

콜린과 엽산 결핍이 흰쥐의 Genomic DNA 메틸화와 혈장 호모시스테인에 미치는 영향*

문 주 애 · 민 혜 선[§]

한남대학교 생명나노과학대학 식품영양학과

Genomic DNA Methylation Status and Plasma Homocysteine in Choline- and Folate-Deficient Rats*

Mun, Ju Ae · Min, Hyesun[§]

Department of Food and Nutrition, College of Bio-Nano Science, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

ABSTRACT

Elevated plasma homocysteine (Hcy) is a risk factor for cognitive dysfunction and Alzheimer disease, although the mechanism is still unknown. Both folate and betaine, a choline metabolite, play essential roles in the remethylation of Hcy to methionine. Choline deficiency may be associated with low folate status and high plasma Hcy. Alterations in DNA methylation also have established critical roles for methylation in development of the nervous system. This study was undertaken to assess the effect of choline and folate deficiency on Hcy metabolism and genomic DNA methylation status of the liver and brain. Groups of adult male Sprague Dawley rats were fed on a control, choline-deficient (CD), folate-deficient (FD) or choline/folate-deficient (CFD) diets for 8 weeks. FD resulted in a significantly lower hepatic folate (23%) ($p < 0.001$) and brain folate (69%) ($p < 0.05$) compared to the control group. However, plasma and brain folate remained unaltered by CD and hepatic folate reduced to 85% of the control by CD ($p < 0.05$). Plasma Hcy was significantly increased by FD ($18.34 \pm 1.62 \mu\text{M}$) and CFD ($19.35 \pm 3.62 \mu\text{M}$) compared to the control ($6.29 \pm 0.60 \mu\text{M}$) ($p < 0.001$), but remained unaltered by CD. FD depressed S-adenosylmethionine (SAM) by 59% ($p < 0.001$) and elevated S-adenosylhomocysteine (SAH) by 47% in liver compared to the control group ($p < 0.001$). In contrast, brain SAM levels remained unaltered in CD, FD and CFD rats. Genomic DNA methylation status was reduced by FD in liver ($p < 0.05$). Genomic DNA hypomethylation was also observed in brain by CD, FD and CFD although it was not significantly different from the control group. Genomic DNA methylation status was correlated with folate stores in liver ($r = -0.397$, $p < 0.05$) and brain ($r = -0.390$, $p < 0.05$), respectively. In conclusion, our data demonstrated that genomic DNA methylation and SAM level were reduced by folate deficiency in liver, but not in brain, and correlated with folate concentration in the tissue. The fact that folate deficiency had differential effects on SAM, SAH and genomic DNA methylation in liver and brain suggests that the Hcy metabolism and DNA methylation are regulated in tissue-specific ways. (*Korean J Nutrition* 40(1): 14~23, 2007)

KEY WORDS : choline, folate, homocysteine, S-adenosylmethionine, DNA methylation.

서론

호모시스테인혈증은 인지능력저하로부터 치매에 이르기까지 다양한 수준의 인지능력장애의 독립적인 위험인자로 작

용하며, 혈중 호모시스테인 농도가 증가될수록 뇌경색과 치매의 위험이 높은 것으로 조사되었다.¹⁻⁴⁾ 호모시스테인은 메티오닌이 대사될 때 생성되는 비필수 황함유아미노산이며 호모시스테인이 대사되기 위해서는 엽산, 비타민 B₁₂, 비타민 B₆ 및 콜린 등의 비타민이 필요하다.⁵⁾ 따라서 혈장 호모시스테인 농도는 이들 B-비타민들의 영양상태에 영향을 받는다.

콜린은 호모시스테인이 메티오닌으로 전환되는 반응에서 엽산과 대사적으로 상호 관련되어 있다. Betain: homocysteine S-methyltransferase는 betain을 기질로 사용하여 호모시스테인을 메틸화하여 메티오닌을 재합성하는 효소이

접수일 : 2006년 11월 22일

채택일 : 2007년 1월 12일

*This research was supported by the Hannam University Research Fund in 2005.

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail : hsmn@hannam.ac.kr

다.⁶⁻⁸⁾ 메틸기는 식이중의 메티오닌과 콜린을 통해 대부분이 공급되며, 인체는 메틸기의 약 60%를 콜린으로부터 얻고 있다.⁹⁾ 메티오닌은 methionine adenosyltransferase에 의해 S-adenosylmethionine (SAM)으로 전환되며, SAM은 DNA가 메틸화되는 과정에서 주된 메틸기 공여체로 작용한다.¹⁰⁻¹²⁾ 따라서 콜린과 메티오닌과 같은 메틸기 공여 영양소가 부족할 때 genomic DNA의 메틸화를 비롯하여 다양한 메틸화 반응이 저해되며,^{8,13,14)} 조직내에 SAM이 부족할 경우 DNA의 메틸화가 저하되어 특정 유전자의 발현에 영향을 줄 수 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 이러한 변화는 인지능력저하의 위험을 증가시키는 것으로 제안되었다.

메티오닌 대사회로에서 작용하는 콜린, 엽산, 메티오닌 가운데 어느 한 가지의 대사과정을 제한하는 연구를 통해 이 세 가지 물질의 대사과정이 밀접하게 상호관련되어 있음이 다음과 같이 밝혀졌다. 흰쥐에게 콜린결핍 식이를 2주간 주었을 때, 간조직내 엽산함량이 31~40% 저하되었으며, 콜린을 다시 공급하였을 때 간 엽산함량이 정상수준으로 회복되었다.¹⁸⁾ 흰쥐에게 메티오닌과 콜린이 모두 결핍된 식이를 5주간 먹인 결과 간조직내 엽산함량이 대조군의 50% 수준으로 저하되어 이들 물질이 대사상 밀접하게 상호관련되어 있었다.^{7,18)} 실험동물에게 항엽산제인 methotrexate를 투여하거나 무엽산식으로 tetrahydrofolate 결핍을 유도한 결과 간조직의 총콜린 및 phosphocholine 함량이 저하되었으므로 심한 엽산결핍이 콜린 저장량을 고갈시켰다.^{7,19,20)} 이와 같이 메티오닌 대사회로의 영양소들은 대사적으로 밀접하게 상호 관련되어 있으므로 영양상태를 평가하거나 DNA 메틸화 상태를 연구할 때 이들 메틸기 공여 영양소들의 상호작용을 고려하는 것이 필요하다.

