Journal of Life Science 2007 Vol. 17. No. 5. 634~640 ©JLS / ISSN 1225-9918

N-3 지방산 결핍이 혈청 및 신경조직의 지방산 조성에 미치는 영향

임 선 영*

한국해양대학교 해양환경생명과학부

Received February 13, 2007 / Accepted March 29, 2007

Effect of n-3 fatty acid deficiency on fatty acid compositions of nervous system in rats reared by artificial method. Sun Young Lim*. *Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan, 609-761, Korea* – Our previous study suggested that n-3 fatty acid deficiency was associated with significantly reduced spatial learning as assessed by Morris water maze test. Here we investigated an effect of n-3 fatty acid deficiency on rat brain, retina and serum fatty acyl compositions at 15 wks age using a first generational artificial rearing technique. Newborn Rat pups were separated on day 2 and assigned to two artificial rearing groups or a dam-reared control group. Pups were hand fed artificial milk via custom-designed nursing bottles containing either 0.02% (n-3 Deficient) or 3.1% (n-3 Adequate) of total fatty acids as α-linolenic acid (LNA). At day 21, rats were weaned to either n-3 deficient or n-3 adequate pelleted diets and fatty acid compositions of brain, retina and liver were analyzed at 15 wks age. Brain docosahexaenoic acid (DHA) was lower (58% and 61%, $P<0.05$) in n-3 deficient in comparison to n-3 adequate and dam-reared groups, receptively, while brain docosapentaenoic acid (DPAn-6) was increased in the n-3 deficient group. In retina and serum fatty acid compositions, the decreased precentage of DHA and increased precentage of DPAn-6 were observed. These results suggested that artificial rearing method can be used to produce n-3 fatty acid deficiency in the first generation and that adequate brain DHA levels are required for optimal brain function.

Key words – Docosahexaenoic acid, artificial rearing system, brain function, n-3 fatty acid deficiency

서 론

N-3 지방산이 결핍된 불균형 식이로 장기간 사육된 동물의 경우 뇌의 지방산 조성에 변화가 일어나 n-6 계열의 docosapentaenoic acid (22:5n-6, DPAn-6)의 함량은 증가하고 docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA)의 함량은 감소하는 경향을 나타낸다. 이러한 지방산 조성의 변화는 여러 가지 뇌 기능에 관련된 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다. Morris water maze를 이용한 공간 기억력 테스트에서 n-3 지방산이 결핍된 군은 목적 플래트폼까지 수영해서 도달하는데 걸리는 시간이 n-3 지방산이 적절히 함유된 군보다 더 길었으며 이전의 목적 플래트폼의 자리를 기억하는 실험에서도 결함을 나타냄이 보고되었다[12,15,16]. 이 밖에도 후각에 기초로 한 기억 학습 실험에서도 두 가지 뚜렷한 냄새 구분에 있어서 n-3 지방산이 결핍된 군의 경우 식별 및 기억 능력에 결함을 보였다[3,5]. DHA는 또한 망막의 기능 유지에도 관여하는데 electroretinogram을 이용한 망막의 활성 실험에서 비정상적인 양상을 나타내었고[17,23-25], G-protein coupling과 관련된 신호전달 활성 실험[18]에서도 n-3 지방산이 적절히 공급된 식이군에 비해 n-3 지방산이 결핍된 식이군의 경우 활성이 떨어짐이 보고되었다.

*Corresponding author
Tel : +82-51-410-4757, Fax : +82-51-404-3988
E-mail : sylim@hhu.ac.kr

신경조직의 DHA가 결핍된 동물을 생성하기 위해서 인공 사육 시스템이 널리 이용된다. 기존의 튜브형 인공 사육 방법은 출생 후 4-5일 경과 후 식도-위 연결 튜브 수술을 수행하여 신생 쥐들에게 수술과 마취라는 스트레스를 주고 사육 동안에도 개개의 cage에서 사육되어짐으로 자연스러운 동물들 간의 신체적 접촉이 부족하며, 튜브와 자동 펌프로 시간별로 강제 수유되어지는 비자발적인 방식이다[21,22]. 이에 본 연구에서는 저자가 선행한 인공 사육 동물 시스템[13]을 보완하여 신생 쥐의 입의 크기와 유사한 젖꽂지와 젖병을 제작하여 매 3시간마다 하루 총 15시간 인공적으로 수유시켰다. 여기서 사용된 큰 크기의 젖꼭지는 선행된 연구의 단점인 신생 쥐들의 장 비대와 꼬임으로 인한 사망을 감소시킬 수가 있었다. 또한, 기존의 강제 수유 방식의 경우 수술로 인하여 생후 5일이 경과된 후 인공 사육이 가능하므로 출생 후 일주일 이내 가장 많은 양의 DHA가 모유에 함유되어 신생 쥐에 전달되어지므로 뇌의 DHA 결핍 동물 생성 연구에서는 적절하지 못하다. 따라서 본 연구에서 기존에 튜브형 인공 사육 방법과 차별화하여 새롭게 변형된 인공 사육 동물 모델 시스템을 이용하여 출생 후 12시간 내 엄마 쥐들로부터 분리하여 인공 사육 시스템에서 인공 쥐 분유를 조제하여 신생 쥐들을 3주 동안 사육하는 실험을 행하므로 모유에 함유된 DHA가 신생 쥐로 전달되는 것을 최대한 줄일 수가 있다. 인공 쥐 분유 또한 개선하여 기존의 시판 우유의 경우 쥐의 모유와 비교해 볼 때 지방 함량이 다소 낮으므로 우유의 변형

