관인 비장과 백혈구의 DNA 이중 나사선 절단정도가 증가하고, 식이 엽산 수준이 증가함에 따라 결핍에 따른 증상들이 유의적으로 호전되며 특히 엽산이 적정수준의 2배를 제공했을 때보다 4배를 제공했을 때 DNA 이중나사선 잔존율이 크다는 것을 알 수 있었다. 식이엽산 수준을 증가시키는 것이 면역기관의 유전자적 수준에서 DNA 안전성을 증가시키는 효과를 나타냄으로써 실제적인 면역기능의 향상을 가져올 수 있을 것이라고 예상되며, 앞으로 사람을 대상으로 연구가 더 행해져야 할 것으로 생각된다.

### Literature cited

- 1) Kim YI, Pogribny IP, Basnakian AG, Miller JW, Selhub J, James SJ, Mason JB. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. *Am J Clin Nutr* 65: 46-52, 1997
- 2) Taheri MR, Wickremasinghe RG, Jackson BFA, Hoffbrand AV. The effect of folate analogues and vitamin B12 on provision of thymine nucleotides for DNA synthesis in megaloblastic anemia. *Blood* 59(3): 634-640, 1982
- 3) Pietrzik K, Průz R, Reusch K, Bung P, Mallmann P, Chronides A. Folate status and pregnancy outcome. *Ann NY Acad Sci* 669: 371-373, 1992
- 4) Brattstrom L, Israelsson B, Norving B, Bergqvist D, Thorne J, Hurtberg B, Hamfelt A. Impaired homocysteine metabolism in early-onset cerebral and peripheral occlusive arterial disease: effects of pyridoxine and folic acid treatment. *Atherosclerosis* 81: 51-60, 1990
- 5) Swine RA, Clair LS. The role of folic acid in deficiency states and prevention of disease. *J Fam Pract* 44(2): 138-144, 1997
- 6) McBurney MW, Whitmore GF. Isolation and biochemical characterization of folate deficient mutants of Chinese hamster cells. *Cell* 2: 173-182, 1974.
- 7) Fenech MF, Dreosti IE, Rinaldi JR. Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis* 18(7): 1329-36, 1997
- 8) O'Neill C. Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos. *Human Reproduction* 13(5): 1312-1316, 1998
- 9) Tamanoi F, Okazaki T. Uracil incorporation into nascent DNA of thymine requiring mutant *Bacillus subtilis* 168. *Proc Natl Acad Sci USA*. 75: 233-237, 1978

