

엄마 쥐의 식이 섭취기간이 뇌의 오메가 3 지방산 결핍 동물 생성에 미치는 영향: 임신전 단계 실험식이 섭취 방법 vs 임신동물을 이용하는 방법

임 선 영*

한국해양대학교 해양환경생명과학부

Received June 21, 2006 / Accepted August 2, 2006

Effect of Length of Maternal Diet Intake on Production of Newborn Rats with Brain n-3 Fatty Acid Deficiency: Pre-pregnancy Method vs. Use of Time-pregnant Animals. Sun-Young Lim*. *Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan, 609-761, Korea* – This study was performed to determine whether the length of the feeding of the controlled experimental diet to the dam resulted in changes to the dam milk or pup brain fatty acid composition. As a first method, females have been obtained at 3 weeks of age and fed the experimental diet throughout their growth to adulthood including mating, pregnancy, and lactational periods. As a second method, in order to shorten this long and expensive process, time-pregnant dams were obtained as early as possible from a commercial supplier, on day 3 of gestation, and immediately switched to the experimental diet. At birth, the milk of dams prepared by these two different methods was compared by collecting the stomach contents of the pups. This showed a slight increase in docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA) in the pup stomach contents from the time-pregnant dams. There were no significant changes in the brain fatty acid composition of pups between the two different lengths of the experimental diet intake. By the 10 days of age, there were only minor differences in the milk fatty acid composition of pup stomach contents from the two sets of dams. However, the pup brains of the time-pregnant groups at 10 days showed increased AA and DHA due to intake of the chow diet including AA, DHA and eicosapentaenoic acid (EPA). Thus, the history of the maternal feeding could affect the results under these particular circumstances, but the differences were minimal.

Key words – Docosahexaenoic acid, brain function, n-3 fatty acid deficiency, fatty acid composition

서 론

Docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA)는 n-3 지방산인 α -linolenic acid (LNA)를 전구물질로 하여 생체 내에서 합성되며 다른 장기 조직들과 비교해 볼 때 뇌와 망막 등 신경조직에 많이 분포되어 있는 것이 특징이다[1,4,9,19]. 선행된 연구에 따르면 식이 중 n-3 지방산 결핍은 여러 가지 뇌 기능에 관련된 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다. 그 예로 Morris water maze를 이용한 공간 기억력 테스트[10,12,13], 후각에 기초로 한 기억 학습 능력[5,8], electroretinogram을 이용한 망막의 활성 실험[14,24-26] 그리고 G-protein coupling과 관련된 신호전달 활성 실험[15] 등에서 n-3 지방산이 적절히 공급된 식이군에 비해 n-3 지방산이 결핍된 식이군의 경우 기억력 및 시력이 유의적으로 떨어짐이 보고되었다.

뇌의 기억력에 미치는 DHA의 중요한 역할을 규명하기 위해서는 뇌의 DHA가 결핍된 동물을 생성할 필요가 있다. 여기에는 두 가지 대표적인 방법이 있는데 첫째, 2세대 동물 사육 방법과 인공 사육 동물 모델 시스템을 이용하는 것이

다. 전자는 2세대동안 n-3 지방산이 결핍된 식이를 투여하여 최종적으로 뇌 내의 DHA가 결핍된 동물을 생성시키는 것이다[2,3,6,16,20,21]. 이는 수유기 동안 모유를 통하여 신생 쥐에게 DHA가 상당량 전달되지므로 완전한 n-3 지방산이 결핍된 동물의 생성이 어려우므로 2세대에 걸쳐 n-3 지방산이 결핍된 식이로 사육된 엄마 동물로부터 뇌 내 지방산 중 DHA 함량이 83% 저하된 신생 동물을 생성시킬 수가 있기 때문이다[27]. 반면, 후자인 인공 사육 동물 모델 시스템은 분만 후 12시간 내 엄마 쥐들로부터 신생 쥐들을 분리하여 인공 사육 시스템에서 n-3 지방산이 결핍된 인공 쥐 분유를 조제하여 신생 쥐들을 3주 동안 사육하여 뇌 DHA 함량을 약 70% 감소시키는 방법이다[22,23]. 이 방법은 기존의 2세대 실험 연구에서의 막대한 동물의 수와 엄청난 시간의 손실을 보완하고 완전한 영양소의 제한을 할 수 있다는 장점이 있으며 1세대에서 n-3 지방산이 결핍된 동물을 생성할 수가 있으며 더 나아가 이들 뇌 기능 손상 동물을 이용하여 뇌 기능 개선 효과가 있는 후보 영양물질의 활성을 검색 할 수가 있다.

