

## 흰쥐 뇌의 축종격핵에서 망간에 의한 산화적 손상에 관한 연구

고현철<sup>1\*</sup> · 신현아<sup>2</sup> · 이수진<sup>3</sup>

<sup>1</sup>\*한양대학교 의과대학 약리학교실, <sup>2</sup>예방의학교실, <sup>3</sup>산업의학교실

### Manganese-induced Oxidative Stress in Nucleus Accumbens of Rat Brain

Hyun Chul KOH<sup>1\*</sup>, Hyun A SHIN<sup>2</sup> and Soo-jin LEE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>\*Department of Pharmacology, <sup>2</sup>Department of Preventive Medicine

<sup>3</sup>Department of Occupational & Environmental Medicine

Hanyang University College of Medicine, Seoul 133-791, Korea

(Received January 1, 2002 ; accepted March 10, 2002)

**Abstract** – This study was carried out to identify the effect of oxidative stress on the pathogenesis of manganese intoxication. Five rats in experimental group were given with MnCl<sub>2</sub> intraperitoneally for 4 weeks (4 mg/kg once daily, 5 days per week) and another five rats for control group were given with normal saline. In experimental group, manganese concentrations increased significantly in nucleus accumbens by 142% (p<0.05), SOD activities increased significantly by 124% (p<0.01), and MDA concentrations increased significantly 148% (p<0.05) compared with control group. Among fatty acids, total n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) increased significantly by 231% (p<0.05) compared with control group. Arachidonic acids (AA) increased by 224% (p<0.05), and these increase were composed mostly of n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA). Among n-3 PUFAs except linolenic acids, eicosapentanoic acid (EPA) decreased significantly by 38% (p<0.01) and docosahexanoic acids (DHA) decreased by 30% (p<0.05) compared with control group. Our results suggest that the oxygen free radicals produced by manganese may cause compositional changes of fatty acids in nucleus accumbens of the rat. Characteristics of fatty acids compositional changes by manganese were the decrease of EPAs and DHAs (n-3 PUFAs), and increase of AAs (n-6 PUFAs). These changes with the increase of MDA, suggest that manganese neurotoxicity is caused by lipid peroxidation mediated with oxygen free radicals, especially superoxide radicals.

**Key words:** Fatty acid, Manganese, Malondialdehyde, Nucleus accumbens, Oxidative stress, Superoxide dismutase

망간은 필수금속 중의 하나로, 결핍시 성장장애, 골격변형, 생식불능이나 신생아 사망 등을 유발할 뿐 아니라 (Hurley, 1981), 고농도 노출시 심각한 건강장애를 일으키는 것으로 알려져 있다. 망간제련 및 합금, 망간 함유 세라믹, 건전지의 분극제, 화학공업의 산화제, 농약 생산 및 망간 흡이 발생하는 용접작업 등을 통해 직업적으로 노출되고, 최근 무연가솔린 및 제트연료의 항녹킹제로 사용되는 methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyls(MMT)에 의한 노출도 급증하고 있다(NIOSH, 1997). 망간에 의한 건강장애는 주로 만성중독에 의해 초래되며, 중독 초기에는 피로감, 두통, 수면과다, 무기력, 무관심과 같은 비특이적 증상과 정서변화, 정서불안정, 강박성 웃음, 환각과 같은 증상이 주를 이루어 망간정신병(manganese psychosis)이라 불리며(Mena 등, 1967), 노출이 지속되면 진전, 구음장애, 보행장애, 행동이 느려지는 증상, 소자증 및 자세이상 등 특발성

파킨슨병에서 나타나는 추체외로계 이상소견과 유사한 운동장애가 나타나는 것이 특징으로 알려져 있다(Calne 등, 1994; Huang 등, 1998). 최근, 망간중독과 파킨슨병의 임상양상의 유사성으로 인해 일부 신경변성질환의 발병에 망간과 같은 전이금속이 관련된다는 환경성 원인설에 대한 관심이 증대되고 있다(Cramner, 1998).

망간의 신경독성에 대한 기전은 현재까지 명확하게 구명되어 있지 않다. 상술한 바와 같이 망간중독의 임상양상이 이상성 경과(biphasic course)를 보인다는 사실과 함께 망간중독 발병 후 경과시기에 따라 생체에서 관찰되는 생화학적 변화에도 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 즉, 초기에는 도파민 생성에 관여하는 tyrosine hydroxylase의 활성도 증가(Bonilla, 1980), 선조체의 도파민 교체율(turnover rate)의 증가(Barbeau, 1984), NMDA 의존성 glutamate 수용체에 의해 매개되는 시냅스전 도파민 자기수용체의 손실(Chandra 등, 1981) 등이 관찰되는데, 이 결과들은 뇌조직의 도파민 농도나 활동성 증가가 중독 초기에 보이는 정신분열증과 유

\*To whom correspondence should be addressed.

사한 임상증상의 발현과 관련됨을 시사한다. 반면 급성 추체외로계 관련 증상은 도파민이 cyclized *ortho*-quinone으로의 불가역적인 산화와 이로 인한 뇌조직내 도파민 농도의 일시적인 감소에 기인하고, 만성 망간중독증은 산소유리기(oxygen free radical)와 apoptosis에 의한 세포사가 기여하는 것으로 알려져 있다(Segura-Aguilar와 Lind, 1989).

