

# 식이지방산 조성 및 비타민 E의 보충이 제 2세대 흰 쥐 뇌조직의 항산화 체계에 미치는 영향

황혜진<sup>§</sup> · 엄영숙 · 정은정\* · 김수연 · 이양자

연세대학교 생활과학대학 식품영양학과, 강남대학교 교양학부\*

## Effect of Dietary Fatty Acid and Vitamin E Supplementation on Antioxidant Systems of the Second Generation Rat Brain Sections

Hwang, Hye Jin<sup>§</sup> · Um, Young Sook · Chung, Eun Jung\*  
Kim, Soo Yeon · Lee-Kim, Yang Cha

Department of Food & Nutrition, College of Human Ecology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea  
General Education Kangnam University, \* Kyunggido 449-702, Korea

### ABSTRACT

In this study, we examined the effects of dietary fatty acids and vitamin E supplementation on antioxidant systems in the rat brain regions. The Sprague Dawley rats were fed the experimental diets 3-4 wks prior to the conception. Experimental diet consisted of 10% fat(wt/wt) which were safflower oil(SO, poor in ω3 fatty acids), mixed oil(MO, P/M/S ratio = 1.03 : 1.45 : 1, ω6/ω3 ratio = 6.3), and mixed oil supplemented with vitamin E(ME : MO + 500mg vitamin E/kg diet). At 3 and 9 weeks of age of the newborn rats, frontal cortex(FC), corpus striatum(CS), hippocampus(H), cerebellum(CB) were dissected out from the whole brain. Activities of glutathione peroxidase(GSH-Px), superoxide dismutase(SOD) and concentrations of malondialdehyde(MDA) were measured. Dietary fatty acids were not effective in antioxidative system for rat brain. However, when vitamin E was supplemented to the diet(ME), the activities of GSH-Px tended to increase in comparison to MO group. Therefore, the activities of GSH-Px of FC and H at the age of 3 weeks showed significant differences(p < 0.05). The activities of Total-SOD tended to decrease in ME group compared to MO group. There were significant differences(p < 0.05) in FC and CS at the age of 3 weeks. The activities of Mn-SOD tended to increase and Cu, Zn-SOD tended to decrease when vitamin E was supplemented. The activity levels of antioxidative enzymes at the age of 3 weeks and 9 weeks were similar. This suggested that the activity level of antioxidative enzymes reached to the adult level at the age of 3 weeks which is the end point of lactation period. The concentrations of MDA were not altered by experimental diets. When the activities of antioxidant enzymes were compared, the activity of antioxidant enzymes were the lowest in H and highest in FC. In conclusion, the antioxidative system were not altered by dietary fatty acid at the age of 3 weeks and 9 weeks, but the supplementation of vitamin E altered the antioxidative systems. Therefore, these findings should be considered comprehensively in scope of the balance of various antioxidative systems and their interactions. (*Korean J Nutrition* 34(1) : 14~22, 2001)

KEY WORDS: frontal cortex, corpus striatum, hippocampus, cerebellum, glutathione peroxidase(GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde(MDA).

### 서 론

Long chain polyunsaturated fatty acids(LCPUFAs)를 장기간 섭취할 경우 높은 불포화도로 인하여 세포에 손상과 세포 기능의 장애 및 노화가 촉진되는 것으로 알려져 있는데,<sup>1)</sup> 이는 hydrogen peroxide, lipid peroxide, free rad-

ical등의 reactive oxygen species(ROS)에 의한<sup>2)</sup> 정상적인 두뇌는 노화가 진행되면서 ROS와 항산화 작용의 불균형으로 산화적 스트레스가 증가되고, 이는 Alzheimer's disease나 Parkinson's disease<sup>3)</sup>와 연관이 된다. 이러한 산화적 스트레스와 관련된 생체의 주요 항산화 기전으로는 i) 산화제와 vitamin C나 glutathione(GSH)같은 항산화물질의 반응, ii) 비타민 E, ascorbic acid, β-carotene, superoxide dismutase(SOD)에 의한 free radical과 singlet oxygen의 제거 기능, iii) glutathione peroxides

채택일 : 2001년 1월 8일

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

(GSH-Px)와 catalase에 의한 hydroperoxides의 제거, iv) 금속과 결합하여 여러 가지 chelate를 형성하는 반응, v) 대사적인 활성을 통하여 산화로 인한 손상을 복구하는 기전으로 나눌 수 있다.<sup>45)</sup>

특히 불포화도가 높은 생선 기름은 세포막의 유동성을 변화시키며 지질의 과산화 반응을 용이하게 해 주는데, 신생 쥐의 발달에 있어서 비타민 E는 지질 과산화로부터 보호할 수 있다고 한다.<sup>6)</sup> 비타민 E의 필요량은 총 PUFA함량과 불포화도에 따라 결정되는데, 조직 내에서 비타민 E의 turnover가 PUFA보다 짧아 섭취된 비타민 E는 계속적으로 조직을 보호할 수가 없다고 보고<sup>7)</sup>되는 반면, 생체막 조직에서 비타민 E가 소량이지만 재이용됨을 강조한 논문도 발표되었다.<sup>8)</sup>

호기성 세포, 고등 동 식물 및 인간에게는 항산화 방어 기전이 개발되어 있는 바, 내인성 항산화제인 metalloenzyme 이 그 좋은 예이다. 미토콘드리아와 세포질에는 Se을 함유한 GSH-Px가 존재하고, 미토콘드리아에는 Mn-superoxide dismutase(Mn-SOD), 그리고 세포질과 nucleoplasm에는 Cu,Zn-SOD가 존재한다.<sup>9)</sup> Central nervous system(CNS)에서 Cu,Zn-SOD는 두뇌의 손상과 신경의 괴사에 대하여 보호작용을 함이 알려졌다,<sup>10)</sup> Mn-SOD는 superoxide radical 이 미토콘드리아 내막에 발생되기 때문에 호기성 개체에서의 항산화 효소로서 산화적 스트레스에 대한 방어적인 작용을 하는 것으로 알려졌다.<sup>11)</sup> Malondialdehyde(MDA)는 지질 과산화의 최종 생성물로서, 생물학적인 조직에서 지질과산화의 지표로 이의 농도를 측정하기도 한다.<sup>12)</sup>

뇌조직이 다른 조직에 비해 산화적 손상이 큰 이유는 PUFA 함량이 높고 catalase 활성이 낮고, SOD와 GSH-Px만이 moderate하게 존재하기 때문으로 여겨지나<sup>13)</sup> 부위별 농도의 차이에 대해서는 더 연구되어야 한다. Brain slice가 oxygen free radical-generating system에 노출되었을 때 신경전달물질의 uptake가 감소, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-AT-Pase 활성의 저하, Ca<sup>++</sup>의 유입이 증가하며, 이로 인하여 지질 산화에 의한 막의 유동성과 지질 구성의 변화가 초래된다.<sup>14)</sup> 특히 lipid peroxide는 신경세포막에서의 인지질의 reacylation을 저해하여 유리된 지방산을 축적시켜 영구적인 두뇌손상을 초래할 수 있다.

