

Trimethyltin 유도성 인지기능 저하 동물 모델에 대한 들기름의 개선효과

강진용 · 박보경 · 승태완 · 박창현 · 박선경 · 진동은 · 강성원¹ · 최성길 · 허호진*
경상대학교 응용생명과학부 (BK21 plus) · 농업생명과학연구원, ¹에스엔티푸드 주식회사

Amelioration of Trimethyltin-induced Cognitive Impairment in ICR Mice by Perilla Oil

Jin Yong Kang, Bo Kyeong Park, Tae Wan Seung, Chang Hyeon Park, Seon Kyeong Park,
Dong Eun Jin, Sung Won Kang¹, Sung-Gil Choi, and Ho Jin Heo*

Division of Applied Life Science (BK21 plus) · Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University
¹S&T FOODS Co. Ltd

Abstract This study aimed to investigate the anti-amnesic effect of perilla oil against trimethyltin (TMT)-induced learning and memory impairment in ICR mice. Perilla oil (2.5 mL/kg of body weight) and soybean oil (2.5 mL/kg of body weight) were administered orally to mice for 3 weeks, and at the end of the experimental period, cognitive behavior was examined by Y-maze and Morris water maze (MWM) tests. Behavioral tests showed that the mice treated with perilla oil had improved cognitive function compared to that in mice administered soybean oil. Analysis of brain tissue showed that perilla oil significantly lowered acetylcholinesterase activity and malondialdehyde (MDA) levels. Oxidized glutathione (GSH)-to-total GSH ratio also decreased from 10.4% to 5.3% in perilla oil-treated mice, but superoxide dismutase (SOD) activity increased from 11.7 to 14.2 U/mg protein. Therefore, these results suggest that the perilla oil could be a potential functional substance for improving cognitive function.

Keywords: acetylcholinesterase, cognition, perilla oil, soybean oil

서 론

우리나라는 경제성장과 함께 의학기술의 발달로 평균 수명이 늘어남에 따라 노인 유병율은 증가하고 있으며 2050년에는 치매 노인비율이 65세 이상 인구 비율의 13.2%를 차지할 것으로 예상하는 가운데 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease, AD)를 포함한 퇴행성 뇌신경계 질환의 발병률은 계속적으로 증가하고 있다. 고령화로 인한 자연적인 기억력 상실 또는 치매 등의 퇴행성 질환에 의해 인지기능이 감퇴된 경우, 개인의 사회 활동 뿐만 아니라 주변인들의 삶의 질을 저하시키므로 이에 대한 연구의 중요성은 증대되고 있다(1). 현재까지의 연구결과에 의하면 퇴행성 뇌 질환의 대표적인 기억력 손상의 원인 중 하나로 콜린성 가설(Cholinergic hypothesis in AD)이 제기되고 있다. 노인성 치매에 노출된 뇌신경은 다양한 손상이 진행되고, 그 중에서 콜린성 신경의 손상이 심각하여 그로 인한 기억력, 언어적 능력 및 판단능력 등의 점진적이고 지속적인 감퇴 현상이 나타난다고 보고하고 있다(2).

Trimethyltin (TMT)는 유기 주석 화합물의 일종으로 대뇌피질

과 해마조직 등 중추신경계에 강력한 독성을 나타내며, 중독된 실험동물은 자발성 간질, 동종간의 과도한 공격성, 자극과민성 등 변연계 손상으로부터 나타나는 신경행동을 나타낸다. 신경병리학적으로는 뇌 특정부위의 신경세포에 선택적 손상이 관찰되며 설 치류에서 비가역적 해마의 손상이 알츠하이머성 치매증상과 유사하다고 보고되고 있어 TMT를 이용한 학습 및 기억력 등 인지적 결함을 가진 동물모델 구축에 활용되고 있다(3).

오래전부터 주요작물의 하나로 재배되고 있는 들깨(*Perilla frutescens* (var. japonica))는 꿀풀과(Labiatae)의 일년생 초본식물로 있는 쌈채소, 절임, 각종 가공식품 등에, 종자는 전통적 과, 죽, 목 등으로 이용되고 있으며 들깨씨앗은 압착 방법을 통해 들기름을 얻어낸다. 들기름은 고유의 향이 좋아 우리나라에서 각종 음식에 식용유지 및 양념 등으로 소비되고 있다. 들기름은 비타민E의 함량이 500.9 mg/kg으로 다른 유지에 비해 풍부하며, 대부분의 식물성 기름에서 섭취하기 어려운 필수지방산인 ω -3/6/9 불포화지방산이 총 지방산의 약 93%를 차지하고 특히 리놀렌산(60%), 리놀레산(16%), 올레산(17%) 등이 주요 구성 지방산으로 보고되고 있다(4,5). 필수지방산 등이 갖는 영양학적 중요성뿐만 아니라 들기름 구성 성분의 물리화학적 특성 연구(6), 향암(7), 폐질환(8) 등의 다양한 생리활성 연구 역시 보고되었으나 인지기능 개선효과에 관하여는 연구는 매우 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성 물질을 함유한 들기름을 이용하여 TMT의 중추신경계통 손상 유발로 인한 ICR (Institute of Cancer Research) 마우스에서의 인지기능 장애에 대한 개선효과를 연구하고 또한 우리나라 가정에서 보편적으로 사용되는 식용유지인 대두유와의 그 효과를 상대적으로 비교하고자 하였다.

*Corresponding author: Ho Jin Heo, Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea
Tel: 82-55-772-1907
Fax: 82-55-772-1909
E-mail: hjher@gnu.ac.kr
Received January 19, 2015; revised March 25, 2015;
accepted April, 10, 2015

재료 및 방법

재료 및 추출물의 제조

본 실험에서 사용된 들기름은 전남 함평 농협에서 2013년 12월에 구매한 들깨종자(*Perilla frutescens* (L.) Britton)를 4°C에서 냉장보관 한 후 정제수로 3회 반복 수세하여 45°C에서 건조하였고, 착유기(National Eng., Goyang, Korea)를 이용하여 40°C에서 착유하였다. 실험에는 24시간 동안 불순물을 자연 침전시킨 것을 사용하였으며, 들기름의 대비균으로서 사용한 대두유(Beksul, CJ CheilJedang, Seoul, Korea)는 경남 진주 지역의 대형마트에서 구매하여 사용하였다.

