

식이 철분 수준이 노령흰쥐의 지방대사, 항산화능 및 항혈전능에 미치는 영향*

김순기[§] · 박주연 · 김미경

이화여자대학교 식품영양학과

Effect of Dietary Iron Levels on Lipid Metabolism, Antioxidative and Antithrombogenic Capacities in 16-month-old Rats*

Kim, Soun Ki[§] · Park, Juyeon · Kim, Mi Kyung

Department of Food & Nutritional Sciences, Ewha Womans University, Seoul, 120-750, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to examine the effect of dietary iron levels on lipid metabolism, antioxidative and antithrombogenic capacities in 16-month-old rats. Thirty-two Sprague-Dawley male 16-month-old rats weighing 618 ± 6 g were raised for 10 days with medium-iron diet (35 ppm in diet) and blocked into 4 groups according to their body weights. One of groups was sacrificed to obtain initial data and the rest 3 groups were raised for 3 months with experimental diets containing different levels of iron (5 ppm, 35 ppm, and 350 ppm). Total lipid, triglyceride and total cholesterol concentrations in plasma and liver, HDL-cholesterol concentration in plasma, fecal total lipid triglyceride and total cholesterol excretions, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) level in plasma LDL + VLDL (low density lipoprotein + very low density lipoprotein) fractions, blood-clotting time and eicosanoids levels in plasma were measured. The results are as follows: Plasma total lipid, triglyceride and total cholesterol concentrations, TBARS level in plasma LDL + VLDL fractions were increased and blood-clotting time tended to be shortened during 3 months of experimental period. Low (5 ppm) iron diet improved lipid metabolism via increasing HDL-cholesterol and fecal cholesterol excretion. High (350 ppm) iron diet decreased plasma total lipid, triglyceride and total cholesterol concentrations as compared to medium (35 ppm) iron diet and lowered body weight and epididymal fat pad weight. On the other hand, TBARS level in plasma LDL + VLDL fractions and blood-clotting time were increased with high iron diet. It is plausible that low iron diet improves lipid metabolism, antioxidative and antithrombogenic capacities in 16-month-old rats. (*Korean J Nutrition* 37(4) : 273~280, 2004)

KEY WORDS : iron, lipid metabolism, antioxidative capacity, antithrombogenic capacity, aged rats.

서 론

우리나라의 평균 수명은 1997년 통계청 자료¹⁾에 따르면 남성 70.6세, 여성 78.1세로 1971년에 비해 남녀 모두 약 11~12년 연장되었으며 인구 전체에서 65세 노령인구의 비중이 급격히 증가하여 2000년 7%를 상회하는 것으로 나타났다, 2020년이 되면 14%를 상회하게 되어 본격적인 고령사회 (aged society)로 진입할 것으로 보인다. 의학의

접수일 : 2004년 2월 27일

채택일 : 2004년 4월 17일

*This research was supported by grants from Sang Woo., Corporation.

[§]To whom correspondence should be addressed.

발달, 공중보건과 생활의 개선, 식품 수급의 증가 등이 수명 연장의 주된 원인이었으나 수명이 연장된 만큼 삶의 질을 향상시키기 위해서는 이들 인구 집단의 유병률, 이환률을 감소시키는 것이 필요하다.²⁾ 따라서 노인기에 흔히 발생하는 심혈관계질환을 감소시키기 위한 많은 노력이 요구되며 관련 식이 인자의 규명이 절실하다 하겠다.

철은 지구표면에 다량 존재하는 무기질로 생물학적으로 대단히 유용하고 상세하게 연구되어진 영양소 중 하나이다.³⁾ 인체에서 철은 hemes, cytochromes, 철함유 효소의 구성성분 또는 효소의 촉매인자 등으로 산소운반 및 에너지 대사에 필수적이며⁴⁾ 철분결핍과 이로 인한 빈혈은 아직도 전 세계적으로 공통적인 영양장애 중 하나로 꼽을 수 있다. 지금까지 철분연구는 대부분 성장기아동 및 여성을 대상으

로, 주로 철분결핍의 영향 및 철분보충의 방법과 그 효과에 대한 연구들이 주를 이루었다.^{5,6)} 그러나 선진국을 비롯하여 우리나라에서도 식생활의 서구화로 인해 체내 이용률이 높은 heme 철분의 섭취량이 높아졌고 특히 노인 계층에서는 철분 영양보충제의 복용사례가 증가하고 있다.⁷⁾ 체내 과잉으로 유입된 철분은 free radical 생성에 관여하여 LDL의 산화적 변화를 통해 혈관내피 세포와 같은 조직 손상을 초래하는 것으로 논의되고 있어서⁸⁾ 지나친 철분보충은 순환기질환의 새로운 위험인자로 인식되고 있다. 특히,