이 아니라 신생 쥐에 필요한 각 영양소들을 직접 혼합, 균질화하여 조제하였음으로 영양소들의 통제가 가능하여 n-3 지방산의 함량을 조절 할 수가 있었다.

본 연구에서는 변형된 인공 사육 모델 시스템과 인공 쥐용 분유를 이용하여 출생 직후 12시간 내에 엄마 쥐들로부터 신생 쥐를 분리하여 n-3 지방산 결핍 분유와 n-3 지방산 적절 분유로 사육하여 15주가 되었을 때 뇌, 망막, 혈액을 취하여 뇌 성장 발달 과정 동안 n-3 지방산 결핍이 이들 장기들의 지방산 조성 변화에 미치는 영향을 규명하고 선행된 공간 기억력 결과와의 상호관련성에 대하여 알아보고자 한다.

재료 및 방법

실험동물의 종류 및 사육

임신 3일된 Long-Evans 쥐를 Charles River 실험실(Portage, MI)에서 구입하여 3% α-linolenic acid (LNA)가 첨가된 AIN-93 표준식이[19]를 급여하여 적정 환경(온도 23±1℃, 명암 12시간 주기)에서 분만까지 사육하였다. 신생 쥐들을 생후 12시간 내에 체중을 고려하여 5마리 엄마 쥐들로부터 각 1마리씩 신생 쥐를 분리하여 3군으로 분류하였는데 즉, 대조군으로 엄마 쥐가 직접 수유하는 군(Dam-reared group)과 인공 사육시스템을 이용한 인공 사육 동물군을 다시 n-3 지방산이 적절히 함유된 군(n-3 adequate group, n-3 Adq)과 n-3 지방산이 결핍된 군(n-3 deficient group, n-3 Def)으로 나누었다. 대조군은 이유기(생후 3주)이후부터는 3% LNA가 첨가된 AIN-93 표준 식이를 급여하였고 인공 사육 동물군은 각각 n-3 지방산이 적절히 함유된 분유와 n-3 지방산이 결핍된 분유로 이유기까지 급여한 후 인공분유의 지방산 조성과 유사한 고형사료로 실험기간동안 급여하였다. 실험식이와 음용수는 실험기간동안 자유섭취방법으로 급여하였다.

실험식이

고형사료는 AIN-93에 따른 식이로 지방의 급원을 변형하였다. 대조군(Maternal diet)의 경우, 포화지방산의 급원으로 수소화된 coconut oil을 사용, linoleic acid (LA) 급원으로 safflower oil을 사용, LNA급원으로 flaxeed oil을 사용하였다. 대조군식이의 LNA와 LA의 함유량은 각각 전체 지방산의 3% 와 15% 임을 Table 1에 나타내었다. 인공사육동물군의 경우는 인공분유의 지방산 조성과 유사하게 유지하기 위하여 medium-chain triglyceride와 수소화된 coconut oil을 사용하였고 불포화지방산으로 정제된 ester형의 지방산들(oleate LA, LNA, Nu-Chek Prep, Elysian, MN)을 사용하였다. N-3 지방산 결핍군(n-3 Def)은 17.8% LA와 0.06% LNA를 함유, n-3 지방산 적절군(n-3 Adq)은 17.6% LA와 3.2% LNA를 함유하였다(Table 1).

Table 1. Nutrients and fatty acyl compositions of diets

Ingredient	Amount (g/100 g)		
Casein, vitamin free	20		
Carbohydrate			
Cornstarch	15		
Sucrose	10		
Dextrose	19.9		
Maltose-dextrin	15		
Cellulose	5		
Salt mix	3.5		
Vitamin mix	1		
L-Cystine	0.3		
Choline bitatrate	0.25		
tert-Butylhydroquinone	0.002		
	Maternal	n-3 Deficient	n-3 Adequate
Fat			
Hydrogenated coconut oil	7.75	2.7	2.7
Safflower oil	1.77	-	-
Flaxseed oil	0.48	-	-
Medium-chain triglyceride	-	1.3	1.3
18:1n-9 ethyl ester	-	4.5	4.2
18:2n-6 ethyl ester	-	1.5	1.5
18:3n-3 ethyl ester	-	-	0.3
Fatty acid composition			
18:2n-6	15.3	17.8	17.6
18:3n-3	3.1	0.06	3.2
n-6/n-3	4.9	296.7	5.5