두뇌의 성장 발달은 동물에 따라 차이가 있으며 쥐의 경우 사람과는 달리 수유기에 가장 활발하여 출생 후 10일경에 최대에 이르게 되며, 쥐의 수유기는 사람의 pre-term과 유사하므로, 쥐의 수유기에 대한 연구는 infant 특히 미숙아에게 적용시킬 수 있을 것으로 보인다. 따라서 본 연구에서는 어미 식이의 조성을 달리하여 임신되기 3~4주 전부

터 섭취시키고, 이로부터 출생한 새끼 쥐도 어미와 같은 실험 식이를 공급하여, 서로 다른 지방산 조성과 비타민 E의 첨가 식이가 제2세대 쥐 뇌조직의 항산화 체계에 미치는 영향에 대하여 알아보려고 하였다.

## 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 어미로부터 출생한 새끼 쥐는 출생 3일 후 8~10마리로 수를 조절하였다. 출생 후 어미와 같은 실험 식이를 공급하여 생후 3주와 9주에 각각 희생시킨 뒤 두뇌를 적출하여 부위별로 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 할 때, 62 : 17 : 21로 구성되어 있다).

식이 지방 수준은 전체 무게의 10%로서, ω3계 지방산을 결핍시킨 군(safflower Oil: SO)과 ω3 및 ω6계 지방산을 적절한 비율로 공급한 군(mixed Oil: MO), 비타민 E를 보충한 군(MO + 비타민 E: ME)으로 분류하였다. 여러 종류의 기름의 지방산 조성을 computer에 입력하여 바람직한 P/M/S 및 ω6/ω3 지방산의 비율을 갖춘 혼합 기름 중 배합되는 기름의 종류 수가 비교적 적은 것을 선택하였다. 본 연구에 사용한 MO군의 지방산 조성은 P/M/S 비율이 1.03 : 1.45 : 1, ω6/ω3 비율은 6.28이며, Arachidonic acid(20 : 4, ω6, AA)를 총지방산의 0.6%, AA/DHA 비율은 1.37이었다. 따라서 ω6 및 ω3계 지방산의 비율을 조절한 MO군의 혼합유는 corn oil(삼양사) : soy oil : palm oil : canola oil(주식회사 농심) : menhaden oil(Zaphata, USA) : arachidonic acid의 비율을 18 : 5 : 45 : 25 : 5 : 2로 혼합한 것이다. Table 2에는 실험식이의 지방산 조성을 나타내었다. 비타민 E의 수준은 모든 군에 50mg α-tocopherol acetate/kg diet을 기본적으로 첨가하였고, 비타민 E를 보충한 군(ME)에서는 500mg의 α-tocopherol acetate/kg diet을 더 보충하였다. 비타민 mixture와 무기질 mixture는 AIN-76을 사용하였다.

### 3. 두뇌의 부위별 분획

뇌조직은 마취없이 단두하여 두뇌를 적출한 다음, 얼음 위에서 부위별로 해부하여 전두피질(FC), 해마(H), 선조

**Table 1.** Composition of experimental diets(%)

Ingredient	Experimental groups		
	Safflower oil(SO)	Mixed oil(MO)	MO + Vit E
Carbohydrate <sup>1)</sup>	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 <sup>2)</sup>	4	4	4
Vitamin mixture <sup>3)</sup>	1	1	1
CMC <sup>4)</sup>	2	2	2
$\alpha$ -tocopherol acetate supplementation (mg/Kg diet)	-	-	500

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(250,000IU/gm) 1, cholecalciferol (400,000IU/g) 0.25, menaquinone 0.05, sucrose 990,  $\alpha$ -tocopherol 53) AIN-76 mineral mix: g/kg of mix: CaHPO<sub>4</sub>, 500; NaCl, 74; K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O, 220; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 52; MgO, 24; MnCO<sub>3</sub>, 3.5; FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, 6; CuCO<sub>3</sub>, 0.3; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.01; KIO<sub>3</sub>, 0.01; CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0.55; sucrose, finely powdered, 118.03

4) Carboxymethyl cellulose sodium salt

체(CS), 소뇌(CB)의 4부위를 구하였다.

#### 4. 항산화 체계 측정

##### 1) Malondialdehyde(MDA) 농도 측정

Buckingham<sup>15)</sup>의 방법을 이용하여 뇌조직 0.1g에 4배의 0.1M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer(pH 7.4)를 가하여 3분간 균질화시킨 후, 이 균질액(20% homogenate) 50 $\mu$ l에 1/12N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4ml과 10% phosphotungstic acid 0.5ml을 가하여 혼합한 후 실온에서 5분간 방치하였다. 이 혼합액을 원심분리(4000rpm, 10분간)한 후 침전물에 1/12N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2ml과 10% phosphotungstic acid 0.3ml을 가한 후 강하게 섞어 주었다. 이 혼합액을 원심분리(4000rpm, 10분간)하고, 침전물에 증류수 5ml과 1% thiobarbituric acid 2ml을 가한 후 90~95 $^{\circ}$ C에서 20분간 incubation시켰다. 이를 냉각시킨 후 n-butanol 5ml을 가하여 vortex한 후 원심분리(4000rpm, 10분간)하여 상층의 butanol층을 luminescence spectrophotometer(Amico Bowman series)을 이용하여 excitation 500nm, emission 553nm에

**Table 2.** Fatty acid composition of dietary oils<sup>1)</sup>

Fatty acid	Safflower oil(SO)	Mixed oil(MO)
14 : 0	0.08	0.83
16 : 0	5.45	23.83
18 : 0	5.84	3.16
18 : 1	8.60	39.33
18 : 2 $\omega$ 6	77.65	24.06
18 : 3 $\omega$ 3	ND <sup>2)</sup>	2.58
20 : 0	ND	Tr <sup>3)</sup>
20 : 3	ND	ND
20 : 4 $\omega$ 6	0.18	0.6
20 : 5	ND	0.7
22 : 1	ND	Tr
22 : 5 $\omega$ 6	ND	0.1
22 : 6 $\omega$ 3	ND	0.5
Total $\omega$ 6 <sup>4)</sup>	78.0	24.66
Total $\omega$ 3 <sup>5)</sup>	-	3.9
Total $\omega$ 6/ $\omega$ 3		6.3
P <sup>6)</sup>	78.0	28.1
M	9.1	40.0
S	11.4	28.0
P/M/S	6.9/0.8/1	1.1/1.4/1

1) Values are expressed as relative % of total fatty acids

2) ND: Not detected

3) Tr: Trace amount

4) Total  $\omega$ 6 = 18 : 2 + 20 : 3 + 20 : 45) Total  $\omega$ 3 = 18 : 3 + 20 : 5 + 22 : 5 + 22 : 6

6) P: Polyunsaturated fatty acids

M: Monounsaturated fatty acids

S: Saturated fatty acids

서 fluorescence intensity를 측정된 후 표준용액과 비교하여 비색 정량하였다.

