

## 식이 지방산이 흰쥐 뇌조직 Subcellular Fractions내 Oleic Acid( $\omega$ 9) 조성에 미치는 영향

정은정<sup>1</sup> · 엄영숙<sup>2</sup> · 이양자<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>강남대학교 교양학부

<sup>2</sup>연세대학교 생활과학대학 식품영양과학연구소

### Effects of Dietary Fatty Acid Composition on Level of Oleic Acid ( $\omega$ 9) in Brain Subcellular Fractions of Rats

Eun-Jung Chung<sup>1</sup>, Young-Sook Um<sup>2</sup> and Yang Cha Lee-Kim<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>General Education, Kangnam University, Gyeonggi 449-702, Korea

<sup>2</sup>Res. Institute of Food and Nutritional Sciences, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

#### Abstract

In recent, the roles of oleic acid, most abundant fatty acid in myelin, were investigated in relation to the brain functions. This study examined the effects of diets either with desirable ratios of  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 and P/M/S (mixed oil-fed group: MO) or with deficient in  $\omega$ 3 series fatty acids (safflower oil-fed group: SO) on the oleic acid composition in RBC and brain synaptosomal, mitochondrial & microsomal phospholipids. The desirable fatty acid composition was computer-searched with different fats and oils to meet right ratios of both  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 and P/M/S. Diets were fed 3 weeks before conception and new-born pups were fed maternal milk from the same mothers and same diets until 9 wks of age. At 3 wks of age, the compositions of oleic acid in brain subcellular fractions and red blood cells were constantly remained whatever the composition of dietary fatty acids. But at 9 wks of age, the composition of oleic acid in synaptosome and mitochondria were significantly higher in MO group than SO group. The composition of oleic acid in milk was significantly higher in MO group than SO group, but in case of SO group, that of oleic acid was increased by 48%, in comparison with dietary fatty acid compositions.  $\Delta$ -9 desaturase index (18:0 → 18:1) of brain synaptosome was significantly higher in MO group than SO group at 3 and 9 weeks of ages, but that of brain microsome was higher in SO group than MO group at 9 wks of age. Taken together, the presences of oleic acid in the diet was important to maintain brain functions. The origins of oleic acid in brain may suggests two hypotheses; first, the central nervous system has priority for the uptake of oleic acid, and second the nervous system can synthesize all the oleic acid it needs, independently of its presence in the diet.

**Key words:** oleic acid,  $\Delta$ -9 desaturase index, brain subcellular fractions (synaptosome, mitochondria, microsome)

#### 서 론

두뇌발달과 지방질 영양과의 관계는 주로  $\omega$ 3계인 docosahexaenoic acid (DHA, 22:6  $\omega$ 3)와  $\omega$ 6계인 아라키도닉산 (arachidonic acid, AA, 20:4  $\omega$ 6)과의 관계에서 그 연구가 진행되어 왔다(1-3). 최근에는 마이엘린의 주요 구성 지방산인 oleic acid(18:1  $\omega$ 9)(4)의 뇌기능과의 관련 연구가 보고되면서 많은 주목을 받고 있다.

지금까지 oleic acid는 주로 혈청 지단백질 수준을 조절하여 심혈관질환을 예방하는 역할에 대해 많은 연구가 이루어져 왔다(5,6). 그러나 식이 oleic acid는 막인지질의 구성분이 되고, 특히 oleic acid와 뇌기능과의 관련 연구결과를 살펴보

면, 알쓰하이머성 치매 환자의 뇌조직에서 학습과 기억의 중추인 전두엽(frontal cortex)과 해마(hippocampus)의 인지질 분획내 oleic acid의 조성이 정상인에 비해 20%정도 감소되었음이 보고되었다(7). Hwang 등(8)의 연구에서는 생후 9주된 흰쥐의 학습능력이 뇌조직의 전두엽과 해마의 oleic acid 조성과 매우 높은 양의 상관관계가 있음이 보고되었으며, 본 연구팀의 연구(9)에서도 뇌조직의 oleic acid와 학습능력이 유의한 양의 상관관계가 지적된 바 있다.

생화학적 기전 측면에서 뇌에서의 oleic acid의 기능을 살펴보면, oleic acid는 뇌조직의 protein kinase C나 해마에서 단백질의 인산화과정을 활성화시킴으로써 신호 전도(signal transduction)에 영향을 줄 수 있으며(10,11), 표유동물의 대

\*Corresponding author. E-mail: ycleekim@yonsei.ac.kr  
Phone: 82-2-2123-3118, Fax: 82-2-2123-3118

표적인 inhibitory 신경전달물질인  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor에 영향을 줄 수 있음(12)도 보고되었다. 이와 같이 뇌에서 주요한 기능을 하는 oleic acid는 마이엘린에 의해 유도되는 Schwann 세포의 증식에 있어 1-oleoyl-2 acetyl-glycerol로서 그 구조에 참여하기도 한다(13). 최근에는 oleic acid가 뇌조직 자체 즉, 보조세포인 astrocytes에서 합성되며, 이렇게 합성된 oleic acid는 뉴우런의 분화를 촉진하는 것으로 알려졌다(14). 이와 같이 뉴우런의 세포분열시기에 이어 신생아기에는 마이엘린의 주요 구성분인 oleic acid가 급속히 축적되므로, 조제분유의 조성 결정에 있어 oleic acid와 같은 불필수 지방산에 대한 연구의 필요성이 제기되고 있다.

따라서 본 연구에서는 뇌조직의 구조적 지질성분으로 중요한 DHA를 포함한  $\omega$ 3계 지방산과 AA를 포함한  $\omega$ 6계 지방산 수준의 확보를 위한 식이 지방산의  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 비율이 뇌조직 내 oleic acid 수준에 미치는 영향을 살펴봄으로써 유아의 이상적인 조제분유 조제에 유용한 기초 자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 실험식이

체중이 170~230 g인 Sprague-Dawley 계통의 흰쥐 암컷 12마리를 두 군으로 분류한 뒤, 모체 내에 저장되어 있는 지방산의 영향력을 최소하기 위해 임신 3~4주전부터 어미에게 실험식이를 공급하였으며, 이유(생후 3주) 후부터 생후 9주까지 어미와 같은 실험식이를 공급하였다.