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Ingredients	Experimental diet ¹⁾			
	I	L	M	H
Corn starch	700.7	700.7	700.7	700.7
Casein	150	150	150	150
Corn oil	60	60	60	60
Soybean oil	40	40	40	40
Low iron mineral mixture ²⁾		35	-	-
Medium iron mineral mixture ³⁾	35	-	35	-
high iron mineral mixture ⁴⁾	-	-	-	35
Vitamin mixture ⁵⁾	10	10	10	10
Choline chloride	2.5	2.5	2.5	2.5
L-cystine	1.8	1.8	1.8	1.8

1) I: Initial group, L: Low iron group, M: Medium iron group, H: high iron group

2) Low iron mineral mix (g/kg mixture): Calcium phosphate, di-basic (CaHPO₄·2H₂O) 500, Sodium chloride (NaCl) 74, Potassium citrate, monohydrate (K₃C₆H₅O₇·H₂O) 220, Potassium sulfate (K₂S (MgO) 24, Manganous carbonate (43 - 48%, Mn) 3.5, Ferric citrate (16 - 17% Fe) 0.886, Zinc carbonate (70% ZnO) 1.6, Cupric carbonate (53 - 55% Cu) 0.3, Potassium iodate (KIO₃) 0.01, Sodium selenite (Na₂SeO₃·5H₂O) 0.01, Chromium potassium sulfate (CrK (SO₄)₂·212H₂O) 0.55, Sucrose finely powdered, to make 1000 gram.

3) Medium mineral mix (g/kg mixture): Calcium phosphate, di-basic (CaHPO₄·2H₂O) 500, Sodium chloride (NaCl) 74, Potassium citrate monohydrate (K₃C₆H₅O₇·H₂O) 220, Potassium sulfate (K₂S (MgO) 24, Manganous carbonate (43 - 48%, Mn) 3.5, Ferric citrate (16 - 17% Fe) 6.06, Zinc carbonate (70% ZnO) 1.6, Cupric carbonate (53 - 55%, Cu) 0.3, Potassium iodate (KIO₃) 0.01, Sodium selenite (Na₂SeO₃·5H₂O) 0.01, Chromium potassium sulfate (CrK (SO₄)₂·212H₂O) 0.55, Sucrose finely powdered, to make 1000 gram.

4) High iron mineral mix (g/kg mixture): Calcium phosphate, di-basic (CaHPO₄·2H₂O) 500, Sodium chloride (NaCl) 74, Potassium citrate, monohydrate (K₃C₆H₅O₇·H₂O) 220, Potassium sulfate (K₂S (MgO) 24, Manganous carbonate (43 - 48%, Mn) 3.5, Ferric citrate (16 - 17% Fe) 60.6, Zinc carbonate (70% ZnO) 1.6, Cupric carbonate (53 - 55% Cu) 0.3, Potassium iodate (KIO₃) 0.01, Sodium selenite (Na₂SeO₃·5H₂O) 0.01, Chromium potassium sulfate (CrK (SO₄)₂·212H₂O) 0.55, Sucrose finely powdered, to make 1000 gram.

5) Vitamin mix (AIN-93M) (mg/kg mixture): Nicotinic acid 3000, Calcium Pantothenate 1600, Pyridoxine-HCl 700, Tiamin-HCl 600, Riboflavin 600, Folic acid 200, D-Biotin 20, Vitamin B12 (cyanocobalamin) (0.1% in mannitol) 2.5, Vitamin E (all-rac- α -tocopherol acetate) (500 IU/g) 1500, Vitamin A (all-trans-retinyl palmitate) (500,000 IU/g) 800, Vitamin D₃ (cholecalciferol) (400,000 IU/g) 250, Vitamin K (phylloquinone) 75, Powdered sucrose 974,655 g

최근 여러 population-based study에서 연령이 증가함에 따라 체내 철분 축적량이 증가하고 이와 더불어 cardiovascular disease (CVD) risk factor들이 함께 증가한다는 보고⁹⁻¹¹⁾가 있으나 아직까지 철분 보충이 CVD risk에 미치는 영향에 관한 중재연구 (intervention study)는 미미한 실정이다.

