

# 어미 쥐의 엽산 영양상태가 자손 쥐의 수초기본단백질 (Myelin Basic Protein) 발현에 미치는 영향\*

채은혜\*\* · 김수정\*\* · 이화영\*\*\* · 장남수\*\*§

이화여자대학교 생활환경대학 식품영양학과, \*\* 이화여자대학교 의과대학 해부학교실\*\*\*

## Effects of Maternal Folic Acid Nutritional Status on the Expression of Myelin Basic Protein in the Offspring\*

Chae, Eun Hye\*\* · Kim, Soo Jung\*\* · Lee, Hwa Young\*\*\* · Chang, Namsoo\*\*§

Department of Nutritional Sciences, \*\* Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Department of Anatomy \*\*\* Ewha Womans Medical Center, Seoul 120-750, Korea

### ABSTRACT

Myelin basic protein (MBP), a major structural protein of the myelin, is thought to be important for the maintenance of myelin in the central nervous system (CNS). We investigated the effect of maternal folic acid nutritional status on the folate level and the synthesis of MBP in the offspring. In order to test this hypothesis, female Sprague-Dawley rats were fed either folic acid sufficient (8 mg/kg diet) or deficient (0 mg/kg diet) diet from 2 wks prior to the mating throughout the entire pregnancy, lactation and weaning period. We examined plasma folate level by the radioimmunoassay and homocysteine level by HPLC, respectively. The MBP expression was measured by the western blot analysis. The maternal folic acid deficiency decreased plasma folate level with a concomitant increase in plasma homocysteine level in their offspring. The maternal folic acid deficiency decreased hepatic levels of SAM and SAM/SAH ratio with a concomitant increase in hepatic levels of SAH and the MBP expression of spinal cord in their offspring at 7 wks of age. These results suggest that maternal folic acid nutritional status affect plasma folate and homocysteine level in their offspring. Moreover, the maternal folic acid deficiency might inhibit the MBP expression of the spinal cord and disrupt many other vital CNS reactions in their offspring. (*Korean J Nutrition* 40(2) : 130~137, 2007)

KEY WORDS : myelin basic protein (MBP), folate, SAM/SAH ratio, spinal cord.

### 서 론

엽산 결핍은 죽상동맥경화증,<sup>1)</sup> 혈전증<sup>2)</sup>과 같은 심혈관 계통 질환뿐 아니라 신경정신 장애,<sup>3)</sup> 알츠하이머병<sup>4)</sup>과 같은 신경퇴행성 질환 그리고 신경관 결손<sup>5,6)</sup> 등을 포함한 다양한 신경학적 및 정신 질환의 발병에도 중요한 역할을 하는 것으로 인식되고 있으며 뇌, 척수 혈관주위 백질의 탈수초성 질환을 일으키는 것으로 보고되었다.<sup>7)</sup> 엽산 결핍은 spinal cord의 아급성연합성척수변성 (subacute combined dege-

neration), 뇌교 수초 용해 (central pontine myelinolysis) 와도 관련성이 보고되고 있다.<sup>8)</sup>

엽산 결핍은 DNA, 지방산, 인지질, 다가불포화지방산, 그리고 단백질 등의 100여 가지 이상의 생체화합물의 메틸화 과정의 주요 methyl group donor인 S-adenosylmethionine (SAM) 결핍을 유도함으로써 저메틸화를 일으킨다.<sup>7)</sup> 메틸화의 감소로 인해 일어나는 신경학적 위험은 엽산 결핍이나 비타민 B<sub>12</sub> 결핍에 의해 유발된다는 것이 널리 알려진 사실로서 받아들여지고 있다.<sup>7)</sup>

정상적인 중추신경계의 작용을 위해서는 수초의 합성과 유지가 필수적이다. 수초의 기능 손실은 축삭에서의 자극전달 장애를 초래하므로 이에 따른 신경학적 기능 손상이 유발될 수 있다. 노화와 치매를 포함한 신경학적 질환에서 수초 손상의 중요성이 많은 연구를 통해 지적되고 있다.<sup>8)</sup>

말초 및 중추신경계에서 수초의 주요 구조적 역할을 하는 수초기본단백질 (myelin basic protein, MBP)는 수초막의

접수일 : 2007년 2월 1일

채택일 : 2007년 3월 2일

\*This study was supported by a grant from the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (KRF-2005-C00088-I00261).

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : nschang@ewha.ac.kr

형성과 구조에 있어서 중요한 역할을 지니고 있다. MBP는 18.4 kDa, 14.0 kDa을 포함한 exon-1과 21.5 kDa, 17.0 kDa을 포함한 exon-2로 발현되며 이 isoform들은 시기적으로 서로 다른 발현 패턴을 가진 것으로 알려져 있다. 특히 21.5 kDa, 17.0 kDa을 포함한 exon-2 MBP isoform은 초기 발달 동안 가장 풍부하게 발현되기 때문에 수초화 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다.<sup>10,11)</sup> MBP는 post-translation 단계에서 SAM으로부터 methyl기를 받아 107 번 위치의 아미노산인 arginine에 메틸화가 일어나게 된다.<sup>12)</sup> 엽산 결핍 등으로 단일 탄소 대사에 문제가 있을 경우 수초를 구성하고 있는 MBP의 methylation이 일어나지 않아 불완전하고 불안정한 MBP가 생성되며 이로서 수초형성 장애가 유발 될 수 있다.<sup>13)</sup> 그러므로 엽산 결핍으로 인한 불완전한 methylation은 MBP의 기능과 보전을 손상시킴으로써 안정화된 수초 형성에 문제를 야기 시키고 더욱이 신경전달에 장애를 일으킬 수 있을 것이다.