따라서 2세대 동물 사육방법과 비교해 볼 때 여러 가지 장점들을 가진 인공 사육 동물 모델 시스템의 활용을 위해서는 효율적인 엄마 쥐의 사육 방법에 대한 검토가 필요하다. 여기에도 두 가지 방법이 가능하며 즉, 엄마 쥐를 3주령부터 실

*Corresponding author

Tel : +82-51-410-4757, Fax : +82-51-404-3988

E-mail : sylim@bada.hhu.ac.kr

험식으로 사육하는 방법과 실험 기간을 단축하기 위한 방법으로 임신동물을 구입하여 임신기간에만 실험식으로 사육하는 방법이 있다. 여기서 중요한 요인은 뇌의 DHA 함량이므로 본 연구에서는 이상의 두 가지 방법으로 사육한 엄마 쥐들로부터 각각 신생 쥐를 분리하여 이들 사육 방법 및 식이 섭취기간이 신생 쥐의 뇌 지방산 조성, 특히 DHA 함량에 미치는 영향을 검토하여 향후 실험 방법 선택에 있어서 질적, 시간적면에서 효율적인 방법을 고려하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물의 종류 및 사육

본 실험에서는 두 가지 방법으로 1세대 엄마 쥐들을 사육하였다. 첫째 임신전 단계 동물 사육 방법(Pre-pregnancy group)으로 생후 3주된 암컷 Long-Evans 쥐를 Charles River 실험실(Portage, MI)에서 구입하여 2.6% LNA가 첨가된 AIN-93G 표준식이[17]를 각각 급여하여 적정 환경(온도 23±1°C, 상대습도, 명암 12시간 주기)에서 8주간 사육하였다. 11주가 되었을 때 12주된 수컷과 교배시킨 후 임신 쥐들을 구별하여 교배 17일부터 개개 cage에서 사육하였다. 두 번째 방법으로는 Charles River 실험실(Portage, MI)에서 임신 3일째 된 암컷 쥐를 구입하여 동일한 식이와 환경으로 사육하였다(Pregnancy group). 실험기간동안 실험식이와 음용수는 자유섭취방법으로 급여하였다. 두 가지 방법들로 각각 사육된 엄마 쥐들로부터 얻어진 신생 쥐들을 생후 12시간 내에 체중을 고려하여 5마리 엄마 쥐들로부터 각 1마리씩 신생 쥐를 분리하여 연령별로 위 내용물 및 뇌를 취하여 지방산을 분석하였다(Fig. 1).

실험식이

본 실험에 사용된 고품사료는 AIN-93G에 따른 식이로 지방의 급원을 변형하였다(Table 1). 임신전 단계 동물 사육 방법(Pre-pregnancy group)에서 엄마 쥐를 위한 식이의 경우 포화지방산의 급원으로 수소화된 coconut oil을 사용, linoleic acid(LA) 급원으로 safflower oil을 사용, LNA급원으로 flaxeed oil을 사용하였다. 두 번째 사육 방법인 임신 쥐를 사용한 경우(Pregnancy group)는 실험실에 도착한 날부터 위와 동일한 사료로 임신 동물을 사육하였다.

Table 1. Composition of experimental diet

Ingredient	Amount (g/100 g)
Casein, vitamin free	20
Carbohydrate	60
Corn starch	15
Sucrose	10
Dextrose	19.9
Maltose-dextrin	15
Cellulose	5
Salt mix	3.5
Vitamin mix	1
L-Cystine	0.3
Choline bitartrate	0.25
tert-Butylhydroquinone	0.002
Fat:	10
Hydrogenated coconut oil	7.75
Safflower oil	1.77
Flaxseed oil	0.48

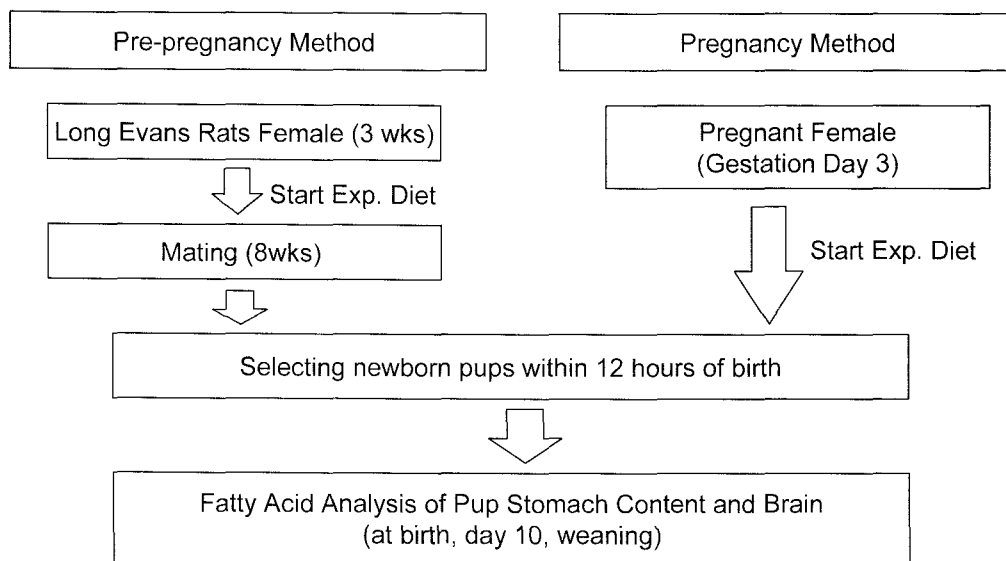


Fig. 1. Flow diagram of the experimental design.

