

엽산 보충이 호모시스틴 식이에 의해 유발된 고호모시스테인혈증과 간의 S-Adenosylmethionine 대사에 미치는 영향*

김지명 · 이화영** · 장남수§

이화여자대학교 식품영양학과, 이화여자대학교 의과대학 해부학교실**

Effects of Dietary Folate Supplementation on the Homocystine Diet-Induced Hyperhomocysteinemia and Hepatic S-Adenosylmethionine Metabolism in Rats*

Kim, Ji-Myung · Lee, Hwa Young** · Chang, Namsoo§

Department of Food and Nutritional Science, Ewha Women University, Seoul 120-750, Korea

Department of Anatomy, ** College of Medicine, Ewha Women University, Seoul 120-750, Korea

ABSTRACT

We investigated the effects of dietary folate supplementation on plasma homocysteine, vitamin B₁₂ and hepatic levels of S-adenosylmethionine (SAM) and S-adenosylhomocysteine (SAH) in diet-induced hyperhomocysteinemic rats. All animals were fed 0.3% homocysteine diet for 2 weeks, then they were placed either on a 0.3% homocystine or no homocystine with or without 8 mg/kg folate diet for 8 weeks. Homocystine diet induced hyperhomocysteinemia up to 3.5-fold at 10 weeks ($28.0 \pm 4.8 \mu\text{mol/l}$ vs. $7.9 \pm 0.3 \mu\text{mol/l}$). Dietary folate supplementation caused a significant decrease in plasma homocysteine levels which had been increased by a homocystine-diet. Also, dietary folate supplementation made them return to control levels at 4 wk when the diet was free of homocystine. Plasma folate levels were markedly decreased with homocystine diet with no folate supplementation. Plasma vitamin B₁₂ did not differ between groups. Dietary homocystine increased hepatic levels of SAM in folate supplementation group at 10 weeks ($p < 0.05$). Dietary folate supplementation increased hepatic levels of SAM/SAH ratios in homocystine group ($p < 0.05$). In conclusion, dietary folate supplementation can effectively ameliorate the detrimental effects of hyperhomocysteinemia. (Korean J Nutrition 36(8) : 811~818, 2003)

KEY WORDS : hyperhomocysteinemia, folate, S-adenosylmethionine (SAM), S-adenosylhomocysteine (SAH).

서 론

최근 소득수준의 향상 및 노령화 사회의 도래로 인해 고호모시스테인혈증 인구가 증가하는 추세에 있으며 이에 따라 관상심장질환, 대혈관 질환, 뇌혈관 질환 뿐 아니라 뇌의 유전자적 수준의 손상, 뇌 기능의 악화로 인한 치매 등 뇌질환이 증가하는 것으로 보고되고 있다.^{1,2)}

고호모시스테인혈증의 혈관독성기전으로는 산화적 손상,³⁾ 메틸공여체 결핍으로 인한 DNA나 기타 생물학적 기능을 지닌 체내 주요 물질의 hypomethylation^{4,5)} 등이 거론되고

있다. 호모시스테인의 혈관독성기전을 설명하는 산화적 손상기전은 혈관 내피세포의 peroxide 생성 증가, 간조직의 TBARS증가, superoxide dismutase감소, glutathione peroxidase 감소, vitamin E와 glutathione의 감소 등 항산화 능이 감소된다는 증거에 의해 뒷받침되고 있다.³⁾ 해마 신경 세포를 이용한 연구에서 호모시스테인이 DNA 손상, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 활성 및 p53 유발 등의 기전을 통해 신경세포고사를 유도하며, 흥분자극에 대한 신경세포의 취약성을 증가시킴으로써 고호모시스테인혈증과 관련된 신경퇴행성질환들의 병리기전에 참여할 가능성이 제시된 바 있다.⁶⁾

혈액에 호모시스테인이 축적되는 원인으로는 크게 유전 요인, 다른 질병으로 인한 2차요인, 영양요인으로 나누어볼 수 있으며, 유전요인으로는 호모시스테인을 cystathionine으로 전환시키는 효소인 cystathionine synthase의 결핍이나, methylenetetrahydrofolate reductase의 변이, methio-

접수일 : 2003년 5월 9일

제작일 : 2003년 10월 15일

'This study was supported by a grant from the Korea Health 21 R&D project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (02-PJ1-PG10-22003-0002).