신생 쥐용 인공분유 조제

Kanno 등[7]의 방법을 변형하여 단백질로는 지질성분이 최소인 casein과 whey protein을, 당질은 lactose를, 지질은 medium-chain triglyceride와 수소화된 coconut oil을 사용하였고 불포화지방산으로 정제된 ester형의 지방산들(oleate LA, LNA, Nu-Chek Prep, Elysian, MN)을 사용하였다(Table 2). N-3 지방산 적절군은 3.1% LNA를, n-3 지방산 결핍군은 0.02% LNA를 함유하고 있어 두 식이군의 중요한 특징은 LNA 함유량의 차이이며 LA 함유량은 각각 16.6%와 16.3%로 거의 동일하였다(Table 3). 신생 쥐 성장에 필요한 모든 영양소들을 순서에 맞추어 배합하여 분유 조제 동안 응고되는 것을 피하고자 하였다. 혼합 후 고압 균질기(FES International, Irwindale, CA)를 이용하여 두 번 균질화하였고 65℃에서 30분간 2회 살균한 후 냉장 보관하며 산패방지를 위하여 필요시 매번 조제하였다.

인공사육시스템을 이용한 신생 쥐 사육

인공사육시스템은 Hoshiba[6]의 방법과 Lim[12]의 방법을

Table 2. Nutrient composition of artificial rat milk diets

Ingredient	Amount (mg/100 ml milk)
Casein (ALACID, acid casein)[a]	6275
Whey protein isolate (ALACEN895)[a]	4000
Carbohydrate (alpha-lactose)[b]	1893
Serine[b]	28.8
Cystine[b]	22.5
Tryptophan[b]	27.0
Minerals :	
NaOH[b]	2100
KOH[b]	170
$GlyCaPO_4$[b]	800
$MgCl_26H_2O$[d]	183
$CaCl_22H_2O$[d]	210
Ca_34H_2O-Citrate[b]	250
Na_2HPO_4[d]	114
KH_2PO_4[d]	51.0
$FeSO_4$[b]	3.0
$ZnSO_4$[b]	6.0
$CuSO_4$[b]	1.6
$MnSO_4$[b]	0.07
NaF[b]	0.16
KI[b]	0.18
Carnitine[b]	4.0
Picolinate[b]	2.0
Ethanolamine[b]	3.4
Taurine[b]	15.0
Vitamine mix (dextrose)[c]	500
Tricholine citrate[b]	370
Cholesterol[b]	40

	n-3 Def	n-3 Adq
Fat Sources	g/100 ml milk	
MCT oil[e]	1.56	1.56
Coconut oil (hydrogenated)[f]	3.24	3.24
18:1n-9 ethyl ester[g]	5.04	4.68
18:2n-6 ethyl ester[g]	2.16	2.16
18:3n-3 ethyl ester[g]	-	0.36

Component sources were as follows: [a]NZMP (North America) Inc, Santa Rosa, CA; [b]Sigma-Aldrich Corp. ST. Louis, MO; [c]Rx993666 Harlan, Madison, WI; [d]Malinkrodt, Hazelwood, MO; [e]Mead Johnson Nutritionals, Evansville, IN; [f]Dyets, Bethlehem, PA; [g]99% grade, Nu-Chek Prep, Inc. Elysian, MN.

변형하였고 실리콘으로 만든 젖병(nursing bottle)과 젖꼭지를 이용하여 실린지로 매번 인공 분유를 주입시켰다. 젖병은 내부에 2개의 튜브, 즉 분유 주입구(fill tube)와 공기 튜브(vent tube)로 구성되어 있다. 수유는 매 3시간 하루에 5번 정도로 총 15시간을 실험자가 직접 수유시켰다. 수유와 수유시간 사이에는 온도를 유지시켜주는 항온시스템에서 신생 쥐들을 사육시켰다. 인공사육시스템을 이용한 사육법은 생후 15일까지 계속 행하고 그 이후에는 신생 쥐들의 경우 감겨진 눈이 열리는 시기이므로 50 ml conical tube를 이용하여 신생 쥐가 시각적으로 보면서 스스로 마시는 형태로 분유를 취하게 하였다.

Table 3. Fatty acid compositions of artificial rat milk

Fatty Acids[1]	Dietary Group	
	n-3 Def	n-3 Adq
	%	
Σ Saturated	33.8	32.6
Σ Monounsaturated	48.4	47.6
18:2n-6	16.3	16.6
18:3n-3	0.02	3.1
n-6/n-3	815	5.5

[1]Only trace quantities of long chain polyunsaturated indicating 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3 were detected, i.e. less than 0.01%. Other minor peaks were not included.