Gas chromatography를 이용한 지방산 측정

두 가지 사육방법에 따른 암마 쥐들의 모유의 지방산 조성을 연령별(출생 후 0, 10일)로 취해서 비교 검토하였다. 모유는 신생쥐를 희생시킨 후 위내용물을 취하였고, 다음으로 뇌를 취하여 뇌의 무게를 재고 -80℃에 보관하여 실험에 사용하였다. 지질 추출은 Folch 등[7]을 변형하여 실시하였으며 Morrison과 Smith의 방법[11]에 따라 추출된 지질에 methylation용 시약인 boron trifluoride methanol 1 ml와 hexane 0.4 ml를 가한 후 1시간동안 100℃에서 가열하여 methylation시켰다. 지방산 분석은 HP-5890B gas chromatography (Agilent, Palo Alto, CA)를 이용하였고[18] 이용된 칼럼은 silica capillary column (DB-FFAP, 30 m x 0.25 mm inner diameter x 0.25 μm film thickness, J and W Scientific, Folsome, CA) 이었으며 기기의 분석 조건은 detector (FID) 250℃, oven (initial 130℃, 분당 증가율 175℃까지 4℃/min, 250℃까지 1℃/min, 210℃까지 30℃/min, final 245℃), injector 250℃ 그리고 carrier gas는 수소를 사용하였다[25]. 지방산 분석은 표준용액의 retention 시간과 비교하여 정성하였으며 개개의 지방산들은 전체 peak area의 퍼센트로 산출하였다.

통계처리

실험결과는 mean ± SEM (Standard Error of Mean)으로 나타내었고 분석된 실험 데이터는 Statistica program (Statsoft, Tulsa, OK)을 이용하여 one-way ANOVA를 실시하여 살펴보았다. 유의성이 있을 경우에 post-hoc test로 Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test를 실시하여 5% 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

체중변화 및 사료의 지방산 조성 비교

식이 섭취기간을 달리하여 사육된 암마 쥐들로부터 얻어진 각각 신생 쥐들의 체중에는 유의적 차이가 없었다. 임신동물을 이용한 군의 경우(Pregnancy group), 임신 전 상업용 사료로 사육되었으므로 이들 사료에 포함된 n-3 지방산의 영향을 알아보기 위하여 본 실험에 사용된 식이의 지방산 조성 비교해 보았다(Table 2). 실험 식이에 비하여 총 포화지방산양은 현저하게 적은 반면 총 monounsaturated 지방산 함량은 높았고, 그 중에서 특히 16:0과 18:1n-9의 함량이 높았다. 실험식이의 18:2n-6와 18:3n-3의 양이 각각 12.7%와 2.6%인데 반하여 상업용 사료는 각 44.5%와 4.4%를 나타내었으며 eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3)와 DHA도 각각 1.8% 및 2.5%를 함유하고 있었다. 이러한 사료의 지방산 조성의 차이는 향후 신생 쥐가 섭취한 모유와 뇌의 지방산 함량에도 영향을 끼칠 것으로 사료되어진다.

Table 2. Fatty acid composition of experimental and commercial diets (g/100g)

	Experimental diet	Chow diet
Fatty acids		
8:0	2.9	nd
10:0	5.0	nd
12:0	41.6	nd
14:0	15.9	1.9
16:0	nd	16.7
18:0	7.8	3.3
20:0	0.1	0.3
22:0	0.1	0.3
24:0	0.1	0.2
Σ Saturates	82.2	22.6
16:1n-7	nd	2.0
18:1n-9	3.2	19.7
18:1n-7	0.2	1.2
20:1n-9	nd	0.7
22:1n-9	nd	0.1
24:1n-9	nd	0.2
Σ Monounsaturates	3.5	23.9
18:2n-6	12.7	44.5
20:2n-6	nd	0.1
20:4n-6	nd	0.2
Σ n-6	12.7	44.8
18:3n-3	2.6	4.4
20:5n-3	nd	1.8
22:6n-3	nd	2.5
Σ n-3	2.6	8.7

신생 쥐의 위 내용물 및 뇌의 지방산 조성 변화

두 가지 방법으로 사육된 암마 쥐들로부터 얻어진 각각 신생 쥐의 위 내용물의 지방산 조성은 Table 3과 4에 나타내었다. 출생 직후 신생 쥐들의 위 내용물의 지방산 조성의 경우, 총 포화지방산과 총 monounsaturated 지방산의 함량에는 두 군 간에 유의적 차이가 없었다(Table 3). 임신동물을 사용한 군(Pregnancy group)의 경우, 임신전 단계 사육 방법으로 사육한 군(Pre-pregnancy group)에 비하여 20:2n-6는 84%가 낮았고 20:3n-6, 20:4n-6 및 총 n-6 지방산의 경우 각각 21%, 15% 및 17%가 더 높은 함량을 보였다. DHA 함량의 경우, 임신동물의 신생 쥐의 위 내용물에서 25% 더 높게 나타났다(P<0.05). 이러한 경향은 임신동물의 경우, 임신 전 섭취하였던 사료 중에 상대적으로 많이 함유된 DHA 함량에 기인하는 것으로 사료되어진다. Table 4는 신생 쥐들이 생후 10일 경과되었을 때 위 내용물의 지방산 조성에 관한 결과를 나타내었다. 총 포화지방산과 총 monounsaturated 지방산의 함량에는 두 군 간에 유의적 차이가 없었으나 각각의 지방산