*To whom correspondence should be addressed.

nine synthase 변이등을 들 수 있다.^{7,8)} 혈중 호모시스테인 수준은 비타민 B군의 영양상태, 특히 엽산 상태에 의해 영향을 받는다. 엽산은 체내에서 tetrahydrofolate로 환원된다, 단일 탄소기와 결합하여 단일탄소 전이반응의 조효소로 작용하며 purine과 thymidylate의 생합성의 필수적인 요소로서, DNA 복제와 세포의 증식, 분화, 성장과정에 영향을 주기 때문에 엽산이 결핍되면 거대적아구성 빈혈 등의 혈액학적 이상을 초래할 뿐만 아니라 신경관 결함, 심혈관계질환, 암 등 다양한 질환에서 유전자적 수준의 손상과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.^{9,10)}

호모시스테인은 엽산의 메틸기를 받아 메티오닌으로 전환된 후 methionine adenosyltransferase (MAT)에 의해 S-adenosylmethionine (SAM)으로 전환된다. SAM은 DNA, 단백질, 지질에서 일어나는 여러 transmethylation 반응의 주된 methyl donor로 이용되며 S-adenosylhomocysteine (SAH)로 전환되고, 이는 SAM transmethylation 반응의 강력한 inhibitor로 작용한다. SAH는 가역효소인 SAH hydrolase에 의해 adenosine과 호모시스테인으로부터 형성되거나, 또는 호모시스테인으로 가수분해된다.¹¹⁾ In vivo 연구들^{12,13)}을 살펴보면 쥐에서 식이의 methionine, choline 결핍시 체내 메티오닌이 고갈되면서 호모시스테인 수준이 증가하고, 이는 혈관내피세포의 증식, 동맥경화성 손상을 미칠 뿐 아니라 조직에서 SAM 수준이 감소하고 SAH 수준이 증가되는 hypomethylation 상태가 된다고 보고하고 있다.

동맥경화증, 허혈성 심장질환, 순환계질환 등의 혈관성 질환의 위험인자인 고호모시스테인혈증을 미리 예방하고 치료하는 것은 매우 중요하다. 고호모시스테인혈증에 대한 엽산 보충효과에 대해서는 잘 알려져 있으나 호모시스테인의 대사연구에서 아직까지 식이를 통한 고호모시스테인혈증 유발 동물모델을 이용하거나 또는 비타민 투여에 의한 고호모시스테인혈증 회복효과를 관찰한 연구는 없었다.

따라서 본 연구에서는 호모시스틴 함유 식이에 의해 증가된 혈장 호모시스테인 수준 및 식이 엽산 보충이 비타민 영양상태 및 간에서의 호모시스테인 methylation 대사에 미치는 영향을 알아보고자 혈중 호모시스테인, 비타민 및, 간의 SAM, SAH 농도 변화를 관찰하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험계획

Table 1에서 제시한 바와 같이 본 실험에서는 실험동물에게 0.3% 호모시스틴이 함유된 식이를 2주간 먹여 고호모시스테인혈증을 유발한 후, 실험군을 식이의 호모시스틴

첨가 유무에 따라 2군, 엽산 보충 유무에 따라 2군으로 나누어 실험식이로 총 10주간 사육하였다. 호모시스틴 식이 섭취 및 엽산 보충에 의한 혈중 호모시스테인 수준의 변화 및 체내 엽산대사에 미치는 영향을 알아보고자 사육기간별 2주 4주, 10주로 총 3회에 걸쳐 6마리씩 실험동물을 희생하였다.

2. 실험동물 사육 및 식이

본 실험에서는 생후 8주된 Sprague Dawley종 수컷쥐를 체중에 따라 난괴법에 의하여 72마리를 5군으로 나누었다. 실험동물들은 1주일간 고형배합사료[(주)삼육동물실험연구소]로 적응시킨 후, 실험식이를 공급하였다.

실험에 사용된 식이의 조성을 Table 2와 같다. 식이는 American Institute of Nutrition (AIN)-93M¹⁴⁾의 조성을 바탕으로 하였으며, 엽산 함량을 0 mg (결핍) 또는 8 mg/kg diet (보충) 두가지 수준으로 제조하였다. 호모시스틴 함유식이의 경우 호모시스틴을 3 g/kg diet으로 첨가하였다. 실험기간 중 물과 식이는 자유로이 섭취하도록 하였다. 동물 사육실의 환경은 온도 23 ± 1°C, 습도 50 ± 5%로 조정하였고, 12시간 명암주기를 유지하였다. 매일 일정한 시각에 식이량을 측정하였으며, 체중은 1주일에 한번씩 측정하였다.

3. 시료 채취

실험동물을 희생시키기 전 12시간을 절식시킨 후 에틸 에테르로 마취시켜 개복한 후 10 ml 주사기를 사용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 EDTA가 들어있는 원심분리관에 담아 4°C, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 혈장은 -70°C에 냉동 보관하여 엽산, 비타민 B₁₂ 및 호모시스테인 분석에 이용하였다. 혈액 채취 후 실험동물을 즉시 해부하여 간을 적출하고, 즉시 -70°C에 냉동 보관하여 SAM, SAH 분석에 이용하였다.