##### 2) Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

SOD활성은 Marklund<sup>16)</sup>와 Sheri<sup>17)</sup>의 방법을 수정하여 pyrogallol의 autooxidation을 SOD가 억제하는 정도를 통하여 측정하였다. Total SOD 활성을 측정하기 위해 뇌조직 0.1g에 4배의 0.25M sucrose를 가하여 균질화하고 1,000rpm에서 30분간 원심분리하였다(20% homogenate). 상층액 20 $\mu$ l에 Tris buffer 3ml과 pyrogallol 20 $\mu$ l를 순서대로 가한 후 거꾸로 세워 혼합하였다. 이 혼합액을 Gilford Spectrophotometer(Stasar III, 1220)를 이용하여 파장 420nm에서 5분동안 흡광도가 증가되는 정도를 측정하였다. Enzyme 1 unit는 pyrogallol의 auto oxidation을 50% 방해하는데 필요한 효소의 양으로서 산출하고 specific activity는 cytosol의 1mg protein에 해당하는 enzyme unit로 환산한다. 위의 assay buffer에 1mM KCN을 1 : 1비율로 첨가하여 위와 같은 방법으로 Mn-SOD 활

**Table 3.** Superoxide dismutase activities in rat brain regions at the age of 3 & 9 weeks (U/mg protein)

Brain regions	Groups	Mn-SOD		Cu, Zn-SOD		Total-SOD	
		3rd week	9th week	3rd week	9th week	3rd week	9th week
FC	SO	3.50 ± 1.16	3.53 ± 0.15 <sup>b</sup>	4.44 ± 0.32 <sup>a</sup>	4.95 ± 1.57	7.08 ± 0.14 <sup>a</sup>	8.24 ± 0.67
	MO	3.61 ± 0.90	3.72 ± 0.17 <sup>b</sup>	3.97 ± 0.16 <sup>a</sup>	4.81 ± 1.56	7.54 ± 0.15 <sup>a</sup>	8.45 ± 0.93
	ME	3.07 ± 0.55	4.89 ± 1.58 <sup>a</sup>	2.44 ± 0.15 <sup>b</sup>	3.52 ± 1.64	5.52 ± 0.17 <sup>b</sup>	7.53 ± 1.15
CS	SO	3.89 ± 1.10	3.30 ± 0.71	4.06 ± 0.12 <sup>a</sup>	4.51 ± 1.63	7.53 ± 0.44 <sup>a</sup>	7.84 ± 2.03
	MO	3.0 ± 0.43	2.73 ± 0.71	4.47 ± 0.14 <sup>a</sup>	4.12 ± 0.89	7.43 ± 0.33 <sup>a</sup>	6.82 ± 2.03
	ME	3.34 ± 0.94	3.23 ± 0.33	3.21 ± 0.49 <sup>b</sup>	3.33 ± 0.92	6.0 ± 0.32 <sup>b</sup>	6.15 ± 0.77
CB	SO	2.39 ± 0.42	2.52 ± 0.37	3.05 ± 1.40	3.21 ± 1.23	5.46 ± 1.18	5.74 ± 1.21
	MO	2.61 ± 0.39	2.63 ± 0.45	3.84 ± 0.77	3.52 ± 0.73	5.47 ± 0.66	6.12 ± 0.65
	ME	3.03 ± 0.46	2.95 ± 0.93	2.67 ± 0.93	2.54 ± 0.92	4.54 ± 1.23	5.44 ± 1.41
H	SO	2.17 ± 0.15 <sup>b</sup>	2.58 ± 0.29	1.36 ± 0.48	1.21 ± 0.55	3.54 ± 0.52	3.83 ± 0.66
	MO	2.01 ± 0.18 <sup>b</sup>	2.35 ± 0.34	1.36 ± 0.32	1.72 ± 0.24	3.77 ± 0.38	4.10 ± 0.43
	ME	2.53 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.14 ± 0.35	0.86 ± 0.25	1.05 ± 0.41	3.12 ± 0.37	3.18 ± 0.47

Values are mean ± S.E.M of 6 rats

Values with the same letters are not significantly different from the others within the same brain region(p < 0.05)

FC: Frontal cortex, CS: Corpus striatum, CB: Cerebellum, H: Hippocampus, SO: Safflower oil, MO: Mixed oil, ME: MO + vitamin E

성을 측정하며, Cu, Zn-SOD 활성은 total-SOD 활성에서 Mn-SOD 활성을 감하여 산출하였다.

### 3) Glutathione Peroxidase(GSH-Px) 활성 측정

GSH-Px 활성은 Paglia<sup>18)</sup>와 Deagen<sup>19)</sup>의 방법을 수정하여 과산화수소를 기질로 이용한 coupled enzyme procedure로 측정하였다. 뇌조직 0.1g에 0.1M ice-cold phosphate buffer(0.25M sucrose 함유한 pH 7.0인 buffer)을 가하여 glass teflon homogenizer를 이용하여 균질화시켰다. 이 균질액(20%)을 14,000rpm에서 1시간 동안 원심분리한 후, 얻은 상층액을 0.1ml 취하였다. 0.8ml 반응 혼합물(4.5mM EDTA, 4.7mM sodium azide를 포함한 0.125M phosphate buffer, pH 7.0과 2.8nM NADPH, 49.9nM reduced glutathione, 0.67 units glutathione reductase를 함유)을 가한 후, 0.25mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1ml을 가하여 반응을 일으킨 즉시 spectrophotometer를 이용하여 파장 340nm에서 산화형 glutathione(GSSG)의 형성에 따른 NADPH의 흡광도가 감소되는 속도를 3분동안 측정하였다. GSH-Px의 존재 하에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 첨가에 의하여 환원형 glutathione(GSH)이 생성되고, reaction mixture 내 glutathione reductase와 NADPH가 개입되어 GSSG가 다시 GSH로 환원되는 속도를 흡광도의 변화를 통해서 관찰함으로써 GSH-Px의 활성을 산출하였다. 효소 1 unit은 혈청 1ml당 1분동안 산화된 NADPH의 nM로 나타내었고, specific activity는 1mg 단백질에 해당하는 효소 unit으로 환산하였다.