최근, 카드뮴, 수은 및 연중독을 비롯하여(Donaldson 과 Knowles, 1993; Sarkar 등, 1995; Hussain 등, 1997; Stajn 등, 1997), 파킨슨병, 알츠하이머병, 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis)과 같은 신경변성질환의 병리기전으로 산소유리기의 역할이 제기되고 있다(Markesby, 1997). 항상성이 유지되는 조건에서 산소유리기는 세포내에 존재하는 superoxide dismutase(SOD), catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 제거 효소들과 환원형 glutathione, 수용성 또는 단백질과 결합된 형태의 thiol, 비타민 A, C, E와 같은 저분자량의 비효소형 항산화물에 의해 제거된다(Sugiyama, 1994). 그러나 세포내·외의 산소유리기가 항산화계에 의한 제거 한계를 초과하였을 때, 과도한 지질 과산화반응이 초래되어 막투과성의 변화, 주요 구조단백질의 산화, 막간 이온 이동의 혼란과 같은 세포의 기능적 장애와 구조적 손상이 유발되고 결국, 세포사로 진행된다(Mason 등, 1997).

한편, 뇌조직은 산소유리기의 민감한 표적물인 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acids, 이하 PUFAs), 특히 다수의 이중결합 구조를 지닌 eicosapentanoic acid(EPA)와 docosahexanoic acid(DHA)가 타 조직에 비해 풍부하게 존재하고(Esterbauer 등, 1991), 뇌세포의 O<sub>2</sub> 소모량이 많은 점, Fe<sup>2+</sup>의 풍부함, catalase 같은 항산화 효소의 부족(Halliwell, 1992) 등의 이유로 인해 산화적 스트레스에 의해 쉽게 지질과산화반응이 일어나는 것으로 알려져 있어 다수 중추신경계 질병의 병인으로 산소유리기가 지목되고 있다(Halliwell 과 Gutteridge, 1998).

망간은 oxidative stress monoamine 특히 dopamine에 영향을 미치는 것으로 알려져 있고(Kontur과 Fechter, 1988), 측중격핵은 선조체와 더불어 dopamine과 관련된 뇌의 중요부위로 알려져 있다. 그러므로 이 연구는 망간에 의한 신경독성이 산소유리기가 매개된 과도한 지질과산화반응에 기인한다는 가설 하에 망간을 투여한 흰쥐의 측중격핵에서 SOD 활성도, malondialdehyde 농도 및 지방산 조성 변화를 비교·분석함으로써 망간중독증의 병리기전에서 산화적 손상의 역할을 구명하고자 하였다.

## 실험방법

### 실험동물 및 실험재료

체중 240±10 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 실험

3일 전부터 상업용 배합사료로 약 18°C가 유지되는 동물실에서 사육하였다. 실험기간 동안 사료와 물은 제한 없이 공급하였으며, 조도는 한쪽 벽면에 위치한 창을 통한 자연광과 낮 시간(09-18시)의 인공조명으로 조절하였다.

망간주사군은 MnCl<sub>2</sub>를 4 mg/kg(0.5 cc/250 g)용량으로, 대조군은 0.9% 생리식염수를 1회/1일, 5회/1주, 4주 동안 복강내 주사하였으며, 각 군 당 동물은 5마리였다. 4주 후, 동물을 단두도살하여 즉시 얼음 위 slide glass에서 뇌와 측중격핵(nucleus accumbens)을 분리하여 phosphate buffered saline 용액으로 균질화하였다. 이 중 일부는 망간 측정에 사용하였고, 나머지는 초음파 처리한 후, 4°C, 20,000 G에서 30분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 지방산, superoxide dismutase(SOD) 활성도와 malondi-aldehyde(MDA) 측정에 사용하였다.

### 측중격핵의 망간 농도 및 SOD 활성 측정

망간농도는 조직시료 0.1 ml와 매질개선제(0.5% Triton X-100, 1.25% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0.9 ml를 섞은 다음, 이 중 10 µl를 graphite furnace 원자흡수분광광도계(PE 3300, Perkin Elmer, Norwalk, CT, U.S.A.)로 정량분석하였다. SOD 활성은 Sun 등(1988)의 방법으로 정량하였다. Xanthine oxidase(1 kU/g) 20 µl를 1 mM sodium salicylate가 함유된 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 ml에 희석하여 최종농도가 167 mU/l가 되도록 하였다. SOD 측정시약은 0.3 mM xanthine 용액 40 ml, 0.6 mM EDTA 용액 20 ml, 150 µM nitro-blue tetrazolium 용액 20 ml, 400 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 12 ml, 1 g/l bovine serum albumin 용액 6 ml를 섞어 제조하였다. 먼저, 5 ml 용량의 시험관에 2.45 ml의 SOD 측정시약을 분주하고, 검체 또는 SOD 표준용액 0.5 ml를 시험관에 첨가한 후, xanthine oxidase 용액을 검체간 30초의 간격을 두고 50 µl씩 분주한 다음 20분간 반응시켰다. 0.8 mM CuCl<sub>2</sub> 용액을 1 ml씩 분주한 후, 534 nm 파장에서 분광광도계(DU-65, Beckman, Fullerton, U.S.A.)로 흡광도를 측정하였다.