지방산 분석

들기름과 대두유 소량을 취하여 0.5 N NaOH-MeOH를 가하여 80°C에서 환류시키면서 가수분해 시킨 후 14% BF₃-methanol 및 n-heptane을 가하여 끓이고 식힌 후 증류수와 Na₂SO₄로 탈수, 여과한 용액 1 μL를 GC/MS에 주입하였다. GC/MS에 의해 분리된 각 지방산 methyl ester를 피크 면적의 비율로 계산하여 각 지방산의 조성비를 구하였다(9).

실험동물 사육 및 실험군의 구성

실험동물은 4주령의 ICR-male mouse를 구입하여(Samtako, Osan, Korea) 7일간의 환경 적응 기간을 거치게 한 후, 모든 실험동물은 3마리씩 한 개의 사육케이스에 넣고 온도 22±2°C, 상대습도 50-55%, 조명 시간 12시간으로 동일한 실험실 환경에서 충분한 양의 식수와 사료를 공급하며 사육하였다. 실험동물들은 7일간의 적응기간이 종료된 후 대조군과 trimethyltin chloride (TMT, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 주사 투여군(인지결함유발 대조군), 들기름과 대두유 처리군으로 분류하여 각 군마다 9마리씩 6군으로 나누어 4주간 실험하였다. 들기름과 대두유 처리군은 21일 동안 각각 대두유, 들기름(2.5 mL/kg of body weight)을 매일 경구 투여하였고, 28일째 되는 날에 0.85% 식염수에 녹인 TMT (7.6 μg/kg of body weight)를 100 μL씩 마우스의 복강에 주사하여 인지결함을 유발시켰다. TMT 주사 2일 후 Y-maze test 및 Morris water maze test의 행동 실험을 6일간 진행하였다.

TMT 주사 후 Y-maze test

TMT 주사 2일 후 Y-maze 실험을 실시하였다. 실험에 사용되는 Y-maze는 검은색 플라스틱 재질로 3개의 구역으로 구성되어 있고, 각 구역의 길이, 높이, 너비는 33, 15, 10 cm이다. 각 구역을 A, B, C로 정한 후 한쪽 구역에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 마우스가 들어간 구역의 이동경로를 video-tracking system (Smart v3.0, Panlab SL, Barcelona, Spain)을 이용하여 기록하였다. 3개의 서로 다른 구역에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여하고, 변경 행동력(alternation behavior)은 총 통과횟수(total arm entry)와 점수를 이용하여 다음의 식을 통해 계산하였다(10).

$$\text{Alternation (\%)} = \frac{\text{Actual alternation}}{\text{Maximum alternation}^*} \times 100$$

*Maximum alternation = total number of arm entry-2

TMT 주사 후 Morris water maze test

Y-maze 실험 종료 다음 날 실험동물의 공간기억 평가를 위해

Morris water maze 실험을 실시하였다. 원형 수조(직경 150 cm, 높이 60 cm)안에 물을 30 cm 높이로 채우고(23±2°C), 수조 4분면의 한 구역에 도피대(escape platform)를 설치하고 식용먹물(Cebesa, Valencia, Spain)을 풀었다. 실험 첫날은 수조에서 실험동물이 platform없이 60초간 자유롭게 수영하도록 하여 적응훈련을 시킨 후, 다음 날은 platform이 수면 위로 1 cm 보이게 하여 위치를 기억하도록 하였다(visible trial). 이후 4일 동안은 platform을 수면 아래로 2 cm로 보이지 않게 설정한 수조에서 매번 입수하는 위치(N, S, E, W zone)를 다르게 하고 하루 1번씩 반복하여 훈련시켰으며 video-tracking system (Panlab SL)을 이용하여 기록하였다(hidden trial). 실험동물이 60초안에 platform에 도달하는 경우에는 10초 동안 platform에 머물게 하였으며, platform을 찾지 못할 경우에는 손으로 위치를 안내해주어 platform에 위치하도록 하고 20초 동안 있도록 하였다. 실험 5일째에는 platform을 제거하고 working memory를 측정하기 위하여 60초 동안 platform이 있었던 구역(W zone)에 머무르는 시간(sec)을 기록하는 규명시험(probe test)을 실시하였다(11).

마우스 뇌 조직 중의 acetylcholinesterase (AChE) 활성 측정

Morris water maze test 종료 후 적출한 마우스 뇌 일정량에 10배의 ice-cold PBS 완충용액을 넣고 Glass-Col 균질기로 균질화한 후 14,000×g에서 30분간 원심 분리하였으며, 그 상층액을 AChE 활성 측정에 사용하였다. 모든 추출공정은 4°C에서 수행하였으며, Quant-iT™ 단백질 분석 키트(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출한 효소액의 단백질 함량을 측정하였다. 효소 5 μL에 50 mM sodium phosphate 완충용액 65 μL를 넣고 37°C에서 15분간 선반응 시킨 후, 반응 혼합물에 250 mM 기질용액을 70 μL를 첨가하고 10분간 반응 후, microplate reader (Bio-rad, Hercules, CA, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 마우스 뇌 조직 중의 AChE 활성은 대조군 대비 % 활성으로 나타내었다(12).

마우스 뇌 조직 중의 malondialdehyde (MDA) 함량 측정

적출한 마우스 뇌의 일정량에 PBS 완충용액을 넣고 추출하여 얻어진 균질액 160 μL에 1% 인산 960 μL을 혼합한 후 0.67% thiobarbituric acid 320 μL를 넣고 95°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액은 원심분리기(Combi-514R, Hanil Co. Ltd., Seoul, Korea) 2,500×g에서 10분간 원심분리하고, 532 nm에서 상층액의 흡광도(Libra S32PC, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)를 측정하였다. MDA 함량은 mg protein 당 nmole의 농도로 표시하였다(13).

Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

적출한 마우스의 뇌조직을 10배 부피의 세포용해용 완충용액을 넣고 Glass-Col 균질기로 균질화한 후 10,000×g에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 버리고 펠릿을 취하였다. 1× 세포 추출 완충용액(10× SOD Buffer 1 mL, 20% triton X-100 0.2 mL, 증류수 8.8 mL, 200 mM pMSF 10 μL)을 넣고 30분간 5분 단위로 교반한 후, 100×g에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 실험에 이용하였다. 모든 공정은 4°C를 유지하였으며 추출한 상층액의 단백질함량을 측정하기 위하여 Quant-iT™ 단백질 분석 키트(Invitrogen Co)를 이용하였다. SOD 활성을 측정하기 위하여 SOD 분석 키트(Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 사용하였으며 측정된 흡광도 값을 계산하여 SOD (U/mL)로 나타내었다.

Glutathione (GSH) 함량 측정

일정량의 마우스 뇌에 10 volume의 cold 5% metaphosphoric

acid를 넣고 균질화한 후 15분간 원심분리(14,000×g)하여 상등액을 얻어 실험에 사용하였으며, 2 M 4-vinylpyridine 10 µL를 더하여 산화형 glutathione 측정에 사용하였다. 모든 공정은 4°C를 유지하였으며 추출한 상등액의 단백질 함량을 측정하기 위하여 Quant-iT™ 단백질 분석 키트(Invitrogen Co)을 이용하였다. GSH의 함량은 GSH (GSSG/GSH) 검출 키트(Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY, USA)를 이용하여 측정하였으며, 측정된 총 GSH, 산화된 GSH (oxidized GSH)의 흡광도 값을 GSH 표준곡선에 대입하여 산화 GSH과 총 GSH의 비율을 퍼센트로 나타내었다.

통계처리

실험의 결과는 평균과 표준편차(mean±SD)로 나타내었고, 실험군 간 차이의 통계적 유의성은 SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 일원배치 분산분석과 Duncan's multiple range test로 유의성 검정을 시행하였다($p<0.05$).

결과 및 고찰

지방산함량

들기름 및 대두유의 지방산조성을 분석한 결과 주요 지방산 조성은 Table 1과 같다. 들기름의 경우 불포화지방산이 약 90%를 차지하고 있었으며, 그중 ω-3 불포화지방산인 α-리놀렌산이 약 61%로 대다수를 차지하고 있었으며, 그다음으로 올레산(16%), 리놀레산(13%) 팔미트산(6%), 스테아르산(2.4%)의 순서로 지방산 함량이 많은 것으로 나타났다. 대두유의 경우는 불포화지방산의 함량이 약 82%로 들기름에 비해 상대적으로 적은 함량 분포가 나타났으며, 가장 많은 지방산으로는 ω-6 불포화지방산인 리놀레산으로 약 51%를 함유하고 있는 것으로 나타났으며, 다음으로 올레산(24.8%), 팔미트산(11.4%), α-리놀렌산(5.4%), 스테아르산(4.5%)의 순서로 지방산 조성이 많은 것으로 나타났다.

Y-maze 실험을 통한 공간 인지능력 평가

Y-maze test는 단기 기억 형태의 순간 공간인 지력을 평가하기 위한 방법으로, 뇌의 해마 부위에 비가역적인 손상을 일으킴으로써 AD와 유사한 증상을 나타내는 TMT를 이용하여 기억력과 학습능력이 감퇴된 마우스 모델을 대상으로 8분 동안 Y-maze에서의 마우스 행동을 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. TMT군은 대조군(100%) 대비 약 79%로 기억력 저하(약 21% 감소)를 보였고, 대두유군은 88%로 TMT군과 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 이에 반해 들기름군은 TMT군과 비교하였을 때 기억력을 개선할 뿐만 아니라 대조군과 유사한 것으로 나타났다(Fig. 1A). Figure 1B는 8분 동안 마우스들이 Y-maze의 각 구역을 통과한 총 횟수를 나타낸 것으로 마우스의 기본적인 운동능력에는 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. TMT에 중독된 실험동물은 자발성 간질, 공격성, 과민성 등 변연계 손상으로부터 나타나는 신경적 과잉행동을 나타내는데, 각 군들 중 대표적인 한 마리 쥐의 행동 패턴을 Fig. 1D를 통해 나타내었다. Fig. 1C에서 TMT군은

대조군과 비교하였을 때 같은 시간당 구역 내에서의 이동거리가 현저하게 많았으며 대두유군도 유사한 행동을 나타내었다. 반면에 들기름군은 대조군과 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 TMT 복강 주사로 유도된 인지 결함 및 과잉행동 장애에 대한 들기름의 개선 효과를 나타내고 있다.

Morris water maze test를 이용한 기억력 및 학습능력 개선 효과

Morris water maze 실험은 실험동물의 공간 기억 학습 능력을 평가하는 방법으로 결과는 다음과 같다(Fig. 2). 실험기간(hidden trial) 동안 대두유군을 제외하고는 모두 시간의 경과와 더불어 platform을 찾아가는데 소요되는 시간(escape latency)이 감소하였다. TMT군은 대조군과 비교하여 항상 platform (W zone)에 찾아가는 시간이 길었고, 들기름군은 첫째 날에는 대조군보다 찾아가는 시간이 길었으나, 4일째에 통계적으로 의미 있는 수준으로 감소한 것을 확인하였다(Fig. 2A). Figure 2B는 5일째에 platform을 제거한 후 platform이 있었던 구간(W zone)을 지나가거나 머무르는 시간을 측정하여 공간 기억력을 검사하는 probe test를 나타내며 결과는 다음과 같으며(Fig. 2B), probe test에서의 쥐의 행동패턴을 비교하기 용이하도록 Fig. 2C를 통해 각군들 중 대표적인 한 마리의 행동패턴을 나타내었다. 동그란 원이 platform이 있던 위치이며 실험 결과 TMT군의 경우 24.5%로 대조군의 31.5%과 비교하여 낮은 공간 기억력을 보였으며, 대두유군(26.4%)은 TMT군과 유사한 공간 기억력을 보였다(Fig. 2B). 반면 들기름군(35.2%)은 원래 platform이 위치했던 구간에 대한 기억력이 상대적으로 우수했고, 또한 수조 4분 면 중 platform이 위치한 특정 구역을 경유하는 횟수가 대조군보다 유의적으로 많았거나 차이가 없는 것으로 나타나($p<0.05$) TMT에 의한 공간 학습 및 기억력 손상이 개선된 것으로 나타났다. Umezawa 등(14)에 의하면, α-리놀렌산/리놀레산(ω-3/ω-6) 지방산 조성이 다른 해바라기씨 기름과 들기름을 노화를 촉진시켜 학습 및 기억력이 감퇴한 마우스(SAMP8)에게 공급한 결과 지방산의 α-리놀렌산 비율이 높은 들기름 투여군이 상대적으로 우수한 기억력, 학습력 및 행동장애 개선 효과가 나타났다. 또한 노령 마우스를 이용한 동물 실험에서는 ω-3 지방산이 결핍된 식이군은 대조군에 비하여 공간 인지 및 기억학습능력이 저하되었으며(15), 장기적인 ω-3 지방산 함유 식이는 저하된 기억력을 효과적으로 개선하고 뇌의 지질과산화물 함량을 감소시켜 신경세포 사멸로 인한 퇴행성 장애가 발생하는 것을 예방하는 것으로 보고되었다(16). 대두유는 총 지방산의 85%가 불포화지방산이며 리놀레산(65%), 올레산(26%) 및 α-리놀렌산(9%)로 구성되어 있는 반면 들기름은 약 93%이 불포화지방산이 차지하며 α-리놀렌산(60%), 올레산(17%), 리놀레산(16%)의 구성 차이를 보이는 것으로 알려지고 있으며(4,17) 이는 본 실험 결과와도 유사한 내용이다. 이러한 것으로 미루어보아 본 실험 결과는 ω-3 지방산의 구성 함유량 등의 상대적 차이가 인지 기능 개선에 일부 영향을 미친 것으로 판단된다.