### 5. 통계처리

모든 자료는 Statistical Analysis System(SAS)을 이용하였고, 측정치는 Mean ± S.E.M.으로 표시하였다. 뇌 조직 부위별 항산화 효소의 활성 및 MDA 농도는 one-way analysis of variance(ANOVA) 및 Duncan's Multiple Test를 실시하여 실험 군간의 비교와 함께 두뇌 부위 별로 비교하였다.

## 실험 결과 및 고찰

### 1. 실험식에 따른 뇌조직 부위의 항산화체계의 변화

지방산 종류가 다른 식이 섭취와 비타민 E의 첨가에 따라 제 2세대 뇌의 부위별 항산화 효소와 MDA의 수준을 Table 3, 4에 나타내었다.

ω3계 지방산은 다른 지방산에 비해 지방산 자체의 불포화도가 높고 cis형의 불안정한 이중결합을 지니고 있으므로, 체내에서 산화되어 free radical과 peroxide를 생성할 가능성이 높으며, 생성된 과산화물은 세포막 파괴, lipoprotein의 산화, 체조직의 노화 등 생체에 치명적인 영향을 줄 수 있는 것으로알려져 왔으나,<sup>20)</sup> 전체적으로 볼 때 본 연구에서는 SO군과 MO군간의 항산화 효소의 활성은 유의한 차이를 나타내지 않아 식이 지방산이 뇌조직의 항산화 체계에는 별 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

다른 연구에서도 식이지방산과 항산화효소와의 연관성에 대해서는 상반된 결과가 보고되고 있는데, 흰쥐에 Docosa-hexaenoic acid(DHA) 함량이 높은 생선기름을 생체의

**Table 4.** Glutathione peroxidase(GSH-Px) activities and malondialdehyde(MDA) concentrations in rat brain regions at the age of 3 & 9 weeks

Brain regions	Groups	GSH-Px(U/mg protein)		MDA(nmole/mg protein)	
		3rd week	9th week	3rd week	9th week
FC	SO	26.50 ± 1.84 <sup>b</sup>	27.23 ± 4.01	3.48 ± 0.43	3.17 ± 0.41
	MO	26.31 ± 0.44 <sup>b</sup>	27.13 ± 3.95	3.31 ± 0.47	3.13 ± 0.30
	ME	29.16 ± 0.54 <sup>a</sup>	30.23 ± 2.02	3.24 ± 0.57	2.32 ± 0.42
CS	SO	20.49 ± 5.63	21.87 ± 2.51	3.18 ± 0.51	4.11 ± 0.59
	MO	22.26 ± 2.82	23.35 ± 1.86	3.65 ± 0.51	3.62 ± 0.64
	ME	23.10 ± 3.74	24.23 ± 3.11	3.70 ± 0.92	3.82 ± 0.46
CB	SO	20.77 ± 1.35	21.13 ± 3.24	3.59 ± 0.21	4.04 ± 0.26
	MO	23.85 ± 3.35	22.56 ± 3.65	3.32 ± 0.47	4.48 ± 0.78
	ME	20.44 ± 3.32	24.95 ± 3.40	3.70 ± 0.69	3.73 ± 0.87
H	SO	14.60 ± 1.96 <sup>b</sup>	16.89 ± 3.34	4.22 ± 0.51	3.85 ± 0.69
	MO	17.01 ± 0.68 <sup>b</sup>	17.46 ± 2.89	3.35 ± 0.52	3.55 ± 0.36
	ME	20.03 ± 1.64 <sup>a</sup>	18.65 ± 2.58	3.66 ± 0.45	3.97 ± 0.49

Values are mean ± S.E.M of 6 rats

Values with the same letters are not significantly different from the others within the same brain region( $p < 0.05$ )

FC: Frontal cortex, CS: Corpus striatum, CB: Cerebellum, H: Hippocampus, SO: Safflower oil, MO: Mixed oil, ME: MO + vitamin E

CaCo-2 세포<sup>21)</sup>와 흰쥐<sup>22)</sup>에 투여한 경우 세포 및 간조직내 GSH 함량의 감소와 GSH-Px 활성감소가 보고되었고 간 조직내  $\alpha$ -tocopherol 및 ascorbic acid 등 항산화 vitamin 감소가 관찰되었고, 이는 생선기름의 산패 및 고농도의 DHA 함량에 기인하리라 추정된다고 보고하였다. 이에 반해 다량의 PUFA의 섭취에 따라서 생체막에서 PUFA의 비율이 높아지고, 이에 따라 과산화 반응이 활발히 진행되어 그 방어기전으로 GSH-Px 활성이 증가된다고 보고되었고,<sup>23)</sup> Bolanos 등<sup>24)</sup>은 세포내에 glutathione이 부족하면 neuron의 peroxynitrite에의 susceptibility가 높아짐을 보고하였는데, peroxynitrite는 superoxide와 nitrite oxide (NO)의 반응으로 생기며, NO의 neurotoxic effect와 연관이 되어 있다<sup>25)</sup>고 한다.

최근의 연구<sup>26)</sup>에서 보면 쥐를 대상으로 고콜레스테롤 식이에 DHA를 첨가한 군에서 고콜레스테롤 식이군 보다 뇌 조직의 catalase, GSH-Px의 증가된 결과를 보고하면서, 식이의 DHA가 이들 효소의 활성을 높임으로써 활성 산소에 대한 간접적인 항산화적인 역할을 하는 것으로 제안하였다. AA는 auto-peroxidation에 의해 과산화물을 증가시키는데, 식이 DHA가 두뇌의 AA의 수준을 감소시키고 세포막에서 구조적인 지방산으로 작용하여 helical conformation을 형성함으로써 항산화 능력이 증가된다고 하며, DHA/AA비율은 산화에의 손상에 대한 보호 지표<sup>27)</sup>가 된다고 하였다.

Table 3에는 식이 지방산과 비타민 E의 보충에 따른 Total-SOD, Mn-SOD, Cu, Zn-SOD의 활성을 나타내었는데, 전반적으로 식이지방산은 SOD활성에는 유의한 영향

을 미치지 못하였다. Mn-SOD의 활성은 전체적으로 비타민 E를 첨가한 ME군에서 낮아지는 경향을 볼 수 있었고, 이는 생후 3주의 해마(H)와 생후 9주에의 전두피질(FC)에서 유의적으로 낮았다( $p < 0.05$ ). Cu, Zn-SOD의 활성은 전두피질(FC), 선조체(CS)에서 비타민 E를 보충한 ME군에서 MO군보다 유의적으로 낮았는데 이는 여분의 비타민 E가 Cu, Zn-SOD의 항산화역할을 분담해 준 것으로 풀이된다. Total SOD의 활성은 비타민 E를 첨가한 ME군에서는 생후 3주의 전두피질(FC)과 선조체(CS)에서는 MO군에 비해 유의적으로 낮았다(Table 3). 식이에 의한 SOD활성의 변화를 종합해 보면 본 연구에서 연구한 뇌 부위 중 전두피질(FC)에서 다른 부위보다 영향을 많이 받았음을 알 수 있다.