노인 인구 집단은 철분 영양상태에 있어서 결핍 또는 과잉의 문제를 동시에 나타낸다. 노인기에는 치아의 유실 및 미뢰의 변화 등의 원인으로 철분 섭취량이 낮아질 수 있다.¹²⁾ 그러나 노인기에 있어서는 저 철분섭취로 인한 여러 장애보다는 체내 철분 저장량이 낮은 경우, 협심증 등 순환기 질환의 위험이 감소하였다는 보고⁹⁾가 있으며, Ramkrishnan 등¹⁰⁾은 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III의 대상자 중에서 가입기 여성층을 대상으로 철분 저장량과 CVD risk factor간의 상관성을 조사하여 그 중 당 대사 및 지질대사와 양의 상관성이 있다고 하였으며, 중년여성을 대상으로 한 또 다른 연구에서는 체내 철분저장량이 낮을수록 산화 스트레스가 적다고 보고하였다.¹¹⁾

따라서 본 연구에서는 노인기의 식이 내 철분 수준이 지질대사, 항산화능, 항혈전능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생후 16개월령 수컷 노령 흰쥐 32마리를 네 군으로 분리한 후 한 군은 초기 데이터를 얻기 위해 실험초기에 희생하고 나머지 세 군은 식이 철분수준 (5, 35, 350 ppm)을 달리한 실험 식이를 3개월간 공급한 후 희생하여 혈장과 간 내 지방수준과 변으로의 지방 배설량을 측정하여 지방 대사를 살펴보았으며, 저밀도 지단백질의 산화정도 (LDL oxidation)를 살펴보았으며, 전혈 응고시간 및 혈중 eicosanoids 함량을 측정하여 항혈전능을 알아보았다.

실험 재료 및 방법

1. 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 (SAM: TacN (SD)BR, (주) 삼육 동물 연구소) 40마리를 대상으로 하였으며, 생후 15½개월 되었을 때 본 동물 사육실로 옮긴 후에 10일간 동일한 고형배합사료 ((주)삼육 동물 연구소)로 적응시킨 후 다시 10일간 중 (35 ppm) 철분식이로 적응시켰다. 생후 16개월이 되었을 때 체중이 618 ± 6 g 인 쥐들을 체중에 따라 난괴법 (randomized complete block design)에 의해 8마리씩 4군으로 분류한 후에 그 중 한 군을 초기 데이터를 얻기 위해 희생하였다. 나머지 3군은 3개월간 한 마리씩 stainless steel cage에서 사육하였

고, 식이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 동물 사육실은 온도 22~24℃, 습도 45%내외로 유지 시켰으며 lighting cycle은 12시간 주기로 일정하게 하였다.

실험에 사용한 식이의 구성성분은 <Table 1>과 같았다. 식이의 탄수화물 급원으로는 옥수수전분 (corn starch, 대상)을, 지방 급원으로는 옥수수유 (corn oil, 오뚜기)와 대두유 (soybean oil, CJ)를 3 : 2 (w : w)의 비율로 섞어 실험식이의 10% (w/w) 수준으로 사용하였고, 단백질 급원으로는 casein (edible acid casein, Scerma Goulburn Co-operative Co., France)을 식이 무게의 15%수준으로 사용하였다. 무기질과 비타민은 시약급을 사용하여 혼합한 것 (AIN-93M)¹³⁾을 각각 식이무게의 3.5%와 1% 수준으로 식이에 섞어 공급하였다. 식이 섭취량은 일주일에 3회 일정한 시각에 측정하였고, 체중은 한 달에 2회 같은 시각에 측정을 하였으며, 식이 섭취에서 오는 갑작스러운 체중변화를 막기 위하여 체중 측정 2시간 전에 식이 그릇을 빼주었다.