### 측중격핵의 MDA 농도 측정

지질과산화반응은 TBA 반응에 의해 생성된 MDA 농도를 Shah 등(1983)의 방법으로 정량하였다. 원심분리된 상층액 0.5 ml를 취한 후 17.5% TCA 0.5 ml와 0.6% TBA(pH 2.0) 0.5 ml를 첨가 후 15분간 끓여 유도체화하고, 실온에서 10분간 식힌 뒤 70% TCA 0.5 ml를 첨가하고 20분간 얼음 욕조에 방치하였다. 2,500 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상층액을 534 nm 파장에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. 표준시료는 malondialdehyde bis(diethyl acetal) 24 µl를 0.01 M 염산 10 ml에 섞어 6시간 동안 실온에 방치하여 얻었다.

**Table I.** Manganese (Mn) concentration, superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) concentration in nucleus accumbens after administration of MnCl<sub>2</sub> (4 mg/kg, i.p.) for 4 weeks

| Group             | Mn concentration (ug/g protein) | SOD activity (unit/mg protein) | MDA concentration (ng/g protein) |
|-------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Normal saline     | 1.02 ± 0.06                     | 0.58 ± 0.02                    | 21.60 ± 2.27                     |
| MnCl <sub>2</sub> | 1.45 ± 0.10                     | 0.72 ± 0.03                    | 31.99 ± 3.47                     |
| p-value<          | 0.05                            | 0.01                           | 0.05                             |

All values represent mean ± SE (n=5). p-values indicated the comparison of values of normal saline group.

**축종격핵의 지방산 조성 측정**

조직시료 2 ml와 hexane:isopropyl alcohol(3:2 v/v) 1 ml를 섞은 다음 7,500 G에서 10분간 원심분리 하였다. 상층의 지방층 300 µl를 취한 다음 methanol:hexane(4:1 v/v) 2 ml를 첨가하였다. 200 µl의 acetyl chloride를 가하고, 100°C에서 1시간 동안 가열하여 메틸화하였다. 상온에서 냉각한 다음 n-hexane 1 ml와 6% potassium carbonate 5 µl를 첨가하고 1,000 G에서 15분간 원심분리하였다. 상층액 3 µl를 취하여 gas chromatography(HP 6890, Hewlette Packard, U.S.A.)에 주입하였다. 표준액은 myristic acid, docosahexanoic acid, linoleic acid, palmitoleic acid, stearic acid, palmitic acid, eicosapentanoic acid, arachidonic acid, linolenic acid, oleic acid, arachidic acid의 혼합액으로 각각의 농도는 10 mg/ml이었다.

**축종격핵의 단백질 농도 측정**

조직의 망간농도 및 MDA 농도를 보정하기 위하여 축종격핵 조직의 단백질 농도를 구하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준으로 하여 Lowry 등의 방법으로 측정하였다. 실험방법은 다음과 같다. 균질화된 조직액 0.01 ml와 시약 D(0.5 N NaOH에 녹인 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 ml, 1% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.7 ml, 2% potassium tartrate 0.7 ml) 1 ml를 섞은 다음 실온에서 15분간 방치하였다. Folin 시약(2 N folin-ciocalteau-phenol 10 ml, 증류수 90 ml)을 3 ml 첨가한 다음 실온에서 45분간 방치하였다. 정량은 540 nm 파장에서 분광광도계(DU 65, Beckman, U.S.A.)로 흡광도를 측정하였다. 표준액으로는 bovine serum albumin 0.3% 용액을 사용하였다.

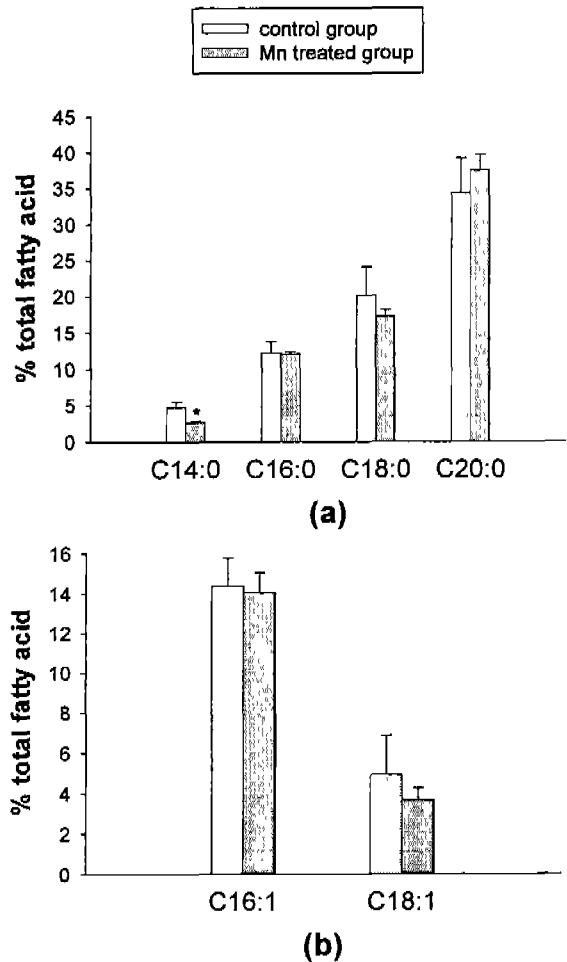
**통계분석**

모든 실험성적은 평균±표준오차로 표시하였다. 각 군별 측정항목들에 대해 Wilcoxon rank sum test로 대조군과 망간주사군들간의 유의성을 검정하였다. 모든 통계분석은 SPSS(ver 10.0) 프로그램을 사용하였으며, 검정에 대한 유의수준은 0.05로 설정하였다.