Table 1. Composition of fatty acids

(Unit: %)

	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α-Linolenic acid	Saturated fatty acid	Unsaturated fatty acid
Perilla oil	6.02±0.05 ¹⁾	2.39±0.05	15.98±0.06	13±0.02	61.47±0.19	9.00	91.00
Soybean oil	11.35±0.07	4.51±0.1	24.76±0.07	51.17±0.09	5.37±0.02	17.14	82.86

¹⁾Means±SD (n=3)

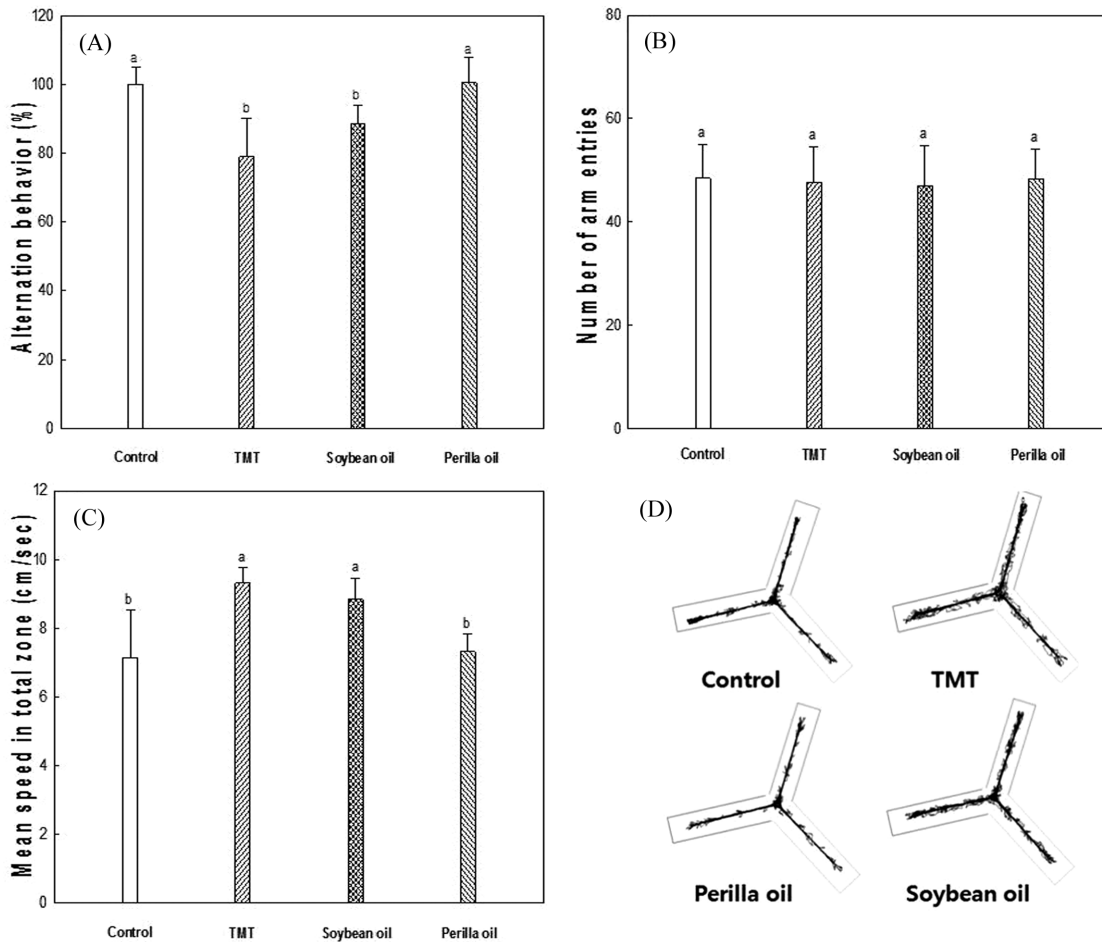


Fig. 1. Effect of soybean oil and perilla oil on spontaneous alternation behavior. Alternation behavior (A), number of arm entries (B), mean speed in total zone (C), and behavioral observation (D). Control group was injected with saline (0.85%). Sample groups were injected with TMT followed by feeding with sample (soybean oil and perilla oil 2.5 mL/kg body weight per day, respectively). Spontaneous alternation behaviors were measured during 8 min. Result shown are means \pm SD ($n=9$), and small letters represent statistical differences.