생체 조직내 들어있는 다양한 종류의 methyltransferase는 대체로 SAM을 메틸기 공여체로 사용한다.¹¹⁾ SAM이 me-

thyltransferase의 작용에 의해 탈메틸화 될 때 SAH가 생성되며, 이어서 SAH는 SAH hydrolase에 의해 호모시스테인과 adenosine으로 분해된다. 이때 호모시스테인이 효율적으로 제거되지 않으면, 호모시스테인으로부터 SAH가 생성되는 역반응이 우세하게 진행된다.¹⁰⁾ 대체로 SAH는 대부분의 methyltransferase에 대한 친화도가 SAM 보다 훨씬 높기 때문에 SAH는 이들 methyltransferase의 작용을 강력하게 저해한다.¹⁰⁾ 이런 이유로 인해 호모시스테인혈증이 나타나면 조직내 SAH의 농도가 증가된다. 최근에 혈장 호모시스테인 뿐 아니라 뇌조직의 SAH 농도 상승도 인지능력 손실과 알츠하이머와 상관성이 있는 것으로 조사되었다.¹⁻³⁾ 이와 같이 호모시스테인이나 SAH 농도가 증가될 때 인지능력이 저하되는 기전은 호모시스테인이 신경독성물질로 작용하여 신경세포가 손상되거나^{21,22)} 뇌조직내 SAM의 부족으로 인해 DNA와 단백질을 포함한 여러 물질의 메틸화가 저하되어 혈관구조가 손상되거나 또는 신경세포가 세포사멸과정에 민감해지기 때문인 것으로 제안되었다.²³⁻²⁵⁾

본 연구에서는 엽산과 콜린영양 불균형에 의해 뇌조직과 간조직에서 일어나는 메티오닌 대사회로에서의 메틸기 대사과정에 나타나는 변화를 조사함으로써 호모시스테인혈증 및 뇌조직 SAM과 SAH 수준과의 대사적 연관성을 분석하였다. 이들 메틸기 대사반응의 biomarker들의 상관성 연구는 인지능력부전의 위험인자로 작용하는 혈장 호모시스테인 또는 SAM과 SAH 수준의 개선과 인지능력부전의 예방 및 치료연구를 위한 기초자료가 될 것이다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

엽산 분석용 배지는 Difco사 제품, HPLC용 메탄올은 Mer-

Table 1. Experimental diets

Diet ingredients (g/kg)	Control	CD (choline-deficient)	FD (folate-deficient)	CFD (choline/folate-deficient)
Folic acid	0.002	0.002	0	0
Choline bitartrate (41.1% choline)	2.5	2.5	0	0
Cornstarch	620.690	620.690	623.192	623.192
Vitamin-free casein (> 85% protein)	140	140	140	140
Sucrose	100	100	100	100
Soybean oil	40	40	40	40
α -cellulose	50	50	50	50
Mineral mix (AIN-93M-MX)	35	35	35	35
Folate-free vitamin mix ¹⁾	10	10	10	10
L-cystine	1.8	1.8	1.8	1.8
t-butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008	0.008

1) Folate-free vitamin mix had the same formulation as AIN vitamin mix (AIN-93-VX) with the exception that folic acid was absent

ck사 제품, tributylphosphine은 Fluka사 제품, 7-fluoro-benzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulphonate (SBDF)는 Wako사 제품을 사용하였다. CpG methylase는 New England사 제품, [³H]S-adenosylmethionine은 Perkin-Elmer사 제품을 사용하였고, genomic DNA는 Qiagen사의 kit로 정제하였으며 그 밖의 분석시약은 Sigma사 제품을 사용하였다.

2. 실험 동물 및 식이

Sprague Dawley 종 수컷 (6주령 170~180 g) 32마리를 일본 Slc사에서 분양받아 체중에 따라 난괴법으로 각 군당 8마리씩 4군으로 나누어 스텐레스 사육장에 한 마리씩 분리하여 사육하였다. 사육실의 온도와 습도는 각각 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 5\%$ 로 유지하였으며 조명은 12시간 주기 (9:00~21:00)로 조절하였고 물은 2차 증류수로 무제한 급여하였다.

실험 식이는 AIN-93M식을 기준으로 실험군에 따라 control 식이, 콜린결핍 식이 (CD), 엽산결핍 식이 (FD), 콜린 및 엽산결핍 식이 (CDF)를 제공하면서 8주간 사육하였다 (Table 1). 식이 성분 중의 전분과 sucrose는 삼양사 제품을 사용하였으며, vitamin-free casein, AIN-93 mineral mix와 folate-free vitamin mix는 Dyets사 제품을, 나머지 식이성분은 Sigma사 제품을 사용하였다. 식이섭취량은 2일에 한 번씩 측정하였으며, 체중은 1주일에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율 (Food efficiency ratio: FER)은 일정기간의 체중증가량을 동일기간 섭취한 식이량으로 나누어 산출하였다.

3. 시료수집 및 전처리

실험기간이 종료되기 전날부터 동물을 12시간 절식시킨 상태에서 CO₂ 가스로 마취시킨 뒤 개복하여 심장천자법으로 해파린 처리된 주사기를 사용하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리 및 채취한 후 즉시 -70°C 에 냉동 보관하였다. 간과 뇌 조직을 적출한 후 무게를 측정하고 즉시 액체질소로 급속 냉동시켜 -70°C 에 냉동 보관하였다가 생화학적 분석에 사용하였다. 동물 조직의 생화학적 분석결과를 토대로 콜린과 엽산 결핍의 영향을 비교·분석하였다.

4. 분석방법

1) 조직내 엽산 농도 분석 (96-well microplate를 이용한 분석법)

시료의 엽산 함량은 *Lactobacillus casei*를 이용한 미생물학적 방법을 96-well에 적용시킨 방법으로 분석하였다.²⁹⁾

간과 뇌조직의 엽산은 aultolysis 방법에 의해 polyglutamate chain을 분해한 후²⁷⁾ 분석하였으며, 혈장엽산은 직접 미생물학적 분석법으로 분석하였다.

2) Methionine synthase (MS) 활성도 측정

Methionine synthase 활성도는 Brot와 Weissbach 방법²⁸⁾ 일부 수정한 Kolhouse와 Allen의 방법에²⁹⁾ 의해 측정하였다. 조직 분쇄액으로부터 준비된 상청액의 MS 활성에 의해 5-¹⁴CH₃-THF로부터 [¹⁴C]-methyl기를 호모시스테인으로 전이시켜 [¹⁴C]-methionine이 생성되도록 하였다. Bio Rad AG1-X minicolumn을 이용하여 5-¹⁴CH₃-THF로부터 [¹⁴C]-methionine을 분리하였다. 분리된 [¹⁴C]-methionine의 방사능을 scintillation counter로 측정하여 MS 활성을 정량 분석하였다.

3) Protein assay

단백질 농도는 Bradford's method로³⁰⁾ 분석하였으며, 이때 bovine 혈청단백질을 표준용액으로 사용하였다.

4) HPLC를 이용한 호모시스테인과 시스테인의 분석

혈장 호모시스테인 농도는 Araki와 Sako의 HPLC법³¹⁾ 일부 수정한 방법³²⁾ 사용하여 분석하였다. 혈장 호모시스테인의 티올기와 ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulphonate를 반응시켜 높은 형광성을 나타내면서 안정한 성질의 형광물질을 형성시킨 후 fluorescence detector로 정량하였다.

5) HPLC를 이용한 SAM과 SAH의 분석

간과 뇌조직내 SAM과 SAH의 농도는 Fell 등의 방법³³⁾에 의해 측정하였다. 조직을 0.4 M perchloric acid 용액을 이용하여 분쇄한 후 원심분리하여 얻은 상청액을 당일 분석하였다. 상청액은 centrifugal filter (Millipore사)로 여과한 후 분석 column에 주입하였으며, gradient mobile phase를 이용하여 분리하였다. 254 nm에서의 얻은 흡광도 peak area를 이용하여 SAM과 SAH의 농도를 정량하였다.