신경계통의 발생과정에서 엽산영양의 중요성과 그 역할에 관한 지금까지 수행된 선행 연구들은 주로 엽산 결핍으로 인한 신경관 결손을 규명하기 위한 연구에 집중되어 왔다.<sup>14)</sup> 또한 신경계통에서의 엽산의 역할을 이해하기 위하여 주로 배양상태의 세포를 대상으로 엽산 결핍에 의한 손상 또는 보충 효과를 규명하는 연구가 주로 시행되어 왔으며,<sup>15)</sup> 그 한계점을 극복할 수 있는 in vivo 연구는 극히 부족하다. 외형적인 신경계통의 선천적인 기형 이외에도 출생 후 발달과정에서 나타날 수 있는 인지 및 행동 장애가 신경계통의 발생과정에서 수초형성 장애와 관련되어 있음이 관찰되었으나<sup>16)</sup> 극히 단편적으로 시행되어 왔기 때문에 수초 형성과정에서 엽산의 역할을 입증하기 위한 자료가 미비한 실정이다. 따라서 본 연구는 어미 쥐의 임신기 및 수유기, 이유기의 엽산 영양상태가 자손 쥐의 MBP발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 식이 엽산 수준을 달리하고 이에 따른 뇌조직과 척수

에서 MBP 21.5 kDa isoform의 발현정도를 western blotting으로 분석, 관찰하였다.

## 연구방법

### 1. 실험동물의 사육 및 식이 구성

본 실험에서는 생후 6주된 Sprague Dawley종 암컷 흰쥐 (initial body weight: 134.2 ± 6.5 g, (주)Orient) 16마리를 체중에 따라 난괴법 (randomized complete block design)에 의하여 엽산충분군 (FS) 및 엽산결핍군 (FD)으로 나누었다. 실험동물들은 교배 2주전부터 엽산 충분 식이 (8 mg/kg diet), 엽산 결핍 식이 (0 mg/kg diet)를 공급하였다. 실험에 사용된 식이의 조성은 Table 1과 같았다. 식이는

Table 1. Experimental diet composition

Ingredients	Group <sup>1)</sup>	
	FS	FD
	(g/kg)	
Cornstarch	397.49	397.49
Casein	200	200
Dextrinized cornstarch	132	132
Sucrose	100	100
Soybean oil	70	70
Fiber	50	50
Mineral mix <sup>2)</sup>	35	35
L-cystine	3	3
Choline chloride	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014
Vitamin mix without folic acid <sup>3)</sup>	10	10
Folic acid	0.008	0
Total	1,000	1,000

<sup>1)</sup> FS: Folic acid sufficient (8 mg/kg diet) diet, FD: Folic acid deficient (0 mg/kg diet) diet

<sup>2)</sup> AIN-93G Mineral mixture

<sup>3)</sup> AIN-93 Vitamin mixture without folic acid

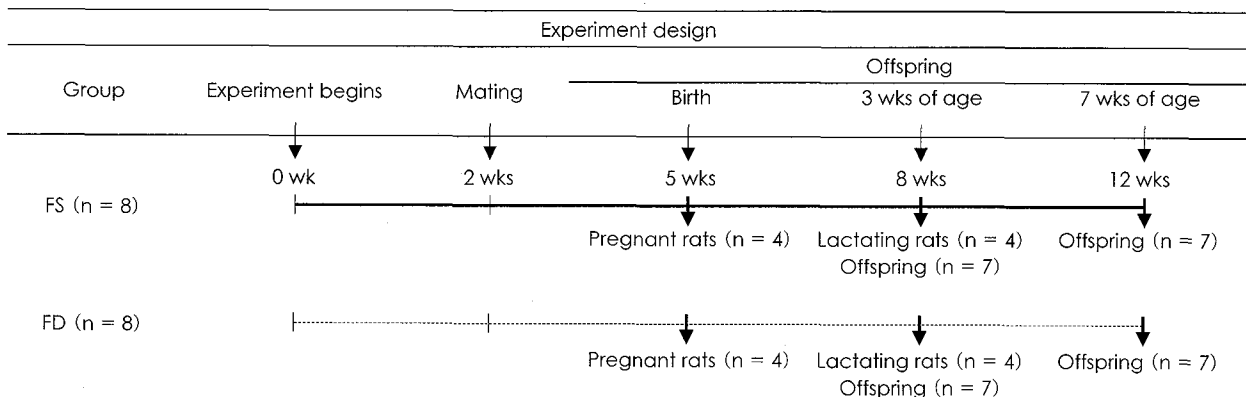


Fig. 1. Experimental design. The letters represent the diets available with FS: Folic acid sufficient (8 mg/kg diet) diet, FD: Folic acid deficient (0 mg/kg diet) diet. ↓ The mark represents the sacrifice point.

American Institute of Nutrition (AIN)-93Maintenance의 조성을 바탕으로 제조하였다.<sup>24)</sup> 본 연구에서 Fig. 1에 제시한 바와 같이 실험동물을 엽산충분군 (FS)과 엽산결핍군 (FD)으로 나누어서 자손이 생후 7주되는 시점까지 사육하였으며 자손은 군에 따라 14마리씩 나누어 총 28마리를 사육하였다. 실험동물은 한 마리씩 poly carbonate cage에서 사육하였고, 식이와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사육장의 환경은 온도  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 5\%$ 로 조정하였고, 12시간 명암주기를 유지하였다. 매일 일정한 시각에 식이량을 측정하였으며, 체중은 1주일에 한번 씩 측정하였다.

## 2. 실험동물의 희생 및 시료, 조직 채취

Fig. 1에서 제시한 바와 같이, 어미 쥐는 임신 20일 시점과 수유가 끝나는 시점에 희생하였으며 자손은 젖을 떼는 시점인 생후 3주 그리고 이유기가 끝난 생후 7주로 총 3회에 걸쳐 각 군에 따라 어미 쥐는 4마리씩, 자손 쥐는 7마리씩 희생하였다. 실험동물을 희생시키기 전 12시간동안을 절식시킨 후 동일한 시간대 (오전 9~11시)에 에틸 에테르로 마취시켜 개복한 후 10 ml 주사기를 사용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 ethylene diamine tetra acetate (EDTA)가 들어있는 원심 분리관에 담아 5000 rpm에서 5분간 원심분리 (Union 55R, Hanil Science Industrial Co.)하여 혈장을 분리한 후, 분석 직전까지  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였다. 각 군의 자손 쥐 7마리는 심장에서 혈액을 채취하고 간을 분리한 후, ice bath위에서 즉시 뇌 조직을 적출한 후 cortex, hippocampus와 spinal cord를 분리하여 eppendorf tube에 담아 분석 전까지  $-70^\circ\text{C}$ 의 deep freezer에 보관하였다.