**실험결과**

축종격핵에서 망간농도는 망간주사군이 대조군에 비해

142%(p<0.05)로 유의하게 증가하였고, SOD 활성은 124%(p<0.01)로 유의하게 증가하였으며, MDA 농도는 148%(p<0.05)로 유의하게 증가하였다(Table I). 지방산 조성 결과를 보면 포화지방산(saturated fatty acids, 이하 SFAs)인 palmitic acid, stearic acid, arachidic acid는 망간주사군과 대조군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었으나, myristic



**Fig. 1.** Compositional changes of (a) saturated fatty acids and (b) monounsaturated fatty acids. Values are mean ± SE (n=5). \*p<0.01 compared with the control. Abbreviations: C14:0 myristic acid; C16:0: palmitic acid; C18:0: stearic acid; C20:0 arachidic acid; C16:1: palmitoleic acid; C18:1: oleic acid.

acid( $15.70 \pm 1.28$ )는 망간주사군이 대조군( $23.01 \pm 2.19$ )에 비해 55%( $p < 0.01$ )로 유의하게 감소하였다(Fig. 1). 단일불포화지방산(monounsaturated fatty acids, 이하 MUFAs)인 palmitoleic acid, oleic acid는 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 1). n-6계 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acids, 이하 PUFAs)의 경우, linoleic acid( $4.30.70$ )는 망간주사군이 대조군( $1.12 \pm 0.16$ )에 비해 114%( $p < 0.05$ )로 유의하게 증가하였고, arachidonic acid( $42.27 \pm 6.42$ )도 대조군( $14.18 \pm 3.62$ )에 비해 224% ( $p < 0.05$ )로 유의하게 증가하였다(Fig. 2). n-3계 PUFAs의 경우, linolenic acid는 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었으나, eicosapentanoic acid( $2.17 \pm 0.38$ )는 대조군( $4.79 \pm 0.53$ )에 비해 38%( $p < 0.01$ )로 유의하게 감소하였고, docosahexanoic acid( $2.10 \pm 0.61$ )도 대조군( $5.75 \pm 0.78$ )에 비해 30%( $p < 0.05$ )로 유의하게 감소하였다(Fig. 2). PUFAs를 n-6

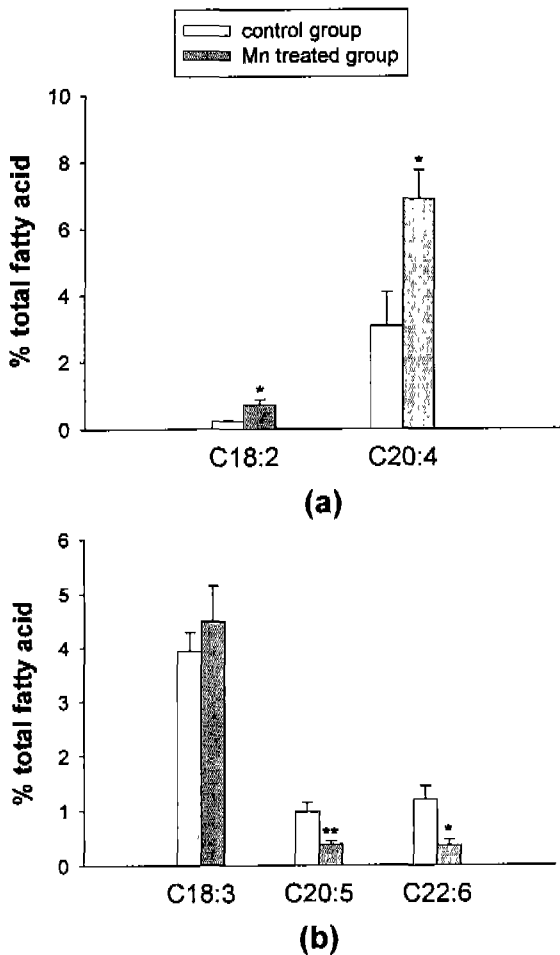


Fig. 2. Compositional changes of (a) n-6 polyunsaturated fatty acids and (b) n-3 polyunsaturated fatty acids. Values are mean  $\pm$  SE(n=5). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the control. Abbreviations: C18:2: linoleic acid; C20:4: arachidonic acid; C18:3 linolenic acid; C20:5: eicosapentanoic acid(EPA); C22:6 docosahexanoic acid(DHA).