2. 실험동물의 희생 및 변, 혈액과 장기의 채취

실험동물을 희생하기 8일전부터 12시간씩 2회에 걸쳐 대사장 (metabolic cage)에서 24시간동안의 변을 채취하였다. 이때 식이에 의해 변의 성분이 오염되는 것을 막기 위하여 대사장에는 식이 그릇을 넣어주지 않았다. 첫째 날에는 오후 9시부터 오전 9시까지 대사장에서 변을 채취하였고 그날 오전 9시부터 다음날 오전 9시까지 다시 본래의 사육장에서 식이를 섭취하도록 한 후 시료 채취 3일째인 날 오전 9시부터 다시 12시간동안 대사장에서 변을 채취하였다. 이 기간 중 물은 제한 없이 공급하였고, 채취한 변은 무게를 측정한 후 -20℃에 냉동 보관하였다. 실험기간이 종료된 실험동물은 12시간 절식 시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 개복한 후 10 ml 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 이때 혈액은 3.8% sodium citrate 용액 0.1 ml로 내부를 coating한 주사기를 사용하였다. 이와 같은 방법으로 채취한 혈액은 응고되는 것을 방지하기 위해 ethylene diamine tetra acetate (EDTA)가 들어있는 polystyrene tube에 담아 ice bath에 20분간 방치한 후 원심분리기 (refrigerated multipurpose centrifuge union 55R Hanil)로 2,800 rpm, 4℃에서 30분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 아래층의 red blood cell (RBC)과 혈장을 분리하고, 혈장 중 일부는 혈장 내 지방수준과 LDL oxidation을 측정하기 위해 -70℃ deep freezer에 보관하고, 일부는 eicosanoids 측정을 위해 혈장 600 μl에 EDTA 용액 57 μl와 absolute alcohol에 녹인 0.04 M in-

domethacin 용액 3 μl을 넣어 가볍게 혼합한 후 분석 전까지 -70℃ deep freezer에 보관하였다. 위의 EDTA 용액은 2 g의 disodium EDTA와 0.8 g의 NaCl을 증류수로 녹인 후 NaOH로 pH 7.4를 맞추고 3차 증류수로 최종부피가 100 ml가 되도록 제조한 것으로 indomethacin 용액과 함께 혈장에 첨가되어 arachidonic acid가 prostaglandins로 전환되지 않도록 한다.

혈액을 채취한 후 ice bath위에서 즉시 간을 떼어 ice cold saline에 넣어 세척한 다음 여지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 바로 -70℃ deep freezer에 보관하여 지방수준 측정에 사용하였으며 부고환 지방 조직은 떼어서 그 무게를 측정하였다.

3. 생화학 지표 분석

혈장의 총지방 농도는 Frings법¹⁴⁾으로 간의 총지방 농도는 Bligh와 Dyer법¹⁵⁾을 이용하여 측정하였다. 혈장, 간, 변의 중성지방농도와 콜레스테롤 농도는 효소법을 이용한 분석 kit (영동제약)을 사용하여 비색 정량 하였으며, HDL-콜레스테롤 농도는 LDL 및 VLDL을 침전 시킨 후 효소법으로 측정하는 분석 kit (아산제약)을 이용하여 비색정량 하였다.

LDL + VLDL fraction을 분리하기 위하여 dextran sulfate solution (0.91 g/L)과 MgCl₂ (91 mmol)을 동량 (w : w)으로 섞은 혼합물 50 μl를 혈장 500 μl에 가하여 4℃에서 1시간동안 incubation 시킨 후, 2500 × g에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액은 제거하고 아래 pellet은 1 ml의 phosphate-buffered saline (PBS)을 넣어 씻어준 후 다시 1 ml의 PBS를 넣고 녹여 LDL+VLDL TBARS함량 분석에 사용하였다.¹⁶⁾ Phosphate-buffered saline (PBS)에 녹인 LDL + VLDL내의 단백질 함량은 Lowry법¹⁷⁾에 준하여 측정된 후 LDL+VLDL protein 100 μg에 CuSO₄ 8 μl (0.25 mmol/L)을 가한 뒤에 최종 부피가 1ml가 되도록 PBS buffer를 채웠다. 이를 24시간 동안 37℃ water bath에서 incubation시킨 후, Ferenoux¹⁸⁾ 등의 방법으로 TBARS의 함량을 측정하였다.

전혈 응고 시간은 실험 기간 종료일에 실험동물을 ethyl ether로 마취시켜 개복한 다음 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하고 채취된 혈액 중 1 ml를 유리시험관에 넣고 즉시 1.7% CaCl₂ · H₂O 200 μl를 가한 후 가만히 섞어 준 뒤, 혈액에 CaCl₂를 가한 시간부터 응고가 생길 때까지의 시간으로 측정하였다.¹⁹⁾ Thromboxane B (TXB₂)는 unlabelled TXB₂와 일정량의 peroxidase로 labelled 된 TXB₂ 간의 한정된 수의 specific antibody의 결합 위

치에 대한 competition을 근거로 한 enzyme immunoassay (EIA) kit (amersham phamacia biotech, UK)를 사용하였으며, Prostacyclin (PGI₂)도 TXB₂와 같은 원리의 EIA kit (amersham phamacia biotech, UK)를 사용하여 450 nm에서 microtitre plate photometer (SPECTRA MAX 340, USA)로 측정을 하였다.