## 3. 생화학적 분석

### 1) 혈장 호모시스테인 농도 분석

혈장 호모시스테인 농도는 Araki와 Sako의 방법<sup>17)</sup>을 이용하여 HPLC (Waters 2690, USA)로 분석하였다. 혈장 100  $\mu\text{l}$ 에 10% tri-n-butylphosphine 용액 10  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 4°C에서 30분간 방치한 후 10% trichloroacetic acid (TCA) 용액 100  $\mu\text{l}$ 를 가하고 4°C,  $3,000 \times g$ 에서 5분간 원심분리하였다. 분리된 상청액에 1.55 M NaOH 20  $\mu\text{l}$ , 4 mM EDTA를 함유하는 0.125 M borate buffer (pH 9.5) 250  $\mu\text{l}$ , ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole 4-sulfonic acid (SBD-F) 용액 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 60°C에서 1시간 동안 반응시키고 0.45  $\mu\text{m}$  filter (HV type, Whatman)로 여과시킨 후 automatic injector (Waters Co., MA, USA)로 20  $\mu\text{l}$ 씩 column에 주입하여 Xterra™RP<sub>18</sub> column을 이용하여 excitation wave length ( $\lambda_{em}$ ) 385 nm, emission

wave length ( $\lambda_{em}$ ) 515 nm의 fluorescence detector (Waters 474, Waters Co., MA, USA)로 분석하였다.

### 2) 혈장 엽산 및 비타민 B<sub>12</sub> 농도 분석

혈장 엽산 및 비타민 B<sub>12</sub> 수준은 <sup>125</sup>I-folic acid와 <sup>57</sup>Co-vitamin B<sub>12</sub> dualcount solid phase no boil (SPNB) radioassay kit (Diagnostic products Co., Los Angeles, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 혈장 200  $\mu\text{l}$ 에 dithiothreitol과 tracer를 혼합한 working solution을 첨가한 후 NaOH/KCN을 넣고 반응을 중지시키고 binder를 넣고 원심분리 후 상층액을 버린 다음 dual  $\gamma$ -counter (Cobra II, auto-gamma, Perkin Elmer Inc., MA, USA)로 분석하였다.

### 3) 간 조직의 SAM, SAH 농도 분석

간 조직의 SAM, SAH 농도는 Wang 등<sup>18)</sup>의 HPLC-UV detection 방법을 이용하여 분석하였다. 100 mg의 간 조직을 취하여 0.4 M HClO<sub>4</sub> 용액을 조직부피의 4배 양을 넣고, 균질화 시킨 후, 4°C,  $10,000 \times g$ 에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 취하여 0.2  $\mu\text{m}$  poly-propylene syringe filter (PVDF, 0.4 mm diameter Whatman, Clifton, HJ, USA)로 여과시킨 후 automatic injector (Water Co.)로 25  $\mu\text{l}$ 씩 column에 주입하여 분석하였다.

### 4) Western blotting에 의한 뇌, 척수조직의 MBP 발현 분석

원위의 뇌조직과 척수조직은 lysis buffer (Intron, CA, USA, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.2 g/L sodium azide, 1 g/L sodium dodecyl sulfate (SDS), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  phenylmethanesulfonyl fluoride, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin, 10 g/L NP-40, 5 g/L sodium deoxycholate)에 넣어 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후, 14,500 rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리한 후 지방층을 제외한 상층액을 채취하여 실험 전까지  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

단백질 정량은 BCA 분석법 (Pierce, IL, USA)을 이용하였고 562 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 동량의 단백질을 12% SDS-polyacrylamide gel에서 2시간 동안 전개시키고 PVDF membrane (polyvinylidene difluoride, Pierce, IL, USA)으로 transfer하기 위해 4°C에서 overnight 하였다. Transfer된 membrane을 1차 항체인 goat-anti-MBP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1 : 4000 희석 2% skim milk in PBST)에 반응시킨 후 2차 항체인 anti-goat conjugated to horseradish peroxidase (Amersham Life Sciences, IL, USA, 1 : 2000 희석 2% skim milk in PBST)로 반응시켰다. X-ray film (Kodak, NY, USA)을 이용하여 membrane의 발현 정도를 현상하였

다. 각 단백질의 발현정도를 판단하기 위해서 Gel Doc 2000, Quantity One, Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여, densitometric units로 정량하였다.

**4. 통계분석**

모든 자료는 SPSS 프로그램 (version 12.0)으로 통계 처리하여 평균 ± 표준오차로 나타내었다. 동일한 사육기간 내에서 엽산충분군 (FS)과 엽산결핍군 (FD)의 식이 섭취량, 체중, 혈장 호모시스테인, 엽산 및 비타민 B<sub>12</sub> 농도, 간의 SAM, SAH 농도 및 SAM/SAH ratio 그리고 western blotting 분석 결과를 Student's t-test로 분석하였다.

**연구결과**

**1. 실험동물의 식이 섭취량 및 체중 증가량**

실험동물의 체중 및 식이 섭취량은 Table 2와 같았다. 동

일한 사육기간내에서 엽산충분군 (FS)과 엽산결핍군 (FD)의 일일 평균 식이 섭취량 및 희생 전 체중을 관찰한 결과, 어미 쥐가 젖을 때는 시점에 엽산결핍군 (FD)의 체중은 엽산충분군 (FS)에 비해 유의적으로 감소하였으며 식이 섭취량은 유의적으로 증가하였다. 생후 3주의 자손은 엽산결핍군 (FD)의 체중이 엽산충분군 (FS)에 비해 유의적으로 감소하였다. 생후 7주 자손은 식이 섭취량과 체중이 식이 종류에 따라 p < 0.05수준에서 유의적인 차이가 없었다.