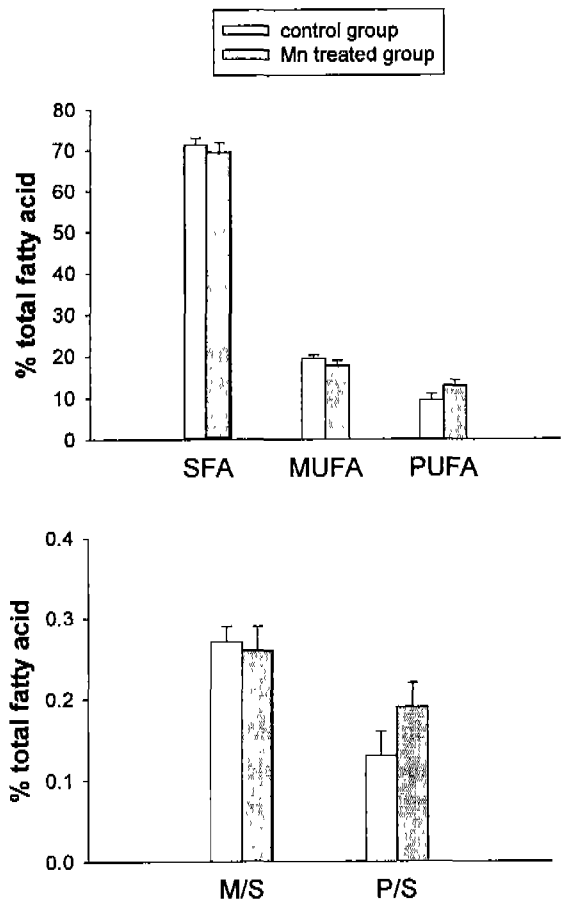


Fig. 3. Fatty acid composition by saturation degree. Values are mean  $\pm$  SE(n=5). Abbreviations: SFA: sum of saturated fatty acids; MUFA: sum of monounsaturated fatty acids; PUFA: sum of polyunsaturated fatty acids; M/S: sum of monounsaturated fatty acids/sum of saturated fatty acids; P/S: sum of polyunsaturated fatty acids/sum of saturated fatty acids.

계와 n-3계로 구분한 비교에서, 총 n-6계는 망간주사군이 대조군에 비해 231%( $p < 0.05$ )로 통계적으로 유의하게 증가하였고, 총 n-3 계는 대조군에 비해 85%( $p > 0.05$ )로 감소하였지만 통계적으로 유의하지 않았다. n-3계에 대한 n-6계의 비는 대조군에 비해 294%( $p < 0.01$ )로 유의하게 증가하였다.

지방산의 포화도에 따른 비교에서, 총 SFAs, 총 MUFAs, 총 PUFAs는 모두 망간주사군과 대조군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 총 SFAs에 대한 총 MUFAs, 총 PUFAs의 비도 두 군간에 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).

### 고찰

본 연구에서  $MnCl_2$  투여 후 흰쥐 뇌의 측중격핵에서 망간 농도 증가되었고, 같은 부위에서 SOD 활성도 및 MDA 농도 또한 망간주사 후 통계적으로 유의하게 증가되었는데,

이는 망간이 직·간접적으로 측중격핵 뇌세포의 산소유리기 특히,  $O_2^-$  농도의 증가를 유발한 결과로 해석된다.

Archibald와 Tyree(1987)는  $Mn^{3+}$ 이 도파민의 산화를 유발하여 cyclized ortho-quinone을 형성하는 동시에 도파민 농도를 저하시키지만, 이 과정에서 산소유리기가 생성되지 않는다고 하였다. 그러나 이후 연속적인 반응으로 cyclized ortho-quinone에서 한 개의 전자가 빠져 나와 semiquinone을 형성하는 과정에서  $O_2$ 가 생성되고, 이 반응의 결과 무독한 hydroquinone이 형성되지만, 이 중 일부는 재산화되어  $O_2^-$ 와  $Mn^{3+}$ 을 생성함으로써 도파민의 산화 및 농도 저하를 가속화하고, 그 결과 망간에 의한 급성 신경독성이 발생하였을 것으로 주장하였는데(Segura-Aguilar과 Lind, 1989), 이 연구들은 본 연구에서 관찰된 SOD 활성도 증가가 망간에 의한  $O_2^-$  증가에 기인할 것이란 가설을 뒷받침한다. 한편, 망간투여가 SOD 활성도에 미치는 영향에 대한 타 연구가 거의 없어 이에 대한 직접적인 비교는 불가능하였다.

이염화니켈(Sunderman 등, 1989), 연(Yiin과 Lin, 1994), 카드뮴(Manca 등, 1991) 등 다수 중금속이 지질과산화반응을 증가시키는 것으로 알려져 있으며, 이 연구에서도 통계적으로 유의한 MDA 증가를 보여 망간이 지질과산화반응을 증가시킨다는 결과를 얻었다. 지질과산화반응에 대한 망간의 효과에 대해 아직 이견이 많은데, Knight와 Voorhees(1990)는 *in vitro*에서 이염화망간이 PUFAs의 일종인 linolenic acid를 산화시켜 지질과산화물이 증가됨을 관찰하였고, Misiewicz 등(1999)은 합금공정에서 망간에 노출된 근로자의 적혈구에서 MDA가 증가된다고 보고하였다. 또한, Yiin 등(1996)은 망간 노출 근로자의 혈장에서 MDA의 증가와 동시에 SOD, glutathione peroxidase 및 catalase와 같은 항산화효소 활성도가 증가된다고 보고하였으며, Slood 등(1996)은 흰쥐 뇌의 선조체에서 이염화망간이 산소유리기의 일종인 hydroxyl radical(OH $\cdot$ )의 생성을 촉진시키는 결과를 관찰함으로써 망간독성이 산소유리기가 매개된 과도한 지질과산화반응에 기인한다는 가설을 뒷받침하고 있다.