어미 쥐의 실험식이 조성은 Table 1과 같이,  $\omega$ 3계 지방산을 결핍시킨 군(SO)과  $\omega$ 3계 지방산을 공급시킨 군(MO)으로 분류하였다.  $\omega$ 3계 지방산을 결핍시킨 SO군에는  $\omega$ 6계 지방산인 linoleic acid(LA, 18:2  $\omega$ 6)가 총지방산의 77.7%인 반면  $\omega$ 3계 지방산이 들어있지 않는 safflower oil을 사용하였다. 컴퓨터 프로그램을 통하여  $\omega$ 6/ $\omega$ 3계 지방산의 비율을 조절시킨 mixed oil(MO)군에는 menhaden(Zaphata Haynie Corp., USA) : soybean(동방유량) : corn(삼양사) : canola(삼양사) : palm oil(농심)의 비율을 5% : 5% : 20% : 25% : 45%로 혼합하여, DHA 수준은 총지방산의 0.5%로,  $\omega$ 6/ $\omega$ 3계 지방산의 비율은 6.1/1로, P/M/S 비율은 1.0/1.4/1.0로 조절하였다.

각 어미로부터 출생한 새끼 쥐는 어미로부터 공급되는 영양을 조절시키기 위해, 출생 3일 후 8~10마리로 조절하였다. 생후 3주와 9주에 각 군에서 무작위로 희생시킨 뒤, 뇌조직 세포분획내 인지질의 지방산 조성을 분석하였다.

### 실험동물의 체중 및 뇌무게 측정

각 어미의 새끼는 9주간의 실험기간동안 출생 2일(=출생 0주)과 그 이후부터는 일주일 간격으로 같은 시각에 체중을 측정하였다. 출생 0주, 1주, 3주 그리고 9주에 각각의 실험동물을 희생시켜 두뇌를 제거한 뒤 0.9% NaCl 용액에 씻어내어 물기를 닦아내고 무게를 측정하였다.

Table 1. Composition of experimental diets (wt. %)

Ingredients	Experimental groups <sup>6)</sup>	
	SO	MO
Carbohydrate <sup>1)</sup>	65.0	65.0
Mixed oil <sup>2)</sup>	-	10.0
Safflower oil	10.0	-
Others <sup>3)</sup>	25.0	25.0
18:1 $\omega$ 9	8.6	39.33
18:2 $\omega$ 6 <sup>4)</sup>	77.7	24.1
18:3 $\omega$ 3	-	2.4
20:4 $\omega$ 6	0.2	0.1
20:5 $\omega$ 3	-	0.5
22:6 $\omega$ 3	-	0.5
Total $\omega$ 3	-	3.9
Total $\omega$ 6	78.0	24.2
Monounsaturates	9.1	40.0
Saturates	11.4	28.0
$\omega$ 6/ $\omega$ 3	-	6.1
P/M/S <sup>5)</sup>	6.9/0.8/1.0	1.0/1.4/1.0

<sup>1)</sup>The carbohydrate was a mixture of 80% corn starch and 20% sucrose.

<sup>2)</sup>Mixed oil (10% by wt) consisted of 0.5% menhaden oil, 0.5% soybean oil, 2.0% corn oil, 2.5% canola oil, and 4.5% palm oil (This mixture was selected from the computer-searched combinations of various fats and oils for this study).

<sup>3)</sup>Others contained 18% casein, 0.1% dL-methionine, 4.0% salt mixture & 1.0% vitamin mixture and 2.0% carboxymethyl cellulose.

<sup>4)</sup>The quantity of each fatty acid is given as a percent of the total fatty acids.

<sup>5)</sup>P/M/S: Polyunsaturated/Monounsaturated/Saturated fatty acids.

<sup>6)</sup>SO: safflower oil group, MO: mixed oil group.

### 혈장과 적혈구의 분리

항응고제인 헤파린으로 처리한 용기에 혈액을 받아낸 뒤 4°C, 2,300 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장과 적혈구를 분리하였다. 이때 적혈구의 buffy coat를 완전히 제거하기 위해 3 mM의 EDTA를 함유하고 있는 생리 식염수로 적혈구를 3번 세척하였다.

### 뇌조직의 시냅토솜, 미토콘드리아 및 마이크로솜의 분리

뇌조직에 0.2 mM dithiothreitol(DTT)을 함유하고 있는 차가운 0.32 M의 sucrose 용액을 넣어 10% 균질용액으로 만들었다. 균질용액을 3,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 (Model J2-21, Beckman) 혁을 제거하고, 상층액을 모았다. 이 상층액을 다시 9,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 시냅토솜을 함유하고 있는 crude 미토콘드리아 분획(침전물①)과 마이크로솜 분획(상층액①)을 얻었다. 위에서 얻은 침전물①에 0.32 M의 sucrose 용액으로 다시 혼탁시킨 뒤, 20 mL의 0.8 M sucrose 용액 위에 넣고 10,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상층액②와 침전물②를 얻었다.

시냅토솜의 경우 상층액②중 0.8 M sucrose 용액 부분을 취하여 농도를 0.32 M로 조절시킨 뒤, 10,000 rpm에서 45분간 원심분리 하여 상층액을 취하여 얻었다(15). 미토콘드리아의 경우, 침전물②를 다시 0.32 M sucrose 용액에 혼탁시

킨 뒤 1.0 M sucrose 용액을 이용하여 원심분리한 후(10,000 rpm, 20분간) 25 mM Tris-HCl/150 mM KCl(1:1, v/v), pH 7.4로 세척하여 얻었다(16). 마이크로솜의 경우 위에서 얻은 상층액①을 34,000 rpm에서 60분간 원심분리하여(model L5-50B, Beckman) 얻었다(17). 이 모든 과정은 0~4°C에서 실시하였으며, 전자현미경 관찰과 cytochrome C oxidase 효소 활성 측정으로 각 분획물의 순도를 확인하였다. 분리된 각각의 세포 분획은 지방산 분석시까지 -70°C에 보관하였다.

#### 모유 및 조직의 지방산 분석

Folch 등(18)의 방법에 준하여 적혈구를 포함한 조직과 혈장의 지질을 추출하였으며, 다시 인지질 성분을 분리하기 위하여 thin layer chromatography(TLC)를 이용하였다. 모유의 총지질과 조직 및 혈장의 인지질 분획에 포함된 지방산 조성을 분석하기 위해서 Lepage와 Roy(19)의 방법에 준하여 지방산을 methylation시킨 후 일정량을 gas-liquid chromatography(GLC, Hewlett Packard 5890A, USA) 기기에 주입시켰으며, internal standard로는 heptadecaenoic acid (HA, 17:0, Nu Check Prep. Inc., USA)를 사용하였다. 각 지방산의 함량은 internal standard로 사용된 HA를 이용하여 총 지방산량을 계산한 뒤 백분율로 표시하였다.