Gas chromatography를 이용한 지방산 측정

실험 쥐들이 15주가 되었을 때 희생시키고 혈액, 뇌 및 망막을 취해서 지방산 조성을 검토하였다. 지질 추출은 Folch 등[4]을 변형하여 실시하였으며 Morrison과 Smith의 방법[14]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 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) 이었다[20]. 지방산 분석은 표준용액의 retention 시간과 비교하여 정성하였으며 개개의 지방산들은 전체 peak area의 퍼센트로 산출하였다.

통계처리

실험결과는 mean ± SEM (Stadndard 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 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

체중 비교

인공사육동안 생후 15일까지는 엄마 쥐가 직접 수유한 대조군(Dam-reared)에 비해 인공적으로 사육한 인공사육동물군의 체중이 유의적으로 낮았으나 n-3 지방산 결핍군과 n-3 지방산 적절군 간에는 유의적 차이가 없었다. 눈을 뜨기 시작한 15일부터는 분유병을 인공젖꼭지와 젖병 타입에서 물

병 타입으로 전환하였기 때문에 인공적으로 사육한 동물군은 스스로 물병을 찾아서 더 많은 양의 분유를 취할 수가 있어서 급격한 체중 증가가 일어났으며 그 이후 대조군과 비교했을 때 유의적 차이는 관찰 할 수가 없었다.

혈청, 뇌 및 망막의 지방산 조성 변화

Table 4는 혈청의 지방산 조성을 나타낸 것으로 총 포화지방산, 총 n-6 지방산과 총 지방산 함량에는 실험군들간에 유의적 차이가 없었다. 총 단일불포화지방산은 n-3 지방산 결핍

Table 4. Effect of n-3 deficiency on rat serum fatty acid compositions[1]

Fatty Acids	Dietary Group[2]		
	n-3 Deficient	n-3 Adequate	Dam-reared
	%		
12:0	1.27±0.19[a]	2.36±0.32[a]	3.50±0.55[b]
14:0	1.21±0.11[b]	1.60±0.13[b]	2.55±0.28[a]
16:0	14.7±0.53	13.6±0.60	16.1±1.23
18:0	17.1±0.78	17.5±0.98	14.8±1.20
20:0	0.07±0.002	-	-
22:0	0.12±0.01[b]	0.16±0.01[b]	0.17±0.02[a]
24:0	0.20±0.02[b]	0.25±0.01[b]	0.35±0.03[a]
Total Saturates	**34.7±0.63**	**35.5±1.56**	**37.4±0.53**
16:1n-7	2.92±0.08	2.70±0.24	2.26±0.53
18:1n-9	15.9±0.71[a]	10.8±0.29[b]	8.50±1.74[b]
18:1n-7	2.68±0.26	2.30±0.22	2.50±0.44
20:1n-9	0.18±0.01[a]	0.12±0.01[b]	0.09±0.03[b]
24:1n-9	0.60±0.03[a]	0.75±0.07[a]	0.46±0.09[b]
Total Monounsaturates	**22.3±0.88[a]**	**16.7±0.52[b]**	**13.8±2.64[b]**
18:2n-6	10.6±0.50	12.6±0.26	13.9±1.38
18:3n-6	0.32±0.04[a]	0.32±0.03[a]	0.14±0.01[b]
20:2n-6	0.09±0.01	0.08±0.02	0.13±0.02
20:3n-6	1.96±0.28[a]	1.87±0.20[a]	0.93±0.15[b]
20:4n-6	20.2±1.45	20.0±0.94	20.9±1.64
22:4n-6	0.25±0.01[a]	0.14±0.01[b]	0.16±0.02[b]
22:5n-6	2.33±0.09[a]	0.51±0.04[b]	0.30±0.06[c]
Total n-6	**35.8±0.85**	**35.5±0.81**	**36.5±2.10**
18:3n-3	0.01±0.002[c]	0.36±0.04[b]	0.52±0.07[a]
20:5n-3	0.02±0.002[b]	0.76±0.08[a]	0.58±0.06[a]
22:5n-3	0.02±0.002[b]	0.23±0.01[a]	0.27±0.06[a]
22:6n-3	0.23±0.02[b]	3.07±0.10[a]	3.52±0.26[a]
Total n-3	**0.28±0.02[b]**	**4.42±0.09[a]**	**4.89±0.29[a]**
22:5n-6/22:6n-3	10.5±0.67[a]	0.17±0.02[b]	0.08±0.01[b]
22:5n-6+22:6n-3	2.56±0.10[b]	3.58±0.09[a]	3.81±0.30[a]
Total fatty acids (μl/ml)	9.56±1.60[a]	7.47±0.70[b]	6.71±1.30[b]

[1]Each variable represents the mean ± SEM, n=5. Different symbols indicate means are significantly different among the groups by Tukey's HSD test, at P<0.05.