PUFAs는 대부분이 linoleic acid와 linolenic acid로부터 합성되는데, 이들은 인체내에서 합성되지 않는 필수지방산으로 음식을 통해 흡수된다. 첫번째 이중결합의 위치에 따라 n-3계와 n-6계로 분류되며, n-3계에는 linolenic acid와 이로부터 합성된 eicosapentanoic acid(EPA), docosahexanoic acid(DHA) 등이 포함되고, n-6계에는 linoleic acid와 이로부터 합성된 arachidonic acid(AA)가 포함된다(Youdim *et al.*, 2000). 생체세포에서 지방산은 세포막의 구조적인 통합성과 막유동성(Stillwell 등, 1993), 효소의 활성도(Shikano 등, 1993) 지질과 단백질간의 상호작용(Salem과 Niebylski, 1995) 및 prostaglandin, leukotriene, thromboxane 같은 eicosanoid 합성을 위한 전구체로서의 역할 등 다양한 생물학적 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다. 한

편, PUFAs는 동맥경화, 관상동맥질환, 급성 심장사(Albert *et al.*, 1998; Nordoy, 1999)를 비롯하여, 간질성 경련(Vreugdenhil 등, 1996), 우울증(Hibbeln, 1998), 양극성 행동질환(Stoll 등, 1999) 같은 중추신경계 질환의 위험도를 감소시키거나 예방하는 효과를 보이며, 이는 주로 n-3계 PUFAs 특히, DHA와 EPA가 관여하여 나타난 결과로 알려져 있다.

일부 연구들에 의하면, n-3계 PUFAs에 기인되는 유익한 생물학적 효과가 산소유리기와 관련된 기전에 의해 나타나는 결과임을 보여주고 있다. 즉, Benito 등(1997)은 섬유모세포 배양액에 첨가된 5.6%의 EPA에 의해 SOD, glutathione peroxidase 등 항산화효소의 활성도가 증가된다고 하였으며, Relton 등(1993)과 Glozman 등(1998)은 동물실험을 통해 이미 산소유리기에 의한 병리기전이 잘 알려져 있는 뇌조직의 허혈성 손상이 DHA 공급에 의해 억제된다고 하였으며, Billman 등(1994)은 심근허혈 손상에서도 동일 효과가 있음을 보고하였다. Youdim과 Deans(1999)는 연령이 증가할수록 말초조직에서 산소유리기는 증가하고 PUFAs는 감소한다고 하였고, Urano 등(1998)은 연령증가에 따라 뇌세포에서 지질과산화물의 증가와 형태적·기능적 변화가 수반되며, 이것은 세포막의 PUFAs 특히, DHA의 감소와 관련되어 나타나는 결과라고 하였다.

이 연구에서 망간주사 후 관찰된 지방산 조성 변화의 특징은 DHA와 EPA 같은 n-3계 PUFAs의 감소였다. 이 결과는 망간이 n-6계인 linoleic acid에는 증가를 초래하였지만 n-3계인 linolenic acid에는 영향을 주지 못하였고 이로 인해 DHA와 EPA의 합성이 줄어 DHA 및 EPA의 감소된 현상을 보이는 것으로 사료된다. 이것은 상기 연구들에 비추어 볼 때, 산소유리기로 매개된 과도한 지질과산화반응의 결과라고 사료되며, SOD활성도의 변화와 MDA의 증가가 동반된 결과로도 확인할 수 있었다. 한편, Lauritzen 등(2000)은 소뇌 과립세포 배양액에 투입된 linolenic acid가 허혈에 의한 경련과 신경세포사를 예방하는 효과를 보이지만, 포화지방산(saturated fatty acids, 이하 SFAs)은 신경보호작용이 없다는 결과를 얻었는데, 본 연구에서도 myristic acid를 제외한 SFAs와 단일불포화지방산(monounsaturated fatty acids, 이하 MUFAs)이 망간주사군에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 이것은 SFAs와 MUFAs가 산소유리기에 의한 지질과산화에 의한 손상에 민감하지 않음을 시사하며, 이는 산소유리기가 C=C 이중결합 위치를 공격하고 다수의 이중결합 구조를 지닌 PUFAs가 지질과산화반응에 취약하다는 사실(Esterbauer 등, 1991)과도 일치된다.

이 연구에서 관찰된 지방산 조성의 또 다른 특징적 변화는 n-3계 PUFAs의 감소와 동반된 n-6계 PUFAs인 AA의 증가였다. 이러한 특징은 n-3계에 대한 n-6계 비값의 비교에서 더욱 현저하게 나타났다. 이와 같은 지방산 조성의 불

균형은 노화, 스트레스, 질병 등의 다양한 조건에서도 관찰된다(Hummel, 1993; Simopoulos, 1991). 또한, Donaldson과 Knowles(1993)는 연중독에서 보이는 생물학적 변화가 지질과산화반응의 증가에 기인되고, 조직에서는 AA가 증가되는 특징을 보인다고 하였으며, Osterode와 Ulberth(2000)도 연에 노출된 근로자의 적혈구막에서 AA 농도가 연농도에 비례하여 증가된다고 보고하였다.