**2. 혈장 호모시스테인, 혈장 엽산 및 비타민 B<sub>12</sub> 농도**

실험동물의 혈장 호모시스테인, 엽산 및 비타민 B<sub>12</sub> 농도는 Table 3에 제시한 바와 같다. 어미 쥐의 임신 20일 시점, 엽산결핍군 (FD)의 혈장 호모시스테인 수준은 엽산충분군 (FS)에 비해서 15배 증가하였으며 (45.5 ± 9.3 μmol/L vs 3.0 ± 0.7 μmol/L, p < 0.05), 수유 후에는 엽산결핍군의 호모시스테인 수준이 3.4배 높았다 (22.2 ± 5.0 μmol/L vs

**Table 2.** Body weights and food intakes of mother rats and their offspring

Group <sup>1)</sup>		Body weight (g)	Food Intake (g/day)
Mother rats	Gestational 20 day		
	FS (n = 4)	327.2 ± 10.0 <sup>2)</sup>	22.37 ± 1.2
	FD (n = 4)	347.4 ± 14.1	20.90 ± 1.1
	Post lactational period		
Offspring	FS (n = 4)	301.4 ± 4.0	36.8 ± 1.9
	FD (n = 4)	250.7 ± 7.3 <sup>3)</sup>	48.6 ± 3.6*
	3 wks of age		
	FS (n = 7)	44.2 ± 2.1	-
	FD (n = 7)	36.5 ± 1.2*	-
	7 wks of age		
FS (n = 7)	185.2 ± 6.4	19.02 ± 1.0	
FD (n = 7)	198.3 ± 6.0	19.46 ± 1.0	

<sup>1)</sup> FS: Folic acid sufficient (8 mg/kg diet) diet, FD: Folic acid deficient (0 mg/kg diet) diet

<sup>2)</sup> Values are mean ± standard error

<sup>3)</sup> \*: Significantly different compared to the value for FS group in the same feeding period by Student's t-test, p < 0.05

**Table 3.** Concentrations of plasma homocysteine, folate and vitamin B<sub>12</sub>

Group <sup>1)</sup>		Homocysteine (μmol/L)	Folate (nmol/L)	Vitamin B <sub>12</sub> (pmol/L)
Mother	Gestational 20 day			
	FS (n = 4)	3.0 ± 0.7 <sup>2)</sup>	26.9 ± 5.7	1177.8 ± 166.4
	FD (n = 4)	45.5 ± 9.3 <sup>3)</sup>	1.5 ± 0.6*	551.2 ± 142.1*
	Post lactational period			
Offspring	FS (n = 4)	6.5 ± 1.0	34.7 ± 4.2	1147.0 ± 292.0
	FD (n = 4)	22.1 ± 5.0*	3.6 ± 0.7*	558.8 ± 119.2
	3 wks of age			
	FS (n = 7)	6.2 ± 0.2	58.3 ± 2.9	2694.0 ± 234.0
	FD (n = 7)	41.6 ± 3.8*	3.8 ± 1.0*	2053.9 ± 154.9*
	7 wks of age			
	FS (n = 7)	7.0 ± 0.8	53.2 ± 1.9	2069.9 ± 165.8
	FD (n = 7)	32.6 ± 4.8*	8.8 ± 1.2*	2013.2 ± 316.3

<sup>1)</sup> FS: Folic acid sufficient (8 mg/kg diet) diet, FD: Folic acid deficient (0 mg/kg diet) diet

<sup>2)</sup> Values are mean ± standard error

<sup>3)</sup> \*: Significantly different compared to the value for FS group in the same feeding period by Student's t-test, p < 0.05

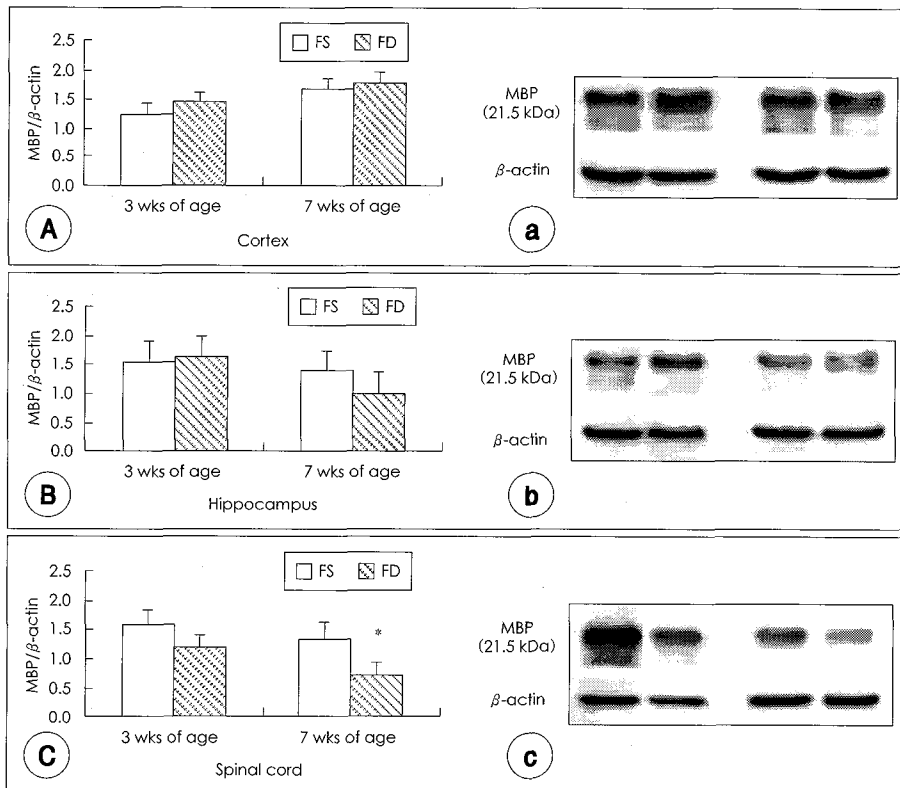
**Table 4.** Hepatic levels of SAM, SAH and SAM/SAH ratio in offspring