Table 3. Pre-pregnancy vs. pregnancy dietary treatment effect on the fatty acid composition of pup stomach at birth (g/100 g)

	Pre-pregnancy	Pregnancy
Fatty acids		
10:0	1.36 ± 0.13 ¹	1.32 ± 0.06
12:0	9.22 ± 0.56	8.60 ± 0.65
14:0	7.13 ± 0.25	7.01 ± 0.09
16:0	23.8 ± 0.28	23.5 ± 0.45
18:0	7.63 ± 0.66	6.47 ± 0.33
20:0	0.09 ± 0.001	0.12 ± 0.02
22:0	0.04 ± 0.001	0.06 ± 0.01
24:0	0.04 ± 0.002	0.07 ± 0.02
Σ Saturates	49.3 ± 0.95	47.1 ± 0.42
16:1n-7	4.87 ± 0.43	3.26 ± 0.44
18:1n-9	20.9 ± 0.78	20.9 ± 1.39
18:1n-7	3.10 ± 0.26	3.36 ± 0.13
20:1n-9	0.66 ± 0.06	0.88 ± 0.12
22:1n-9	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.02
24:1n-9	0.06 ± 0.001	0.09 ± 0.03
Σ Monounsaturates	29.8 ± 1.02	28.6 ± 1.55
18:2n-6	6.44 ± 0.19	6.63 ± 0.53
18:3n-6	0.47 ± 0.09	0.36 ± 0.05
20:2n-6	0.56 ± 0.04	0.09 ± 0.03*
20:3n-6	0.58 ± 0.03	0.70 ± 0.02*
20:4n-6	3.73 ± 0.14	4.29 ± 0.17*
22:4n-6	1.59 ± 0.13	2.76 ± 0.75
22:5n-6	0.39 ± 0.05	0.46 ± 0.09
Σ n-6	13.8 ± 0.31	16.1 ± 0.44*
18:3n-3	0.48 ± 0.02	0.43 ± 0.06
20:5n-3	0.55 ± 0.03	0.43 ± 0.04
22:5n-3	0.71 ± 0.04	1.00 ± 0.21
22:6n-3	1.21 ± 0.04	1.49 ± 0.11*
Σ n-3	3.00 ± 0.07	3.35 ± 0.22

¹Each parameter is presented as the mean ± SEM for 3-4 rats. p<0.05, significant effect between the two groups

들 중 10:0, 12:0, 16:1n-7 및 18:1n-7의 함량은 임신동물을 사용한 군(Pregnancy group)에서 낮았고 16:0의 함량은 높았다 (P<0.05). 또한 22:4n-6 및 22:6n-3도 임신동물을 사용한 군에서 각각 8% 및 8%로 낮았으나 유의적 차이는 없었고 총 n-3 지방산의 함량의 경우 유의적으로 낮았다. 위 내용물의 경우 두 실험군에서 출생 직후와 10일 후의 지방산 조성을 살펴보면 10일 경과함에 따라 특히 고도로 불포화된 지방산들의 감소를 두드러지게 확인 할 수가 있었다. 쥐의 경우, 눈이 감겨지고 뇌가 덜 성숙된 상태로 출생하여 생후 10일 동안 뇌와 시신경의 성장 계속 진행된다. 이러한 시기는 사람의 경우에 비유했을 때 출생 전 석 달 전부터 수유 2주일 동안의 기간

Table 4. Pre-pregnancy vs. pregnancy dietary treatment effect on the fatty acid composition of pup stomach at day 10 (g/100 g)

	Pre-pregnancy	Pregnancy
Fatty acids		
10:0	8.37 ± 0.18 ¹	6.41 ± 0.49*
12:0	18.8 ± 0.22	16.8 ± 0.64*
14:0	14.3 ± 0.07	14.5 ± 0.29
16:0	22.7 ± 0.13	26.6 ± 1.07*
18:0	5.12 ± 0.22	5.22 ± 0.26
20:0	0.09 ± 0.001	0.09 ± 0.002
22:0	0.04 ± 0.001	0.04 ± 0.001
24:0	0.04 ± 0.002	0.06 ± 0.002
Σ Saturates	69.5 ± 0.30	69.8 ± 0.85
16:1n-7	2.20 ± 0.09	1.66 ± 0.03*
18:1n-9	13.5 ± 0.07	13.2 ± 0.73
18:1n-7	1.46 ± 0.07	1.36 ± 0.04*
20:1n-9	0.29 ± 0.001	0.28 ± 0.02
22:1n-9	0.03 ± 0.002	0.03 ± 0.001
24:1n-9	0.03 ± 0.001	0.03 ± 0.001
Σ Monounsaturates	17.6 ± 0.16	16.7 ± 0.78
18:2n-6	6.82 ± 0.05	6.50 ± 0.13*
18:3n-6	0.19 ± 0.07	0.12 ± 0.01
20:2n-6	0.39 ± 0.03	0.33 ± 0.02
20:3n-6	0.40 ± 0.11	0.34 ± 0.02
20:4n-6	0.54 ± 0.17	0.69 ± 0.03
22:4n-6	0.26 ± 0.003	0.22 ± 0.01
22:5n-6	0.04 ± 0.001	0.05 ± 0.01
Σ n-6	8.62 ± 0.08	8.25 ± 0.20
18:3n-3	0.89 ± 0.002	0.84 ± 0.01
20:5n-3	0.18 ± 0.001	0.17 ± 0.01
22:5n-3	0.20 ± 0.001	0.20 ± 0.01
22:6n-3	0.24 ± 0.002	0.22 ± 0.01
Σ n-3	1.51 ± 0.01	1.42 ± 0.03*