[2]N-3 Deficient group contained 0.06% LNA; n-3 Adequate group contained 3.2% LNA; Dam-reared group means that rats were raised by their mother's milk

군(n-3 Def)에서 n-3 지방산 적절군(n-3 Adq)과 대조군(Dam-reared)에 비해 각각 34%와 62%로 증가하였으나 총 n-3 지방산의 경우에는 n-3 지방산 결핍군(n-3 Def) 에서 94%로 감소하였다. N-6 지방산 계열 중에서 22:4n-6와 DPAn-6 함량은 n-3 지방산 결핍군(n-3 Def)에서 n-3 지방산 적절군(n-3 Adq)과 대조군(Dam-reared)에 비해 유의적으로 증가하였으나 22:5n-3과 DHA의 함량은 각각 94%로 감소하였다 ($p<0.05$). 한편, 포화지방산들 중에서 14:0, 22:0과 24:0의 경우, 대조군(Dam-reared)에서 n-3 지방산 결핍군(n-3 Def)과 n-3 지방산 적절군(n-3 Adq)에 비해 유의적으로 증가하였고 단일불포화지방산들 중 24:1n-9는 감소하는 것을 살펴 볼 수가 있었다($p<0.05$). N-3 지방산 결핍군(n-3 Def)은 DPAn-6/DHA비가 또한 n-3 지방산 적절군(n-3 Adq)과 대조군(Dam-reared)에 비해 컸으나, DPAn-6와 DHA의 합에는 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

뇌의 지방산 조성을 살펴보면(Table 5), 총 포화지방산 함량에는 유의적 차이가 없었으나, n-3 지방산 결핍군과 비교했을 때 n-3 지방산 적절군(n-3 Adq)과 대조군(Dam-reared)보다 총 n-3 지방산의 함량이 유의적으로 높았다($p<0.05$). 총 단일불포화지방산과 그 중에서 18:1n-9의 함량은 n-3 적절군(n-3 Adq)에서 가장 높았다($P<0.05$). 예상했듯이 뇌의 DHA 함량의 경우, n-3 지방산 결핍군(n-3 Def)은 n-3 지방산 적절군(n-3 Adq)과 대조군(Dam-reared)에 비해 그 함량이 58-61% 감소하였고 반면 n-6 계열인 DPAn-6의 함량은 상당히 증가하였음을 살펴 볼 수가 있었다. N-6 계열 지방산들 중에서 20:4n-6, 22:4n-6 및 DPAn-6/DHA 비도 n-3 지방산 적절군(n-3 Adq)과 대조군(Dam-reared)에 비해 유의적으로 증가하였다. 선행된 보고로부터[13] 이러한 지방산의 조성 변화, 즉 뇌의 지방산 조성에서 DHA 저하와 DPAn-6 증가는 공간 기억력과 관련된 뇌 기능 저하와도 매우 밀접한 관련이 있음을 확인하였다. 즉 실험쥐들이 8주가 되었을 때 여러 가지 동물 행동 실험을 한 결과, 운동력과 불안감에는 두 군 간의 차이가 없었으나 공간 학습 및 후각을 기초로 한 냄새 구별 능력 실험에서는 n-3 지방산 결핍군(n-3 Def)의 경우 목적지까지 수영하여 도착하는 시간 및 거리가 n-3 지방산 적절군(n-3 Adq)에 비해 유의적으로 길었고 실험 마지막째 목적 플래트폼을 제거한 후 목적 자리를 기억하는 실험에서도 상당한 결함을 나타내었다. 그러나 이들 두 실험군들 간의 수영 속도에는 유의적 차이가 없었으므로 기초적인 운동 능력에는 차이가 없었음을 알 수 있었다. 이 밖에도 Y-maze 실험[11], 명암구별[1,26,27] 및 후각 기능 테스트[3,5]에서 n-3 지방산 결핍에 의한 뇌 기능 관련 능력의 저하현상이 보고되었다.

뇌와 유사하게 망막에도 DHA와 같은 고도로 불포화된 지방산들이 다량 함유되어 있어 빛에 의한 망막 내 G-단백질의 자극에 따른 신호전달에 이들 불포화지방산들의 조성 변화가 매우 중요한 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다[18]. 망

Table 5. Effect of n-3 deficiency on rat brain fatty acid compositions[1]