- 10) Sedwick WD, Kulter M, Brown OE. Antifolate-induced misincorporation of deoxyuridine monophosphate into DNA: inhibition of high molecular weight DNA synthesis in human lymphoblastinoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 917-921, 1981
- 11) Yunis JJ, Sorene AL. Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 226: 1199-1204, 1980
- 12) Asusuwa D, Shimizu K, Koyama H, Takeishi K, Seno T. Accumulation of DNA strand breaks during thymideless death in thymidylate synthase-negative of mouse FM3A cells. *J Biol Chem* 258: 2448-2454, 1983
- 13) Mcfarlane H. Malnutrition and impaired immune response to infection. *Proc Nutr S-oc* 35: 263-272, 1976
- 14) Sadasivan E, Costa MD, Rothenberg SP, Brink L. Purification, Properties, and immunological characterization of folate-binding proteins from human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 925: 36-47, 1987
- 15) Sadasivan E, Costa MD, Rothenberg SP, Brink L. Characterization of multiple forms of folate-binding protein from human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 882: 311-321, 1986
- 16) Costa MD, Fisher C. Immunological heterogeneity of the folate-binding proteins from chronic myelogenous leukemia cells and myelofibrosis spleen. *J Lab Clin Med* 98: 956-964, 1981
- 17) Kim YS. Effects of dietary folate intake on plasma folate and homocysteine status in rats. *Ewha womans university*, 1997
- 18) Report of the American institute of Nutrition. Ad Hoc committee on standard for nutritional studies. *J Nutr* 107: 1340-1348, 1977
- 19) Chang NS, Kim YS. Effects of dietary folate intake on plasma and tissue folate concentration in rats. *Korean J Nutr* 31(3): 271-278, 1998
- 20) Birnboim HC, Jevcak JJ. Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation. *Cancer Res* 41: 1889-1892, 1981
- 21) Zeisel SH, Zola T, DaCosta KA, Pomfret EA. Effect of choline deficiency on S-adenosylmethionine and methionine concentration in rat liver. *Biochem J* 259: 725-729, 1989
- 22) Kim YI, Miller JW, Costa K, Madeau M, Smith D, Selhub J, Swisel SH, Mason JB. Severe folate deficiency causes secondary depletion of choline and phosphocholine in rat liver. *J Nutr* 124: 2197-2203, 1994
- 23) Dhur A, Galan P, Christides JP, Courcy GPD, Preziosi P, Herberg S. Effect of folic acid deficiency upon lymphocyte subsets from lymphoid organs in mice. *Comp Biochem Physiol* 98A(2): 235-240, 1991
- 24) Clifford AJ, Heid MK, Muller HG, Bills ND. Tissue distribution and prediction of total body folate of rats. *J Nutr* 120: 1633-1639, 1990
- 25) James SJ, Yin L. Diet-induced DNA damage and altered nucleotide metabolism in lymphocytes from methyl-donor-deficient rats. *Carcinogenesis* 10: 1209-1214, 1989
- 26) Hoffbrand AV, Ganeshaguru K, Hooton JWL. Megaloblastic anaemia: Inhibition of DNA synthesis in excess of DNA chain elongation as the underlying mechanism. *Clinic-s in Haematol* 5(3): 727-745, 1976
- 27) van der Weyden MB, Hayman RJ, Rose IS, Brumley J. Folate-deficient human lymphoblasts: Changes in deoxynucleotide metabolism and thymidylate cycle activities. *Eur J Haematol* 41: 109-114, 1991
- 28) van der Weyden MB, Rose IS, Newitt P. Folate-deficient human lymphocytes: Changes in de novo purine and pyrimidine synthesis and phosphoribosylpyrophosphate. *Eur J Haematol* 47: 213-218, 1991
- 29) Kim YI, Giuliano A, Hatch KD. Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 74: 893-899, 1994
- 30) Zapiesek WF, Cronin GM, Lyn-Cook BD, Poirier LA. The onset of oncogene hypo-methylation in the livers of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcino-genesis* 13: 1869-1872, 1992
- 31) Das KC, Herbert V. In vitro DNA synthesis by megaloblastic bone marrow: Effect of folates and cobalamins on thymidine incorporation and de novo thymidylate synthesis. *Am J Haematol* 31: 11-20, 1989
- 32) James SJ, Miller BJ, Cross DR, McGarrity LJ, Morris SM. The essentiality of folate for the maintenance of deoxynucleotide precursor pools, DNA synthesis, and cell cycle progression in PHA-stimulated lymphocytes. *Environmental Health Perspectives* 101(Suppl 5): 173-178, 1994
- 33) Bhawe MR, Wilson MJ, Poirier LA. c-H-ras and c-K-ras gene hypomethylation in the livers and hepatomas of rats fed methyl-deficient, amino-acid defined diets. *Carcino-genesis* 9: 343-348, 1988
- 34) Wilson MJ, Shivapurkar N, Poirier LA. Hypomethylation of hepatic nuclear DNA in r-ats fed a carcinogenic methyl-deficient diet. *Biochem J* 218: 987-990, 1984
- 35) Chander N, Aminta J, Kandela JC, Lomnardi B. Liver cell turnover in rats fed a choline-devoid diet. *Carcinogenesis* 9: 669-673, 1987
- 36) Perera MI, Demitris AJ, Katyal JC, Shinozuka H. Lipid peroxidation of liver micros-ome membranes induced by choline deficient diet and its relationship to  $\gamma$ -glutamyl transpepsidase-positive foci. *Cancer Res* 45: 2522-2538, 1985
- 37) Rushmore TH, Lim YP, Farber E, Ghoshal AK. Rapid lipid peroxidation in the membrane fraction of rat liver induced by a diet deficiency in choline and methionine. *Can-cer Lett* 24: 251-255, 1984
- 38) Newberne PM, Naus KM, deCamargo JLV. Lipotropes:immune function and cancer. *Cancer Res* 43 :2426s-2434s, 1983
- 39) Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. third edition. Mosby, 1993
- 40) Wald N. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin study. *Lancet* 338: 131-137, 1991
- 41) Fenech MF, Dreosti IE, Rinaldi JR. Folate, vitamin B<sub>12</sub>, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis* 18(7): 1329-36, 1997