¹Each parameter is presented as the mean ± SEM for 5 rats. *p<0.05, significant effect between the two groups

과 비슷한 상황이며 이 시기동안 가장 많은 DHA가 모유를 통해서 신생아에 전달되어 신생아 뇌 발달 과정에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[27]. 이러한 관점에서 인공 사육 동물 실험의 경우 완전하게 분유의 지방산 조성을 제한할 수가 있으며 사람을 대상으로 하는 임상 실험에 직접 응용될 수가 있는 장점이 있다. 즉 n-3 지방산이 결핍된 인공 분유를 조제하여 인공 사육 시스템으로 신생 쥐를 사육한 후 감소된 뇌의 DHA 함량이 향후 성인 쥐의 뇌 기능 저하에 미치는 영향에 대한 연구에 적합할 것으로 기대되어진다.

연령별로 신생 쥐들의 뇌를 취하여 이들의 지방산 함량을 비교해 보았다(Table 5-7). 출생 직후 뇌의 지방산 조성을 비

Table 5. Pre-pregnancy vs. pregnancy dietary treatment effect on the fatty acid composition of pup brain at birth (g/100 g)

	Pre-pregnancy	Pregnancy
Fatty acids		
14:0	1.70 ± 0.05 ¹	1.63 ± 0.03
16:0	24.7 ± 0.28	25.4 ± 0.24
18:0	14.8 ± 0.12	15.4 ± 0.10
20:0	0.12 ± 0.001	0.12 ± 0.001
22:0	0.07 ± 0.001	0.08 ± 0.001
24:0	0.15 ± 0.03	0.17 ± 0.03
Σ Saturates	41.5 ± 0.33	42.9 ± 0.29*
16:1n-7		
18:1n-9	9.90 ± 0.09	10.5 ± 0.19
18:1n-7	2.61 ± 0.02	2.71 ± 0.03
20:1n-9	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01
24:1n-9	0.33 ± 0.11	0.21 ± 0.03*
Σ Monounsaturates	14.6 ± 0.10	15.2 ± 0.23*
18:2n-6		
20:3n-6	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.01
20:4n-6	10.5 ± 0.24	10.69 ± 0.14
22:4n-6	2.51 ± 0.15	2.65 ± 0.01
22:5n-6	2.68 ± 0.19	2.86 ± 0.02
Σ n-6	16.4 ± 0.27	16.8 ± 0.15
20:5n-3		
22:5n-3	0.19 ± 0.002	0.14 ± 0.002*
22:6n-3	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.02
22:6n-3	9.91 ± 0.22	10.4 ± 0.27
Σ n-3	10.29 ± 0.22	10.7 ± 0.29

¹Each parameter is presented as the mean ± SEM for 3-4 rats. *p<0.05, significant effect between the two groups

교해 본 결과, 총 포화지방산과 총 monounsaturated 지방산의 경우 임신동물을 사용한 군(Pregnancy group)에서 각각 3%와 4%로 그 함량이 유의적으로 높았고 20:5n-3의 함량은 26%로 감소하였다(P<0.05). 나머지 지방산 함량에는 두 간에 유의적 차이를 관찰 할 수가 없었다(Table 5). 신생 쥐들이 생후 10일이 되었을 때(Table 6), 총 포화지방산의 함량에는 차이가 없었으나 총 monounsaturated의 경우, 임신동물을 사용한 군(Pregnancy group)에서 4% 감소하였다(P<0.05). 20:4n-6, 22:4n-6, 22:5n-6 및 총 n-6 지방산의 함량은 7-18%정도로 유의적으로 높았고 22:5n-3, 22:6n-3 및 총 n-3 지방산의 함량도 13-26%로 유의적으로 높았으나 20:5n-3의 함량은 47%로 감소하였다(P<0.05). 이들 신생 쥐들이 수유기간이 끝나는 생후 21일이 되었을 때 뇌의 지방산 조성을 비교해 보았다(Table 7). 총 포화지방산, 총 monounsaturated 지방산, 총 n-6 지방산 및 총 n-3 지방산의 함량에는 유의적 차이를 살펴 볼 수가 없었다. 2-3세대 사육방법에 의하여 사육된 실험동물의 뇌의 지방