본 연구에서 SOD의 활성은 비타민 E의 첨가시에 Mn-SOD는 증가하고, Cu, Zn-SOD는 감소하였으며, Total SOD는 감소하는 것으로 나타났는데, Zidenberg<sup>28)</sup>등의 보고에서 나타난 바와 같이 Mn-SOD가 미토콘드리아 내막 안쪽 공간인 기질에 위치함으로 미토콘드리아에서 지질 과산화 반응의 방어 기전으로 작용시 내막에 주로 결합되는 비타민 E의 영향을 잘 반영하지 못하는 반면, Cu, Zn-SOD는 미토콘드리아 내막과 세포질에 위치하여 비타민 E의 보호작용을 잘 반영한다고 할 수 있다.<sup>29)</sup> Balzan등<sup>11)</sup>은 Cu, Zn-SOD와 Mn-SOD의 활성이 반대로 나타나는 원인은 불분명하나, 산화가 일어나고 항산화효소가 존재하는 위치가 중요한 요인이 된다고 하였다. Ibrahim 등<sup>30)</sup>은 Mn-SOD는 동물의 생존에 있어 매우 중요한 요소로 작용하며, 질병을 발생시키는 원인을 감소시킬 수 있는 중요한

효소로 작용한다고 보고하였다. Lee 등의 연구<sup>31)</sup>에서는 항산화 비타민의 첨가시 간에서의 SOD의 활성은 변화가 없었으나, GSH-Px의 활성은 증가되었다는 실험 결과를 보였다.

SOD는 superoxide radical을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 전환시켜 제거시키는 효소로 그 활성이 억제되면 지질의 과산화 반응이 점진적으로 개시되어 세포막의 integrity가 손상되고,<sup>32)</sup> 이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 catalase와 GSH-Px에 의해 H<sub>2</sub>O로 전환되므로 이들 항산화 효소의 절대 수치보다는 SOD/(GSH-Px + catalase)의 비율이 중요하다고 하였다. 즉, 이 비율이 증가하여 조직에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 축적되면 이는 해로운 hydroxyl radical을 형성하고 세포의 손상을 가져올 수 있으므로, SOD/(GSH-Px + catalase)의 비율이 조직의 노화 및 산화적 스트레스의 중요한 요인이 될 수 있다고 보고된 바 있다.<sup>33)</sup>

GSH-Px활성(Table 4) 역시 SO군과 MO군 사이에 유의적인 차이가 없었으나, 생후 3주의 전두피질(FC)과 해마(H)에서는 비타민 E를 첨가한 ME군이 MO군보다 유의적으로 높음(p < 0.05)을 보여주었다. 생후 9주에서는 비타민 E를 보충하였을 때 GSH의 활성이 증가되는 경향이 나타났으나 뇌조직 모든 부위에서 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 뇌발달이 왕성하게 일어나는 생후 3주에는 비타민 E의 첨가 영향이 나타났으나 생후 9주에는 뇌부위별 차이가 없으며 또한 효소활성의 수준에 있어서 큰 차이가 없는 것으로 보아 수유기가 끝날 무렵(생후 3주) 뇌발달이 완성되면서 효소들의 수준도 일정한 수준에 도달한 것으로 풀이된다.

최근 비타민 E와 산화적 스트레스, Alzheimer disease (AD)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>34,35)</sup> AD환자의 두뇌에서 자유기를 생성시키는 기전에 관계되는 β-amyloid가 많이 생성되며, 비타민 E로 치료시 β-amyloid로부터의 산화적인 손상을 막아주었다고 하였고,<sup>35)</sup> Socci 등<sup>36)</sup>의 연구에서는 비타민 E를 포함한 항산화제로 치료한 노화된 쥐에서 기억 능력이 향상됨을 보고하였다. 또한 Wortwein 등<sup>37)</sup>은 비타민 E가 cholinergic neuron에서 산화적 손상을 가져 오는 neurotoxin(AF64A)으로 인한 기억과 인지능력의 감소를 막아 준다고 하였으며 노화된 쥐에서 해마에서의 neuron의 ischemic 손상도 보고된 바 있다.<sup>38)</sup> 본 연구에서 비타민 E의 첨가 시에 항산화 효소의 변화가 나타나, GSH-Px의 활성이 ME군에서 증가되었는데, 이러한 결과는 비타민 E가 생체막에 다량 존재하는 LCPUFA에 대해 chain breaking antioxidant로서 작용하여 세포막의 소기관 들로부터 보호함으로써 효소 활성의 최적구조를 유지시켜 주는 데 기여하기 때문인 것으로 생각된다.<sup>39)</sup> 그러나 Urano 등<sup>40)</sup>

은 비타민 E의 첨가에 의한 GSH의 활성 증가는 직접적인 영향인지, 비타민 E의 chain-breaking reaction에 반응하는 lipid peroxide가 과잉 생성된 때문인지는 확실치 않다고 하였다.

MDA농도는 식이 지방산의 종류나 비타민 E의 첨가에 관계없이 실험 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 4). 불포화도가 매우 높은 대구 간유를 섭취함에 따라 MDA 배설량이 증가하였다는 보고<sup>41)</sup>도 있고, 비타민 E와 P/S비율이 다양한 식이로 16주간 사육한 쥐 실험<sup>15)</sup>에서 40mg α-tocopheryl acetate/kg diet 이상에서는 식이 지방의 P/S비율에 상관없이 일정한 MDA농도를 보여주었다. 본 연구의 기본 식이내의 비타민 E 첨가수준은 50mg/kg diet로 식이 지방의 종류와 비타민 E 수준에 따른 MDA 농도변화가 관찰되지 않았다.

전체적인 경향을 볼 때 비타민 E의 첨가시 GSH-Px의 활성은 증가하는 경향, Total-SOD의 활성은 감소하는 경향, Mn-SOD는 증가하는 경향, Cu, Zn-SOD는 감소하는 경향을 보였고, MDA 농도는 실험군간의 차이를 나타내지 않았다.