동물행동실험 후 마우스 뇌 조직 중의 AChE 활성 측정 AChE 생성

Acetylcholine (ACh)은 뇌조직의 모든 신경세포에서 발견되는 신경전달물질로서 시냅스와 시냅스 사이의 신경전달에 관계하는 중요한 신경전달물질로 알려져 있다(18). Acetylcholine (ACh)의 합성과 분해에 관련된 효소로는 각각 choline acetyltransferase (ChAT)와 acetylcholinesterase (AChE)가 있으며, 뇌조직의 신경전달이 원활하게 이루어지려면 ACh 수준에 영향을 미치는 ChAT와 AChE 활성이 매우 중요하다. 그러나 AChE의 과도한 증가는 acetylcholine 함량을 감소시키고 amyloid 화합물의 신경독성을 증가시켜 치매가 유발될 가능성이 높아진다고 보고되어 있다(19,20). 이러한 이유로 퇴행성 치매 환자의 치료에 있어 AChE 효소를 억제해 ACh의 농도를 증가시키는 방법도 이용되고 있다. TMT에 의한 뇌신경계 손상의 기본 기작 중 하나는 TMT가 muscarinic receptor 손상을 통한 콜린성 신경전달에서의 변화를 유도하여 손상을 유발하며, 이 손상은 특히 hippocampal neuron에서 발생하는 것으로 나타난다(20-24). 결국 TMT가 hippocampal region의 ACh의 농도를 감소시킨다는 것으로 미루어 볼 때 TMT와 AChE 활성 사이에 직접적인 상관관계는 알려지지 않았지만 마우스 뇌 조직에 존재하는 AChE의 활성을 증가시키는 것으로 판단되며, 각 들기름과 대두유를 식이 하였을 때 AChE 활성 억제 정도

를 측정하고자, Y-maze 및 Morris water maze 실험 종료 후 마우스의 뇌를 적출하여 각 군의 AChE 활성 정도를 측정하였다(Fig. 3). TMT군은 대조군(100%) 대비 약 148%로 AChE 활성이 증가하였으며, 들기름군의 경우 103%로 TMT군 대비 30% 정도의 억제 효과를 보였다. 대두유군은 약 140%로 AChE 활성을 억제하나 들기름과 비교하였을 때 그 효과는 미비한 것으로 나타났다. 알츠하이머병 환자에게 AChE inhibitor를 투여함으로써 뇌중의 ACh 함량이 증가하고 이에 따라 인지 기능과 학습 기능의 개선이 있었다는 많은 연구보고가 있으며(25), 본 실험에서 들기름군의 인지 기능 개선효과는 AChE 활성 억제 작용에 의한 효과라고 사료되어진다.

동물행동실험 후 마우스 뇌 조직 중의 뇌 지질 과산화 억제 활성

조직을 구성하는 세포에서의 과산화 현상은 세포막 주요구성 성분인 인지질을 구성하는 불포화지방산에 산소 유리기와 결합하여 생기게 되며, 과산화지질은 세포막의 불포화지방산과 지단백질에서 유리기와 연쇄 반응하여 부산물로 malondialdehyde (MDA)를 생산한다. MDA는 산화적 스트레스 시 뇌조직의 각 영역에서 증가하는 것으로 알려져 있으며, 축적 시 DNA와 축합물을 형성하는 등 조직에 산화적 손상을 유발하는 것으로 보고되

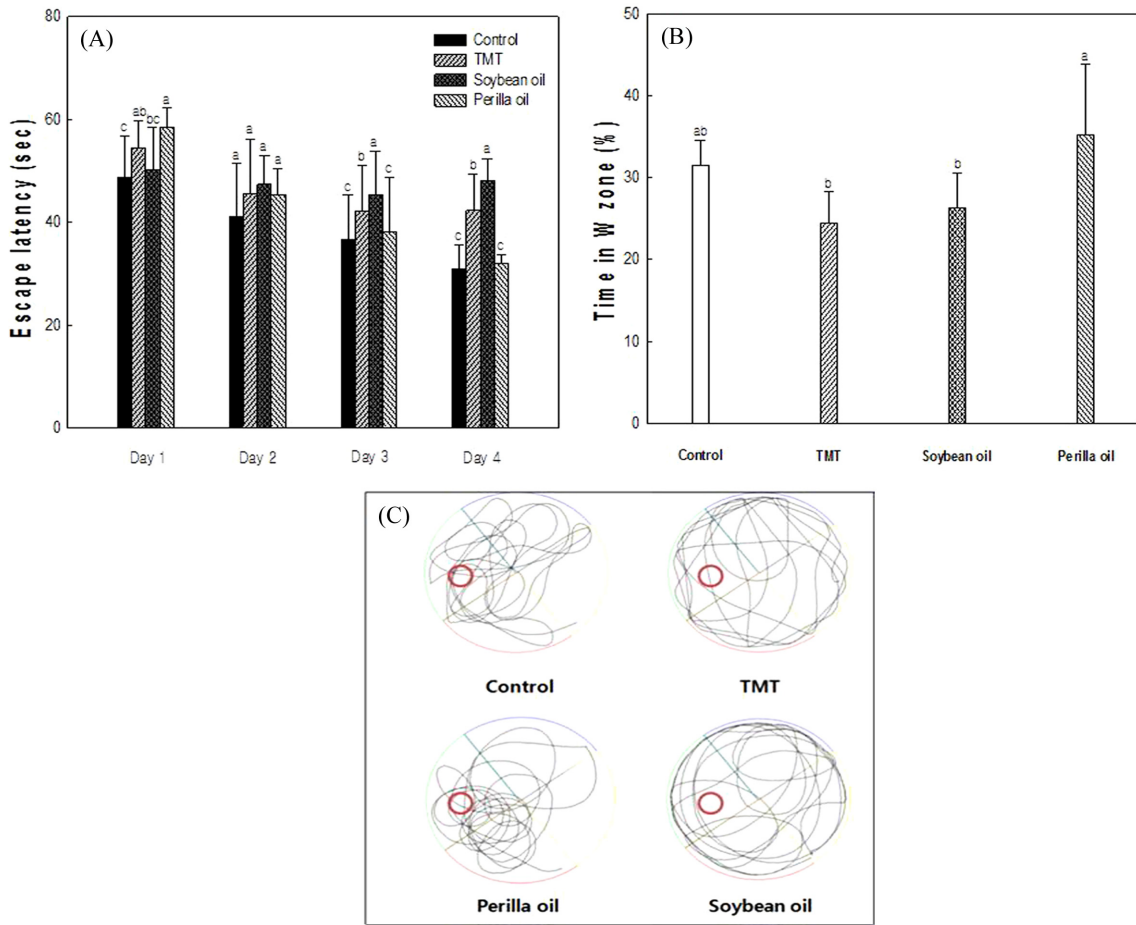


Fig. 2. Effect of soybean oil and perilla oil on Morris water maze test. Control group was injected with saline (0.85%). Escape latency (A), Probe test (Time in W zone) (B) and behavioral observation (C). Sample groups were injected with TMT followed by feeding with sample (soybean oil and perilla oil, 2.5 mL/kg body weight per day, respectively). The escape latency and time in W zone was measured during 60 s. Result shown are means±SD (n=9), and small letters represent statistical differences.