Table 6. Pre-pregnancy vs. pregnancy dietary treatment effect on the fatty acid composition of pup brain at day 10 (g/100 g)

	Pre-pregnancy	Pregnancy
Fatty acids		
14:0	1.31 ± 0.03 ¹	1.36 ± 0.06
16:0	25.6 ± 0.05	24.7 ± 0.28
18:0	17.0 ± 0.05	17.1 ± 0.12
20:0	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01
22:0	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.02
24:0	0.15 ± 0.01	0.18 ± 0.04
Σ Saturates	44.4 ± 0.05	43.7 ± 0.32
16:1n-7		
18:1n-9	9.75 ± 0.10	9.58 ± 0.14
18:1n-7	2.41 ± 0.02	2.33 ± 0.02
20:1n-9	0.27 ± 0.01	0.22 ± 0.01*
24:1n-9	0.21 ± 0.01	0.05 ± 0.01*
Σ Monounsaturates	14.0 ± 0.13	13.5 ± 0.16*
18:2n-6		
20:3n-6	0.41 ± 0.01	0.47 ± 0.02
20:4n-6	13.1 ± 0.06	14.0 ± 0.14*
22:4n-6	3.06 ± 0.04	3.47 ± 0.04*
22:5n-6	1.48 ± 0.02	1.74 ± 0.08*
Σ n-6	18.9 ± 0.10	20.5 ± 0.20*
20:5n-3		
22:5n-3	0.15 ± 0.001	0.08 ± 0.01*
22:5n-3	0.31 ± 0.01	0.39 ± 0.03*
22:6n-3	11.3 ± 0.05	12.9 ± 0.29*
Σ n-3	11.9 ± 0.07	13.4 ± 0.30*

¹Each parameter is presented as the mean ± SEM for 5 rats. *p<0.05, significant effect between the two groups

산 조성을 살펴보면 n-3 지방산이 적절하게 포함된 식이군에 비해 n-3 지방산이 결핍된 식이군의 경우, 뇌 DHA 함량은 83% 감소한 반면 docosapentaenoic acid(22:5 n-6, DPAn-6)의 함량은 매우 높게 나타났다. 이러한 뇌의 지방산 조성의 변화는 공간기억력과 관련된 뇌 기능 저하와도 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다[12]. Salem 등[19]의 연구에서도 DHA가 결핍된 쥐의 뇌 중량 및 신경세포의 크기가 감소되는 현상을 관찰하였다고 보고하였다. 한편, 뇌의 DHA 결핍 동물 생성 방법으로 선행된 인공사육방법으로 튜브와 자동펌프를 이용하는 경우로 여기에는 몇 가지 단점을 가지고 있다. 예를 들면, 출생 후 4-5일 경과 후 식도-위 연결 튜브 수술로 인한 신생 쥐들에게 상당한 스트레스를 주고 사육 동안에도 개개의 cage에서 사육되어짐으로 자연스러운 동물들 간의 신체적 접촉이 부족하며 튜브와 자동 펌프로 시간별로 강제 수유되는 비자발적인 방식과 뇌의 DHA 함량도 50% 정도의 감소만 나타내었다[22].

Table 7. Pre-pregnancy vs. pregnancy dietary treatment effect on the fatty acid composition of pup brain at weaning (g/100 g)

	Pre-pregnancy	Pregnancy
Fatty acids		
14:0	1.05 ± 0.36 ¹	0.86 ± 0.31
16:0	19.1 ± 0.99	18.7 ± 0.63
18:0	18.6 ± 1.38	18.5 ± 0.99
20:0	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.05
22:0	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.01
24:0	0.56 ± 0.17	0.62 ± 0.15
Σ Saturates	39.9 ± 2.18	39.1 ± 1.43
16:1n-7	0.62 ± 0.15	0.59 ± 0.12
18:1n-9	8.95 ± 1.49	10.0 ± 1.37
18:1n-7	1.99 ± 0.28	2.24 ± 0.25
20:1n-9	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.01
22:1n-9	0.15 ± 0.06	0.07 ± 0.04
24:1n-9	0.54 ± 0.19	0.64 ± 0.19
Σ Monounsaturates	12.4 ± 1.90	13.7 ± 0.12
18:2n-6	1.31 ± 0.27	1.24 ± 0.27
20:2n-6	0.19 ± 0.02	0.16 ± 0.01
20:3n-6	0.36 ± 0.93	0.41 ± 0.07
20:4n-6	8.81 ± 0.14	9.70 ± 0.94
22:2n-6	0.07 ± 0.001	0.07 ± 0.001
22:4n-6	1.88 ± 0.47	2.38 ± 0.47
22:5n-6	1.39 ± 0.25	1.13 ± 0.15
Σ n-6	14.0 ± 1.09	15.1 ± 1.22
22:5n-3	0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.05
22:6n-3	12.6 ± 0.90	13.0 ± 0.85
Σ n-3	13.0 ± 0.94	13.4 ± 0.90

¹Each parameter is presented as the mean ± SEM for 3-4 rats. *p<0.05, significant effect between the two groups

이에 반하여 앞으로 본 연구에서 이용될 인공 사육 동물 시스템의 경우 분유의 자유섭취 및 한 cage에 10마리씩 같이 사육함으로써 동물들 간의 신체적 접촉과 인공 젖병과 젖꼭지를 사용하지 않도록 자연스러운 수유방식을 시도할 예정이다.