4. 혈장 호모시스테인 농도

혈장 호모시스테인 농도는 Araki와 Sako의 방법¹⁵⁾을 이용하여 HPLC로 분석하였다. 혈청 100 μl에 10% tri-n-butylphosphine 용액 10 μl을 첨가하여 4°C에서 30분간 방치한 후 10% trichloroacetic acid (TCA) 용액 100 μl를 가하고 4°C, 3000 × g에서 5분간 원심분리하였다. 상청액 100 μl에 1.55M NaOH 20 μl, 4 mM EDTA (ethylene diamine tetraacetatic disodium)를 함유하는 0.125 M borate buffer (pH 9.5) 250 μl, ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole 4-sulfonic acid (SBD-F) 용액 100 μl를 첨가한 후 60°C에서 1시간 동안 반응시켰

Table 1. Study design

Treatment group	Dietary treatments (wk)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C	C		C				C			
H (+)		FD		FD				FD		
H (-)		FD		FD				FD		
FH (+)		FD		F				F		
FH (-)		FD		F				F		

After the first 2 wk of homocystine diet without folate, diets were changed. The letter represent the diets available, with C: Control diet, FD: Folate deficient diet, F: Folate sufficient diet, Dark area: Homocystine diet, Light area: Homocystine-free diet. The treatment groups are designated by the diets offered

Table 2. Diet composition

Ingredients	Hcy-free diet [C, H (-), FH (-)] ¹⁾		Hcy diet [H (+), FH (+)]
	g/kg		
Cornstarch	466.8		463.8
Casein	140		140
Dextrinized cornstarch	155		155
Sucrose	100		100
Soybean oil	40		40
Fiber	50		50
Mineral mix ²⁾	35		35
L-cystine	1.8		1.8
Choline chloride	1.4		1.4
Terf-butylhydroquinone	0.008		0.008
Vitamin mix with or without folate ³⁾	10		10
Homocystine	0		3

1) C: Control group, H (-): Homocystine free group, FH (-): Folate sufficient group without homocystine, H (+): Homocystine group, FH (+): Folate sufficient group with homocystine

2) AIN-93 mineral mixture

3) AIN-93 vitamin mixture provided 0.008 g folate/kg in supplement diets [FH (-), FH (+)], 0.002 g folate/kg in control diet (C) and 0 g folate/ kg in deficient diets [H (-), H (+)]

다. 반응이 끝난 용액을 냉각시켜 0.45 μm filter (HV type, Whatman, Clifton, NJ, USA)로 여과시킨 후 automatic injector (Waters Co. MA, USA)로 20 μl 씩 column에 주입하여 분석하였다.

5. 혈장 엽산, 비타민 B₁₂ 농도

혈장 엽산, 비타민 B₁₂ 농도는 ⁵⁷Co/¹²⁵I Radioimmunoassay kit (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA)를 이용하여 γ -counter로 측정하였다.

6. 간 SAM, SAH 농도

간 조직의 SAM, SAH 농도는 HPLC-UV detection 방법¹⁶⁾을 이용하여 분석하였다. 100 mg의 간 조직을 취하여 0.4 M HClO₄ 용액을 조직 부피의 4배 양을 넣고, 균질화 시킨 후, 4°C, 10,000 × g에서 15분간 원심분리하였다. 상청액을 취하여 0.2 μm filter (PVDF, Whatman)로 여과시킨 후 automatic injector (Waters Co.)로 25 μl 씩 column에 주입하여 분석하였다.

7. 통계분석

모든 자료는 SAS 프로그램 (ver 8.0)을 이용하여 통계 처리하여 평균 ± 표준오차로 나타내었다. 2주간 호모시스틴 함유식이에 의해 고호모시스테인혈증이 유발된 실험군과 대조군간의 비교를 위하여 Student's t-test를 실시하였다. 4주, 10주째의 실험동물의 식이 섭취량, 체중 증가량, 혈장 호모시스테인, 엽산, 비타민 B₁₂ 농도 및 간의 SAM, SAH 수준, SAM/SAH ratio는 일원분산분석 후 Duncan의 multiple range test를 사용하여 사후 검증하였다. 혈장 호모시스테인 농도와 혈중 비타민 수준 및 간의 SAM, SAH 농도, SAM/SAH ratio와의 상관관계는 Pearson's correlation analysis를 이용하여 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 실험동물의 체중 및 식이섭취량

실험동물의 체중 증가량 및 식이섭취량은 Table 3에 제

Table 3. Daily food intake and weight gain of experimental rats

		Experimental period (Wk)		
		2	4	10
Food intake (g/d)	C	22.2 ± 1.0 ^{NS¹}	25.4 ± 3.0 ^{ab}	20.6 ± 1.0 ^a
	H (+)	30.9 ± 5.1	19.8 ± 1.2 ^a	19.4 ± 0.5 ^a
	H (-)		24.9 ± 1.6 ^{ab}	23.7 ± 0.9 ^b
	FH (+)	-	20.0 ± 1.1 ^a	20.7 ± 0.8 ^a
Weight gain (g/wk)	FH (-)		29.1 ± 3.4 ^b	20.7 ± 0.7 ^a
	C	29.8 ± 8.1 ^{NS}	25.0 ± 2.8 ^{ab}	15.9 ± 4.0 ^{NS}
	H (+)	34.6 ± 5.5	18.1 ± 3.9 ^a	19.4 ± 3.1
	H (-)		35.7 ± 5.0 ^b	17.6 ± 1.1
	FH (+)	-	19.2 ± 1.5 ^a	11.6 ± 0.8
	FH (-)		31.3 ± 2.8 ^b	12.5 ± 2.5