4. 통계처리

모든 측정치는 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

실험 결과 및 고찰

1. 식이 철분이 지방대사에 미치는 영향

실험동물의 식이 섭취량, 체중 증가량 및 장기 무게는 <Table 2>에 제시하였다. 체중은 16개월령 초기군에 비해 3개월간의 사육후인 19개월령 실험 군들에서 모두 증가하였고 유의적이지는 않으나 저철분군과 중철분군에서 다소 높았으며, 부고환지방의 무게 또한 초기군에 비해 19개월령 실험군들에서 높았고, 그 중 19개월령 저철분군의 부고환 지방 무게가 초기군에 비해 유의적으로 높았다. 이는 본 연구에서 공급한 식이 내 지방 수준이 AIN-93 diet에서 성장이 끝난 adult rat에 권장하는 수준¹³⁾ 보다 높았기 때문에 실험기간동안 체중이 증가한 것으로 사료된다. 본 연구에서 식이 내 지방 수준을 다소 높게 선정한 것은 사

람의 경우 성인기의 식사 pattern이 성장기와 다르지 않고 성인기의 지방 섭취량이 권장량보다 높은 경향을 감안하였기 때문이다. 본 연구의 저철분군의 식이 섭취량이 중·고철분군에 비하여 낮았으나 체중 증가량 및 부고환 지방 조직의 무게가 다소 높은 것은 저철분식이 공급하였을 때 체내 에너지 대사에 영향을 미쳐 지방이 축적된다는 보고²⁰⁾와 일치하였으나 유의적이지는 않았다.

실험동물의 혈장 내 총 지방, 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도 및 혈장 내 HDL-콜레스테롤과 총 콜레스테롤의 비율은 <Table 3>과 같았다. 혈장 내 총 지방은 유의적이지는 않으나 16개월령 초기군에 비해 19개월령 실험군들에서 높았으며 그 중 중철분군에서는 유의적으로 가장 높았으며, 저철분, 고철분군으로 높아서 체중증가량과 같은 경향을 보였다. 혈장 내 중성지방 농도와 총 콜레스테롤 농도 또한 같은 경향을 보여서 19개월령 실험군들이 16개월령 초기군에 비해 유의적으로 높았으며, 19개월령 실험군들에서는 중철분군에서 유의적으로 가장 높았으며 저철분, 고철분군 순으로 높았다. 그러나, HDL-콜레스테롤 농도는 저철분군에서 유의적으로 높아서 타 실험군의 약 2배 가량 높은 것으로 나타나 HDL-콜레스테롤과 총 콜레스테롤의 비율이 16개월령 초기군의 비율보다 유의적이지는 않으나 오히려 높은 것으로 나타났다 (Fig. 1).

동일한 식이를 공급 받았으나 16개월령 초기군에 비해 19개월령 중철분군의 혈중 총지질, 중성지방 및 총콜레스테롤의 농도가 유의적으로 높은 것은 흰쥐에서 연령의 증가와 함께 혈중 총지질, 중성지방 및 총콜레스테롤의 농도가 증가한다는 Um과 Kim의 결과²¹⁾와 일치하는 것이다. 한

Table 2. Food intake, body weight gain and epididymal fat pad weight in rat fed diet with different level of Fe¹⁾

Groups	Food intake (g/day)	Body weight gain (g)	Liver weight (g)	Epididymal fat pad (g)
I	-	-	14.27 ± 0.65 ^b	10.65 ± 1.37 ^b
L	18.90 ± 0.81 ^{b2)}	71.13 ± 11.49 ^{NS3)}	16.14 ± 0.71 ^{ob}	15.72 ± 1.78 ^a
M	21.31 ± 0.66 ^a	83.60 ± 14.99	17.81 ± 0.55 ^a	13.58 ± 1.65 ^{ob}
H	21.72 ± 0.24 ^a	44.85 ± 13.16	16.21 ± 1.19 ^{ob}	14.25 ± 1.41 ^{ob}

1) Mean ± Standard error (n = 8)

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ level by Duncan's multiple range test

3) Not significant at $\alpha = 0.05$ level by Duncan's multiple range test

Table 3. Plasma lipids concentration and HDL: total cholesterol ratio in rat fed diet with different level of Fe¹⁾