#### 통계분석

본 연구의 모든 실험 결과는 각 실험 식이별로 평균치와 평균오차를 산출하였고, 두 실험군간의 평균의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student's *t*-test에 의해 유의성 여부를 검증하였다. 모든 자료는 SAS package를 이용하여 통계처리하였다.

#### 결과

##### 실험동물의 체중과 뇌 무게

Table 2에 제시된 바와 같이 두 실험군간의 체중은 유의한 차이를 보이지 못하였으나, 전반적으로 MO군의 체중이 SO군보다 높은 경향을 보였다.

실험동물의 뇌무게는 출생직후부터 생후 3주까지 급격히

**Table 2. Changes of body weight and brain weight in the rat pups during the experimental periods** (unit: g)

Experimental groups <sup>1)</sup>	Age (weeks)			
	0	1	3	9
Body weight				
SO	6.1±0.2 <sup>2)</sup>	14.1±0.8	38.0±0.8	194.4±6.2
MO	7.0±0.3	13.9±0.7	49.9±1.2	219.8±6.5
Brain weight				
SO	0.28±0.01	0.86±0.01	1.34±0.01	1.67±0.02
MO	0.23±0.03	0.83±0.01	1.40±0.01*	1.69±0.03

<sup>1)</sup>SO: safflower oil group, MO: mixed oil group.

<sup>2)</sup>Values are the means±SEM.

\*Significantly different by Student's *t*-test compared with the value of SO group at p<0.05.

증가하였고, 특히 생후 1주까지의 증가율이 더 크게 나타났으며, 그후부터는 완만하게 증가하였다(Table 2). 생후 1주 일까지는 SO군의 뇌무게가 MO군보다 높은 경향을 보였으나, 수유기가 끝나는 생후 3주에는 MO군의 뇌무게가 유의하게 높게 나타났다(p<0.05). 생후 9주에도 이와 같은 경향을 보여 MO군의 뇌무게가 SO군보다 무거웠으나, 유의한 차이는 아니었다.

#### 모유내 지방산 조성

모유내 지방산 조성은 식이 지방산 조성을 상당히 반영하여 SO군의 P/M/S 비율은 0.9/0.3/1이었으며, MO군의 경우는 0.4/0.9/1로 나타났다(Table 3). DHA는 MO군(0.55%)에서 높게 나타났으나, ω3계 지방산이 전혀 없는 SO군의 모유내에도 DHA가 0.13%나 존재하였다. Oleic acid 역시 식이 지방산 조성을 반영하여 MO군에서 그 비율이 SO군보다 매우 높게 나타났으며(p<0.001), 특기할 사항은 SO군의 식이에는 oleic acid가 8.6% 존재한 반면(Table 1), 모유에는 12.73% 존재하여 그 조성 비율이 48.0%나 크게 증가하였다는 점이다. 한편 MO군의 경우, 식이에는 oleic acid가 39.33%

**Table 3. Fatty acid composition of rat milk at lactation 8th day**

Fatty acids	Experimental groups <sup>2)</sup>	
	SO	MO
12:0	9.49±0.305 <sup>3)</sup>	6.74±0.896*
14:0	10.19±0.437	7.47±1.234
16:0	20.57±1.410	25.15±0.851*
16:1	0.59±0.075	1.40±0.113**
18:0	3.17±0.056	3.78±0.264
18:1	12.73±0.301	32.24±1.861***
18:2 ω6	32.89±0.941	13.79±0.615***
18:3 ω6	0.56±0.034	0.31±0.025**
18:3 ω3	0.33±0.010	0.85±0.033***
20:1	0.36±0.022	0.68±0.080**
20:3 ω6	0.89±0.063	0.40±0.027***
20:4 ω6	2.05±0.275	1.14±0.089*
20:5 ω3	0.05±0.005	0.47±0.035***
22:1	0.05±0.007	0.05±0.008
22:4 ω6	0.69±0.180	0.23±0.059*
22:5 ω6	0.40±0.043	0.32±0.056
22:5 ω3	0.08±0.021	0.34±0.050**
24:0	0.14±0.048	0.09±0.011
22:6 ω3	0.13±0.037	0.55±0.046**
24:1	0.16±0.006	0.18±0.022
Saturates	44.0±1.65	43.8±2.64
Monounsaturates	14.9±0.42	35.7±1.77***
Polyunsaturates	38.0±1.33	18.3±0.80***
Total ω6	37.5±1.30	16.1±0.71***
Total ω3	0.56±0.06	2.20±0.09***
ω6/ω3	50.0	7.14
P/M/S <sup>1)</sup>	0.88/0.34/1.0	0.44/0.85/1.0

<sup>1)</sup>P/M/S: Polyunsaturated/monounsaturated/saturated fatty acids.

<sup>2)</sup>SO: safflower oil group, MO: mixed oil group.

<sup>3)</sup>Values are means±SEM expressed as wt % of total fatty acids from 7 independent analyses.

Significantly different by Student's *t*-test compared with the value of SO group at \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001.

존재하였으나(Table 1), 보유에는 32.24% 존재하여 그 조성 비율이 18.0% 감소하였다.

#### 흰쥐 뇌조직의 subcellular fractions내 주요 지방산 조성의 변화

Table 4, 5와 Fig. 1에는 단일불포화지방산을 중심으로 뇌조직의 subcellular fractions내 주요 지방산 조성을 제시하였다. 생후 0주와 1주의 뇌조직에서는 세포 분획을 분리하기가 어려워 생후 3주와 9주에만 세포 분획별 지방산 조성을 분석하여 비교하였다. 생후 3주에 흰쥐 뇌조직의 시냅토솜, 미토콘드리아 및 마이크로솜 내 oleic acid 조성은 두 실험군 간에 유의한 차이가 관찰되지 못하였다. 그러나 생후 9주에는 시냅토솜과 미토콘드리아에서 SO군에 비해 MO군의 oleic acid 수준이 유의하게 높았으며( $p<0.01$ ), 마이크로솜의 경우에는 MO군이 SO군보다 높은 경향을 보였으나, 유의한 차이는 아니었다. 반면에 DHA 조성은 모든 실험기간동안 MO군에서 유의하게 높았는데, 두 군간의 차이는 생후 9주보다는 생후 3주에서 더 뚜렷하게 나타났다(Fig. 1).