Group <sup>1)</sup>	SAM ( $\mu\text{mol/g tissue}$ )	SAH ( $\mu\text{mol/g tissue}$ )	SAM/SAH ratio
3 wks of age			
FS (n = 7)	10.75 $\pm$ 1.00	5.07 $\pm$ 0.59	2.35 $\pm$ 0.57
FD (n = 7)	7.66 $\pm$ 0.63*	7.39 $\pm$ 0.27*	1.01 $\pm$ 0.10*
7 wks of age			
FS (n = 7)	10.25 $\pm$ 0.78	5.91 $\pm$ 0.49	1.78 $\pm$ 0.27
FD (n = 7)	7.31 $\pm$ 0.42*	10.58 $\pm$ 1.34*	0.90 $\pm$ 0.18*

<sup>1)</sup> FS: Folic acid sufficient (8 mg/kg diet) diet, FD: Folic acid deficient (0 mg/kg diet) diet

<sup>2)</sup> Values are mean  $\pm$  standard error

<sup>3)</sup> \*: Significantly different compared to the value for FS group in the same feeding period by Student's t-test,  $p < 0.05$



**Fig. 2.** Effects of folic acid sufficiency and deficiency on MBP expression of cortex, hippocampus and spinal cord in 3 wks and 7 wks of age offspring rats by western blot analysis. A, B, C: The expression level of MBP in cortex, hippocampus and spinal cord were quantified by densitometry. Results were expressed as mean  $\pm$  SEs and were presented in a bar. a, b, c: The expression of MBP in cortex, hippocampus and spinal cord was analyzed by western blotting. \*:  $p < 0.05$  by Student's t-test.

6.5  $\pm$  1.0  $\mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0.05$ ). 임신 20일 시점, 엽산결핍군 (FD)의 혈장 엽산 수준은 엽산충분군 (FS)의 4.4% 수준으로 급격히 감소하였으며 (1.5  $\pm$  0.6 nmol/L vs 26.9  $\pm$  5.7 nmol/L,  $p < 0.05$ ), 수유 후, 엽산결핍군 (FD)의 혈장 엽산 수준은 엽산충분군 (FS)의 10%수준으로 낮았다 (3.6  $\pm$  0.7 nmol/L vs 34.7  $\pm$  4.2 nmol/L,  $p < 0.05$ ). 혈장 비타민 B<sub>12</sub> 농도는 임신 20일 시점의 엽산결핍군 (FD)이 엽산충분군 (FS)에 비해 46.8% 유의적으로 낮았다 (551.2  $\pm$  142.1 pmol/L vs 1177.7  $\pm$  166.4 pmol/L,  $p < 0.05$ ). 수유 후에는 엽산충분군 (FS)에 비해 48.7% 수준으로 낮았으나 유의적인 차이는 없었다.

생후 3주령의 자손 쥐의 경우, 엽산결핍군 (FD)의 혈장 호

모시스테인 수준은 엽산충분군 (FS)에 비해서 6.7배 증가하였다 (41.6  $\pm$  3.8  $\mu\text{mol/L}$  vs 6.2  $\pm$  0.2  $\mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0.05$ ). 혈장 엽산수준은 엽산결핍군 (FD)이 엽산충분군 (FS)에 비해 93.5% 감소하였다 (3.8  $\pm$  1.0 nmol/L vs 58.3  $\pm$  2.9 nmol/L,  $p < 0.05$ ). 엽산결핍군 (FD)의 혈장 비타민 B<sub>12</sub> 농도는 엽산충분군 (FS)에 비해 23.8% 유의적으로 감소하였다 (2053.9  $\pm$  154.9 pmol/L vs 2694.0  $\pm$  233.9 pmol/L,  $p < 0.05$ ).

생후 7주령 자손 쥐의 경우 엽산결핍군 (FD)의 혈장 호모시스테인 수준은 엽산충분군 (FS)에 비해 4.7배 유의적으로 증가했다 (32.6  $\pm$  4.8  $\mu\text{mol/L}$  vs 7.0  $\pm$  0.8  $\mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0.05$ ). 혈장 엽산 수준은 엽산결핍군 (FD)이 엽산충분군

(FS)의 16.5% 수준으로 감소하였다 ( $8.8 \pm 1.2$  nmol/L vs  $53.2 \pm 1.9$  nmol/L,  $p < 0.05$ ). 혈장 비타민 B<sub>12</sub> 농도는 엽산결핍군 (FD)과 엽산충분군 (FS)사이 유의적인 차이가 없었다.

#### 4. 간조직의 SAM, SAH 농도와 SAM/SAH ratio

생후 3주령 자손 쥐의 간의 SAM 수준은 엽산결핍군 (FD)이 엽산충분군 (FS)에 비해 29% 감소하였으며 ( $7.66 \pm 0.63$   $\mu$ mol/g tissue vs  $10.75 \pm 1.00$   $\mu$ mol/g tissue,  $p < 0.05$ ), SAH 수준은 엽산결핍군 (FD)이 엽산충분군 (FS)에 비해 46% 증가하였다 ( $7.39 \pm 0.27$   $\mu$ mol/g tissue vs  $5.07 \pm 0.59$   $\mu$ mol/g tissue,  $p < 0.05$ ). 그러므로 간의 SAM/SAH ratio는 엽산결핍군 (FD)이 엽산충분군 (FS)에 비해 57% 감소하였다 ( $1.01 \pm 0.10$  vs  $2.35 \pm 0.57$ ,  $p < 0.05$ ).