AA의 합성은 dihomogamma linolenic acid로부터 합성되며, phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)가 속도조절효소로 작용된다. 따라서 망간이 PLA<sub>2</sub>의 합성 또는 활성도를 증가시키는 작용을 한다면 결국, AA의 증가가 초래될 것이라 예측되지만, 본 연구에서는 이 주제를 다루지 못하였다. 한편, Shikano 등(1993)과 Martin(1998)은 정확한 기전은 모르지만, DHA가 PLA<sub>2</sub>의 활성도를 저하시키는 작용이 있음을 보고하였는데, 이는 역으로 DHA의 감소가 PLA<sub>2</sub>의 활성도의 증가를 유발하고, 결과적으로 AA가 증가할 가능성이 있음을 시사한다고 사료된다. 따라서 차후 연구에서 망간의 PLA<sub>2</sub>에 대한 작용과 n-3계 PUFAs 특히, DHA와 EPA 투여가 망간독성에 미치는 영향에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과는 망간에 의해 생성된 산소유리기가 대뇌의 측중격핵에서 지방산의 조성변화를 초래한 것으로 사료된다. 망간에 의한 지방산 조성변화의 특징은 n-3계 PUFAs인 EPA, DHA의 감소와 n-6계 PUFAs인 AA의 증가였는데, MDA의 증가와 동반된 이러한 변화는 망간성 신경독성기전이 산소유리기 특히 O<sub>2</sub>가 관여하는 지질과산화반응에 의한 것임을 시사한다.

### 감사의 말씀

본 연구는 1999년 한양대학교 교내연구비 지원으로 이루어 졌기에 감사드립니다.

### 참고문헌

Albert, C. M., Hennekens, C. H., O'Donnell, C. J., Ajani, U. A., Carey, V. J., Willett, W. C., Ruskin, J. N. and Manson, J. E. (1998). Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *J. Am. Med. Assoc.* **279**, 23-28.

Archibald, F. S. and Tyree, C. (1987). Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Arch. Biochem. Biophys.* **256**, 638-650.

Barbeau, A. (1984). Manganese and extrapyramidal disorders. *Neurotoxicology* **5**, 13-36.

Benito, S., Fernandez, Y., Mitjavila, S., Moussa, M., Anglade, F. and Periquet, A. (1997). Phospholipid fatty acid composition affects enzymatic antioxidant defences in cultured Swiss 3T3 fibroblasts. *Redox Rep.* **3**, 281-286.

Billman, G. E., Hallaq, H. and Leaf, A. (1994). Prevention of ischemia-induced ventricular fibrillation by  $\omega$ 3 fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4427-4430.

Bonilla, E. (1980) L-tyrosine hydroxylase activity in the rat brain after chronic oral administration of manganese chloride. *Neurobehav. Toxicol.* **2**, 37-41.

Calne, D. B., Chu, N. S., Huang, C. C., Lu, C. S. and Olanow, W. (1994). Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. *Neurology* **44**, 1583-1586.

Chandra, S. V., Shukla, G. S. and Srivastava, R. S. (1981). An exploratory study of manganese exposure to welders. *Clin. Toxicol.* **18**, 407-416.

Cramner, J. M. (1998). Report on the fifteenth international neurotoxicology conference. *Neurotoxicology* **19**, 443-445.

Donaldson, W. E. and Knowles, S. O. (1993). Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes? *Comp. Biochem. Physiol.* **104C**, 377-379.

Esterbauer, H., Shauer, R. J. and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 91-128.

Glozman, S., Green, P. and Yavin, E. (1998). Intraamniotic ethyl docosahexanoate administration protects fetal rat brain from ischemic stress. *J. Neurochem.* **70**, 2484-2491.

Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**, 1609-1623.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1998). Free radicals in biology and medicine. Oxford university press., Oxford.

Hibbeln, J. R. (1998). Fish consumption and major depression. *Lancet* **351**, 1210-1213.

Huang, C. C., Chu, N. S., Lu, C. S., Chen, R. S. and Calne, D. B. (1998). Long-term progression in chronic manganism: ten years of follow-up. *Neurology* **50**, 698-700.

Hummel, D. S. (1993). Dietary lipids and immune function. *Prog. Food Nutr. Sci.* **17**, 327-329.

Hurley, L. S. (1981). Teratogenic aspects of manganese, zinc, and copper nutrition. *Physiol. Rev.* **61**, 249-295.

Hussain, S., Rodgers, D. A., Duhart, H. M. and Ali, S. F. (1997). Mercuric chloride-induced reactive oxygen species and its effect on antioxidant enzymes in different regions of rat brain. *J. Environ. Sci. Health B* **32**, 395-409.

Knight, J. A. and Voorhees, R. P. (1990). Peroxidation of linolenic acid catalysis by transition metal ions. *Anal. Clin. Lab. Sci.* **20**, 347-352.

Kontur P. J. and Rechter L.D. (1988). Brain regional manganese level and monoamine metabolism in manganese-treated neonatal rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **10**, 295-303.