6) Methyl acceptance assay를 이용한 genomic DNA 메틸화 분석

간과 뇌조직의 genomic DNA는 kit를 사용하여 정제한 다음, CpG methylase를 사용하여 Balaghi와 Wagner 방법³⁴⁾로 DNA 메틸화를 분석하였다. 반응조건은 다음과 같다: DNA 0.5 μg , L-[methyl ³H]-SAM 3 μM (2 μCi), CpG methylase 3 units, Tris buffer (Tris-HCl 10 mM, pH 7.9, NaCl 120 mM, EDTA 10 mM, Dithiothreitol 1 mM)를 혼합하여 총 30 μl 가 되도록 하였다. 이 혼합물을 두

Table 2. Effect of choline and folate-deficient diets on food intake, weight gain and liver weight of rats

Group ¹⁾	Control	CD	FD	CFD
Food intake (g/day)	23.3 ± 0.9 ^{3)cd}	22.2 ± 0.5 ^{ab}	22.2 ± 0.7 ^{ab}	20.7 ± 0.7 ^b
Weight gain (g/day)	6.08 ± 0.41 ^a	5.26 ± 0.17 ^{ab}	5.46 ± 0.29 ^{ab}	5.08 ± 0.21 ^b
F.E.R ²⁾	0.259 ± 0.009 ^a	0.237 ± 0.004 ^b	0.245 ± 0.006 ^{ab}	0.246 ± 0.003 ^b
Liver wt/body wt ratio	0.0329 ± 0.0116 ^b	0.0331 ± 0.0017 ^b	0.0316 ± 0.006 ^b	0.0368 ± 0.0051 ^a

1) CD: Choline-deficient, FD: Folate-deficient, CFD: Choline- and folate-deficient

2) Feed Efficiency Ratio = Weight gain (g)/Food intake (g)

3) Values are mean ± S.E. (n = 8)

4) Values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by two-way ANOVA and calculation of Duncan's multiple-range test

벌씩 준비하여 30℃에서 1시간동안 항온 유지하며 메틸화 반응이 진행되도록 하였다. 반응이 끝난 혼합물을 흡입펌프에 연결한 Whatman DE 81 이온교환필터에 옮긴 다음, 0.5 M phosphate buffer pH 7.0, 70% ethanol, 99% ethanol 순으로 씻어 주었다. 마른 필터를 vial에 넣고 5 ml의 scintillant를 첨가하여 scintillation counter로 방사능을 측정하여 genomic DNA의 메틸화수준을 분석하였다. 각 시료의 blank는 CpG methylase를 제외한 나머지 성분을 위와 동일하게 처리하여 준비하였다.

7) 통계처리

모든 분석결과는 SPSS PC⁺ 12.0 프로그램을 이용하여 통계처리 하였다. 결과는 실험군별 평균과 표준오차로 나타내었고 실험군간의 차이는 이원배치 분산분석법 (two-way ANOVA)으로 분석한 후 Duncan의 다중비교법으로 $p < 0.05$ 수준에서 사후검정 하였다. 일부 변수들 사이의 관련성은 Pearson's correlation으로 분석한 다음 이에 대한 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 사료섭취량, 체중증가량 및 사료효율

실험 식이를 8주간 흰쥐에게 급여하였을 때 조사된 식이섭취량과 체중증가량을 Table 2에 제시하였다. 식이섭취량은 콜린결핍군 (CD)과 엽산결핍군 (FD)에서 낮은 경향을 보였고 콜린/엽산결핍군 (CFD)에서 가장 낮은 경향을 보였다 ($p = 0.090$). 체중증가량도 식이섭취량과 유사한 경향을 나타내어 콜린과 엽산결핍 식이급여에 (CFD) 의해 성장이 유의적으로 저해되는 것으로 나타났으며, 체중 대비 간 무게 (liver wt/body wt ratio)도 CFD군이 다른 실험군들 보다 높아 ($p < 0.05$) 콜린/엽산결핍군에 지방간의 위험이 있었다.

2. 혈장, 간 및 뇌조직의 엽산농도

혈장과 간 및 뇌조직의 엽산 농도를 분석한 결과 Fig. 1과 같았다. 엽산결핍 식이 (FD)를 6주령 adult rat에게 8주 동

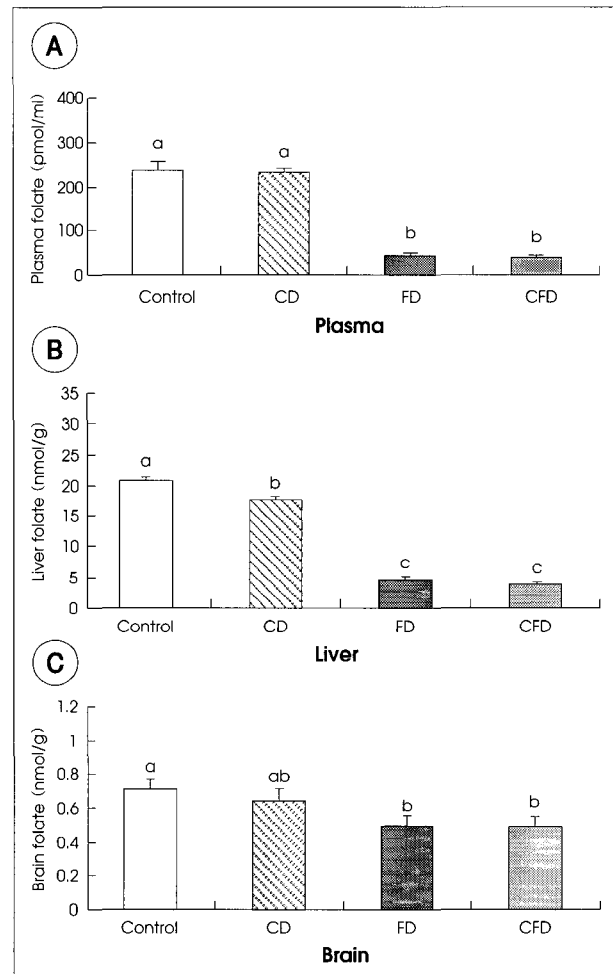


Fig. 1. Effect of choline and folate deficiency on plasma, liver and brain folate in rats. Concentration of folate was measured in plasma (A), liver (B) and brain (C) as describe in methods. Values are the means ± S.E. of measurements carried out from eight rats. Different letter above each bar indicates that it is significantly different at $p < 0.05$ by two-way ANOVA and calculation of Duncan's multiple-range test. CD: Choline-deficient, FD: Folate-deficient, CFD: Choline & folate-deficient.