생후 7주령 자손 쥐의 경우, 간의 SAM 수준은 엽산결핍군 (FD)이 엽산충분군 (FS)에 비해 29% 감소하였다 ( $7.31 \pm 0.42$   $\mu$ mol/g tissue vs  $10.25 \pm 0.78$   $\mu$ mol/g tissue,  $p < 0.05$ ) 또한 엽산결핍군 (FD)의 SAH수준은 엽산충분군 (FS)에 비해 79% 증가했으며 ( $10.58 \pm 1.34$   $\mu$ mol/g tissue vs  $5.91 \pm 0.49$   $\mu$ mol/g tissue,  $p < 0.05$ ), SAM/SAH ratio는 엽산결핍군 (FD)이 엽산충분군 (FS)에 비해 49% 유의적으로 감소하였다 ( $0.90 \pm 0.18$  vs  $1.76 \pm 0.27$ ,  $p < 0.05$ ).

#### 3. 뇌, 척수조직의 MBP발현 정도

뇌, 척수 조직의 MBP발현 결과, 생후 3주 자손과 생후 7주 자손 쥐의 cortex와 hippocampus부위에서는 엽산충분군 (FS)과 엽산결핍군 (FD)사이 유의적인 차이가 없었다. 생후 3주 자손의 spinal cord부위에서는 엽산충분군 (FS)과 엽산결핍군 (FD)사이 유의적인 차이는 없었으나 생후 7주 자손 쥐에서는 엽산충분군 (FS)에 비해 엽산결핍군 (FD)의 MBP발현이 34% 감소되었다.

## 고 찰

본 연구는 생후 6주된 Sprague Dawley종 암컷 흰쥐를 대상으로 엽산 충분식이와 엽산 결핍식이를 먹인 후, 어미 쥐와 자손 쥐의 혈중 엽산 수준과 호모시스테인 수준 변화를 분석하였다. 이러한 혈중 수준의 변화가 뇌 조직과 척수에서 수초의 주요 구조적 역할을 하는 myelin basic protein 발현에 미치는 영향을 western blotting으로 분석, 관찰하였다.

동일한 사육기간 내에서 엽산충분군 (FS)과 엽산결핍군

(FD)의 일일 평균 식이 섭취량 및 희생 전 체중을 관찰한 결과, 어미 쥐는 젖을 때는 시점에, 엽산 결핍군의 식이 섭취량이 엽산충분군 (FS)에 비해 유의적으로 증가했음에도 불구하고 체중은 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과는 엽산 결핍군의 태어난 평균 자손 수가 엽산충분군 (FS)에 비해 많았기 때문에 엽산결핍군 (FD)의 어미 쥐가 젖을 먹이는데 더 많은 열량을 소모하여 체중감소를 보인 것으로 생각된다.

어미 쥐, 생후 3주령과 7주령 자손 쥐의 혈장 엽산 수준은 동일한 기간 내의 엽산충분군 (FS)에 비하여 유의적으로 낮았던 반면 엽산결핍군 (FD)의 혈중 호모시스테인 수준은 동일한 기간 내의 엽산충분군 (FS)에 비하여 유의적으로 높았다. 엽산결핍군 (FD)의 간의 SAM수준은 생후 3주령과 7주령 자손 쥐 모두에서 엽산충분군 (FS)에 비해 유의적으로 감소하였다. 엽산결핍군 (FD)의 간의 SAH 수준은 생후 3주령과 7주령 자손 쥐 모두에서 엽산충분군 (FS)에 비해 유의적으로 증가하였다. 엽산결핍군 (FD)의 SAM/SAH ratio는 생후 3주령과 7주령 자손 쥐에서 엽산충분군 (FS)에 비하여 유의적으로 감소되었다 ( $p < 0.05$ ). 뇌 조직과 척수의 western blotting 분석 결과, 생후 7주령 자손 쥐의 척수에서 엽산충분군 (FS)과 비교하여 엽산결핍군 (FD)의 MBP발현이 유의적으로 감소되었다.

본 실험에서, 어미 쥐의 임신기 및 수유기 엽산 결핍은 생후 7주 자손의 cortex, hippocampus에 비해 spinal cord의 MBP발현을 유의적으로 감소시켰다. 이러한 결과로 보아, 다른 부위보다 spinal cord가 엽산 영양 상태에 민감하게 영향을 받는다는 것으로 추정된다. 이와 같은 결과는 본 실험에서 측정된 21.5 kDa MBP isoform의 발현시기가 뇌와 척수에 따라 다르게 나타나기 때문으로 생각된다. Akiyama 등<sup>19)</sup>은 수초화에 있어서 MBP의 다른 발현 패턴을 구별하기 위한 연구에서, 쥐의 발달시기인 생후 14일과 21일 때부터 소뇌와 spinal cord에서 21.5 kDa와 17.0 kDa의 MBP isoform발현이 점차적으로 증가되는 반면, 대뇌에서는 생후 14주 때부터 발현이 점차 증가되는 것을 관찰한 바 있다. 대뇌에서의 21.5 kDa와 17.0 kDa MBP발현은 발생 시 수초형성 보다는 성인 및 노령 쥐의 대뇌 재수초화에 관여하는 것으로 보고된바 있다. 즉, 발생 시 신경발달단계에서 21.5 kDa의 MBP isoform발현이 증가되는 spinal cord와 달리 cortex와 hippocampus가 포함된 대뇌는 발달단계에 상대적으로 MBP의 발현 정도가 적어 엽산 영양 상태에 덜 민감한 영향을 받는 것으로 생각된다. 위 절제를 통해 만성적인 cobalamin 결핍을 유도한 7주령의 흰쥐 (Sprague Dawley 종)를 대상으로, cobalamin 결핍이 중추신경계 수초를 형성하는 glial cells에 미치는 영향을 실험한 결과에서도 중추

신경계 부위에 따라 MBP발현이 다르게 나타나<sup>20)</sup> 영양소 결핍은 중추신경계 부위에 따라 서로 다른 영향을 미치는 것으로 보인다.