## 2. 뇌조직 부위별 항산화체계 비교

Total-SOD의 활성은 SO, MO, ME군 모두 다른 뇌부위 조직보다 해마(H)에서 유의적으로(p < 0.05) 낮은 활성을 보였고, 전두피질(FC)에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1). 또한 뇌조직 부위별 GSH-Px활성의 차이를 살펴보면(Fig. 2), SOD와 유사한 경향으로 전두피질(FC)에서의 활성이 높은 경향을, 해마(H)에서의 활성이 가장 낮게 나타났다. Mn-SOD와 Cu, Zn-SOD의 활성도 Total SOD의 활성과 같은 경향을 보여, 전두피질(FC) > 선조체(CS)~소뇌(CB) > 해마(H)의 순서로 낮았다.

Hussain 등<sup>42)</sup>은 해마(H)가 다른 부위보다 aging동안 산화적 손상을 받기 쉽다고 하여 본 연구 결과를 간접적으로 뒷받침하여 주며, Fuhrmann 등<sup>43)</sup>은 비타민 E의 함량은 소뇌에서 가장 낮게 나타나, 뇌의 부위 중 소뇌가 비타민 E의 결핍된 식이 섭취시 산화적 손상에 민감하다고 하였다. 뇌조직 부위별 항산화 체계를 종합해보면 본 항산화 비타민의 경우 즉 전두피질(FC)에서 가장 농도가 낮고 해마에서 가장 농도가 높은 반면,<sup>44)</sup> 항산화 효소의 활성은 반대의 경향을 보여, 일부 항산화계 요소의 감소는 다른 요소의 증가에 의해 보상되어진다는 Matsuo<sup>45)</sup>의 연구를 뒷받침하여 주고 있다.

## 3. 실험기간에 따른 차이

본 연구에서 생후 3주와 생후 9주의 항산화효소의 활성을 비교하여 보면 생후 3주보다 생후 9주에서 유사한 수치

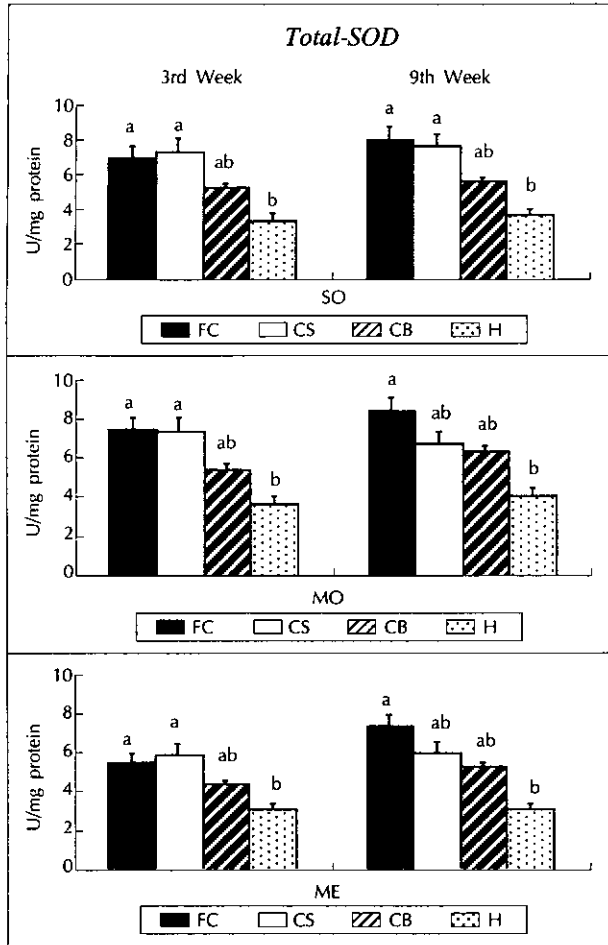


Fig. 1. Total-SOD activities in the rat brain regions at the age of 3 & 9 weeks. FC : Frontal cortex, CS : Corpus striatum, CB : Cerebellum, H : Hippocampus, SO : Safflower oil, MO : Mixed oil, ME : MO+vitamin E. Values with the same letters are not significantly different from the others within the same week ( $p < 0.05$ ).

를 나타내어 차이가 없는 것으로 나타나(Table 3, 4) 이는 쥐의 뇌발달이 끝나는 3주에 이미 성숙한 쥐의 수준에 도달되었음을 말해준다.

나이에 따른 여러 항산화효소 활성의 변화에 대한 몇가지 다른 연구를 살펴보면, 쥐의 경우 신경조직에서 GSH-Px의 활성은 나이에 따라 큰 변화를 보이지 않은<sup>46)</sup> 반면, catalase 활성은 생후 14~30일에 peak를 이루었다는 보고가 있다.<sup>47)</sup> Aspberg 등<sup>48)</sup>은 쥐 두뇌의 경우, 태아기 15일부터 생후 45일까지 Cu, Zn-SOD의 활성은 처음에는 증가하다가 나이에 따라 감소하고, Mn-SOD는 계속 증가한다고 하였다. Catalase는 생후 5일에 최대 활성을 보였으며, GSH-Px는 생후 첫 주에 증가하다가 생후 45일에 adult 수준에 도달하였음을 관찰하였다. Hussain 등<sup>42)</sup>은 뇌 부위별로 항산화 효소의 활성을 관찰한 연구에서 1, 6, 12 및 24개월의 쥐의 경우 catalase 활성은 소뇌를 제외하고는

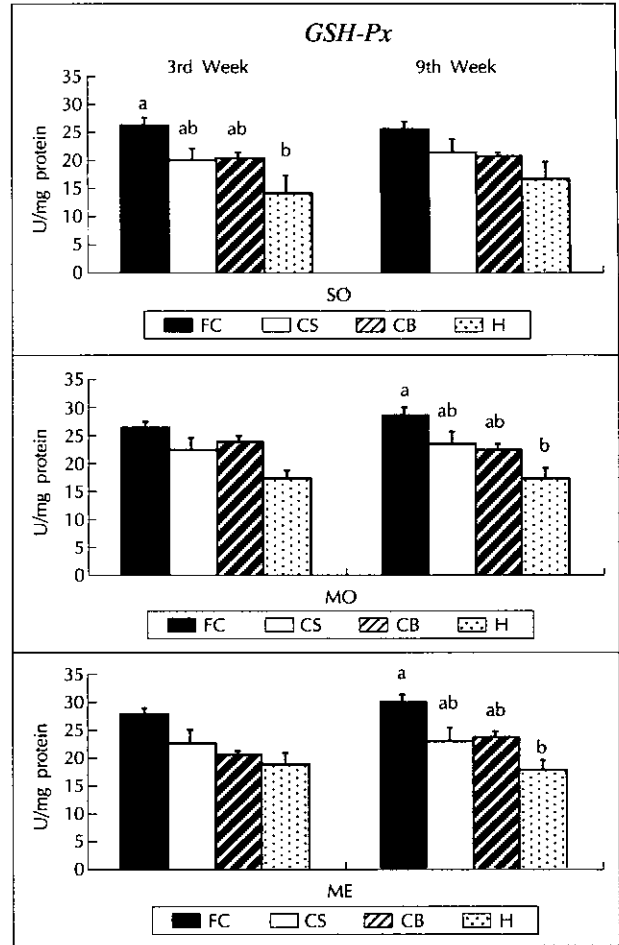


Fig. 2. Glutathione peroxidase activities in the rat brain regions at the age of 3 & 9 weeks. FC : Frontal cortex, CS : Corpus striatum, CB : Cerebellum, H : Hippocampus, SO : Safflower oil, MO : Mixed oil, ME : MO+vitamin E. Values with the same letters are not significantly different from the others within the same week ( $p < 0.05$ ).