안 주었을 때 혈장의 엽산농도는 대조군의 18% 수준으로 크게 저하되었으며 ($p < 0.05$), 간의 엽산농도는 대조군의 23% 수준으로 현저히 저하되어 ($p < 0.001$) 심한 엽산결핍상태가 유도되었음을 알 수 있었다. 이와 대조적으로 뇌조직의 엽산

Table 3. Effect of choline- and folate-deficient diets on hepatic methionine synthase activity and plasma homocysteine in rats

Group ¹⁾	Control	CD	FD	CFD
Liver methionine synthase (nmole/hr/mg protein)	2.88 ± 0.19 ^{NS}	3.37 ± 0.16	2.75 ± 0.29	3.01 ± 0.16
Plasma homocysteine (μM)	6.29 ± 0.60 ^b	4.34 ± 0.23 ^b	18.34 ± 1.62 ^a	19.35 ± 3.62 ^a
Plasma cysteine (μM)	121.37 ± 2.93 ^{ab}	125.85 ± 5.86 ^a	118.87 ± 3.25 ^{ab}	109.86 ± 2.39 ^b

1) CD: Choline-deficient, FD: Folate-deficient, CFD: Choline- and folate-deficient

2) Values are mean ± S.E. (n = 8)

3) Values with different superscripts are significantly different at p < 0.05 by two-way ANOVA and calculation of Duncan's multiple-range test

4) NS: not significant

Table 4. Effect of choline- and folate-deficient diets on hepatic and brain SAM and SAH in rats

Group ¹⁾	Control	CD	FD	CFD
Liver SAH (nmole/g)	18.17 ± 1.10 ^{2) b3)}	16.30 ± 1.69 ^b	26.80 ± 1.90 ^a	27.40 ± 2.80 ^a
Liver SAM (nmole/g)	41.35 ± 2.45 ^a	41.18 ± 4.08 ^a	17.84 ± 1.93 ^b	17.78 ± 1.63 ^b
Liver SAM/SAH ratio	2.32 ± 0.15 ^a	2.69 ± 0.30 ^a	0.70 ± 0.10 ^b	0.73 ± 0.13 ^b
Brain SAH (nmole/g)	2.01 ± 0.10 ^{NS4)}	1.83 ± 0.07	1.95 ± 0.13	1.97 ± 0.11
Brain SAM (nmole/g)	13.19 ± 0.18 ^{NS}	13.71 ± 0.43	13.81 ± 0.38	14.03 ± 0.14
Brain SAM/SAH ratio	6.67 ± 0.34 ^{NS}	7.55 ± 0.39	7.33 ± 0.60	7.24 ± 0.33

1) CD: Choline-deficient, FD: Folate-deficient, CFD: Choline- and folate-deficient

2) Values are mean ± S.E. (n = 8)

3) Values with different superscripts are significantly different at p < 0.05 by two-way ANOVA and calculation of Duncan's multiple-range test

4) NS: not significant

농도는 대조군의 69%수준으로 저하되었으므로 ($p < 0.05$), 뇌조직 엽산 농도는 엽산결핍 식이에 의한 영향을 간조직 보다 덜 받는 것으로 조사되었다.

콜린결핍 식이 (CD)를 8주간 공급한 결과 간 엽산농도는 대조군의 85% 수준으로 저하되었으나 ($p < 0.05$) 혈장과 뇌조직 엽산농도는 대조군과 유의적이 차이가 없었다 (Fig. 1). 이와 같이 8주간의 콜린결핍 식이급여에 의해 경미한 엽산 결핍상태가 나타났으므로, 심한 엽산결핍을 유도하기 위해서는 더 오랜 기간 동안 콜린결핍 식이를 주어야할 것으로 사료된다.

3. 혈장 호모시스테인과 간조직 Methionine synthase (MS) 활성

콜린과 엽산결핍 식이 급여에 따른 혈장호모시스테인 농도의 변화는 Table 3과 같았다. 엽산결핍 식이군 (FD)의 혈장 호모시스테인 농도는 대조군의 2.9배를 나타내어 호모시스테인혈증 (moderate homocysteinemia)이 유발되었으므로 ($p < 0.001$), 저조한 엽산영양상태가 호모시스테인의 재메틸화과정을 현저하게 저해함을 보여주었다. 콜린결핍 식이 (CD)는 혈장 호모시스테인 농도에 영향을 주지 않았으며, 콜린/엽산 결핍군 (CFD)의 혈장호모시스테인 농도는 엽산결핍군과 유사한 수준을 나타내어 8주간의 콜린결핍 식이 공급이 adult rat의 호모시스테인 대사에 유의적인 영향을 주지 않았다.

엽산은 MS에 의해 호모시스테인으로부터 메티오닌이 합성

될 때 필요한 영양소이며, MS 활성은 혈장 호모시스테인 농도에 직접적인 영향을 주므로, 엽산과 콜린결핍 식이가 흰쥐의 간조직 MS 활성에 미치는 영향을 조사하였다 (Table 3). 콜린결핍 식이 (CD), 엽산결핍 식이 (FD), 그리고 콜린/엽산결핍 식이 (CFD)는 간조직 MS 활성에 영향을 주지 않았으므로, 엽산 결핍에 의해 나타난 호모시스테인혈증은 MS 활성 저하와 관련되어 있지 않은 것으로 나타났다.

4. 간과 뇌조직의 S-adenosylmethionine과 S-adenosylhomocysteine

조직내 호모시스테인은 SAH hydrolase의 강력한 저해제로 작용하므로 호모시스테인이 증가되면 조직의 SAH 농도도 증가되는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 콜린과 엽산결핍이 간과 뇌조직의 SAH와 SAM에 미치는 영향을 Table 4에 제시하였다. 엽산 (FD) 또는 콜린/엽산결핍 식이 (CFD) 급여는 간조직의 SAH 농도를 대조군의 147% 수준으로 증가시켰으며, 간조직 SAM 농도를 대조군의 41% 수준으로 저하시킴으로써 SAM/SAH 비율이 대조군의 약 30% 수준으로 저하되었다. 그러나 콜린결핍 식이군 (CD)의 간조직 SAH와 SAM 농도는 대조군과 유의적인 차이가 없었다.

간조직과 대조적으로 엽산결핍, 콜린결핍 및 콜린/엽산결핍은 뇌조직의 SAM과 SAH 농도에 영향을 주지 않았다 (Table 4). 이 결과로부터 이들 미타민 결핍이 SAM과 SAH 대사에 미치는 영향이 조직에 따라 특이적으로 차이가 있으며, 뇌조직의 SAM과 SAH의 농도는 엽산과 콜린 결핍에 의