Oleic acid 이외의 다른 단일불포화지방산들(16:1, 20:1, 22:1과 24:1)은 생후 3주와 9주 모두 두 실험군사이에 유의한 차이를 보이지 못하였다. 생후 3주에, 시냅토솜과 미토콘드리아에서는 C22:1과 C24:1이, 마이크로솜에서는 C22:1이 detect되지 않았으나, 생후 9주에는 모든 세포 분획내에서 C22:1과 C24:1이 detect되었다. 이는 이유기 이후에 마이엘린이 형성되면서 oleic acid로부터 chain elongation이 진행되었기 때문으로 설명된다.

Table 4. Monounsaturated fatty acid compositions in brain subcellular fractions of 3 weeks old rats

Fatty acids	Experimental groups <sup>1)</sup>	
	SO (n=10)	MO (n=10)
<b>Synaptosome</b>		
16:1	0.93±0.076 <sup>2)</sup>	0.87±0.096
18:1	11.10±0.078	11.32±0.130
20:1	0.37±0.024	0.35±0.023
22:1	ND <sup>3)</sup>	ND
24:1	ND	ND
<b>Mitochondria</b>		
16:1	1.14±0.069	0.99±0.077
18:1	12.72±0.254	12.88±0.189
20:1	0.38±0.030	0.36±0.011
22:1	ND	ND
24:1	ND	ND
<b>Microsome</b>		
16:1	0.046±0.016	0.42±0.042
18:1	11.14±0.088	10.87±0.111
20:1	0.45±0.017	0.45±0.011
22:1	ND	ND
24:1	0.27±0.024	0.28±0.032

<sup>1)</sup>SO: safflower oil group, MO: mixed oil group.

<sup>2)</sup>Values are means±SEM expressed as wt % of total fatty acids.

<sup>3)</sup>ND: Not detected.

Table 5. Monounsaturated fatty acid compositions in brain subcellular fractions of 9 weeks old rats

Fatty acids	Experimental groups <sup>1)</sup>	
	SO (n=10)	MO (n=10)
<b>Synaptosome</b>		
16:1	0.46±0.039 <sup>2)</sup>	0.43±0.031
18:1	11.84±0.224	13.11±0.152**
20:1	0.71±0.053	0.82±0.041
22:1	0.35±0.156	0.19±0.052
24:1	0.98±0.072	1.58±0.205
<b>Mitochondria</b>		
16:1	0.68±0.042	0.72±0.017
18:1	11.73±0.128	12.60±0.106**
20:1	0.57±0.030	0.55±0.009
22:1	0.09±0.020	0.16±0.078
24:1	0.38±0.015	0.38±0.062
<b>Microsome</b>		
16:1	0.23±0.029	0.21±0.006
18:1	11.75±0.117	12.06±0.091
20:1	0.93±0.038	0.97±0.020
22:1	0.15±0.043	0.16±0.031
24:1	0.94±0.120	1.13±0.048

<sup>1)</sup>SO: safflower oil group, MO: mixed oil group.

<sup>2)</sup>Values are means±SEM expressed as wt % of total fatty acids.

\*\*Significantly different by Student's *t*-test compared with the value of SO group at  $p<0.01$ .

#### 흰쥐의 적혈구와 혈장내 주요 지방산 조성의 변화

Fig. 1에는 생후 3주와 9주의 흰쥐 적혈구와 혈장내 주요 지방산 조성의 변화를 제시하였다. 적혈구내 oleic acid 조성은 생후 3주에는 SO군과 MO군 사이에 유의한 차이가 관찰되지 못하였으나, 9주에는 MO군에서 SO군보다 유의하게 높았다( $p<0.001$ ). 혈장의 oleic acid 조성은 생후 3주( $p<0.05$ )와 9주( $p<0.001$ )에 모두 MO군이 SO군보다 유의하게 높았으며, 그 차이는 생후 9주에 더 크게 나타났다. 따라서 혈장보다는 적혈구의 oleic acid 조성이 뇌조직의 oleic acid 조성과 유사한 패턴을 보였다. AA의 경우, 뇌조직에서와 같이 적혈구와 혈장 모두 생후 3주와 9주에서 두 실험군간에 모두 유의한 차이를 보이지 않았으나, DHA의 경우 적혈구와 혈장 모두 MO군의 수준이 유의하게 높게 나타났다( $p<0.001$ ).

#### 뇌조직의 subcellular fractions, 적혈구 및 혈장의 $\Delta$ -9 desaturation index 변화

$\Delta$ -9 desaturation index( $18:0 \rightarrow 18:1 \omega 9$ )는  $18:0$ 에서  $18:1$ 의 de novo 합성을 나타내는 간접적인 지표로 사용될 수 있다. Table 6에 나타난 바와 같이 적혈구와 혈장의  $\Delta$ -9 desaturation index는 생후 3주( $p<0.05$ )와 9주( $p<0.001$ )에 모두 SO군보다 MO군에서 유의하게 높았다. 뇌조직 세포 분획의 경우, 생후 3주에는 미토콘드리아와 마이크로솜에서 두 실험군간에 유의한 차이를 보이지 않았으나, 시냅토솜에서는 MO군이 SO군보다 유의하게 높았다( $p<0.01$ ). 마이엘린 형성이 활발히 일어나는 이유기 이후인 생후 9주에 시냅토솜에서는 SO군보다는 MO군에서 높게 나타났으나( $p<0.001$ ), 마이크로솜에서 오히려 SO군에서 높게 나타났다( $p<0.001$ ).