발달과정동안의 엽산 결핍에 의한 척수의 MBP발현 감소는 정상적인 수초형성에 장애를 유발하여 spinal bifida와 같은 신경관 결손<sup>21)</sup>과 아급성연합성척수변성 (subacute combined degeneration of the cord)<sup>22)</sup> 등을 유발할 수 있을 것이다. 임신 중 영양불량 상태가 초기 수초화 과정에 미치는 영향을 면역조직화학적 방법을 통해 관찰한 결과, 임신 중 전반적인 영양불량은 태아의 초기 수초화 과정 중 미성숙한 MBP를 만들어서 치밀한 수초를 형성하지 못하는 것으로 보고되었다.<sup>23)</sup> Miller 등<sup>24)</sup>의 연구에서 엽산 결핍식이 먹인 쥐의 태아를 48시간동안 배양한 결과, 신경관이 비정상적으로 뒤틀리거나 꼬이는 현상을 관찰하였다. 모체의 적정한 엽산 영양상태가 신경관 결손 예방에 중요하다는 사실은 많은 선행연구에 의해 증명된 바 있다. Fernstrom<sup>21)</sup>은 엽산 결핍 상태에 있는 임신부에게서 신경관 장애를 가진 아이의 출산이 증가되는 것을 보고하였다. MRC Vitamin Study Research Group<sup>25)</sup>의 연구에서, 엽산 보충을 받은 여성에 비해 엽산보충을 받지 않은 여성에게서 신경관 결손을 가진 영아의 출산이 3배 이상 증가하는 것을 확인하였다. 엽산 결핍으로 인한 S-adenosylmethionine (SAM)수준변화가 저메틸화에 영향을 미친다는 이전 연구<sup>17,26)</sup> 결과에 비추어 볼 때, 본 연구에서 엽산 결핍군의 척수 MBP발현의 감소는 methyl-group donor인 SAM의 부족으로 인해 수초를 구성하고 있는 MBP의 저메틸화가 일어났기 때문으로 생각된다.

엽산 결핍에 의한 SAM수준의 변화는 여러 동물 실험을 통해 증명 되었다. Kim 등<sup>27)</sup>과 Henning 등<sup>28)</sup>의 연구는 엽산 결핍 시, 간에서 SAM 수준의 유의적인 감소, SAH수준의 유의적인 증가 그리고 SAM/SAH ratio의 유의적인 감소를 보고하였다. Gospe 등<sup>29)</sup>은 엽산 결핍식을 먹인 쥐의 뇌조직의 SAM수준이 대조군에 비해 60%감소된다고 보고하였다. 중추신경계 수초에서 구조적 역할을 하는 단백질인 MBP는 methyl-group donor인 SAM에 의해 메틸화되는 107번 위치의 아미노산인 arginine을 포함하고 있다.<sup>30)</sup> 엽산 결핍으로 인해 단일 탄소 대사에 문제가 있을 경우, 수초를 구성하고 있는 MBP의 methylation이 일어나지 않아 불완전하고 불안정한 MBP가 생성되며 이러한 결과로써 수초형성 장애가 유발 될 수 있음이 보고되었다.<sup>13)</sup> 또한 Surtees 등<sup>30,31)</sup>은 선천적인 단일 탄소 대사 장애로 유발된 SAM 결핍은 탈수초화를 초래하는 것으로 보고하였다. 그러므로 엽산 결핍은 SAM의 결핍을 유도하고 정상적인 MBP발현에 필요한 trans-methylation을 억제함으로써 MBP발현을 감소시킨 것으로

생각된다.

이상의 연구 결과들은 종합하면, 어미 쥐의 엽산 결핍으로 인하여 자손 쥐의 spinal cord MBP발현에 영향을 미칠 수 있었다. 어미 쥐 동물의 엽산 결핍은 성장이 끝나는 시점인 생후 7주령 자손에서, cortex와 hippocampus에 비해 spinal cord의 MBP발현에 큰 영향을 미쳤다. 이러한 결과는 성장 발달이 완료된 이후 MBP발현이 증가되는 cortex, hippocampus와 달리 spinal cord부위는 발달 단계에 상대적으로 MBP발현이 증가된다는 연구결과와의 연관성을 살펴볼 때, 엽산 영양 상태가 태아의 신경발달단계에 중요함을 짐작할 수 있다. 또한 이러한 추론은 신경발달단계의 엽산 결핍이 spinal cord에서 주로 발생하는 신경관 결손이나 아급성연합성척수변성의 발생이 증가되는 사실과도 연관성을 보인다.

본 연구는 중추신경계 수초의 형성과 안정성 유지에 있어 중요한 역할을 하는 MBP발현에 어미 쥐의 엽산 결핍과 보충이 자손의 MBP발현에 미치는 영향을 분석한 최초의 연구라는 점에서 의의가 있다고 하겠다. 본 연구의 동물실험결과는 임신 초기의 엽산 결핍이 태아의 신경관 장애와 같은 중추신경계 장애의 위험 증가와 임신 시 엽산 보충의 중요성을 증명하는 연구의 참고 자료로써 사용될 수 있을 것이다.