었다. 특히 뇌세포는 다른 장기에 비하여 불포화 지방산의 함량이 높아 산화적 손상을 받기 쉬우며, 뇌 신경세포에 산화적 스트레스를 가하게 되면 염증반응에 이은 신경독성을 일으켜 신경세포의 사멸이 촉진된다. 결국 이런 산화적 스트레스가 뇌 조직 조직을 구성하는 세포에서의 과산화 현상은 세포막 주요구성 성분인 인지질을 내에서 지속되면 기억 손상 및 손실에 의한 장애를 일으킬 것으로 예상하고 있다(26). MDA 양의 감소는 시료의 항산화 작용으로 인해 산화적 스트레스가 감소한 결과로 해석할 수 있으며, 본 실험에서는 대두유와 들기름을 섭취한 마우스의 뇌 조직에 존재하는 지질과산화 중간생성물인 MDA의 함량을 비교해 보기 위해 각 그룹의 MDA 함량을 측정하였다(Fig. 3). 대조 그룹은 4.21 nmole/mg protein이었으며, TMT 그룹은 이보다 증가한 5.45 nmole/mg protein로 나타났다. 대두유와 들기름 그룹의 MDA 함량은 각각 4.64, 3.20 nmole/mg protein으로 TMT 그룹과 비교하였을 때 모두 MDA 생성을 억제하였으나 대두유는 유의적인 차이가 크지 못한 반면에 들기름은 TMT 대비 약 41% 정도의 억제효과를 보였고 오히려 대조군보다 유의적으로 낮은 MDA 함량을 나타내었다. 들기름에는 항암성이 매우 강하다고 알려진 luteolin과 apigenin, caffeic acid, ascorbic acid, β-carotene, limonene, protocatechuic acid 등의 생리 활성 물질이 함유되어 있다. 또한 우리나라에서는 들기름을 일반 식용유와 다르게 정제하지 않고 이용하기 때문에 이와 같은 생리 활성 물질이 비교적 풍

부하며 그로 인한 항산화 효과 등에 의해 마우스 뇌 조직 중의 지질 산화를 억제할 수 있다고 보고되고 있다(27,28). 따라서 본 실험 결과에서 TMT는 뇌 특정 부위의 신경세포를 손상하는 것으로 사료되며, TMT에 의해 유도되는 뇌 신경세포 손상에 대해 대두유 보다 들기름이 상대적으로 우수한 저해효과를 가지는 것으로 판단된다.

동물행동실험 후 마우스 뇌 조직 중의 SOD 활성 측정

항산화 효소 중의 하나인 SOD는 세포에 유해한 환원 산소종을 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매로 하는 효소이며, SOD는 초산화물을 과산화수소와 일반산소로 전환시키며, 반응성이 큰 superoxide ion을 dismutation 시킴으로써 항산화 작용을 하게 된다. SOD에 의해 생성된 과산화수소는 peroxidase나 catalase에 의하여 무해한 물 분자와 산소 분자로 전환되어 산소 상해로부터 생체를 보호하게 된다(29). 또한 SOD는 자유 라디칼을 근본적으로 제거하는 효소이고 다른 종류의 항산화제보다 우수한 효과를 나타내기 때문에 의약 제제로서 많은 관심을 일으키고 있으며, 현재 항염증 제제나 피부 노화 방지제를 위한 미용 제제로 화장품 등에 이용되고 있는 실정이다(30). 시료의 항산화 효과에 따라 SOD활성이 증가 할 것으로 판단이 되며, 본 실험에서는 각각의 시료를 식이한 마우스 뇌 조직 중의 SOD 활성을 비교 측정함으로써 시료의 항산화 효과를 비교하였다. 실험에 사용한

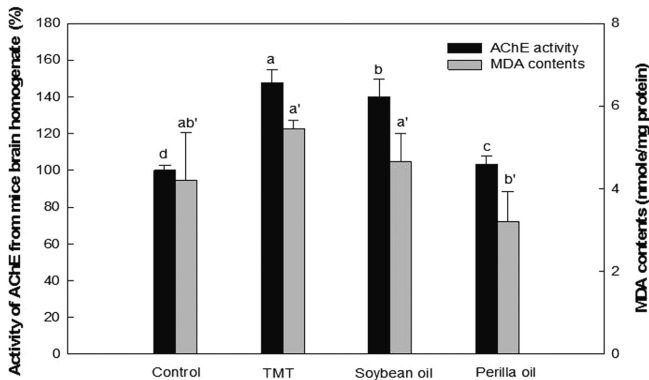


Fig. 3. Effect of soybean oil and perilla oil on AChE and lipid peroxidation. Control group was injected with saline (0.85%). Sample groups were injected with TMT followed by feeding with sample (soybean oil and perilla oil 2.5 mL/kg body weight per day, respectively). Result shown are means \pm SD ($n=9$), and small letters represent statistical differences ($^{a-d}$ for AChE, and $^{a'-d'}$ for MDA).