변화되지 않았고, SOD는 2yr-old mice의 해마를 제외하고 나이에 따라 증가됨을 보고하였다.

전반적으로 뇌조직내 효소 활성도를 본 연구팀의 이전 연구<sup>49)</sup>인 간조직과 비교해 보면 조직 1g당 효소농도는 간조직이 뇌조직에 비해 3~4배 높으나, 본 실험에서와 같이 specific activity로 나타내면 간조직(Total SOD: 1.13~2.56U/mg protein)보다 뇌조직(2.39~5.31U/mg protein)에 더 높게 나타났다. 따라서 LCPUFA의 함량이 높고, 산소의 소비량이 큰 뇌조직을 산화적 stress로부터 보호할 수 있는 매우 효율적인 항산화 체계가 개발되어 있음을 확인할 수 있었다.

### 요약 및 결론

뇌조직은 불포화지방산의 보고이며 산소 소모량이 많고

또한 Fe/Cu와 blood brain barrier의 존재는 뇌의 항산화 system에 대한 관심을 집중시킨다. 이에 본 연구에서는  $\omega$ 3계 지방산 결핍군인 safflower oil(SO)군, 지방산을 바람직한 비율로 공급한 mixed oil(MO, P/M/S ratio = 1.03 : 1.45 : 1,  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 ratio = 6.3)군 및 비타민 E를 보충시킨 (MO + 500mg/kg diet, ME군)식으로 임신되기 3~4주 전부터 섭취시키고, 이로부터 출생한 제 2세대 쥐의 뇌조직을 전두피질(FC), 선조체(CS), 해마(H), 소뇌(CB)의 4부위로 나누어 항산화효소 및 MDA를 측정하였다. 연구 결과는 다음과 같다.

1) 뇌조직 부위별 항산화 체계에서 식이지방산 차이에 따른 효과는 없었으나 비타민 E의 보충 효과가 나타나 비타민 E의 첨가시(ME군) GSH-Px의 활성이 MO군에 비하여 증가하는 경향을 보여, 이는 생후 3주의 전두피질(FC)과 해마(H)에서 유의적인 차이를 나타내었다.

2) Mn-SOD, Cu, Zn-SOD의 활성은 서로 다르게 나타나, Mn-SOD의 활성은 ME군에서 증가하는 경향을 나타내어, 생후 9주의 전두피질(FC), 생후 3주의 해마(H)에서 유의적인 차이를 나타내었고, Cu, Zn-SOD는 감소하는 경향을 보여, 생후 3주의 전두피질(FC)과 선조체(CS)에서 비타민 E의 보충시 유의적으로 감소되었다. Total-SOD의 활성도 Cu, Zn-SOD의 활성과 같은 경향을 보여, MO군에 비하여 ME군에서 감소되는 경향을 나타내었다. 식이지방산의 조성은 SOD의 활성에 영향을 미치지 않았다.

3) 항산화효소의 활성이 생후 3주와 9주 수준이 유사하여, 수유기가 끝나는 생후 3주에 이미 성숙한 쥐의 수준에 미치지 않았다.

4) 뇌조직 부위별로 비교하면 항산화효소의 활성을 비교하면 해마(H)에서 가장 낮았고, 전두피질(FC)에서 가장 높았다.

5) MDA농도는 식이 지방산 조성 및 비타민 E의 보충 식이에 영향을 받지 않아 뇌조직의 모든 부위에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

결론적으로 임신전 3주부터 지방산 조성이 다른 식이를 투여하여 얻은 제 2세대 쥐의 뇌부위별 항산화체계(효소와 MDA)가 유사한 수준으로 유지된 것으로 보아, 뇌조직은 항산화능력을 확보하는데 있어 식이지방산의 영향을 크게 받지 않는 것으로 여겨진다. 비타민 E의 보충으로 항산화체계의 변화와 함께 행동 발달에 영향을 미치는 것으로 나타났는데,<sup>44)</sup> 이는 여러 항산화계의 균형성과 신경전달물질, 그 외 여러 가지 요인들과의 상호작용 측면에서의 종합적인 면으로 해석해야 함을 지적해 주었다.

두뇌의 항산화체계는 CNS의 산화적 손상을 줄이기 위하

여, 나아가서는 노화와 관련된 기억 능력의 손상과 Alzheimer's disease의 예방적 차원으로 앞으로의 연구가 절실히 요청된다고 하겠다.

#### ■ 감사의 글

본 연구를 위해 canola oil을 공급해 주신 (주)농심, safflower oil을 공급해 주신 (주)제일제당, menhaden oil 해 주신 Zaphata(USA) Co.에 감사드립니다.

#### Literature cited

- 1) 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
- 2) Halliwell BH. Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction? *Ann Neurol* 32: 510-515, 1992
- 3) Olanow CW, Arendash GW. Metals and free radicals in neurodegeneration. *Curr Opin Neurol* 7: 548-558, 1994
- 4) Chow CK. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 11: 215-232, 1991
- 5) Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162, 1995
- 6) Suarez A, Ramirez-tortosa M, Gil A, Faus MJ. Addition of vitamin E to long-chain polyunsaturated fatty acid-enriched diets protects neonatal tissue against peroxidation in rats. *Eur J Nutr* 38(4): 169-176, 1999
- 7) Bieri JG, Everts RR. Tocopherols and polyunsaturated fatty acids in human tissues. *Am J Clin Nutr* 29: 717-720, 1975
- 8) Packer L. Vitamin E: Biological activity and health benefits: Overview in vitamin E in health and disease, Ed by Packer L and Fuchs J, Dekker M, Newyork, USA, 1993
- 9) Panganamala RV, Cornwell DG. The effect of vitamin E on arachidonic acid metabolism. *Ann NY Acad Sci* 393: 376-393, 1982
- 10) Greenlund LJS, Deckwerth TL, Johnson EM. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed cell death. *Neuron* 14: 303-316, 1995
- 11) Balzan R, Agius DR, Bannister EH. Cloned prokaryotic iron superoxide dismutase protects yeast cells against oxidative stress depending on mitochondrial location. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 63-67, 1999
- 12) Hsiang JN, Wang JY, Ip SM, Ng HK, Stadlin A, Yu AL, Poon WS. The time course and regional variations of lipid peroxidation after diffuse brain injury in rats. *Acta Neuro* 139(5): 464-468, 1997
- 13) Halliwell B. Oxidants and the central nervous system, some fundamental questions. *Acta Neurol Scand* 126: 23-33, 1989
- 14) Zaleska MH, Wilson DF. Lipid hydroperoxides inhibit reacylation of phospholipids in neuronal membranes. *J Neurochem* 52: 255-260, 1989
- 15) 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
- 16) Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European J Biochem* 47: 469-474, 1974
- 17) Sheri ZC, Keen CL, Hurley LS. Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in the rat: developmental correlations affected by manganese deficiency. *J Nutr* 113: 2498-2504, 1983
- 18) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidation. *J Lab & Clin Med* 70(1): 158-169, 1967