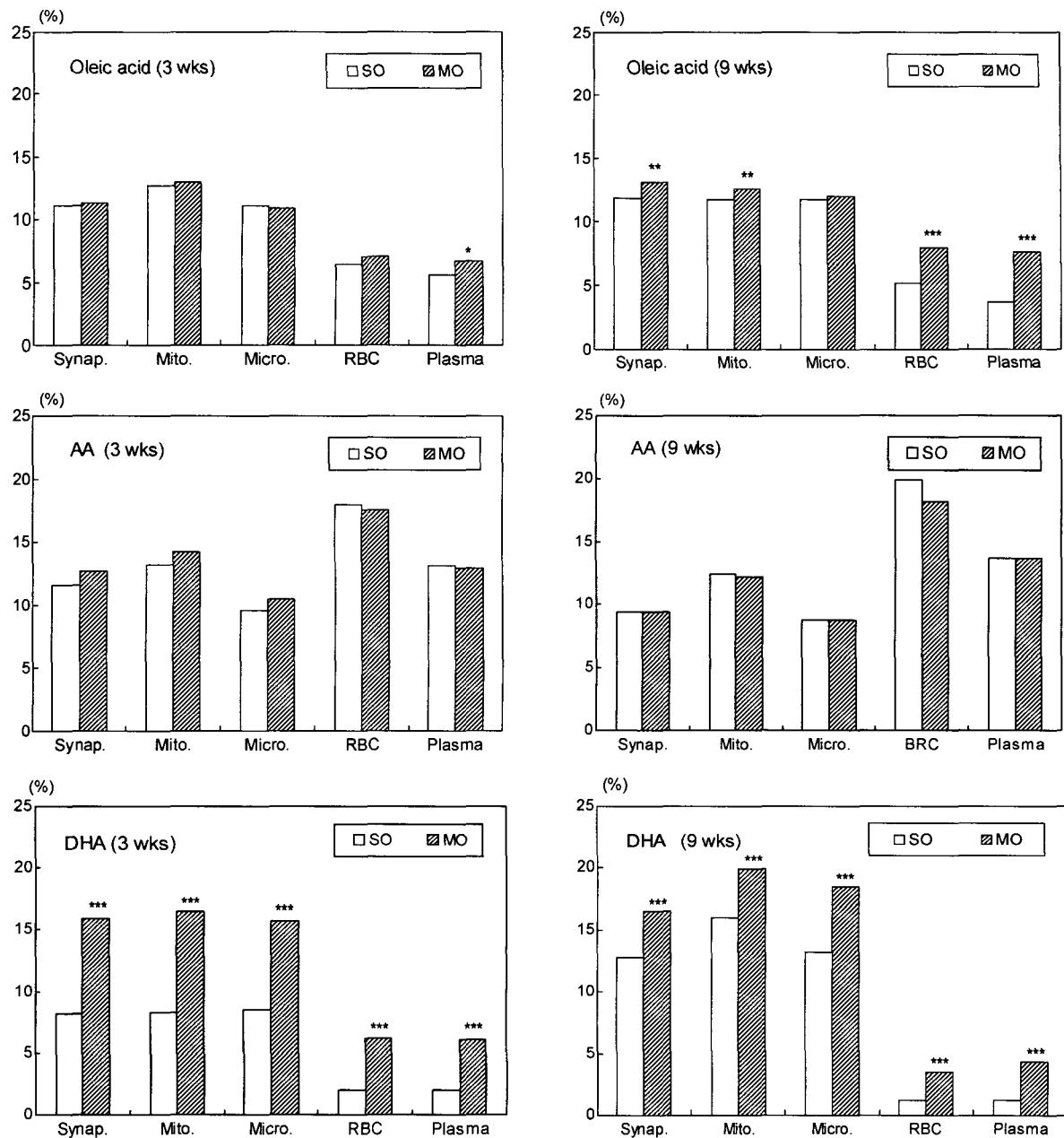


Fig. 1. Oleic acid, arachidonic acid and docosahexaenoic acid composition of rat brain subcellular fractions, red blood cell and plasma.  
Synap: synaptosome, Mito: mitochondria, Micro: microsome, RBC: red blood cell, SO: safflower oil group, MO: mixed oil group.

Significantly different by Student's *t*-test compared with the value of SO group at \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 and \*\*\**p*<0.001.

## 고 찰

$\omega$ 3계 지방산이 부족한 SO군과 P/M/S 및  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 비율이 적절한 MO군으로 임신 3~4주전부터 생후 9주까지 비교적 장기간 사육한 흰쥐의 적혈구와 뇌조직의 시냅토솜, 미토콘드리아 및 마이크로솜 내 oleic acid 조성 비율은 생후 3주에는 두 군간에 유의한 차이를 보이지 않고 거의 일정한 수준으로 유지되는 것으로 나타났으나, 생후 9주에는 MO군에서 SO군보다 유의하게 높게 나타났다.

생후 3주에 나타난 본 연구결과와 같이, 뇌조직내 oleic acid 수준이 일정하게 유지됨에 대해서는 2가지로 설명이 가능하다. 첫 번째 가설은 중추신경계가 oleic acid를 우선적으로 유입되는데, 이를 위해 blood-brain-barrier(BBB)에 oleic acid에 대한 특수한 운반기전의 가능성성이 있다는 것이다(20). 그러나 중수소로 표지된 식이 oleic acid가 뇌조직에서 모두 검출되지 못하였다는 보고(22)가 있어, 뇌조직내 oleic acid가 모두 식이로부터 유래된 것이 아닐 가능성을 시사해주었다. 또 다른 가설은 식이내 oleic acid의 수준과는 무관하

Table 6.  $\Delta$ -9 desaturation index of rat brain subcellular fractions, RBC and plasma

	Experimental groups <sup>1)</sup>	
	SO (n=10)	MO (n=10)
3 weeks		
Synaptosome	0.549±0.0070 <sup>2)</sup>	0.581±0.0080 <sup>**</sup>
Mitochondria	0.642±0.0178	0.454±0.0229
Microsome	0.545±0.0147	0.561±0.0286
RBC	0.602±0.0704	0.913±0.0262 <sup>*</sup>
Plasma	0.262±0.0322	0.376±0.0191 <sup>*</sup>
9 weeks		
Synaptosome	0.582±0.0045	0.669±0.0073 <sup>***</sup>
Mitochondria	0.668±0.0036	0.678±0.0054
Microsome	0.863±0.0030	0.582±0.0032 <sup>***</sup>
RBC	0.337±0.0088	0.696±0.0233 <sup>***</sup>
Plasma	0.159±0.0120	0.450±0.0171 <sup>***</sup>

<sup>1)</sup>SO: safflower oil group, MO: mixed oil group.

<sup>2)</sup>Values are means±SEM.