Fatty Acids	Dietary Group[2]		
	n-3 Deficient	n-3 Adequate	Dam-reared
	%		
12:0	0.03±0.005	0.05±0.04	0.04±0.01
14:0	0.28±0.06	0.27±0.03	0.26±0.02
16:0	19.2±0.31	17.7±0.41	18.2±0.52
18:0	16.7±0.27	16.8±0.32	17.1±0.17
20:0	0.54±0.05	0.64±0.08	0.61±0.05
22:0	0.48±0.02	0.58±0.05	0.59±0.06
24:0	1.06±0.05	1.29±0.08	1.39±0.13
Total Saturates	**38.3±0.43**	**37.3±0.50**	**38.2±0.43**
16:1n-7	0.35±0.01	0.35±0.003	0.38±0.03
18:1n-9	16.1±0.13^{b}	18.3±0.27^{a}	17.6±0.38^{a}
18:1n-7	4.07±0.08	4.17±0.11	3.26±0.70
20:1n-9	2.11±0.09	2.76±0.17	2.38±0.24
22:1n-9	0.21±0.01	0.25±0.01	0.23±0.02
24:1n-9	2.63±0.17	3.15±0.27	3.07±0.38
Total Monounsaturates	**25.5±0.30**^{b}	**28.9±0.55**^{a}	**26.9±1.07**^{b}
18:2n-6	0.33±0.01^{c}	0.40±0.01^{b}	0.53±0.03^{a}
20:2n-6	0.12±0.02	0.12±0.01	0.14±0.01
20:3n-6	0.29±0.01^{b}	0.36±0.01^{a}	0.35±0.02^{a}
20:4n-6	9.29±0.21^{a}	8.17±0.30^{b}	8.51±0.20^{b}
22:2n-6	0.02±0.001	0.02±0.003	0.03±0.003
22:4n-6	3.66±0.11^{a}	3.02±0.08^{b}	2.97±0.06^{b}
22:5n-6	7.36±0.23^{a}	0.45±0.03^{b}	0.37±0.02^{b}
Total n-6	**21.1±0.43**^{a}	**12.6±0.39**^{b}	**12.9±0.23**^{b}
22:5n-3	0.03±0.01^{b}	0.13±0.01^{a}	0.14±0.01^{a}
22:6n-3	5.07±0.25^{b}	12.1±0.20^{a}	12.9±0.30^{a}
Total n-3	**5.10±0.26**^{b}	**12.2±0.20**^{a}	**13.0±0.29**^{a}
22:5n-6/22:6n-3	1.46±0.07^{a}	0.04±0.002^{b}	0.03±0.002^{b}
22:5n-6+22:6n-3	12.4±0.37	12.6±0.22	13.2±0.30
Total fatty acids (μg/mg)	30.2±0.49	30.6±0.59	29.8±0.53

[1]Each variable represents the mean ± SEM, n=5. Different symbols indicate means are significantly different among the groups by Tukey's HSD test, at P<0.05.
[2]N-3 Deficient group contained 0.06% LNA; n-3 Adequate group contained 3.2% LNA; Dam-reared group means that rats were raised by their mother's milk

Table 6. Effect of n-3 deficiency on rat retina fatty acid compositions[1]

Fatty Acids	Dietary Group[2]		
	n-3 Deficient	n-3 Adequate	Dam-reared
	%		
12:0	0.30±0.20	0.14±0.05	0.17±0.04
14:0	0.44±0.07	0.34±0.03	0.35±0.03
16:0	15.2±0.48	14.5±0.23	15.3±0.17
18:0	21.1±0.29^{ab}	20.5±0.30^{b}	21.5±0.21^{a}
20:0	0.27±0.02	0.29±0.02	0.24±0.01
22:0	0.12±0.02	0.15±0.02	0.10±0.01
24:0	0.15±0.004^{a}	0.18±0.04^{a}	0.06±0.03^{b}
Total Saturates	**37.6±0.36**^{a}	**36.1±0.29**^{b}	**37.8±0.20**^{a}
16:1n-7	0.57±0.07^{b}	0.82±0.08^{a}	0.28±0.05^{c}
18:1n-9	7.51±0.19	7.44±0.23	7.15±0.15
18:1n-7	2.11±0.07^{a}	1.98±0.05^{a}	1.71±0.05^{b}
20:1n-9	0.27±0.01^{a}	0.22±0.01^{b}	0.26±0.01^{a}
24:1n-9	0.23±0.05^{a}	0.29±0.03^{a}	0.10±0.01^{b}
Total Monounsaturates	**10.7±0.33**^{a}	**10.7±0.36**^{a}	**9.49±0.20**^{b}
18:2n-6	0.34±0.02	0.53±0.24	0.49±0.04
18:3n-6	0.09±0.01	0.08±0.01	0.10±0.01
20:2n-6	0.07±0.004	0.09±0.01	0.09±0.01
20:3n-6	0.22±0.02^{a}	0.25±0.03^{a}	0.15±0.01^{b}
20:4n-6	9.04±0.19^{a}	8.52±0.19^{b}	8.33±0.08^{b}
22:2n-6		0.05±0.01	0.05±0.004
22:4n-6	2.31±0.04^{a}	1.55±0.03^{b}	1.49±0.03^{b}
22:5n-6	16.8±0.93^{a}	1.05±0.07^{b}	0.83±0.03^{b}
Total n-6	**28.8±0.85**^{a}	**12.2±0.38**^{b}	**10.7±0.14**^{b}
22:5n-3	0.09±0.03^{c}	0.40±0.02^{a}	0.34±0.02^{b}
22:6n-3	15.1±1.17^{b}	33.7±0.84^{a}	33.8±0.57^{a}
Total n-3	**15.2±1.18**^{b}	**34.1±0.83**^{a}	**33.9±0.68**^{a}
22:5n-6/22:6n-3	1.14±0.11^{a}	0.03±0.002^{b}	0.02±0.001^{b}
22:5n-6+22:6n-3	31.8±1.13	34.8±0.81	34.3±0.64
Total fatty acids (μg/mg)	14.0±1.01	13.6±0.60	13.1±0.99