해 간조직 보다 덜 민감하게 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

5. 간과 뇌조직의 Genomic DNA 메틸화

간과 뇌조직의 genomic DNA가 메틸화되어 있는 정도를 methyl group acceptance test¹⁴⁾ 이용하여 분석하였다. 조직에서 분리·정제된 genomic DNA를 L-[methyl ³H]-SAM과 반응시켰으며, CpG methylase에 의해 메틸화 반응이 일어나도록 하였다. 이 실험에서는 L-[methyl ³H]-SAM으로부터 [methyl ³H] group이 genomic DNA로 전이되는 양이 많을수록 genomic DNA의 메틸화 정도가 낮은 상태를 나타낸다. Fig. 2에 제시한 바와 같이 콜린 결핍 (CD), 엽산 결핍 (FD) 및 콜린/엽산결핍 식이군 (CFD)의 간조직 genomic DNA에 대조군보다 유의적으로 많은 [methyl ³H] group이 전이되었으므로, 엽산/콜린결핍 식이는 간조직 DNA 메틸화를 유의적으로 저하시켰다. 따라서 8주간의 콜린결핍식이 급여가 메티오닌 대사회로에서 호모시스테인과 SAM, SAH농도에는 영향을 주지 않았지만 (Table 3, 4), 간조직의 DNA 메틸화는 저해하는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 뇌조직의 DNA 메틸화 수준은 엽산과 콜린 결핍에 의해 저해되는 경향이었으나 대조군과 유의적인 차이는 없었다. 이러

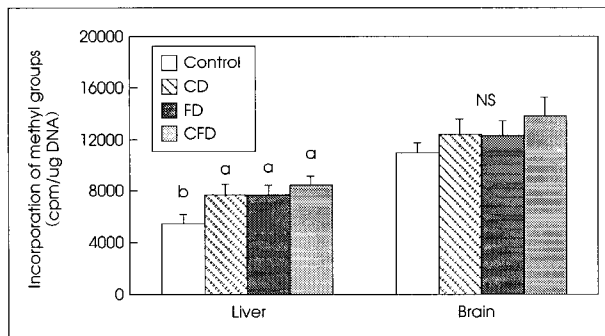


Fig. 2. Effect of choline and folate deficiency on methylation of DNA. DNA from liver and brain was prepared and DNA methylation was measured as described in methods. Values are the means \pm S.E. of duplicate measurements carried out on DNA from eight rats. Different letter above each bar indicates that it is significantly different at $p < 0.05$ by two-way ANOVA and calculation of Duncan's multiple-range test. NS: not significant, CD: Choline-deficient, FD: Folate-deficient, CFD: Choline & folate-deficient diet group.

한 결과는 뇌조직의 SAM과 SAH 농도가 엽산 또는 콜린 결핍에 의해 변화되지 않은 것과 관련이 있는 것으로 보인다.

6. 메티오닌 대사관련 물질, 엽산 및 Genomic DNA 메틸화의 상관관계

엽산과 콜린결핍 식이를 급여하였을 때 나타나는 혈장 호모시스테인, 세포내 genomic DNA 메틸화 및 엽산수준 사이의 대사적 관련성을 분석하기 위하여, 호모시스테인 및 DNA 메틸화와 SAM, SAH 및 엽산 농도와의 상관성을 Pearson의 상관분석법으로 분석하여 Table 5에 제시하였다.

혈장 호모시스테인과 상관성이 높은 관련 변인은 혈장 엽산 ($r = -0.739$, $p < 0.01$), 간조직 엽산 ($r = -0.795$, $p < 0.01$) 및 간조직 SAM 농도 ($r = -0.757$, $p < 0.01$)로서 높은 음의 상관관계를 나타내어, 조직내 엽산과 SAM농도가 높을수록 혈장 호모시스테인 농도가 낮았다. 또한, 혈장호모시스테인은 간조직 SAH ($r = 0.767$, $p < 0.01$), 뇌조직 SAH ($r = 0.443$, $p < 0.05$)와 높은 양의 상관성을 나타내어 혈장 호모시스테인이 높을수록 조직내 SAH 농도가 높은 경향을 보였다. 간과 뇌조직의 DNA 메틸화 정도는 각 조직의 엽산 농도와 상관되어 있었으며 (각각 $r = -0.390$, $p < 0.01$; $r = -0.397$, $p < 0.01$) 엽산농도가 높을수록 DNA 메틸화 정도가 높았다. 간과 뇌조직의 DNA 메틸화 정도는 SAM과 SAH의 농도 및 혈장 호모시스테인 농도와는 상관관계를 나타내지 않아 다른 연구와¹²⁾ 차이가 있었다.

고 찰

역학연구와 임상연구에서 호모시스테인혈증이 동맥경화성 심혈관계질환, 뇌졸중, 말초동맥경색질환 및 정맥전색의 독립적인 위험인자로 밝혀졌으며, 인지능력손상, 치매, 알츠하이머 및 우울증과 같은 신경변성질환의 위험인자로도 보고되었다.¹⁻⁴⁾ 호모시스테인혈증은 비타민 B₁₂, 엽산 또는 콜린이 결핍되거나 일부 효소의 활성이 결여되어 메티오닌 대사에 장애가 있을 때 나타난다. 엽산과 콜린은 메티오닌 대사회로, DNA 메틸화에 필요한 SAM의 합성 및 조직내 SAH의 수

Table 5. Correlation between incorporated methyl groups in DNA, plasma homocysteine, S-adeonsylhomocysteine and S-adenosyl-methionine and folate concentration in rats fed choline- and folate-deficient diets

Variables	Plasma folate	Liver folate	Brain folate	Hepatic SAH	Hepatic SAM	Brain SAH	Brain SAM	Plasma Hcy
Hepatic DNA methylation ¹⁾	-0.306	-0.390*	0.105	0.171	-0.264	-0.304	0.309	0.298
Brain DNA methylation	-0.238	-0.271	-0.397*	0.363*	-0.162	-0.073	0.062	0.106
Plasma Hcy	-0.739**	-0.795**	-0.378*	0.767**	-0.752**	0.443*	0.216	1.000

1) Incorporated methyl groups into DNA (cpm) in methyl group acceptance test

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Significant by Pearson's correlation test

준에 영향을 줌으로써 신경세포 및 혈관계의 정상적 기능 유지에 관여하는 것으로 제안되었다.¹⁻⁴⁾ 따라서 이들 영양소를 적절히 공급하여 혈장 호모시스테인 농도를 낮게 유지하는 것이 이러한 질병의 위험도를 낮추는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

본 연구에서는 메티오닌 대사회로에 관여하는 콜린과 엽산이 결핍되었을 때 호모시스테인 대사에 미치는 영향을 조사할 목적으로 혈장 호모시스테인, 메티오닌 대사회로와 관련된 SAM과 SAH, methionine synthase 활성, genomic DNA 메틸화 정도 및 엽산 영양상태를 분석하였다. 연구결과 엽산결핍 식이군 (FD)에서 엽산영양상태가 현저하게 저하되었으며 (Fig. 1), 이로 인해 혈장 호모시스테인이 크게 증가되었고 (Table 3) 간조직의 SAM이 현저히 감소되고 SAH의 농도가 증가된다는 (Table 4) 종전의 연구결과들이 확인되었다. 뇌조직의 호모시스테인 농도는 간조직과 비교할 때 모든 실험군에서 매우 낮은 수준이었으며, 본 연구에서 사용한 형광도 측정법으로는 분석이 불가능한 수준으로 낮았다.