- 19) Deagen JT, Butler JA, Beilstein MA, Whagner PD. Effects of dietary selenite, selenocysteine and selenomethionine o-selenocysteine lyase and glutathione peroxidase activities and on selenium levels in rat tissues. *J Nutr* 117: 91-98, 1987
- 20) Naito C, Kawamura M, Yamamoto Y. Lipid peroxides as the initiating factor of atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 676: 27-45, 1993
- 21) Cepinskas G, Kvietyis PR, Aw TY. Omega 3-lipid peroxides injure CaCo-2 cells: relationship to the development of reduced glutathione antioxidant systems. *Gastroenterol* 107(1): 80-86, 1994
- 22) Saito M, Nakatsugawa K. Increased susceptibility of liver to lipid peroxidation after ingestion of a high fish oil diet. *Int J Vitamin Nutr Res* 64: 144-151, 1994
- 23) Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605, 1979
- 24) Bolanos JP, Heales SJR. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: Differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 64: 1965-1972, 1995
- 25) Radi R, Rodriguez M, Castro L, Tellerei R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 308: 89-95, 1994
- 26) Hossain MS, Hashimoto M, Gamoh SM. Influence of docosahexaenoic acid on cerebral lipid peroxide level in aged rats with and without hypercholesterolemia. *Neurosci Letters* 244: 157-160, 1998
- 27) Hossain MS, Hashimoto M, Gamoh SM. Antioxidative Effects of docosahexaenoic acid in the cerebrum versus cerebellum and brainstem of aged hypercholesterolemic rats. *J Neurochem* 72(3): 1133-1138, 1999
- 28) Zidenberg CS, Keen CL, Lonnerdal B, Hurley LS. Mitochondrial structure and function in manganese-deficient mice. *Fed Proc* 41: 287, 1982
- 29) Lippman RD. Free radical-induced lipoperoxidation and aging. CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine II, pp. 187-197, 1989
- 30) Ibrahim W, Lee US, Yen HC, Clair DK, Chow CK. Antioxidant and oxidative status in tissues of manganese superoxide dismutase transgenic mice. *Free Rad Biol & Med* 28(3): 397-401, 2000
- 31) Lee BJ, Park JN, Lee SS. Effects of P/S ratios of dietary lipids and antioxidant vitamin supplements on the level of serum lipids and liver lipid peroxidation in rats treated with DMBA. *Korean J Nutr* 31(5): 906-913, 1998
- 32) Keen CL, Amura T, Lonnerdal B, Hurlry LS, Halsted CH. Changes in hepatic superoxide dismutase activity in alcoholic monkey. *Am J Clin Nutr* 41: 929-932, 1985
- 33) de Hann JB, Cristiano F, Lannello RC, Kola I. Cu/Zn superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. *Biochem & Molecular Biol Internal* 35(6): 1281-1297, 1995
- 34) Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 71 (suppl): 621S-629S, 2000
- 35) Grundman M. Vitamin E and Alzheimer disease: the basis for additional clinical trials. *Am J Clin Nutr* 71(suppl): 630S-636S, 2000
- 36) Socci DJ, Crandall BM, Arendash GW. Chronic antioxidant treatment improves the cognitive performance of aged rats. *Brain Res* 693: 88-94, 1995
- 37) Wortwein G, Okaichi H, Yoshikawa T, Iyata Y. Learning behavior in chronic vitamin E-deficient and -supplemented rats: radial arm maze learning and possible avoidance response. *Behav Brain Res* 51: 157-164, 1992
- 38) Hara H, Kato H, Kogure K. Protective effect of alpha-tocopherol on ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. *Brain Res* 510: 335-338, 1990
- 39) Uranos S, Midori HH, tochihi N, Matsuo M, Shiraki M, Ito H. Vitamin E and susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids* 26(1): 58-61, 1991
- 40) Urano S, Asai Y, Makabe S, Matsuo M, Izumiyama N, Ohtsubo K, Endo T. Oxidative injury of synapse and alteration of antioxidative defense systems in rats, and its prevention by vitamin E. *Eur J Biochem* 245: 64-70, 1997
- 41) Draper H. Malondialdehyde and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 54: 429-430, 1991
- 42) Hussain S, Slikker JRW, Ali SF. Age related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int J Devl Neuroscience* 13(8): 811-817, 1995
- 43) Fuhrmann H, Sallmann HP. Alpha-tocopherol and phospholipase A2 in liver and brain of chicks posthatching: the influence of dietary fat and vitamin E. *Ann Nutr Metab* 39(5): 302-309, 1995
- 44) Hwang HJ. Effect of dietary fatty acid and vitamin E supplementation on fatty acid composition, antioxidant systems of the phospholipid in the rat brain and behavioral development. *Doctoral thesis*, Yonsei Univ, 1998
- 45) Matsuo M. Age-related alterations in antioxidative defense. In *Free Radicals in Aging*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.143-181, 1993
- 46) Nistico G, Ciriolo MR, Fiskin K, Rotilio G. NGF restores decrease in catalase activity and increase superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of aged rats. *Free Rad Biol Med* 12: 177-181, 1992
- 47) L'vova SP, Abaeva EM. The tissue antioxidant system in the early postnatal development of rats. *Ontogenes* 27(3): 204-207, 1996
- 48) Aspberg A, Tottmar O. Development of antioxidant enzymes in rat brain and in reaggregation culture of fetal brain cells. *Brain Res Dev Brain Res* 66(1): 55-58, 1992
- 49) Lee SK, Chung EJ, Kim SY, Lee JH, Lee-Kim YC. Relationships between dietary  $\omega 6/\omega 3$  fatty acid composition, vitamin E, minerals and antioxidant enzymes. *Korean J Lipid* 6(1): 1-11, 1996