Significantly different by Student's *t*-test compared with the value of SO group at \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 and \*\*\**p*<0.001.

게 신경조직 자체에서 stearic acid(18:0)로부터 oleic acid를 합성할 수 있는 능력이 있으며(23), 뉴우런으로 유입될 oleic acid의 대부분은 astrocytes에서 생성된다고 한다(14). 또한 sciatic nerve microsome에는 oleyl-CoA와 phosphatidyl-choline 사이에 acyl기의 교환기전이 존재하여 oleic acid를 합성한다고 한다(24). 그러나 이 두 가지 급원 중에서 우선순위 또는 균형(balance)에 대해 아직까지 보고된 바 없다. 한편, 뇌조직의 주요지방산인 DHA나 AA 등의 long chain polyunsaturated fatty acid(LCPUFA)의 생합성과정은 주로 간에서 일어나며, 이렇게 합성된 LCPUFA는 혈액내 지단백질을 통해 뇌나 망막으로 유입되어 막조직으로 들어가게 된다(25). 또한 뇌조직에서도 LCPUFA를 합성할 수 있는데 주로 astrocytes가 뉴우런에 필요한 DHA와 AA를 합성하는 중심적 역할을 하는 것으로 알려져 있으나(26), 성장·발달 중인 흰쥐의 뇌는 간에서 이미 합성된 DHA와 AA를 상당량 공급받는 것으로 알려져 있다(25).

DHA의 경우,  $\omega$ 3계 지방산이 부족한 식이를 공급해도 새끼 뇌의 DHA 수준이 혈액보다 높게 나타났는데, 이는 임신·수유기동안에 태반이나 모유를 통해 어미의 체내에 저장되었던 DHA가 뇌로 우선적으로 공급되기 때문임(27,28)은 이미 알려진 바이다. 본 연구의 oleic acid 경우도, SO군의 식이에는 oleic acid가 매우 적지만(0.86 g/100 g diet), 생후 3주의 뇌조직내 수준이 MO군과 차이 없이 일정하게 유지되는 것은 임신·수유기동안의 이와 같은 적응현상에 의한 것일 수 있다. 즉 본 연구의 실험식이내 oleic acid 조성은 SO군(8.6%)이 MO군(39.3%)보다 매우 낮으나, 모유의 oleic acid 조성비율은 SO군이 12.7%, MO군이 32.2%로 나타나, SO군의 모유에서 oleic acid 조성비율이 식이에 비해 48%나 증가된 것으로 나타났다. 즉 모유의 지방산 조성은 식이 지방산 조성을 반영하기는 하지만, 실험식이에 DHA와 oleic acid가 부족한 SO군의 경우 모유의 DHA나 oleic acid 조성비율이

식이보다 더 많아, 모유가 뇌발달에 필수적인 지방산의 주요 공급원 역할을 하는 것으로 사료된다.

한편, Bourre와 Dumont의 최근 연구결과(20)에서는 식이내 oleic acid의 함량(0~6 g/100 g diet)과는 무관하게 생후 21일과 생후 60일된 흰쥐 전체 뇌조직내 oleic acid의 조성은 일정하게 유지되었다. 반면에 간조직에서는 oleic acid가 식이내 100 g당 4 g까지는 조직내 oleic acid 수준이 계속 증가하다가 그 이상에서는 plateau를 유지하는 것으로 나타나(20), 간조직에서는 oleic acid가 조건적 필수지방산(20,21)임을 보고한 바 있다. 그러나 Bourre와 Dumont(20)는 전체 뇌조직에서는 식이내 oleic acid 수준에 상관없이 그 수준이 일정하게 유지되지만, 세포 분획내 oleic acid 수준에 대한 후속연구의 필요성을 지적한 바 있다. 본 연구에서, 생후 3주에는 모든 뇌세포 분획의 oleic acid 수준은 두 군간에 유의한 차이를 보이지 못하였으나, 생후 9주에는 시냅토솜과 미토콘드리아에서 식이내에  $\omega$ 3계 지방산과 oleic acid가 부족한 SO군에서 유의하게 낮았다(*p*<0.01). Hrboticky 등(29)도 뇌 발달과정이 사람과 유사한 새끼 돼지(30)에게  $\omega$ 3계 지방산과 oleic acid 조성(총 지방산 중 17.3%)이 적은 formula를 수유한 경우, 뇌조직 시냅토솜의 인지질내 oleic acid 수준이 감소함을 보고하여 본 연구결과를 지지해주고 있다. 뇌 발달과정은 실험동물마다 차이를 보이는데, 돼지의 경우 뉴우런의 발달이 주로 태아기에 이루어지는 반면, 흰쥐의 경우 출생 후 수유기에 이루어진다(29). 그러므로 뇌 발달단계상 돼지의 수유기는 흰쥐의 수유기 이후(본 실험의 경우 생후 9주)에 해당되며, 마이엘린이 형성되는 이 시기에  $\omega$ 3계 지방산과 oleic acid가 부족한 식이를 섭취할 경우 뇌조직 시냅토솜과 미토콘드리아내 oleic acid 조성이 낮아짐을 알 수 있었다. 그러나 Hrboticky 등(29)이 지적한 바와 같이, 생후 9주에 SO군에서 oleic acid 조성 비율이 감소된 것이, 식이내 oleic acid가 적기 때문인지 또는 식이내의  $\omega$ 3지방산 조성이 적기 때문인지에 대해서는 정확한 규명이 필요하다고 생각된다.