Lauritzen, I., Blondeau, N., Heurteaux, C., Widmann, C., Romey, G. and Lazdunski, M. (2000). Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotects. *EMBO J.* **19**, 1784-1793.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin reagent *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Manca, D., Ricard, A., Trottier, B. and Chevalier, G. (1991). Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium

- chloride. *Toxicology* **67**, 303-323.
- Markesby, W. R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Rad. Biol. Med.* **23**, 134-147.
- Martin, R. E. (1998). Docosahexanoic acid decreases phospholipase A<sub>2</sub> activity in the neuritis/nerve growth cones of PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **15**, 805-13.
- Mason, R. P., Walter, M. F. and Mason, P. E. (1997). Effect of oxidative stress on membrane structure: small angle X-ray diffraction analysis. *Free Rad. Biol. Med.* **23**, 419-425.
- Mena, I., Marin, O., Fuenzalida, S. and Cotzias, G. C. (1967) Chronic manganese poisoning: clinical picture and manganese turnover. *Neurology* **17**, 128-136.
- Misiewicz, A., Radwan, K., Misiewicz, A. and Dziewit, T. (1999). Malonyl dialdehyde concentration in red blood cells of workers engaged in the production of iron-manganese alloys. *Med. Pr.* **50**, 277-281.
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). (1997). Pocket guide to chemical hazards. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Cincinnati. OH: NIOSH Publication
- Osterode, W. and Ulberth, F. (2000). Increased concentration of arachidonic acid in erythrocyte membranes in chronically lead-exposed men. *J. Toxicol. Environ. Health, part A* **59**, 87-95.
- Relton, J. K., Strijbos, P. J. L. M., Cooper, A. L., Rothwell, N. J. (1993). Dietary n-3 fatty acids inhibit ischemic and excitotoxic brain damage in the rat. *Brain Res. Bull.* **32**, 223-226.
- Salem, N. J. and Niebylski, C. D. (1995). The nervous system has an absolute molecular species requirement for proper function. *Mol. Membr. Biol.* **12**, 131-134.
- Segura-Aguilar, J. and Lind, C. (1989). On the mechanism of the Mn<sup>3+</sup>-induced neurotoxicity of dopamine: prevention of quinone-derived oxygen toxicity by DT diaphorase and superoxide dismutase. *Chem. Biol. Interact.* **72**, 309-324.
- Shah, S. V., Cruz, F. C. and Baricos, W. H. (1983). NADPH induced chemiluminescence and lipid peroxidation in kidney microsome. *Kidney Int.* **23**, 691-698.
- Shikano, M., Masuzawa, Y. and Yazawa, K. (1993). Effect of docosahexanoic acid on the generation of platelet-activating factor by eosinophilic leukemia cells, Eo1-1. *J. Immunol.* **15**, 3525-3533.
- Simopoulos, A. P. (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 438-463.
- Sloot, W. N., Korf, J., Koster, J. F. and De Wit, L. E. (1996). Gramsbergen JB. Manganese-induced hydroxyl radical formation in rat striatum is not attenuated by dopamine depletion or iron chelation *in vivo*. *Exp. Neurol.* **138**, 236-45.
- Stajn, A., Zikic, R. V. and Ogrjanovic, B. (1997). Effect of cadmium and selenium on the antioxidant defense system in rat kidneys. *Comp. Biochem. Physiol.* **117**, 167-172.
- Stillwell, W., Ehringer, W. and Jenki, L. J. (1993). Docosahexanoic acid increases permeability of lipid vesicles and tumor cells. *Lipids* **28**, 103-108.
- Stoll, A. L., Severus, E., Freeman, M. P., Rueter, S., Zboyan, H. A., Diamond, E., Gress, K. K. and Marangell, L. B. (1999). Omega 3 fatty acids in bipolar disorder: a preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *Arch. Gen. Psychiatry* **56**, 413-416.
- Sugiyama, M. (1994). Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. *Cell Biol. Toxicol.* **10**, 1-22.
- Sun, Y., Oberley, L. W. and Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* **34**, 497-500.
- Sunderman, F. W., Hopfer, S. M., Lin, S. M., Plowman, M. C., Stojanovic, T. and Wong, S. H. Y. (1989). Toxicity to alveolar macrophages in rats following parenteral injection of nickel chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **100**, 107-118.
- Urano, S., Sato, Y., Otonari, T., Makabe, S., Susuki, S., Ogata, M. and Endo, T. (1998). Aging and oxidative stress in neurodegeneration. *Biofactors* **7**, 103-112.
- Vreugdenhil, M., Bruehl, C., Voskuyl, R. A., Kang, J. X., Leaf, A. and Wadman, W. J. (1996). Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12559-12563.
- Yiin, S. J. and Lin, T. H. (1994). Lipid peroxidation in workers exposed to lead. *Arch. Environ. Health* **186**, 1-17.
- Yiin, S. J., Lin, T. H. and Shin, T. S. (1996). Lipid peroxidation in workers exposed to manganese. *Scand. J. Work Environ. Health* **22**, 381-386.
- Youdim, K. A. and Deans, S. G. (1999). Beneficial effects of thyme oil on age-related changes in phospholipid C20 and C22 polyunsaturated fatty acid composition of various rat brain. *Brit. J. Nutr.* **1438**, 140-146.