All values are mean ± SE (n = 6)

1) Not significantly different compared to the value for control rats by student's t-test at p < 0.05. Values within a column with different superscripts are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

Table 4. Plasma homocysteine concentrations in experimental rats

		Experimental period (Wk)		
		2	4	10
C		7.1 ± 0.6	6.5 ± 0.4 ^a	7.9 ± 0.3 ^a
H (+)		18.7 ± 2.4 ^{**}	26.2 ± 2.5 ^c	28.0 ± 4.8 ^b
H (-)			14.7 ± 0.7 ^b	25.7 ± 2.5 ^b
FH (+)		-	16.3 ± 1.2 ^b	10.0 ± 1.0 ^a
FH (-)			10.2 ± 0.7 ^a	8.1 ± 0.7 ^a

All values are mean ± SE (n = 6)

**: Significantly different compared to the value for control rats by student's t-test at p < 0.01. Values within a column with different superscripts are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

시하였다. 실험 개시 당시의 평균 체중은 280.8 ± 10.5 g 이었다. 2주간 호모시스틴 식이를 섭취한 군의 식이섭취량은 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 4주에는 엽산 보충 유무와는 상관없이 호모시스틴 함유된 식이군의 섭취량이 엽산을 보충한 호모시스틴 제거군보다 유의적으로 감소하였으나 대조군과는 차이가 없었다. 10주에는 호모시스틴 제거한 군만이 대조군의 식이섭취량보다 유의적으로 높았으며 다른 군들에서는 대조군과 차이가 없었다.

2주간 호모시스틴 식이를 섭취한 군의 체중 증가량은 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 4주에는 엽산 보충 유무와는 상관없이 호모시스틴 함유된 식이군의 체중 증가량이 호모시스틴 제거군보다 유의적으로 감소하였으나 대조군과는 차이가 없었다. 10주에는 군간에 체중 증가량이 차이를 보이지 않았다.

2. 혈장 호모시스테인 농도

실험동물의 혈장 호모시스테인 농도를 살펴보면 Table 4에서 제시된 바와 같이 호모시스틴 식이를 2주간 섭취한 경우 혈중 호모시스테인 수준은 대조군보다 2.6배 증가하였

으며 (18.7 ± 2.4 μmol/l vs. 7.1 ± 0.6 μmol/l, p < 0.01), 호모시스틴 식이를 10주까지 지속적으로 섭취시켰을 때 28.0 ± 4.8 μmol/l까지 증가하였다 (약 3.5배). 엽산결핍식이에서 호모시스틴을 제거하였을 경우 2주에 비해 4주에는 혈중 호모시스테인 수준이 약간 감소 경향을 보이다가, 10주에는 다시 증가하였다. 2주간 호모시스틴 식이에 의해 증가되었던 혈중 호모시스테인 농도가 8주간 엽산보충시 호모시스틴군 (10.0 ± 1.0 μmol/l), 호모시스틴 제거군 (8.1 ± 0.7 μmol/l) 모두에서 감소하여 대조군과 유의적인 차이가 없었다.

3. 혈장 엽산 및 비타민 B₁₂ 농도

호모시스테인 식이 및 엽산 보충에 따른 실험동물의 혈장 엽산 및 비타민 B₁₂ 농도 변화는 Table 5에 제시하였다. 2주간 호모시스틴 식이를 섭취할 경우 대조군의 혈장 엽산 수준에 비해 유의적으로 감소하였으며, 사육기간이 경과할수록 혈장 엽산수준이 감소하는 경향을 보였다. 2주간 호모시스틴 식이에 의해 고호모시스테인혈증이 유발된 동물에서 호모시스틴을 식이에서 제거하더라도 혈장 엽산수준에

는 영향을 미치지 못했다. 고호모시스테인혈증이 유발된 동물에서 호모시스틴 식이를 계속 공급하면서 엽산을 보충할 경우에는 2주만에 혈장 엽산 농도가 증가하여 대조군과 차이를 보이지 않았다.

혈장 비타민 B₁₂ 수준은 호모시스틴 섭취 및 엽산 보충여부에 상관없이 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

4. 간의 SAM, SAH, SAM/SAH Ratio

호모시스테인 식이 및 엽산 보충에 따른 실험동물의 간내 SAM, SAH 및 SAM/SAH ratio 수준은 Table 6에 제시하였다. 간의 SAM, SAH 수준 및 SAM/SAH ratio는 2주간 호모시스틴 식이에 의해 고호모시스테인혈증을 유발할

경우 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 고호모시스테인혈증 유발 후 호모시스틴 식이 유무 및 엽산 보충 유무에 따라 사육할 경우 4주에는 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 10주에는 SAM 수준이 엽산을 보충할 경우 호모시스틴 식이군보다 호모시스틴을 제거한 군에서 유의적으로 낮게 나타났고 ($p < 0.05$), SAM/SAH ratio에서는 호모시스틴 식이군에서 엽산을 보충한 군이 엽산이 결핍된 군보다 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.05$).