본 연구에서는 DHA가 뇌에 미치는 영향을 알아보는 연구방법으로 시간과 동물의 수를 줄일 수 있는 장점을 지닌 인공 사육 동물 시스템의 활용을 위한 전 단계 실험으로 엄마 쥐의 식이 섭취기간이 신생 쥐의 뇌 및 위 내용물의 지방산 조성에 미치는 영향에 대해 검토해 보았다. 기존에 많이 이용되었던 임신 전 단계에서부터 실험식으로 사육한 군(Pre-pregnancy group)과 임신동물을 이용한 군(Pregnancy group)을 비교함으로써 효율적인 실험방법을 선택하고자 한다. 이상의 결과에서 알 수 있듯이 임신 동물을 사용한 군의 경우 임신 전 사료에는 DHA가 함유된 사료를 섭취하였으며

로 임신 전 단계 군에 비하여 뇌 및 위 내용물의 DHA 및 기타 n-3 지방산의 함량이 높았으나 이유기의 뇌의 지방산 조성에는 변화가 없었다. 또한 이러한 지방산의 조성은 향후 인공 사육 시스템을 이용할 경우 차이는 미미한 것으로 여겨지며 보다 효율적인 방법으로 임신동물 활용이 가능하다고 사료되어진다.

요 약

본 연구에서는 DHA가 뇌에 미치는 영향을 알아보는 방법으로 시간과 동물의 수를 줄일 수 있는 장점을 지닌 인공 사육 동물 시스템의 활용을 위한 전 단계 실험으로 엄마 쥐의 식이 섭취기간이 신생 쥐의 뇌 및 위 내용물의 지방산 조성에 미치는 영향에 대해 검토해 보았다. 출생 직후 신생 쥐들의 위 내용물의 지방산 조성의 경우, 임신동물을 사용한 군(Pregnancy group)의 경우, 임신전 단계 사육 방법으로 사육한 군(Pre-pregnancy group)에 비하여 20:2n-6 함량은 낮았고 20:3n-6, 20:4n-6 및 총 n-6 지방산의 경우는 높은 함량을 보였다. DHA 함량의 경우, 임신동물의 신생 쥐의 위 내용물에서 25% 높게 나타났다(P<0.05). 신생 쥐들이 생후 10일 경과되었을 때, 22:4n-6 및 22:6n-3의 경우 임신동물을 사용한 군에서 각각 8% 및 8%로 낮았으나 유의적 차이는 없었다. 출생 직후 뇌의 지방산 조성을 비교해 본 결과, 총 포화 지방산과 총 monounsaturated 지방산의 경우, 임신동물을 사용한 군(Pregnancy group)에서 그 함량이 유의적으로 높았고 20:5n-3의 함량은 26%로 감소하였다(P<0.05). 나머지 지방산 함량에는 두 군에 유의적 차이를 관찰 할 수가 없었다. 신생 쥐들이 생후 10일이 되었을 때, 총 포화지방산의 함량에는 차이가 없었으나 총 monounsaturated의 경우, 임신동물을 사용한 군에서 감소하고 20:4n-6와 22:6n-3의 함량은 유의적으로 높았으나 20:5n-3의 함량은 47%로 감소하였다(P<0.05). 이들 신생 쥐들이 수유기간이 끝나는 생후 21일이 되었을 때, 지방산 함량에 있어서 두 군간에 유의적 차이를 살펴 볼 수가 없었다. 이상의 결과에서 알 수 있듯이 임신 전 단계 군에 비하여 뇌 및 위 내용물의 DHA 및 기타 n-3 지방산의 함량이 높았으나 이유기의 뇌의 지방산 조성에는 변화가 없었다. 이러한 결과는 임신 동물을 사용한 군의 경우 임신 전 사료에 DHA가 함유된 사료를 섭취한 결과에 기인하는 것으로 여겨지며 이러한 특정 상황을 고려해 볼 때 향후 인공 사육 시스템을 이용할 경우 지방산의 조성의 차이는 미미한 것으로 사료되며 뇌의 DHA 결핍 동물 생성을 위한 실험계에 임신동물 활용이 가능하다고 사료되어진다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 우수여성과학자도약연구지

원사업(KRF-2005-204-F00020) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고 문헌