콜린결핍식이 (CD)를 8주간 급여하였을 때 간조직의 엽산농도는 대조군의 85% 수준으로 저하되었고, 혈장 및 뇌조직 엽산농도에는 영향을 주지 않았으므로 콜린결핍이 경미하였음을 알 수 있었다 (Fig. 1). Selhub 등⁷⁾에 의하면 2주간 콜린결핍식이 급여시 간 엽산농도가 대조군보다 31% 저하되어 본 연구와 비교할 때 단기간에 간 엽산농도가 더 많이 저하되었다. 그러나 da Costa 등의 연구³⁵⁾에서는 3주간 동안 콜린이 결핍된 AIN-93G 식이를 먹인 흰쥐의 혈장 호모시스테인 ($4.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$; $n = 5$)과 간조직 betain 농도가 대조군 ($4.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$; $n = 5$)과 차이가 없었으며, 메티오닌을 주사로 부하한 다음 2시간 후에 콜린결핍군의 혈장 호모시스테인 농도는 $25.0 \pm 3.7 \mu\text{M}$ 로서 대조군 ($10.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$)과 비교할 때 2배 증가되어 단일탄소기 대사 능력이 저하되어 있음을 보여주었다. Kim 등의 연구³⁰⁾에 의하면 실험동물에게 succinylsulfathiazole과 무엽산식이를 4주 동안 준 결과 간조직의 엽산함량은 $1.4 \pm 0.7 \mu\text{mol/g}$ 으로 저하되어 대조군보다 ($14.3 \pm 1.1 \mu\text{mol/g}$)과 비교할 때 엽산이 심하게 결핍되었고 간조직 콜린 및 phosphocholine 함량이 유의적으로 저하되었으나, 항생제를 제외시키고 무엽산식이를 20주 동안 주었을 때 간조직 엽산함량은 $4.1 \pm 1.1 \mu\text{mol/g}$ 으로서 대조군 ($18.4 \pm 4.8 \mu\text{mol/g}$) 보다 크게 저하되었으나 항생제를 준 동물보다 엽산영양이 양호했으며, 간조직 콜린 및 phosphocholine 수준에는 영향을 주지 않았다.²⁹⁾

콜린결핍식이군의 조직내 SAM과 SAH의 변화가 본 실험 기간 동안에 관찰되지 않아 다른 연구들과³⁶⁾ 차이가 있었다.

이 결과는 8주간의 콜린결핍식이 급여에 의해 엽산과 콜린 결핍이 경미하게 나타남으로써 호모시스테인 및 메틸기 대사에 유의적인 영향을 미치지 않았기 때문인 것으로 보인다. 따라서 콜린결핍 식이를 더 오랜 기간 급여하거나,³⁵⁾ 콜린결핍식이와 동시에 메티오닌을 부하시키는 것이³⁵⁾ 심한 콜린결핍을 유도하여 메티오닌 대사회로에 유의적인 영향을 줄 것으로 사료된다. Locker 등의 연구에³⁵⁾ 의하면 콜린결핍식을 장기간 (14개월) 주었을 때 간조직에 지방이 다량 침착되었고 DNA 메틸화가 저하되었다. Selhub 등의 연구에서는⁷⁾ 2주 동안의 항엽산제인 methotrexate 투여시 간엽산 농도가 48% 저하되었으며 콜린결핍식이 급여시 31% 저하되었다.

엽산, 콜린 및 비타민 B₁₂는 신경조직의 발달과 퇴화과정에서 중요한 기능을 하며 특히, 초기 배아기의 신경발달과정에서 엽산이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 호모시스테인은 메틸기 전이과정을 저해함으로써 병아리 배아의 신경관 폐쇄를 지연시켰으며,³⁶⁾ 이와 같은 결과는 엽산 보충에 의해 신경관손상이 예방되는 이유를 잘 설명해주고 있다. 호모시스테인 대사에 필요한 미량 영양소 가운데 일부가 결핍되면 수초형성이 저해되고 심각한 신경손상을 가져올 수 있다.

항엽산제인 methotrexate는 뇌척수액의 엽산과 S-adenosylmethionine (SAM)의 농도를 저하시키고 호모시스테인 농도를 증가시켰으므로,³⁸⁾ methotrexate에 의한 신경독성효과는 뇌조직의 엽산 고갈 및 호모시스테인 증가에 기인할 수 있음을 보여주었다. 뇌조직으로 호모시스테인이 운반되는 경로는 확실치 않으나, 동물연구에 의하면 호모시스테인은 단순확산과 운반체를 통한 운반방식에 의해 운반된다.³⁹⁻⁴¹⁾ 마우스를 대상으로 수행된 호모시스테인혈중 연구에서 뇌조직의 blood-brain barrier가 호모시스테인에 의해 교란되었으며,⁴²⁾ 호모시스테인이 bidirectional cellular transporter에 의해 혈장과 뇌조직 양방향으로 운반될 수 있는 것으로 보고되었다.⁴³⁾ 사람의 신경세포는 정상적인 조건에서 자체내에서 호모시스테인을 합성할 수 있으며,⁴⁴⁾ 신경계질환자들의 뇌척수액 호모시스테인 농도는 혈장 호모시스테인 농도에 비례하여 증가되었으나^{45,46)} 뇌척수액 호모시스테인 농도는 혈장보다 20~100배 낮은 수준이었다.⁴⁷⁾ 본 실험의 엽산결핍식이군에서 유도된 혈장 호모시스테인 농도는 $18.34 \mu\text{M}$ 로서 뇌조직의 호모시스테인 농도에 영향을 주기에는 낮은 수준인 것으로 사료된다. Fig. 1에 나타난 것과 같이 뇌조직의 엽산수준은 혈장이나 간과 달리 엽산이나 콜린 결핍식이에 의해 경미하게 저하되었으며, 그 결과 SAM/SAH 및 DNA methylation에 유의적인 영향을 주지 않은 것으로 보인다.

또한 이러한 결과로부터 뇌조직의 엽산보유가 다른 조직보다 효율적으로 이루어지는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 엽산 영양상태를 크게 저하시킬 목적으로 succinylsulfathiazole 이나 methotrexate 등을 식이로 투여하는 방법이 사용되고 있으나, 본 연구에서는 일상적으로 인체에서 일어나는 조건과 유사한 실험조건을 동물연구에 부여할 목적으로 콜린결핍식이만을 단독으로 적용하였다.

Betaine은 콜린이 산화되어 생성되며 호모시스테인으로부터 메티오닌을 합성할 때 이용된다. Cystathionine β -synthase 결손으로 인해 심한 호모시스테인혈증을 나타내는 어린환자들을 ($> 100 \mu\text{M}$) betaine으로 치료하였을 때 혈장과 뇌척수액의 호모시스테인 농도가 저하되었다.⁴⁷⁾ 콜린결핍식이군의 간조직내 엽산 농도는 대조군보다 약 15% 낮았으며 (Fig. 1), 혈장 엽산농도는 콜린결핍 식이급여에 의해 영향을 받지 않았으므로 엽산의 기능적 결핍증세인 호모시스테인혈증이 나타나지 않은 것으로 보인다. Table 5에 제시하였듯이 혈장과 간조직내 엽산농도와 혈장 호모시스테인 농도는 뚜렷한 역관계를 보였으므로, 조직의 엽산농도가 호모시스테인혈증의 가장 주요한 영향 요인임을 확인할 수 있었다.