Groups	Plasma lipids (mg/100 ml)				HDL : Total Cholesterol ratio
	Total lipids	Triglyceride	Total cholesterol	HDL- cholesterol	
I	281.90 ± 21.61 ^{b2)}	22.22 ± 2.98 ^c	86.03 ± 9.76 ^c	18.86 ± 3.88 ^b	0.22 ± 0.06 ^{NS3)}
L	381.01 ± 26.51 ^b	44.85 ± 5.10 ^b	148.93 ± 14.61 ^{ob}	42.85 ± 7.90 ^a	0.31 ± 0.07
M	494.78 ± 54.08 ^a	84.44 ± 2.87 ^a	182.94 ± 5.50 ^a	27.42 ± 3.50 ^{ob}	0.15 ± 0.02
H	332.49 ± 34.45 ^b	49.53 ± 7.79 ^b	118.94 ± 14.86 ^{bc}	25.30 ± 4.58 ^b	0.21 ± 0.03

1) Mean ± Standard error (n = 8)

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ level by Duncan's multiple range test

3) Not significant at $\alpha = 0.05$ level by Duncan's multiple range test

편, 본 연구에서 저철분 혹은 고철분 식이를 공급한 경우, 혈중 총지질, 중성지방 및 총콜레스테롤 농도가 감소하였는데 이러한 결과는 각각 다른 원인 및 기전에 의해 설명될 수 있다고 사료된다. Masson과 Roome²²⁾은 쥐를 대상으로 한 연구에서 연령이 증가할수록 간 내 철분의 축적량이 증가한다고 보고하였고 사람을 대상으로 하는 여러 연구⁸⁻¹¹⁾에서도 체내 철분 저장량과 CVD risk간의 관련성을 제기하였다. 본 연구에서도 저철분군의 혈중 총지질, 중성지방 및 총콜레스테롤의 농도가 중철분군에 비해 낮았으며 특히 HDL-콜레스테롤 수준이 높았으므로 위의 연구결과와 같은 경향을 보여주었다.

Turbino-Ribeiro 등²³⁾은 성장기인 Fisher rat을 8주 동안 사육하면서 철분과잉을 유도하기 위해 iron dextran 10 mg/day을 5일간 정맥 주사하였을 때 혈청 내 중성지방 및 총콜레스테롤 농도가 대조군에 비해 낮았다고 하였다. 이

들은 또한 HDL-콜레스테롤 농도가 iron dextran을 공급한 군에서 높았다고 하였는데 본 연구에서도 총콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤의 농도 비율이 고철분군에서 높아져 이들의 연구와 같은 경향을 보였다. 그러나 본 연구와 Turbino-Ribeiro 등²³⁾의 연구 결과와는 다르게 Meira 등²⁴⁾의 연구에서는 쥐에게 철분을 506 ppm으로 과잉공급을 하였을 때 혈중 콜레스테롤과 중성지방이 증가하였으며 간의 지방함량도 증가하였다고 보고하였다. 성장기가 아닌 노령기의 흰쥐에서는 철분의 체내 요구량 감소 및 저장량 증가 등의 변화가 나타나므로²²⁾ 본 연구에서 공급한 고철분 수준으로 3개월간 사육하였다더라도 지질대사에 악영향을 미치지 않았을 가능성이 있으며, 또한 16개월령 노령흰쥐의 경우 본래 체내 축적된 철분으로 인하여 고철분 및 저철분 식이가 지질대사에 미치는 영향이 그다지 크지 않았을 가능성이 있다. 따라서 식이 철분 수준이 실험동물의 지질대사에 미치는 영향은 실험동물의 종 및 연령, 공급된 식이 철분의 수준과 투여방식 등을 고려하여 이해하여야 한다고 생각되며 이에 대한 기전 규명과 보다 많은 연구가 요구된다 하겠다.

간의 총 지질 농도, 중성지방, 총콜레스테롤 농도는 <Table 4>와 같았다. 간의 총 지질 농도는 실험군간 유의적인 차이가 없었으나 저철분군의 간 내 총지질 농도가 다소 낮았고 간 내 중성지방 농도는 실험군간 유의적 차이가 나타나지 않았다. 간 내 총 콜레스테롤 농도는 16개월령 초기군에 비해 19개월령 실험군들의 농도가 다소 낮은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 혈장 내 총콜레스테롤 농도 결과와 반대되는 결과로 19개월령 노령쥐의 간 내 총 콜레스테롤은 16개월령에 비해 낮아지는 반면, 혈장 내 총콜레스테롤은 증가하는 것으로 생각되나 이에 관련된 구체적인 연구는 아직 미미한 상태이다.