5. 혈장 비타민 수준과 간의 SAM, SAH, SAM/SAH Ratio와 혈장 호모시스테인 수준과의 상관관계

혈장 비타민 수준 및 간의 SAM, SAH, SAM/SAH ratio

Table 5. Plasma folate and vitamin B₁₂ concentrations in experimental rats

		Experimental period (Wk)		
		2	4	10
Folate ($\mu\text{mol/l}$)	C	118.4 ± 14.0	98.0 ± 7.9 ^b	102.3 ± 23.5 ^b
	H (+)	32.3 ± 2.4*	22.8 ± 4.4 ^a	19.6 ± 1.6 ^a
	H (-)		24.2 ± 1.4 ^a	15.5 ± 1.6 ^a
	FH (+)	—	101.5 ± 10.4 ^b	103.7 ± 13.0 ^b
	FH (-)		133.1 ± 18.1 ^c	118.8 ± 20.5 ^b
Vitamin B ₁₂ (pmol/l)	C	992.8 ± 88.0 ^{NS}	852.4 ± 197.1	881.0 ± 119.0
	H (+)	978.4 ± 157.8	892.4 ± 172.8	910.7 ± 173.6
	H (-)		967.6 ± 209.7	586.3 ± 92.5
	FH (+)	—	989.1 ± 78.8	877.5 ± 97.3
	FH (-)		775.3 ± 38.3	769.5 ± 76.6

All values are mean ± SE (n = 6)

*: Significantly different compared to the value for control rats by student's t-test at $p < 0.05$. Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 6. Hepatic levels of SAM, SAH, SAM/SAH ratio of experimental rats

		Experimental period (Wk)		
		2	4	10
SAM ($\mu\text{mol/g tissue}$)	C	14.0 ± 0.7 ^{NS1)}	13.2 ± 0.0 ^{NS}	14.5 ± 0.0 ^{ab}
	H (+)	13.7 ± 0.6	14.3 ± 0.9	15.8 ± 0.7 ^{ab}
	H (-)		12.9 ± 0.7	14.5 ± 0.6 ^{ab}
	FH (+)	—	13.8 ± 0.7	17.5 ± 1.1 ^b
	FH (-)		12.8 ± 1.0	13.4 ± 0.7 ^a
SAH ($\mu\text{mol/g tissue}$)	C	8.7 ± 0.0 ^{NS}	9.1 ± 0.1 ^{NS}	7.6 ± 0.0 ^{NS}
	H (+)	12.1 ± 1.1	12.5 ± 1.1	12.7 ± 2.6
	H (-)		8.8 ± 0.7	8.6 ± 0.8
	FH (+)	—	9.0 ± 2.6	7.3 ± 0.1
	FH (-)		6.9 ± 1.0	7.8 ± 0.6
SAM/SAH ratio	C	1.6 ± 0.2 ^{NS}	1.5 ± 0.1 ^{NS}	1.9 ± 0.1 ^{ab}
	H (+)	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.0	1.3 ± 0.3 ^a
	H (-)		1.5 ± 0.0	1.7 ± 0.2 ^{ab}
	FH (+)	—	1.7 ± 0.6	2.4 ± 0.2 ^b
	FH (-)		1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.0 ^{ab}

All values are mean ± SE (n = 6)

1) Not significantly different compared to the value for control rats by student's t-test at $p < 0.05$. Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 7. Relationship between plasma homocysteine and other parameters

	Pearson correlation coefficient
Folate	-0.66745***
Vitamin B ₁₂	-0.02330
SAM	0.06304
SAH	0.11684
SAM/SAH ratio	-0.09065

***: p<0.001

와 혈장 호모시스테인 수준과의 상관관계를 살펴본 결과, 혈장 엽산만이 호모시스테인 수준과 유의적인 음의 상관관계를 보였다 ($r = -0.67$, $p < 0.001$) (Table 7).

고 찰

본 연구는 호모시스틴 식이로 유발한 고호모시스테인혈증 동물모델에서 호모시스틴을 식이로 공급하였을 때 나타나는 영양상태와 혈중 호모시스테인 수준의 변화 및 엽산 보충시 나타나는 고호모시스테인혈증 회복효과 및 체내 엽산 대사를 조사하였다. 8주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐에게 0.3% 호모시스틴이 함유된 식이를 2주간 먹여 고호모시스테인혈증을 유발한 후 호모시스테인 투여 여부에 따라 2군, 엽산 보충 유무에 따라 2군으로 나누어, 실험식이로 총 10주간 사육하였다. 호모시스테인 식이 섭취 및 엽산 보충에 의한 혈중 호모시스테인 수준의 변화 및 체내 엽산대사에 미치는 영향을 알아보고자 사육기간별 2주 4주, 10주로 총 3회에 걸쳐 시료를 채취하였으며, 실험동물의 체중증가량, 식이섭취량, 혈장 호모시스테인, 엽산, 비타민 B₁₂ 수준 및 간의 SAM, SAH 농도 등을 측정하였다.