SOD 분석 키트-WST는 기존에 많이 이용되어왔던 xanthine oxidase의 억제제를 통한 활성 측정법을 이용하면서도 highly water-soluble tetrazolium salt인 WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2-disulfi-phenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 사용한다. WST-1은 superoxide anion과 반응하여 수용성의 formazan dye를 생성하는 한편 WST-1은 xanthine oxidase의 환원형과도 반응하지 않을 뿐 아니라 cytochrome C와 비교했을 때 superoxide anion 과의 반응성이 70배나 낮아서 SOD의 농도가 낮은 샘플에서도 높은 감도를 보인다. 실험 결과 대조 그룹은 16.5 U/mg protein이었으며, TMT 그룹은 이보다 감소한 11.7 U/mg protein으로 나타났다. 대두유, 들기름 그룹의 SOD 함량은 각각 12.6, 14.2 U/mg protein으로 대두유의 경우 TMT 그룹과 차이가 거의 없지만 들기름 그룹의 경우 SOD의 감소를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 결국 들기름은 TMT로 인한 SOD 활성 감소를 억제함으로써 생체 보호 효과를 어느 정도 유지시켜 주는 것으로 판단된다.

동물행동실험 후 마우스 뇌 조직 중의 GSH 산화 저해 활성 측정

TMT의 신경퇴행 기전은 아직 밝혀져 있지 않지만, hippocampus에서 reactive oxygen species (ROS) 형성이 증가하며 TMT가 glutathione system의 변화를 유발하여 초기에 보상적 기전에 의해 환원형 glutathione이 증가하고 glutathione-S-transferase (GST)의 활성이 증가하는 것으로 나타나, TMT 유도 신경 독성 기전에 oxidate stress가 관여됨을 시사해 주고 있다. 뇌 조직의 glutathione은 산화적 세포 손상에 대한 방어 작용을 나타내는 효소인 GSH-peroxidase와 GST의 기질로 사용되는 물질로 활성산소, 과산화지질 그리고 친전자성 물질들이 세포 내에서 최종적으로 무독화되는 과정에 관여하며 세포 내 지질과산화 물질과 이물질의 제거, 아미노산 수송 및 저장, 간 해독 등 다양한 기능을 수행한다(31). glutathione은 환원 형태(GSH)에서는 시스테인의 thiol group이 전자를 제공하고 자신은 다른 활성형 glutathione과 반응하여 산화 형태를 형성하며 체내에서 자유 라디칼을 소거한다. 산화 형태의 glutathione의 증가는 체내에 자유라디칼이 증가하였기 때문에 판단할 수 있으며(32), glutathione의 산화를 억제하

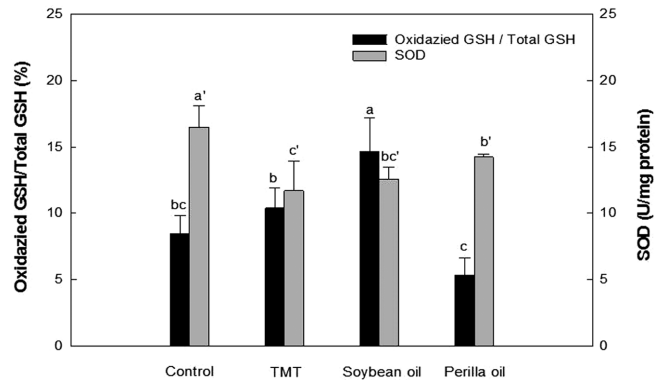


Fig. 4. Effect of soybean oil and perilla oil on oxidized GSH/total GSH contents and SOD activity. Control group was injected with saline (0.85%). Sample groups were injected with TMT followed by feeding with sample (soybean oil and perilla oil, 2.5 mL/kg body weight per day, respectively). Result shown are means \pm SD ($n=9$), and small letters represent statistical differences ($^{a-d}$ for GSH, and $^{a'-d'}$ for SOD).

는 정도를 통해 각 시료의 항산화 효과를 간접적으로 확인할 수 있을 것으로 판단된다. 실험 결과 대조군의 경우 총 glutathione에서 산화된 glutathione의 양이 8.4%인 것에 비해 TMT군의 경우 10.4%를 나타내어 대조군에 비해 산화된 glutathione의 비율이 증가된 것으로 나타났으며, 들기름군은 5.3%로 glutathione의 산화 억제 효과가 뛰어난 것으로 나타났다. 그에 비해 대두유군의 경우 14.6%로 TMT군 보다 산화된 glutathione의 비율이 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). Zaidi 등(33)에 의하면 산화적 스트레스에 지속적으로 노출된 쥐에 비타민 A, E, C를 식이 한 결과, 비타민 E가 뇌 조직의 SOD, glutathione 수치를 가장 많이 높인 것으로 나타났으며, 이를 고려할 때 본 실험에서의 결과는 들기름이 식용유를 포함한 다른 유지에 비해 상대적으로 비타민 E 등을 포함한 생리 활성 구성 성분이 풍부하기 때문으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 들기름의 TMT 유도성 인지 기능 상실에 대한 개선 효과와 함께 가정에서 식용유로서 사용량이 많은 대두유와 그 효과를 비교·연구하였다. 실험에서 들기름과 대두유를 섭취한 마우스를 TMT로 인지 기능 손상을 유발하여 Y-maze test와 Morris water maze test 한 결과, 공간 인지 기능 및 학습능력 개선에 대해 대두유는 효과가 미비하였으나 들기름은 대조군과 유의적인 차이가 없는 정도의 유의적 개선 효과를 보였다. 동물 실험 후 mouse로부터 적출된 뇌 조직을 대상으로 AChE 활성, MDA 함량, SOD 활성 측정 및 산화된 glutathione 측정한 결과, 대두유는 TMT 단독 처리군의 경우와 유사한 반면 들기름은 TMT에 의해 손상을 입은 mice의 뇌 조직에서 AChE의 활성과 MDA 생성 및 GSH의 산화를 억제시킬 뿐만 아니라 SOD 활성을 유의성 있게 증가시킨 것으로 나타났다. 이러한 결과는 들기름에 존재하는 풍부한 생리 활성 물질로서 ω -3계 지방산, 페놀화합물 그리고 비타민 E 등에 의한 것으로 사료된다. 결국 들기름은 상대적으로 우수한 인지 기능 개선 효과를 나타냈고, 이는 건강기능 식품으로서 고부가가치 소재로 활용될 수 있는 산업적 활용 가능성을 나타내는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단에 의해 지원된 연구(2015R1D1A3A01015931) 및 2013년 산림청 산림과학기술개발사업(2013-자유10)의 지원을 받아 수행된 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