메티오닌은 methionine-adenosyltransferase에 의해 SAM 합성에 이용되므로 호모시스테인이 메티오닌으로 재메틸화되는 반응은 SAM의 합성에 필수적이다.⁸⁻¹²⁾ SAM은 DNA methyltransferase의 메틸기 공여체이므로 조직내 SAM의 부족은 DNA 메틸화를 저하시킴으로써 신경조직의 발달 및 유지에 필요한 특정 유전자의 발현에 영향을 줄 수 있는 것으로 제안되고 있다.¹³⁻¹⁷⁾ 또한 SAH는 SAM이 메틸기를 전이하는 반응의 생성물이며 DNA 메틸화를 비롯한 여러 가지 메틸화반응을 저해하는 물질이다.¹⁰⁾

엽산결핍 식이군의 뇌조직 엽산농도는 대조군보다 낮은 수준이었지만 (Fig. 1), 뇌조직의 SAM과 SAH를 포함한 메티오닌 대사회로에 유의적인 영향을 미치지 않는 수준인 것으로 보인다 (Table 4). 그러나 엽산 결핍시 (FD) 간과 뇌조직내 genomic DNA 메틸화가 저하되었으며, 콜린 결핍은 간조직의 DNA 메틸화는 저하시켰으나 뇌조직의 DNA 메틸화에는 영향을 주지 않았다. 이와 같이 엽산 결핍이 SAM, SAH 및 DNA 메틸화에 미치는 영향이 간과 뇌조직에서 차이가 있었으므로 엽산 결핍이 메틸기 대사에 미치는 영향은 조직에 따라 특이적으로 다른 양상을 보였다.

결론적으로 엽산결핍 식이 급여는 저조한 엽산 영양상태, 호모시스테인혈증, 간조직의 SAH 농도 증가 및 SAM 농도 저하를 가져옴으로써 간조직 DNA 메틸화를 저해하는 것으로 나타났다. 그러나 엽산결핍식은 뇌조직의 SAM, SAH 농도 및 DNA 메틸화에는 유의적인 영향을 주지 않았으며

로 뇌조직의 메틸기 대사와 DNA 메틸화는 엽산 및 콜린 결핍에 덜 민감하게 영향을 받는 것으로 나타났다. 메티오닌이 충족된 식이조건에서 콜린 결핍은 메틸기 대사에 미치는 영향이 경미하여 혈중 호모시스테인농도와 간 및 뇌조직의 SAM, SAH에 유의적인 영향을 주지 않았다. 따라서 뇌조직의 메틸기 대사는 엽산과 콜린 결핍에 의해 간조직 보다 덜 민감하게 영향을 받으며, 간과 뇌조직의 메틸기 대사는 조직에 특이적인 방식으로 조절되는 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 6주령 흰쥐를 대상으로 엽산 또는 콜린결핍 식이를 8주간 급여한 후 간과 뇌조직내 메틸기 공여물질인 SAM과 SAH의 수준, 혈장 호모시스테인, 엽산 수준 및 세포내 genomic DNA 메틸화 정도에 미치는 영향을 분석함으로써 콜린과 엽산결핍이 인지능력 저하의 위험인자 및 예측인자로서의 호모시스테인혈증 및 DNA 메틸화에 미치는 영향을 조사하였다.

엽산결핍 식이군의 혈장 엽산농도는 대조군의 18% 수준으로 저하되었으며 ($p < 0.001$) 간의 엽산농도는 대조군의 23% 수준 ($p < 0.001$), 뇌의 엽산농도를 대조군의 70% 수준으로 저하되었다 ($p < 0.05$). 콜린결핍 식이를 급여하였을 때, 간 엽산농도는 85% 수준으로 저하되었으나 ($p < 0.05$) 혈장 및 뇌의 엽산농도에는 유의적인 영향을 주지 않았다. 엽산결핍 식이는 혈장 호모시스테인 농도를 2.9배 상승시켰으나 콜린결핍 식이는 혈장 호모시스테인 농도에 영향을 주지 않아 콜린결핍이 경미함을 보여주었다.

엽산결핍 식이를 급여하였을 때 간의 SAH 함량은 대조군보다 47% 상승되고 ($p < 0.001$) SAM은 대조군보다 43% 저하되었고 SAM/SAH 비율은 대조군의 30% 수준으로 저하되어 ($p < 0.001$) 메틸기가 심각하게 결핍되었으며, 이로 인해 간조직의 DNA메틸화가 저해되었다. 그러나 콜린결핍 식이 급여는 간과 뇌조직의 SAM과 SAH 농도에 영향을 주지 않았으며, 간조직의 DNA 메틸화는 저하시켰으나 뇌조직의 DNA 메틸화에는 유의적인 영향을 주지 않았다.

이상에서와 같이 엽산결핍 식이급여로 인한 저조한 엽산 영양상태는 호모시스테인혈증과 간조직의 SAH 농도 증가 및 SAM 농도 저하를 가져옴으로써 간조직 genomic DNA 메틸화를 저해하였으나, 뇌조직의 DNA 메틸화에는 영향을 주지 않았다. 그러나 콜린결핍 식이급여는 메티오닌 공급이 충분한 조건에서 메틸기 대사에 영향을 주지 않았지만, 간조직 genomic DNA 메틸화를 유의적으로 저해하였다. 따라서 뇌조직의 메틸기 대사는 엽산과 콜린 결핍에 의해 간조직보