18:0에서 oleic acid로의 de novo 합성 정도를 나타내는 간접 지표인 뇌조직의  $\Delta$ -9 desaturation index는 신경전달 물질의 이동이 활발한 시냅토솜에서는 생후 3주와 9주 모두 SO군에서 유의하게 낮았다. 즉 생후 3주에 SO군에서  $\Delta$ -9 desaturation index가 낮으나 oleic acid 수준은 MO군과 유의한 차이를 보이지 않는 것은, 앞서 설명한 바와 같이 oleic acid가 풍부한 모유(Table 3) 섭취로 인한 결과로 설명될 수 있겠다. 반면에 생후 9주에는 SO군의 시냅토솜에서  $\Delta$ -9 desaturation index가 낮아 생합성되는 정도가 적을 뿐 아니라 식이내에도 oleic acid 함량이 적어, oleic acid 수준이 MO군보다 유의하게 적은 것으로 나타나, 식이중의 oleic acid 수준이 뇌조직의 oleic acid 수준에 영향을 주는 것으로 나타났다. Bourre 등(21)은 oleic acid가 부족한 식이에  $\Delta$ -9 desaturase의 기질인 18:0(stearic acid)을 보충·첨가하여도 뇌조직의 stearic acid뿐 아니라 oleic acid 조성 역시 증가되지

못함을 관찰하였다. 이에 대해  $\Delta$ -9 desaturase가 18:1( $\omega$ 9)보다는 16:1( $\omega$ 7)에 더 효과적으로 작용하는 것 같으며, 뇌조직의 oleic acid는 뇌조직에서 de novo 생합성되기보다는 식이나 간에서 이미 합성된 oleic acid가 유입됨이 더 큰 영향을 미칠 수 있음을 설명한 바 있어(21), 본 연구결과를 지지해주고 있다. 이상을 종합하여 볼 때, 유아의 조제분유 조성비율을 결정함에 있어서 뇌조직에서 중요 기능을 수행하는 oleic acid(7-9)의 수준을 유지시키기 위해,  $\omega$ 3계 DHA와  $\omega$ 6계 AA 이외에도  $\omega$ 3계의 oleic acid도 비중 있게 고려해야 할 중요 지방산임을 제안하게 한다.

그러나, 뇌조직에서 oleic acid의 생합성에 대한 여러 연구 결과들(22-24)이 이미 보고된 바 있으며, oleic acid의 전구체인 stearic acid는 뇌조직에서 매우 활발히 합성(31)되거나, BBB를 통해 뇌조직으로 유입될 수 있다고 한다(32). 본 연구에서도 생후 9주에 마이크로솜내 oleic acid 수준은 두 군간에 유의한 차이를 보이지 않았으나,  $\Delta$ -9 desaturation index는 SO군이 MO군보다 유의하게 높았다( $p<0.001$ ). 이는 식이내에 oleic acid 함량이 적은 SO군의 경우 desaturase가 존재하는 마이크로솜에서  $\Delta$ -9 desaturation 과정을 통한 oleic acid 생합성과정이 활발히 일어남을 간접적으로 설명해준다고 생각된다. 따라서 훈취 뇌조직의 oleic acid는 식이나 모유 등을 포함한 이미 합성된 oleic acid가 뇌로 우선적으로 유입되는 부분과 뇌조직 자체에서 합성되는 부분에 의한다고 생각된다. 그러나 생후 9주의 결과에서 같이, 식이내에 oleic acid가 부족하면 뇌 세포 분획내의 oleic acid 수준이 유의하게 감소하게 되므로, 식이내에 적절한 수준의 oleic acid가 정상적인 뇌발달에 필요함을 다시 한번 강조하게 한다.

한편 본 연구와 동일한 실험식이로 사육한 Hwang 등(8)의 연구에서는 생후 9주된 훈취 뇌조직 중 전두엽, 소뇌와 선조체(striatum)의 oleic acid 조성은 두 군간에 유의한 차이가 없었으나, 기억中枢인 해마의 phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl choline 및 phosphatidyl serine에서는 식이내 oleic acid와  $\omega$ 3계 지방산 조성비율이 높은 MO군에서 SO군보다 유의하게 높게 나타났다. 즉 뇌조직의 지방산 조성은 뇌 부위, 뇌세포의 종류(뉴우린, astrocytes), 세포분획 그리고 인지질의 종류 등에 따라 매우 특징적인 패턴을 보임을 알 수 있다. 따라서 oleic acid와 뇌기능과의 관련성을 연구함에 있어서는, oleic acid 등의 단일불포화지방산이 주요지방산인 마이엘린의 합성이 활발하게 일어나는 시기 등을 고려하여야 하며, 마이엘린내 oleic acid의 급원에 대한 자세한 연구도 이루어져야 하겠다.

## 요 약

$\omega$ 3계 지방산이 부족한 SO군과 P/M/S 및  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 비율이 적절한 MO군으로 생후 9주까지 사육한 훈취의 적혈구와 뇌조직의 시냅토솜, 미토콘드리아 및 마이크로솜 내 oleic

acid 조성 비율은 생후 3주에는 두 군간에 유의한 차이를 보이지 않고 일정한 수준으로 유지되는 것으로 나타났으나 생후 9주에는 MO군에서 SO군보다 높게 나타났다. 실험식이내 oleic acid 조성은 SO군이 MO군보다 매우 낮으나, SO군의 모유에서 oleic acid 조성비율이 식이에 비해 크게 증가된 것으로 나타나, 모유가 뇌 성장·발달기간중의 뇌조직내 oleic acid의 주요 급원이 될 수 있음을 나타내주고 있다. 18:0에서 oleic acid의 de novo 합성 정도를 나타내는 간접지표인  $\Delta$ -9 desaturation index는 생후 3주에는 실험군간(시냅토솜 예외)에 유의한 차이를 보이지 않았으나, 생후 9주에는 식이내 oleic acid가 풍부한 MO군의 시냅토솜에서 높게 나타났다. 한편 생후 9주 마이크로솜 분획에서 oleic acid 수준은 실험군 간에 차이를 보이지 않았으나,  $\Delta$ -9 desaturation index는 SO군에서 MO군보다 높아 뇌조직에서 oleic acid가 생합성될 수 있음을 간접적으로 설명해주고 있다. 따라서 훈취 뇌조직의 oleic acid는 식이와 모유 등의 이미 합성된 oleic acid가 뇌로 우선적으로 유입되는 부분과 뇌조직 자체에서 합성되는 부분에 의한다고 생각된다. 그러나 식이중 oleic acid가 부족하면 뇌 세포분획내의 oleic acid 수준이 유의하게 감소하였으므로, 식이중 적절한 수준의 oleic acid가 정상적인 뇌발달에 필수적임을 다시 한번 강조하게 한다.