실험동물의 식이섭취량은 호모시스틴 식이를 2주간 섭취하는 동안에는 변화가 없었으나, 호모시스틴이 함유된 식이로 장기간 사육될 경우 식이섭취량이 감소하는 경향을 나타내었다. 호모시스틴 함유 식이를 섭취하는 경우 식이 섭취량이 감소하면서 체중 증가량도 감소되는 경향을 보였다. Gospe 등¹⁷⁾은 엽산을 결핍시킨 mice에서 식이를 훌트리는 식행동을 관찰하고, 식이섭취량 및 체중 증가량의 감소를 보고한 바 있다. 본 연구에서는 식이의 엽산 유무 보다는 호모시스틴 함유 유무가 식이섭취량 및 체중증가량을 감소시키는데 영향을 미치는 것으로 보였다. 이는 실험기간 동안 실험식이의 손실량을 줄이기 위하여 구멍이 여러개나 있는 stainless steel plate로 식이 위를 덮어주어, 엽산이 결핍된 쥐에서 식이를 훌트리는 식행동을 제한하므로써 엽산 결핍이 식행동에 미치는 영향보다는 호모시스틴 함유 식이

의 영향이 식이섭취량에 반영된 것으로 여겨진다.

본 연구에서는 호모시스틴 식이를 2주간 공급한 경우 혈중 호모시스테인 수준은 대조군보다 2.6배 증가하여 고호모시스테인혈증을 유발하였으며, 호모시스틴 식이를 10주까지 지속적으로 섭취시켰을 때 3.5배 증가하였다. Smith 등¹⁸⁾의 연구에서는 흰쥐에게 4.5% 호모시스틴을 첨가한 choline, methionine, 엽산이 결핍된 식이를 2주간 공급하였을 때 혈중 호모시스테인 농도가 $81.9 \pm 6.5 \mu\text{mol/l}$ 로 정상 수준의 10배 이상으로 급격히 증가하였으며, 엽산을 25 mg/kg diet로 2주간 보충하였을 때 혈장 호모시스테인 수준이 정상수준으로 돌아왔다. 호모시스틴 식이군은 식이에 함유되었던 호모시스틴과 엽산결핍에 의하여 혈중 호모시스테인 농도가 증가되다가 호모시스틴이 제거될 경우 2주간은 혈중 호모시스테인 농도가 감소되는 경향을 보였으나, 식이에서 호모시스틴이 없어졌더라도 엽산결핍이 지속될 경우 10주에는 다시 혈장 호모시스테인 수준이 증가되었다. 본 연구자들의 선행 연구에서는 8주간 엽산 결핍식이로 6개월령의 흰쥐를 사육하였을 때 혈중 호모시스테인 수준이 3.2 배 증가하였음을 보고하였다.¹⁹⁾ 본 실험모델에서는 단기간에 혈중 호모시스테인 수준을 증가시키는데 있어서 식이의 호모시스틴의 영향이 엽산결핍의 영향보다 더 크게 나타났으며, 장기간 엽산결핍시에는 식이의 호모시스틴을 제거하더라도 혈중 호모시스테인 수준이 계속 증가하는 것을 확인하였다.

호모시스테인 투여는 세포모델에서 뿐 아니라 동물모델에서도 투여 2주 내에 고호모시스테인혈증을 유발하며 혈관내피세포의 증식 (hyperplasia), 경화, 세포자멸사 (apoptosis)를 유발하고,²⁰⁻²³⁾ 권장량의 10배 이상 과량의 엽산투여는 이를 교정하는 것으로 보고된 바 있다.¹⁸⁾ 혈장 엽산 수준은 최근의 엽산 섭취상태를 반영하는 지표로서, 본 연구에서 2주간의 엽산 결핍에 의한 혈장 엽산 결핍상태는 적정한 식이 엽산 수준의 4배인 8 mg/kg diet 보충시 2주만에 바로 회복되었고, 고호모시스테인혈증도 감소되었다. 또한 식이로 공급된 호모시스틴은 혈장 엽산 영양상태에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 혈장 비타민 B-12 수준은 10주간의 실험기간동안에는 호모시스틴 섭취 및 엽산 보충여부에 상관없이 차이를 보이지 않았다.

여러 동물 연구에서는 엽산, 메티오닌, 콜린, 비타민 B₁₂ 결핍시 간의 SAM 수준이 감소되고, SAH 수준이 증가되며, SAM/SAH ratio가 유의적으로 감소하였음을 보고하였다.^{11-13,24)} Southern 등²⁰⁾은 1.5% 및 3.0% 호모시스틴 식이로 유발한 고호모시스테인혈증 동물에서 간의 SAM, SAH 수준 및 SAM/SAH ratio가 감소하였으며, 간의 SAM 수