다 덜 민감하게 영향을 받으며, 간과 뇌조직의 메틸기 대사는 조직에 특이적인 방식으로 조절되는 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Fratiglioni L, Ahlborn A, Viitanen M, Winblad B. Risk factors for late-onset Alzheimer's disease a population-based, case-control study. *Ann Neurol* 33: 258-266, 1993
- 2) Seshadri S, Drachman DA, Lippa CF. Apolipoprotein E4 allele and the lifetime risk of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 52: 1074-1079, 1995
- 3) Guo Z, Cupples LA, Kurz A, Auerbach SH, Volicer L, Chui H, Green RC, Sadovnick AD, Duara R, DeCarli C, Johnson K, Go RC, Growdon JH, Haines JL, Kukull WA, Farrer LA. Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study. *Neurology* 54: 1316-1323, 2000
- 4) Selhub J, Bagley LC, Miller J, Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr* 71: 614S-620S, 2000
- 5) Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 346: 476-483, 2002
- 6) Lu SC, Alvarez L, Huang ZZ, Chen L, An W, Corrales FJ, Avila MA, Kanel G, Mato JM. Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5560-5565, 2001
- 7) Selhub J, Seyoum E, Pomfret EA, Zeisel SH. Effects of choline deficiency and methotrexate treatment upon liver folate content and distribution. *Cancer Res* 51: 16-21, 1991
- 8) Kim YI. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 511-519, 2004
- 9) Institute of Medicine, and National Academy of Sciences USA. Dietary Reference Intakes for Folate, Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₁₂, Panthothenic Acid, Biotin, and Choline, vol. 1. National Academy Press, Washington, D.C., 1998
- 10) Hoffman DR, Cornatzer WE, Duerre JA. Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and transmethylation reactions. *Can J Biochem* 57: 56-65, 1979
- 11) Scott JM. Folate-vitamin B₁₂ interrelationships in the central nervous system. *Proc Nutr Soc* 51: 219-224, 1992
- 12) Niculescu MD, Zeisel SH. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr* 132 (Suppl): 2333S-2335S, 2002
- 13) Wainfan E, Dizik M, Stender M, Christman JK. Rapid appearance of hypomethylated DNA in livers of rats fed cancer-promoting, methyl-deficient diets. *Cancer Res* 49: 4094-4097, 1989
- 14) Ghoshal K, Li X, Datta J, Bai S, Pogribny I, Pogribny M, Huang Y, Young D, Jacob ST. A folate- and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. *J Nutr* 136: 1522-1527, 2006
- 15) Bhawe MR, Wilson MJ, Poirier LA. c-H-ras and c-K-ras gene hypomethylation in the livers and hepatomas of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 9: 343-348, 1988
- 16) Dizik M, Christman JK, Wainfan E. Alterations in expression and methylation of specific genes in livers of rats fed a cancer promoting methyl-deficient diet. *Carcinogenesis* 12: 1307-1312, 1991
- 17) Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res* 52 (Suppl): 2071s-2077s, 1992
- 18) Varela-Moreiras G, Ragel C, Perez de Miguelansanz J. Choline deficiency and methotrexate treatment induces marked but reversible changes in hepatic folate concentrations, serum homocysteine and DNA methylation rates in rats. *J Am Coll Nutr* 14: 480-485, 1995
- 19) Pomfret EA, daCosta KA, Zeisel SH. Effects of choline deficiency and methotrexate treatment upon rat liver. *J Nutr Biochem* 1: 533-541, 1990
- 20) Kim YI, Miller JW, da Costa KA, Nadeau M, Smith D, Selhub J, Zeisel SH, Mason JB. Severe folate deficiency causes secondary depletion of choline and phosphocholine in rat liver. *J Nutr* 124: 2197-2203, 1994
- 21) Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, Arnelie DR, Stamler JS. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5923-5928, 1997
- 22) Parsons RB, Waring RH, Ramsden DB, Williams AC. In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines. *Neurotoxicology* 19: 599-603, 1998
- 23) 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: 6920-6926, 2000
- 24) Yen CL, Mar MH, Meeker RB, Fernandes A, Zeisel SH. Choline deficiency induces apoptosis in primary cultures of fetal neurons. *FASEB J* 15: 1704-1710, 2001
- 25) Tsai AY, Friedrich CB, Mar MH, Zeisel SH. Choline availability alters embryonic development of the hippocampus and septum in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 113: 13-20, 1999
- 26) Tamura T. Microbiological assay of folate, in *Folic Acid Metabolism in Health and Disease* (Picciano MF, Stokstad ELR, Gregory JF eds.), pp.121-137. Wiley-Liss, New York, 1990
- 27) Bird OD, McGlohon VM, Vaitkus JW. A microbiological assay system for naturally occurring folate. *Can J Microbiol* 15: 465-472, 1969
- 28) Brot N, Weissbach H. The role of cobamides in methionine synthesis. Enzymatic formation of holoenzyme. *J Biol Chem* 241: 2024-2028, 1966
- 29) Kolhouse JF, Allen RH. Recognition of two intracellular cobalamin binding proteins and their identification as methylmalonyl-CoA mutase and methionine synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 921-925, 1977
- 30) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976

- 31) Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by HPLC with fluorescence detection. *J Chromatogr* 422: 43-52, 1987
- 32) Min H, Im ES, Seo JS, Mun JA, Burri BJ. Effects of chronic ethanol ingestion and folate deficiency on the activity of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in rat liver. *Alcohol Clin Exp Res* 29: 2188-2193, 2005
- 33) Fell D, Steele RD. The effects of vitamin A deficiency on hepatic folate metabolism in rats. *Arch Biochem Biophys* 240: 843-850, 1985
- 34) Balaghi M, Wagner C. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 1184-1190, 1993
- 35) da Costa KA, Gaffney CE, Fischer LM, Zeisel SH. Choline deficiency in mice and humans is associated with increased plasma homocysteine concentration after a methionine load. *Am J Clin Nutr* 81: 440-444, 2005
- 36) Locker J, Reddy TV, Lombardi B. DNA methylation and hepatocarcinogenesis in rats fed a choline-devoid diet. *Carcinogenesis* 7: 1309-1312, 1986
- 37) Afman LA, Blom HJ, Drittij MJ, Brouns MR, van Straaten HW. Inhibition of transmethylation disturbs neurulation in chick embryos. *Brain Res Dev Brain Res* 158: 59-65, 2005
- 38) Quinn CT, Griener JC, Bottiglieri T, Arning E, Winick NJ. Effects of intraventricular methotrexate on folate, adenosine, and homocysteine metabolism in cerebrospinal fluid. *J Pediatr Hematol Oncol* 26: 386-388, 2004
- 39) Grieve A, Butcher SP, Griffiths R. Synaptosomal plasma membrane transport of excitatory sulphur amino acid transmitter candidates: kinetic characterisation and analysis of carrier specificity. *J Neurosci Res* 32: 60-68, 1992
- 40) Griffiths R, Grieve A, Allen S, Olverman HJ. Neuronal and glial plasma membrane carrier-mediated uptake of L-homocysteate is not selectively blocked by beta-p-chlorophenylglutamate. *Neurosci Lett* 147: 175-178, 1992
- 41) Zeise ML, Knopfel T, Zieglansberger W. (+/-)-beta-Parachlorophenylglutamate selectively enhances the depolarizing response to L-homocysteic acid in neocortical neurons of the rat: evidence for a specific uptake system. *Brain Res* 443: 373-376, 1988
- 42) Kamath AF, Chauhan AK, Kisucka J, Dole VS, Loscalzo J, Handy DE, Wagner DD. Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice. *Blood* 107: 591-593, 2006
- 43) Grieve A, Butcher SP, Griffiths R. Synaptosomal plasma membrane transport of excitatory sulphur amino acid transmitter candidates: kinetic characterisation and analysis of carrier specificity. *J Neurosci Res* 32: 60-68, 1992
- 44) Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB, Rogers E. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 14: 32-42, 2003
- 45) Regland B, Andersson M, Abrahamsson L, Bagby J, Dyrehag LE, Gottfries CG. Increased concentrations of homocysteine in the cerebrospinal fluid in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Scand J Rheumatol* 26: 301-307, 1997
- 46) Regland B, Abrahamsson L, Blennow K, Grenfeldt B, Gottfries CG. CSF-methionine is elevated in psychotic patients. *J Neural Transm* 111: 631-640, 2004
- 47) Surtees R, Bowron A, Leonard J. Cerebrospinal fluid and plasma total homocysteine and related metabolites in children with cystathionine beta-synthase deficiency: the effect of treatment. *Pediatr Res* 42: 577-582, 1997