변 무게 및 변으로의 총 지방, 중성지방, 총 콜레스테롤 배설량은 <Table 5>와 같았다. 초기 데이터군의 변으로의 지질 배설량보다 19개월령 실험군들의 지질 배설량이 높았는데 이는 본 연구와 비슷한 월령을 대상으로 한 Um과 Kim²¹⁾의 연구결과와 일치하는 것이다. 변 무게는 저철분군

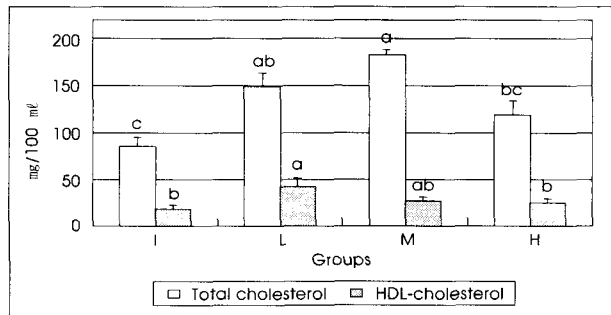


Fig. 1. Plasma total cholesterol and HDL-cholesterol concentrations in rat fed diet with different level of Fe.

Table 4. Liver total lipids, triglycerides and total cholesterol concentrations in rat fed diet with different level of Fe¹⁾ (mg/g wet weight)

Groups	Total lipids	Triglycerides	Total cholesterol
I	57.83 ± 5.94 ^{NS2)}	5.51 ± 0.62 ^{NS}	3.81 ± 0.35 ³⁾
L	50.06 ± 5.19	4.45 ± 0.45	2.87 ± 0.22 ^b
M	53.31 ± 9.84	5.03 ± 0.31	2.55 ± 0.07 ^b
H	54.54 ± 8.62	3.56 ± 0.98	2.60 ± 0.25 ^b

1) Mean ± Standard error (n = 8)

2) Not significant at $\alpha = 0.05$ level by Duncan's multiple range test

3) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ level by Duncan's multiple range test

Table 5. Fecal weight and lipids excretions in rat fed diet with different level of Fe¹⁾

Groups	Wet fecal weight (g/day)	Fecal excretion (mg/day)		
		Total lipids	Triglycerides	Total cholesterol
I	0.69 ± 0.12 ^{b2)}	26.43 ± 1.97 ^{NS3)}	0.19 ± 0.06 ^b	1.71 ± 0.56 ^b
L	1.08 ± 0.18 ^a	52.52 ± 7.87	0.86 ± 0.17 ^a	10.11 ± 2.87 ^a
M	1.05 ± 0.19 ^{ab}	47.66 ± 6.09	0.67 ± 0.12 ^a	4.37 ± 1.38 ^b
H	0.73 ± 0.09 ^{ab}	51.47 ± 7.82	0.66 ± 0.08 ^{ab}	3.86 ± 0.93 ^b

1) Mean ± Standard error (n = 8)

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ level by Duncan's multiple range test

3) Not significant at $\alpha = 0.05$ level by Duncan's multiple range test

에서 타 실험군에 비해 높은 경향을 나타내었고, 유의적이지는 않으나 저철분군에서 변으로의 총지방 배설량이 가장 높았다. 이러한 경향은 중성지방 배설량과 총콜레스테롤 배설량에서도 나타나서 저철분군의 총콜레스테롤 배설량은 중·고철분군의 배설량에 비해 2배 이상 높은 것으로 나타났다.

종합적으로 살펴보면, 저철분식은 지질대사중 특히 콜레스테롤 대사에 영향을 미치는 것으로 보이는데 변으로의 총 콜레스테롤 배설량은 증가시키고 혈중 HDL-콜레스테롤 수준은 증가시켜서 콜레스테롤 배설효과 및 혈중 콜레스테롤을 개선시키는 효과가 있었다. 한편, 본 연구에서 공급한 고철분 식이의 경우 체중 및 부고환 지방 조직의 무게를 낮추고 혈중 지질수준을 개선시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Turbino-Ribeiro 등²³⁾의 연구에서도 관찰되었으나 이와 상반되는 결과²⁴⁾ 또한 보고되고 있으므로 향후 철분과 지방대사에 대한 보다 많은 연구가 요구된다 하겠다.