## 요약 및 결론

본 연구에서는 어미 쥐의 엽산 영양상태가 자손의 뇌 조직과 척수의 수초기본 단백질 발현에 미치는 영향을 western blotting 분석 방법을 이용하여 관찰하였다. 어미 쥐의 엽산 결핍과 성장기간 계속된 엽산 결핍 식이로 인해 자손 쥐의 spinal cord의 MBP발현이 감소되었다. 이러한 결과는 발달 단계에 상대적으로 MBP발현이 증가되는 spinal cord가 다른 뇌 조직에 비해 엽산 영양 상태에 민감하게 영향을 받은 것으로 생각된다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 엽산 결핍 식이로 인한 혈중 엽산 수준의 감소와 혈중 호모시스테인의 증가는 단일 탄소 대사에 장애를 일으키며 이로 인해 DNA, 단백질, 핵산, 지방산, 인지질 등 100여 가지 이상의 생체화합물의 메틸화반응에서 methyl-group donor로서 작용하는 SAM의 결핍을 유도함으로써 MBP발현에 영향을 준 것으로 추측된다. 후생 연구로는 엽산 결핍이 임신 초기와 성장 단계 별 신경발달에 미치는 영향에 관한 체계적인 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

## Literature cited

- 1) Durga J, Bots ML, Schoutena EG, Koka FJ, Verhoef P, Low

- concentrations of folate, not hyperhomocysteinemia, are associated with carotid intima-media thickness. *Atherosclerosis* 179(2): 285-292, 2005
- 2) Faurschou M, Nielsen OJ, Jensen MK, Hasselbalch HC. High prevalence of hyperhomocysteinemia due to marginal deficiency of cobalamin or folate in chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 65: 136-140, 2000
  - 3) Allen RH, Stabler SP, Lindenbaum J. Relevance of vitamins, homocysteine and other metabolites in neuropsychiatric disorders. *Eur J Pediatr* 157(2): 122-126, 1998
  - 4) Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, Haughey N, Lee J, Evans M, Mattson MP. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22(5): 1752-1762, 2002
  - 5) Burgoon JM, Selhub J, Nadeau M, Sadler TW. Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. *Teratology* 65(5): 219-227, 2002
  - 6) Scott JM, Weir DG, Molloy A, McPartlin J, Daly L, Kirke P. Folic acid metabolism and mechanisms of neural tube defects. *Ciba Found Symp* 181: 180-191, 1994
  - 7) Ramaekers VT, Blau N. Cerebral folate deficiency. *Dev Med Child Neurol* 46: 843-851, 2004
  - 8) Geller J, Kronn D, Jayabose S, Andoval C. Hereditary folate malabsorption. *Medicine* 81: 51-68, 2002
  - 9) Tanaka F, Kachi T, Yamada T, Sobue G. Auditory and visual event-related potentials and flash visual evoked potentials in Alzheimer's disease: correlations with Mini-Mental State Examination and Raven's Coloured Progressive Matrices. *J Neurol Sci* 156: 83-88, 1998
  - 10) Endres M, Ahmadi M, Kruman I, Biniszkiessicz D, Meisel A, Gertz K. Folate deficiency increases postischemic brain injury. *Stroke* 36: 321-325, 2005
  - 11) Kruger GM, Diemel LT, Copelman CA, Cuzner ML. Myelin basic protein isoforms in myelinating and remyelinating rat brain aggregate cultures. *J Neurosci Res* 56: 241-247, 1999
  - 12) Surtees R. Demyelination and inborn errors of the single carbon transfer pathway. *Eur J Pediatr* 157: 118-121, 1998
  - 13) Ghosh SK, Syed SK, Jung S, Paik WK, Kim S. Substrate specificity for myelin basic protein-specific protein methylase I. *Biochim Biophys Acta* 1039: 142-148, 1990
  - 14) van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Mariman EC, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 346: 1070-1071, 1995
  - 15) Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 15227-15232, 1996
  - 16) Gilles FH, Leviton A, Dooling FC, Editors. The Developing Human Brain Growth and Epidemiologic Neuropathology, pp.117-183, John Wright, Inc., Boston, 1983
  - 17) Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 422: 43-53, 1987
  - 18) Wang W, Kramer PM, Yang S, Pereira MA, Tao L. Reverse-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. *Chromatogr. B. Biomed Sci Appl* 762(1): 59-65, 2001
  - 19) Akiyama K, Ichinose S, Omori A, Sakurai Y, Asou H. Study of expression of myelin basic proteins (MBPs) in developing rat brain using a novel antibody reacting with four major isoforms of MBP. *J Neurosci Res* 68: 19-28, 2002
  - 20) Magnaghi V, Veber D, Morabito A, Buccellato FR, Melcangi RC, Scalabrino G. Decreased GFAP-mRNA expression in spinal cord of cobalamin-deficient rats. *FASEB express article* 10.1096/fj.02-0231 fje. September 19, 2002
  - 21) Fernstrom JD. Can nutrient supplements modify brain function? *Am J Clin Nutr* 71(1): 1669S-1673S, 2000
  - 22) Surtees R, Leonard J. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway. *Lancet* 338(8782/8783): 1550-1554, 1991
  - 23) Ulfig N, Nickel J, Saretzki U. Alterations in myelin formation in fetal brains of twins. *Pediatr Neurol* 19: 287-293, 1998
  - 24) Miller PN, Pratten MK, Beck F. Growth of 9.5-day rat embryos in folic-acid-deficient serum. *Teratology* 39(4): 375-385, 1989
  - 25) MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: result of Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338: 131-137, 1991
  - 26) Scott JM. Folate-vitamin B<sub>12</sub> interrelationships in the central nervous system. *Proc Nutr Soc* 51: 219-224, 1992
  - 27) Kim YI, Pogribny IP, Basnakian AG, Miller JW, Selhub J, James SJ, Masmon 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
  - 28) Henning SM, McKee RW, Swendseid ME. Hepatic content of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and glutathione in rats receiving treatment modulating methyl donor availability. *J Nutr* 119(10): 1478-1482, 1989
  - 29) Gospe SM, 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
  - 30) Liu MC, Akle V, Zheng W, Kitlen J, O'Steen B, Lerner SF, Dave JR, Tortella FC, Hayes RL, Wang KKW. Extensive degradation of myelin basic protein isoforms by calpain following traumatic brain injury. *J Neurochem* 98: 700-712, 2006
  - 31) Surtees R, Clelland J, Hann I. Demyelination and single-carbon transfer pathway metabolites during the treatment of acute lymphoblastic leukemia: CSF Studies. *J Clin Oncol* 16(4): 1505-1511, 1998