[1]Each variable represents the mean ± SEM, n=5. Different symbols indicate means are significantly different among the groups by Tukey's HSD test, at P<0.05.
[2]N-3 Deficient group contained 0.06% LNA; n-3 Adequate group contained 3.2% LNA; Dam-reared group means that rats were raised by their mother's milk

막의 총 포화지방산의 경우 n-3 지방산 적절군(n-3 Adq)에서 가장 낮은 수준을 나타내었고 총 단일불포화지방산에서는 대조군(Dam-reared)에서의 함량이 가장 낮았다(Table 6). 총 n-6 지방산과 그 중에서 22:4n-6, DPAn-6 및 DPAn-6/DHA 비의 함량은 n-3 지방산 결핍군(n-3 Def)에서 n-3 지방산 적절군(n-3 Adq)과 대조군(Dam-reared)에 비해 유의적으로 증가하였으나 22:5n-3, DHA와 총 n-3 지방산의 함량은 상당히 감소하였음을 살펴 볼 수가 있었다($p<0.05$). 그러나 대조군(Dam-reared)과 n-3 지방산 적절군(n-3 Adq)의 지방산 조성에는 유의적 변화가 없었다. 최근의 *in vivo* 연구로[18] 2 세대동안 n-3 지방산 결핍 식이를 투여한 후 n-3 지방산 결핍이 G-protein에 의한 신호전달에 미치는 효과를 조사한 결과 장기간 n-3 지방산 결핍은 망막 내 rhodopsin 활성화 감소, rhodopsine-transduction coupling 활성 감소, cGMP phosphodiesterase 활성 감소 등을 보여 망막 내의 신호전달 체계에 결함을 나타내었음이 보고되었다. 따라서 시력 관련 electoretinogram test[1,23-25]에서 n-3 지방산 결핍에 따른 시력 저하 현상은 본 연구 결과인 n-3 지방산 결핍군의 망막 DHA 함량 감소와 이에 수반하는 DPAn-6 함량 증가 현상과 매우 밀접한 연관이 있는 것으로 사료된다. Kim 등[8]은 DHA가

신경세포막의 phophatidylserine 축적을 도와 일련의 세포 분화 및 성장을 유도하는 신호 전달 체계로 진행시켜 결국 신경세포의 appotosis를 예방하는 효과가 있다고 보고하였으며 이때 DPAn-6와 비교했을 때 그 appotosis 예방 효과가 더 큰 것으로 나타났다고 덧붙였다[9]. Calderon과 Kim[2]은 n-3 지방산이 결핍된 동물로부터 해마 조직을 primary culture 한 결과, n-3 지방산 적절군의 것에 비해 해마 조직의 신경돌기의 성장이 둔화하였고 상대적으로 짧은 신경돌기로 성장되어짐을 관찰하였다. 또한, n-3 지방산이 결핍된 그룹에 DHA 공급했을 때 해마의 신경돌기의 성장이 촉진되었고 n-3 지방산 적절군의 것과 유사한 길이의 신경돌기로 성장됨을 확인하였으나 DPAn-6, arachidonic acid (20:4n-6) 및 18:1n-9를 n-3 지방산 결핍군에 처리했을 때는 이러한 효과를 관찰 할 수가 없었다고 보고하였다. Katajika 등[10]은 n-3 불포화지방산의 섭취는 시냅스 가소성과 기억력에 관여하는 뇌의 유전자 발현에도 영향을 미친다고 보고하였다. 따라서 뇌 성숙 발달 과정동안 n-3 지방산 결핍은 뇌의 DHA의 결핍을 초래하여 불적절한 신경돌기의 성장이 야기되므로 적절한 양의 DHA 함량의 유지가 뇌 기능 항상성에 필수적이라고 여겨진다.