## 문 헌

- Sastry PS. 1985. Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24: 169-176.
- Innis SM, Nelson CM, Rioux FM, King DJ. 1994. Development of visual acuity in relation to plasma and erythrocyte  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 fatty acids in healthy term gestation infants. *Am J Clin Nutr* 60: 347-352.
- Crawford MA, Gofetto I, Gebremeskel K, Min Y, Moodley T, Poston L, Phylactos A, Cunnane S, Schmidt W. 2003. The potential role for arachidonic and docosahexaenoic acids in protection against some central nervous system injuries in preterm infants. *Lipids* 38: 303-315.
- Youyou A, Durand G, Pascal G, Picotti M, Dumont O, Bourre JM. 1986. Recovery of altered fatty acid composition induced by a diet devoid of n-3 fatty acids in myelin, synaptosome, mitochondria and microsomes of developing of rat brains. *J Neurochem* 46: 224-228.
- Khosla P, Hayes KC. 1993. Dietary palmitic acid raises plasma LDL cholesterol relative to oleic acid only at a high intake of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1210: 13-22.
- Reaven PD, Grasse BJ, Tribble DL. 1994. Effects of linoleate-enriched and oleate-enriched diets in combination with  $\alpha$ -tocopherol on the susceptibility of LDL and LDL subfractions to oxidative modification in humans. *Arterioscler Thromb* 14: 557-566.
- Guan Z, Wang Y, Carins NJ, Lantos PL, Lallner G, Sindelar PJ. 1999. Decrease and structural modifications of phosphatidylethanolamine plasmalogen in the brain with Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurology* 58: 740-747.
- Hwang HJ, Um YS, Chung EJ, Kim SY, Park JH, Lee YC. 2002. Effects of fatty acids and vitamin E supplementation on behavioral development of the second generation rat. *Nutraceuticals & Food* 7: 265-272.
- Um YS, Chung EJ, Lee-Kim YC. 1996. Effects of dietary

- $\omega$ 3 and  $\omega$ 6 fatty acids on the fatty acid composition of RBC and brain synaptosomal, microsomal and mitochondrial phospholipids and on behavioral development of rats. *Korean J Nutr* 29: 849-860.
10. Khan WA, Blobe G, Halpern A, Taylor W, Wetsel WC, Burns D, Loomis C, Hannun YA. 1993. Selective regulation of protein kinase C isoenzymes by oleic acid in human platelets. *J Biol Chem* 268: 5063-5068.
  11. Chen SG, Murakami K. 1994. Effects of cis-fatty acid on protein kinase C activation and protein phosphorylation in the hippocampus. *J Pharm Sci Technol Jpn* 48: 71-75.
  12. Witt MR, Nielsen M. 1994. Characterization of the influence of unsaturated free fatty acids on brain GABA/benzodiazepine receptor binding *in vitro*. *J Neurochem* 62: 1432-1439.
  13. Saunders RD, DeVries HG. 1988. 1-Oleoyl-2-acetylglycerol and A23187 potentiate axolemma- and myelin-induced Schwann cell proliferation. *J Neurochem* 51: 1760-1764.
  14. Tabernero A, Lavado EM, Granda B, Velasco A, Medina JM. 2001. Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes. *J Neurochem* 79: 606-616.
  15. Hajos F. 1975. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res* 93: 485-489.
  16. Das NP, Ratty AC. 1987. Studies on the effects of the narcotic alkaloids, cocaine, morphine and codeine on non-enzymatic lipid peroxidation in the rat brain mitochondria. *Biochem Med Metab Biol* 37: 256-264.
  17. Tahin QS, Blum M, Carafoli E. 1981. The fatty acid composition of subcellular membranes of rat liver, heart and brain: Diet-induced modifications. *Eur J Biochem* 121: 5-13.
  18. Folch J, Lees M, Sttanley S. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
  19. Lepage G, Roy CC. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27: 114-120.
  20. Bourre JM, Dumont O. 2003. Dietary oleic acid not used during brain development and in adult in rat, in contrast with sciatic nerve. *Neurosci Lett* 336: 180-184.
  21. Bourre JM, Dumont OL, Clement ME, Durand GA. 1997. Endogenous synthesis cannot compensate for absence of dietary oleic acid in rats. *J Nutr* 127: 488-493.
  22. Edmond J, Higa TA, Korsak RA, Bergner EA, Lee WN. 1998. Fatty acid transport and utilization for the developing brain. *J Neurochem* 70: 1227-1234.
  23. Carreau JP, Daudu O, Mazlik P, Bourre JM. 1979. Palmitoyl-CoA and stearoyl-CoA desaturase in mouse brain microsome during development in normal and neurological mutant (Quaking and Jimpy). *J Neurochem* 32: 659-660.
  24. Juguelin H, Bessoule JJ, Boiron F, Heape A, Garbay B, Testet E, Cassagne C. 1996. Acylation of endogenous acyl acceptors by mouse sciatic nerve microsomes. *Neurochem Int* 28: 271-276.
  25. Scott BL, Bazan NG. 1989. Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc Natl Acad Sci* 86: 2903-2907.
  26. Moore SA, Yoder E, Murphy S, Dutton GR, Spector AA. 1991. Astrocytes not neurons, produce docosahexaenoic acid and arachidonic acid. *J Neurochem* 56: 518-524.
  27. Lee-Kim YC, Kim MK, Chung EJ, Chee KM. 1992. The requirement of linoleic acid for rat is minimal. Fifth Scientific Meeting of the Society for Research on Polyunsaturated Fatty acids, Tokyo, Japan. Nov. 11-14.
  28. Alsted AL, Hoy CE. 1992. Fatty acid profiles of brain phospholipid subclasses of rats fed n-3 polyunsaturated fatty acids of marine or vegetable origin, A two generation study. *Biochim Biophys Acta* 1125: 237-244.
  29. Hrboticky N, MacKinnon MJ, Puterman ML, Innis SM. 1989. Effect of linoleic acid-rich infant formula feeding on brain synaptosomal lipid accretion and enzyme thermotropic behavior in the piglet. *J Lipid Res* 30: 1173-1184.
  30. Puvis JM, Clandinin MT, Hacker RR. 1982. Fatty acid accretion during perinatal brain growth in the pig. A model for fatty acid accretion in human brain. *Comp Biochem Physiol* 72B: 195-199.
  31. Bernert JT Jr, Bourre JM, Baumann NA, Sprecher H. 1979. The activity of partial reactions in the chain elongation of palmitoyl-CoA and stearoyl-CoA by mouse brain microsomes. *J Neurochem* 32: 85-90.
  32. Bourre JM, Gozlan-Devillierre N, Daudu O, Baumann N. 1978. Is there a blood-brain-barrier relationship for saturated fatty acids during development? *Biol Neonate* 34: 182-186.

(2004년 10월 1일 접수; 2004년 12월 2일 채택)