References

- Kidd PM. Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: Current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern. Med. Rev.* 13: 85-115 (2008)
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215: 1237-1239 (1982)
- Choi GN, Kim JH, Kwak JH, Jeong CH, Jeong HR, Lee U, Heo HJ. Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. *Food Chem.* 132: 1019-1024 (2012)
- Zhaoli M, Jinping C. Study on the composition of fatty acid, vitamin E content and physicochemical properties of perilla oil. *J. Northwest Sci.-Tech. Univ. Agri. For.* 34: 195-198 (2006)
- Longvah T, Deosthale YG. Chemical and nutritional studies on hanshi (*Perilla frutescens*), a traditional oilseed from northeast India. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68: 781-784 (1991)
- Lee JH, Park KH, Lee MH, Kim HT, Seo WD, Kim JY, Baek IY, Jang DS, Ha TJ. Identification, characterisation, and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean perilla (*Perilla frutescens*) cultivars. *Food Chem.* 136: 843-852 (2013)
- Feng J, Wang W, Yu C. Chemical composition and anti-inflammatory effects of the essential oils from *Perilla frutescens* leaf. *Pharm. J.* 23: 45-48 (2011)
- Deng YM, Xie QM, Zhang SJ, Yao HY, Zhang H. Anti-asthmatic effects of perilla seed oil in the guinea pig *in vitro* and *in vivo*. *Planta Med.* 73: 53-58 (2007)
- Metcalf LD, Schmitz AA, and Pelka JR. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 38: 514-515 (1966)
- Kim MJ, Choi SJ, Lim ST, Kim HK, Heo HJ, Kim EK, Jun WJ, Cho HY, Kim YJ, Shin DH. Ferulic acid supplementation prevents trimethyltin-induced cognitive deficits in mice. *Biosci. Biotech. Bioch.* 71: 1063-1068 (2007)
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 11: 47-60 (1984)
- Ellman GL, Courtney KD, Andres jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-90 (1961)
- Choi SJ, Kim MJ, Heo HJ, Kim JK, Jun WJ, Kim HK, Kim EK, Kim MO, Cho HY, Hwang HJ, Kim YJ, Shin DH. Ameliorative effect of 1,2-benzenedicarboxylic acid dinonyl ester against amyloid beta peptide-induced neurotoxicity. *Amyloid.* 16: 15-24 (2009)
- Umezawa M, Ohta A, Tojo H, Yagi H, Hosokawa M, Takeda T. Dietary α -linolenate/linoleate balance influences learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Brain Res.* 669: 225-233 (1995)
- Lim SY, Suzuki H. Effect of dietary docosahexaenoic acid and phosphatidylcholine on maze behavior and fatty acid composition of plasma and brain lipids in mice. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 70: 251-259 (2000)
- Gamoh S, Hashimoto M, Sugioka K, Shahdat Hossain M, Hata N, Misawa Y, Masumura S. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience* 93: 237-241 (1999)
- Padley FB, Gunstone FD, Harwood JL. Occurrence and characteristics of oils and fats. Vol. III. pp. 37-158. In: *The Lipid Handbook with CD-ROM*. Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ (eds). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA (2012)
- Yu QS, Holloway HW, Utsuki T, Brossi A, Greig NH. Synthesis of novel phenserine-based-selective inhibitors of butyrylcholinesterase for alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 42: 1855-1861 (1999)
- Talesa VN. Acetylcholinesterase in alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 122: 1961-1969 (2001)
- Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pietra C, Villetti G, Kendrick KM, Cuomo V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 187-194 (2000)
- Earley B, Burke M, Leonard BE. Behavioural, biochemical and histological effects of trimethyltin (TMT) induced brain damage in the rat. *Neurochem. Int.* 21: 351-366 (1992)
- Loullis CC, Dean RL, Lippa AS, Clody DE, Coupet J. Hippocampal muscarinic receptor loss following trimethyl tin administration. *Pharmacol. Biochem. Be.* 22: 147-151 (1985)
- Kim JK, Bae HR, Kim MJ, Choi SJ, Cho HY, Hwang HJ, Kim YJ, Lim ST, Kim EK, Kim HK, Kim BY, Shin DH. Inhibitory effect of *Poncirus trifoliata* on acetylcholinesterase and attenuating activity against trimethyltin-induced learning and memory impairment. *Biosci. Biotech. Bioch.* 73: 1105-1112 (2009)
- Kim JK, Choi SJ, Bae H, Kim CR, Cho HY, Kim YJ, Lim ST, Kim CJ, Kim HK, Peterson S, Shin DH. Effects of methoxsalen from *Poncirus trifoliata* on acetylcholinesterase and trimethyltin-induced learning and memory impairment. *Biosci. Biotech. Bioch.* 75: 1984-1989 (2011)
- Sclar DA, Skaer TL. Current concepts in the treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Ther.* 14: 2-10 (1992)
- Chang NS, Ryu SM. Antioxidative effects of green tea powder diet against ethanol-induced oxidative damage in rat brain regions. *J. Nutr. Health* 34: 525-531 (2001)
- Hwang SZ, Ko YS. Studies on the constituents of Korean edible oils and fats-Part 5: Analysis of fatty acids in sesame and perilla oil by high performance liquid chromatography. *J. Nutr. Health* 15: 15-21 (1982)
- Hong SH, Kim MJ, Oh CH, Yoon SH, Song YO. Antiradical capacities of perilla, sesame and sunflower oil. *J. Food Sci. Nutr.* 15: 51-56 (2010)
- Klug D, Rabani J, Fridovich I. A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.* 247: 4839-4842 (1972)
- Kim HY, Yeo SI, Lee JT. Antioxidant effects of solvent fraction from *Sanguisorba officinalis* L. with acetone. *J. Appl. Biol. Chem.* 54: 89-93 (2011)
- Nam JH, Park HS. Effect of quality and quantity of dietary fat on the status of tocopherol and lipid peroxidation of plasma tissue in rats. *J. Nutr. Health* 26: 566-577 (1993)
- Wohaieb SA, Godin DV. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat: Effects of insulin treatment. *Diabetes* 36: 1014-1018 (1987)
- Zaidi SMKR, Banu N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin. Chim. Acta.* 340: 229-233 (2004)