준과 혈중 호모시스테인간에 유의적인 음의 상관관계를 보였다고 하였다. Dayal 등²⁵⁾은 호모시스테인이 혈관내피세포를 증식시켜며, hypomethylation을 유도함을 확인하였다. 또한 식이의 methionine, choline을 결핍시킬 경우 체내 메티오닌이 고갈되면서 동맥경화성 손상 뿐 아니라 조직에서 SAM 수준이 감소하고 SAH 수준이 증가하였다.¹³⁾ SAH가 호모시스테인으로 가수분해되는 반응은 가역적이기 때문에 호모시스테인 수준이 증가할 경우 대개 SAH도 증가하는 경향을 보인다. 본 실험을 계획하면서 호모시스틴 식이에 의하여 유발된 고호모시스테인혈증으로 인해 간의 SAM 수준이 감소하며 엽산보충시 호모시스테인에 메틸기를 전달 하므로써 SAM이 증가할 것으로 기대하였으나, 연구결과 간의 SAM, SAH 수준 및 SAM/SAH ratio는 호모시스틴 식이에 의해 고호모시스틴혈증을 유발한 후 호모시스틴 식이 유무 및 엽산 보충 유무와는 상관없이 4주까지는 차이를 보이지 않았다. SAM 수준에 있어서 10주에는 엽산 보충 유무에 의한 영향은 없었으며, 엽산을 보충할 경우 오히려 호모시스틴을 제거한 군에서 호모시스틴군의 수준보다 감소하였다 ($p < 0.05$). SAM/SAH ratio에서는 호모시스틴 식이군에서 엽산을 보충한 군이 엽산이 결핍된 군보다 유의적으로 높게 나타나 ($p < 0.05$), Southern 등²⁰⁾의 연구결과와 동일한 경향을 보였으나 혈중 호모시스테인과의 상관성을 보이지는 않았다.

본 연구 결과 호모시스틴 함유식이로 유발된 고호모시스테인혈증은 식이 엽산을 장기간 보충할 때 혈중 호모시스테인 수준 및 엽산 영양상태가 정상으로 회복 될 수 있었다. 고호모시스테인혈증이 유발된 동물에서 엽산보충이 간에서 호모시스테인 대사에 어떠한 영향을 미치는지에 관한 체계적인 연구가 더 필요할 것으로 보인다. 본 실험 결과 동맥경화증, 허혈성 심장질환, 순환계질환 등의 혈관성 질환의 위험인자인 고호모시스테인혈증의 예방 및 치료에 있어서 엽산을 장기간 보충하므로써 이러한 위험요인을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구는 호모시스틴 식이로 유발한 고호모시스테인혈증 동물모델에서 호모시스틴을 식이로 공급하였을 때 나타나는 영양상태와 혈중 호모시스테인 수준의 변화 및 엽산보충시 나타나는 고호모시스테인혈증 회복효과 및 체내 엽산 대사를 조사하였다. 8주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐에게 0.3% 호모시스틴이 함유된 식이를 2주간 먹여 고호모시스테인혈증을 유발한 후 호모시스테인 투여 여부에

따라 2군, 엽산 보충 유무에 따라 2군으로 나누어, 실험식으로 총 10주간 사육하였다. 호모시스테인 식이 섭취 및 엽산 보충에 의한 혈중 호모시스테인 수준의 변화 및 체내 엽산대사에 미치는 영향을 알아보고자 사육기간별 2주 4주, 10주로 총 3회에 걸쳐 시료를 채취하였으며, 실험동물의 체중증가량, 식이섭취량, 혈장 호모시스테인, 엽산, 비타민 B₁₂ 수준 및 간의 SAM, SAH 농도 등을 측정하였다.

호모시스틴 식이를 2주간 섭취한 경우 혈중 호모시스테인 수준은 대조군보다 2.6배 증가하였으며 ($18.7 \pm 2.4 \mu\text{mol/l}$ vs. $7.1 \pm 0.6 \mu\text{mol/l}$, $p < 0.05$), 호모시스틴 식이를 10주까지 지속적으로 섭취시켰을 때 $28.0 \pm 4.8 \mu\text{mol/l}$ 까지 증가하였다. 엽산결핍식이에서 호모시스틴을 제거하였을 경우 2주에 비해 4주에는 혈중 호모시스테인 수준이 약간 감소 경향을 보이다가, 10주에는 다시 유의적으로 증가하였다. 호모시스틴 식이에 의해 증가되었던 혈중 호모시스테인 농도가 8주간 엽산보충시 호모시스틴군 ($10.0 \pm 1.0 \mu\text{mol/l}$), 호모시스틴 제거군 ($8.1 \pm 0.7 \mu\text{mol/l}$) 모두에서 감소하여 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 혈장 엽산 수준은 호모시스틴 식이를 섭취하더라도 엽산을 보충할 경우 대조군과 차이를 보이지 않았다. 혈중 비타민 B-12 수준은 군간에 차이를 보이지 않았다. 간의 SAM, SAH, SAM/SAH ratio는 2, 4주에는 군간에 차이를 보이지 않았으나, 10주에는 SAM 수준이 엽산을 보충할 경우 호모시스틴 식이군보다 호모시스틴을 제거한 군에서 유의적으로 낮게 나타났고 ($p < 0.05$), SAM/SAH ratio에서는 호모시스틴 식이군에서 엽산을 보충한 군이 엽산이 결핍된 군보다 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 동맥경화증, 허혈성 심장질환, 순환계질환 등의 혈관성 질환의 위험인자인 고호모시스테인혈증의 예방 및 치료에 있어서 엽산을 장기간 보충하므로써 이러한 위험요인을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다. 또한 고호모시스테인혈증이 유발된 동물에서 엽산보충 효과에 따른 호모시스테인 대사에 미치는 영향에 관한 체계적인 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