요 약

인공사육시스템으로 사육된 n-3 지방산이 결핍된 군 및 n-3 지방산이 적절히 함유된 군과 대조군으로 엄마쥐가 직접 수유하여 사육시킨 군의 혈장, 뇌 및 망막의 지방산 조성을 비교 검토한 결과, 혈장의 총 단일불포화지방산은 n-3 지방산 결핍군에서 n-3 지방산 적절군과 대조군에 비해 증가하였으나 총 n-3 지방산의 경우에는 n-3 지방산 결핍군에서 94%로 감소하였다. N-6 지방산 계열 중에서 22:4n-6와 DPAn-6 함량은 n-3 지방산 결핍군에서 n-3 지방산 적절군과 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으나 22:5n-3과 DHA의 함량은 94%로 감소하였다($p<0.05$). 뇌의 지방산 조성의 경우, 총 포화지방산 함량에는 유의적 차이가 없었으나, n-3 지방산 결핍군과 비교했을 때 n-3 지방산 적절군과 대조군보다 총 n-3 지방산의 함량이 유의적으로 높았다($p<0.05$). 뇌의 DHA 함량의 경우, n-3 지방산 결핍군은 n-3 지방산 적절군과 대조군에 비해 그 함량이 58-61% 감소하였고 반면 n-6 계열인 DPAn-6의 함량은 상당히 증가하였음을 살펴 볼 수가 있었다($p<0.05$). 망막의 총 포화지방산의 경우 n-3 지방산 적절군에서 가장 낮은 수준을 나타내었고 총 단일불포화 지방산에서는 대조군에서의 함량이 가장 낮았다. 총 n-6 지방산과 그 중에서 22:4n-6와 DPAn-6의 함량은 n-3 지방산 결핍군에서 n-3 지방산 적절군과 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으나 22:5n-3, DHA와 총 n-3 지방산의 함량은 상당히 감소하였음을 살펴 볼 수가 있었다($p<0.05$). 이상의 결과로부터 뇌의 지방산 조성, 특히 감소된 DHA 함량과 증가된 DPAn-6 함량은 해마 신경조직의 신경돌기 성장과 뇌 기능에 악영향을 끼치므로 적절한 양의 DHA 함량의 유지가 뇌 기능 항상성에 필수적이라고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 우수여성과학자도약연구지원사업(KRF-2005-204-F00020) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. 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.
2. Calderon, F. and H. Y. Kim. 2004. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **90,** 979-988.
3. 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.
4. 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.
5. Greiner, R. S., T. Moriguchi, B. M. Slotnick, A. Hurron and N. Salem. 2001. Olfactory discrimination deficits in n-3 fatty acid-deficient rats. *Physiol. Behav.* **72,** 379-385.
6. Hoshiba, J. 1996. Automatic feeder for newborn rat use within 12 hours of birth. *Contemp. Top Lab. Anim. Sci.* **35.** 83-86.
7. Kanno T, N. Koyanagi, Y. Katoku, A. Yonekubo, T. Yajima, T. Kuwata, H. Kitagawa and E. Harada. 1997. Simplified preparation of refined milk formula comparable to rat's milk: influence of the formula on development of the gut and brain in artificially reared rat pups. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **24,** 244-252.
8. Kim, H. Y., M. Akba, A. Lau and L. Edsall. Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. *J. Biol. Chem.* **275,** 35215-35223.
9. Kim, H. Y., M. Akbar and A. Lau. 2003. Effects of docosapentaenoic acid on neuronal apoptosis. *Lipids* **38,** 453-457.
10. Kitajka, K., A. J. Sinclair, R. S. Weisinger, H. S. Weisinger, M. Mathai, A. P. Jayasooriya, J. E. Halver and L. G. Puskas. 2004. Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brian gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 10931-10936.
11. Lamptey, M. S. and B. L. Walker. 1976. A possible essen-

tial role for dietary linolenic acid in the development of the young rat. *J. Nutr.* **106**, 86-93.
12. 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, Champaigan, IL, p122-131
13. Lim, S. Y., J. Hoshiba, T. Moriguchi and N. Salem. 2005. N-3 fatty acid deficiency induced by a modified artificial rearing method leads to poorer performance in spatial learning tasks. *Pediatr. Res.* **58**, 741-748.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Salem, N., M, Reyzer and J. Karanian. 1996. Losses of arachidonic acid in rat liver after alcohol inhalation. *Lipids* **31**, S153-156.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Yamamoto, N., M. Saitoh, A. Moriuchi, M. Nomura and H. Okuyama. 1987. Effect of dietary α-linolenate/linoleate balance on brain lipid compositions and learning ability of rats. *J. Lipid Res.*, **28**, 144-151.
27. Yamamoto, N., A. Hashimoto, Y. Takemaoto, H. Okuyama, M. Nomura, R. Kitajima, T. Togashi and Y. Tamai. 1988. Effect of the dietary α-linolenate/linoleate balance on lipid compositions and learning ability of rats. II. Discrimination process, extinction process, and glycolipid compositions. *J. Lipid Res.*, **29**, 1013-1021.