- Ahmad, A., T. Moriguchi and N. Salem. 2002. Decrease in neuro size in docosahexaenoic acid-deficient brain. *Pediatr. Neurol. Eurotoxicol.* **26**, 210-218.
- Birch, E. E., D. R. Hoffman, R. Uauy, D. G. Birch and C. Prestidge. 1998. Visual acuity and the essentiality of docosahexaenoic acid and arachidonic acid in the diet of term infants. *Pediatr. Res.* **44**, 201-209.
- Bourre, J. M., M. Francois, A. Youyou, O. Dumont, M. Piciotti, G. Pascal and G. Durand 1989. The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J. Nutr.* **119**, 1880-1892.
- Calderon, F. and H. Y. Kim. 2004. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **90**, 979-988.
- Catalan, J. N., T. Moriguchi, B. M. Slotnick, M. Murthy, R. S. Greiner and N. Salem. 2002. Cognitive deficits in docosahexaenoic acid deficient rats. *Behav. Neurosci.* **116**, 1022-1031.
- Champoux, M., J. R. Hibbeln, C. Shannon, S. Majchrzak, S. J. Suomi, N. Salem and J. D. Higley. 2002. Fatty acid formula supplementation and neuromotor development in rhesus monkey neonates. *Pediatr. Res.* **51**, 273-281.
- Folch, J., M. Lees and G. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipid from boron fluoride-methanol. *J. Biol. Chem.* **226**, 495-509.
- Greiner, R. S., T. Moriguchi, B. M. Slotnick, A. Hurrion and N. Salem. 2001. Olfactory discrimination deficits in n-3 fatty acid-deficient rats. *Physiol. Behav.* **72**, 379-385.
- Innis, S. M. 1991. Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid Res.* **30**, 39-103.
- Lim, S. Y., T. Moriguchi, B. Lefkowitz, J. Loewke, S. Majchrzak, J. Hoshiba and N. Salem. 2003. Artificial feeding of an n-3 essential fatty acid-deficient diet leads to a loss of brain function in the first generation. In *Essential Fatty Acids and Eicosanoids*. Huang YS, Lin SJ, Huang PC, editors. AOCS Press, Champaign, IL, p122-131
- Morrison, W. R. and L. M. Smith. 1959. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron-fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* **5**, 600-608.
- Moriguchi, T., R. Greiner and N. Salem. 2000. Behavioral deficits associated with dietary induction of decrease brain docosahexaenoic acid concentration. *J. Neurochem.* **75**, 2563-2573.
- Moriguchi, T. and N. Salem. 2003. The recovery of brain docosahexaenoate subsequent to dietary n-3 fatty acid insufficiency leads to recovery of spatial task performance. *J. Neurochem.* **87**, 297-309.
- Neuringer, M., W. E. Connor, D. S. Lin, L. Barstad and S. Luck. 1986. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal w3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4021-4025.
- Niu, S. L., D. C. Mitchell, S-Y. Lim, Z. M. Wen, H. Y. Kim, N. Salem and B. J. Litman. 2004. Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency. *J. Biol. Chem.* **279**, 31098-31104.
- Okuyama, H., T. Kobayashi and S. Watanabe. 1997. dietary fatty acids-the n-6/n-3 balance and chronic elderly diseases: Excess linoleic acid and relative n-3 deficiency syndrome seen in Japan. *Prog. Lipid Res.* **35**, 409-457.
- Reeves, P. G., F. H. Neilsen and G. C. Fahey. 1993. Committee report on the AIN-93 purified rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 1939-1951.
- Salem, N., M. Reyzer and J. Karanian. 1996. Losses of arachidonic acid in rat liver after alcohol inhalation. *Lipids* **31**, S153-156.
- Salem, N., B. Litman, H-Y. Kim and K. Gawrisch. 2001. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* **36**, 945-959.
- Tinoco, J., R. Babcock, I. Hincenbergs, B. Medwadowski and P. Miljanich. 1978. Linolenic acid deficiency: Changes in fatty acid patterns in female and male rats raised on a linolenic acids-deficient diet for two generations. *Lipids* **13**, 6-17.
- Tinoco, J. 1982. Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid in animals. *Prog. Lipid Res.* **21**, 1-45.
- Ward, G., J. Woods, M. Reyzer and N. Salem. 1996. Artificial rearing of infant rats on milk formula deficient in the n-3 essential fatty acids: A rapid method for the production of experimental n-3 deficiency. *Lipids* **31**, 71-77.
- Ward, G. R., Y. S. Huang, H. C. Xing, E. Bobik, I. Wauben, N. Auestad, M. Montalto and P. E. Wainwright. 1999. Effect of gamma-linolenic acid and docosahexaenoic acid in formulae on brain fatty acid composition in artificially reared rats. *Lipids* **34**, 1057-1063.
- Weisinger, H. S., A. J. Vingrys and A. J. Sinclair. 1996. Effect of dietary n-3 deficiency on the electroretinogram in the guinea pig. *Ann. Nutr. Meta.* **40**, 91-98.
- Weisinger, H. S., A. J. Vingrys, V. B. Bang and A. J. Sinclair. 1999. Effects of dietary n-3 fatty acid deficiency and repletion in the guinea pig retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 327-338.
- Weisinger, H. S., J. A. Armitage, B. G. Jeffrey, D. C. Mitchell, T. Moriguchi, A. J. Sinclair, R. S. Weisinger and N. Salem. 2002. Retinal sensitivity loss in third-generation n-3 PUFA-deficient rats. *Lipids* **37**, 759-765.
- Yavin, E. and P. Green 1998. Mechanisms of docosahexaenoic acid accretion in the fetal brain. *J. Neurosci. Res.* **15**, 129-136.