Literature cited

- 1) Selzman CH. Current approaches to therapy for vascular injury. *Expert Opin Pharmacother* 5: 753-764, 2001
- 2) Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function. *Nutr Rev* 59 (8 Pt 2) : S69-74, 2001
- 3) van Guldener C, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia, vascular pathology, and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 26 (3) : 281-289, 2000
- 4) Sohn KJ, Stempak JM, Reid S, Shirwadkar S, Mason JB, Kim YI. The effect of dietary folate on genomic and p53-specific DNA

- methylation in rat colon. *Carcinogenesis* 24(1) : 81-90, 2003
- 5) James SJ, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Caudill MA. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J Nutr* 132(8 Suppl) : 2361S-2366S, 2002
 - 6) Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 20(18) : 6920-6926, 2000
 - 7) Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 19: 217-246, 1999
 - 8) Selhub J, D'Angelo A. Relationship between homocysteine and thrombotic disease. *Am J Med Sci* 316(2) : 129-141, 1998
 - 9) House JD, Jacobs RL, Stead LM, Brosnan ME, Brosnan JT. Regulation of homocysteine metabolism. *Adv Enzyme Regul* 39: 69-91, 1999
 - 10) Bailey LB, Gregory JF 3rd. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 129(5) : 919-922, 1999
 - 11) Fu W, Dudman NP, Perry MA, Young K, Wang XL. Interrelations between plasma homocysteine and intracellular S-adenosylhomocysteine. *Biochem Biophys Res Commun* 271(1) : 47-53, 2000
 - 12) 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(1) : 46-52, 1997
 - 13) Henning SM, McKee RW, Swendseid ME. Hepatic content of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and glutathione in rats receiving treatments modulating methyl donor availability. *J Nutr* 119(10) : 1478-1482, 1989
 - 14) Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* 127(5 Suppl) : 838S-841S, 1997
 - 15) Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 422: 43-52, 1987
 - 16) Wang W, Kramer PM, Yang S, Pereira MA, Tao L. Reversed-phase high-performance liquid chromatography procedure for the simultaneous determination of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine in mouse liver and the effect of methionine on their concentrations. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 762(1) : 59-65, 2001
 - 17) Gospé SM Jr, Gietzen DW, Summers PJ, Lunetta JM, Miller JW, Selhub J, Ellis WG, Clifford AJ. Behavioral and neurochemical changes in folate-deficient mice. *Physiol Behav* 58(5) : 935-941, 1995
 - 18) Smith TP, Cruz CP, Brown AT, Eidt JF, Moursi MM. Folate supplementation inhibits intimal hyperplasia induced by a high-homocysteine diet in a rat carotid endarterectomy model. *J Vasc Surg* 34(3) : 474-481, 2001
 - 19) Kim JM, Lee H, Chang N. Hyperhomocysteinemia due to short-term folate deprivation is related to electron microscopic changes in the rat brain. *J Nutr* 132(11) : 3418-3421, 2002
 - 20) Southern F, Eidt J, Drouilhet J, Mukunyadzi P, Williams DK, Cruz C, Wang YF, Poirier LA, Brown AT, Moursi MM. Increasing levels of dietary homocystine with carotid endarterectomy produced proportionate increases in plasma homocysteine and intimal hyperplasia. *Atherosclerosis* 158(1) : 129-138, 2001
 - 21) Cook JW, Malinow MR, Moneta GL, Taylor LM, Orloff SL. Neointimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries: the influence of hyperhomocysteinemia. *J Vasc Surg* 35(1) : 158-165, 2002
 - 22) Ambrosi P, Rolland PH, Bodard H, Barlatier A, Charpiot P, Guisgand G, Friggi A, Ghiringhelli O, Habib G, Bouvenot G, Garcon D, Luccioni R. Effects of folate supplementation in hyperhomocysteinemic pigs. *J Am Coll Cardiol* 34(1) : 274-279, 1999
 - 23) Chen C, Surowiec SM, Morsy AH, Ma M. Intraperitoneal infusion of homocysteine increases intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries. *Atherosclerosis* 160(1) : 103-114, 2002
 - 24) Mason JB. Biomarkers of nutrient exposure and status in one-carbon (methyl) metabolism. *J Nutr* 133(Suppl 3) : 941S-947S, 2003
 - 25) Dayal S, Bottiglieri T, Arning E, Maeda N, Malinow MR, Sigmund CD, Heistad DD, Faraci FM, Lentz SR. Endothelial dysfunction and elevation of S-adenosylhomocysteine in cystathione beta-synthase-deficient mice. *Circ Res* 88(11) : 1203-1209, 2001