2. 식이 철분이 항산화능에 미치는 영향

일반적으로 체내 철분은 Fenton reaction을 통하여 hydroxy radical을 생성함으로써 체내 radical 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다.²⁵⁾ 철분의 과잉상태와 순환기계 질환과의 관계에 대한 연구들을 종합하여 볼 때, 체내 과잉 철분은 free radical 생성을 통해 조직손상을 초래하게 된다는 보고가 지배적이다. 또한 Bacon 등²⁶⁾은 유리된 철이온이 사람에서 atherosclerotic lesion을 진행 시켰다고 보고하였으며 다른 *in vitro* 실험²⁷⁾에서도 철분으로 microsomal lipid peroxidation이 관찰되었다고 하였다.

본 연구에서는 CVD risk factor로 주목 받는 LDL 분획 내 지질 과산화물 함량을 알아보기 위해 혈장의 LDL + VLDL 분획을 분리하여 지질 과산화물 함량(Thiobarbituric Acid Reactive Substances : TBARS values)을 측정하여 그 결과를 <Fig. 2>에 제시하였다. 19개월령 실험군들의 LDL + VLDL 분획 내 지질과산화물 함량은 16개월령 초기군의 함량에 비해 높았으며 유의적이지는 않으나 철분수준이 낮을수록 지질과산화물의 함량이 낮은 경향을 나타내었다. Swain 등¹¹⁾은 중년여성을 대상으로 체내 철분 저장량과 항산화능의 상관성을 조사하여 철분저장량이 낮을수록 항산화능 관련지표가 높다고 보고하였으며, 성숙한 흰쥐를 대상으로 고철분 식이 (500 ppm)를 12주간 공급하였을 때 식이 내 불포화지방산 함량이 높을수록 간 내 콜레스테롤 과산화물이 증가한다²⁸⁾고 하여서 본 연구 결과와 일치하는 경향을 보여주었다. 따라서 과량의 식이 철분은 혈장 내 LDL

분획 내의 지질과산화물을 증가시킴으로써 CVD risk를 증가시키는 것으로 생각된다.

3. 식이 철분이 항혈전능에 미치는 영향

혈소판 응집 반응은 동맥경화, 혈전형성 및 혈관 협착에 의한 색전증의 주요한 병인으로 여기어 지는 것으로 inflammatory condition에서 arachidonic acid가 세포막으로부터 유출되어 lipoxygenase와 cyclooxygenase에 의해 prostaglandin endoperoxide와 thromboxane A₂ (TXA₂)로 대사 되는 과정을 통해서 일어난다.^{29,30)} Prostaglandin endoperoxide와 TXA₂는 혈소판을 활성화시켜서 활성화된 혈소판이 혈관벽에 침착, 응집되도록 유도하고, lipid peroxide와 free radical의 발생을 증가시키고 또한 내피 세포에서 항혈전 및 혈관이완 인자인 prostacyclin과 nitric oxide가 생성되는 것을 방해하는 역할을 한다.^{29,30)} 그러므로 본 연구에서는 항혈전능을 알아보기 위하여 전혈 응고시간과 혈소판 응집과 혈관수축을 유도하는 TXB₂와 혈관 이완 인자인 6-keto-PGF_{1α}를 측정하였으며 그 결과를 <Table 6>에 제시하였다.

전혈 응고 시간은 유의적인 차이는 없었으나 16개월령 초기군에 비해 19개월령 중철분군에서 짧아서 연령이 증가함에 따라 혈액응고가 보다 빨라지는 것으로 나타났다. 한편, 철분수준이 높을수록 혈액응고시간이 단축되는 것으로 나타났는데 저철분식을 공급받은 경우 전혈 응고 시

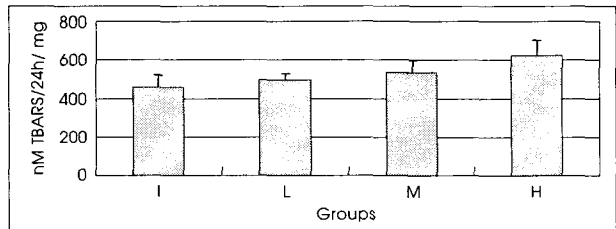


Fig. 2. TBARS level of LDL + VLDL fractions in rat fed diet with different level of Fe.

Table 6. Blood clotting time and plasma eicosanoids contents in rat fed diet with different level of Fe¹⁾

Groups	Blood clotting time (sec)	Plasma eicosanoids contents	
		Thromboxane B ₂ (ng/dl)	6-keto-prostaglandin F _{1α} (ng/dl)
I	53.14 ± 1.56 ^{NS2)}	12.41 ± 1.69 ^{ab3)}	1.75 ± 0.28 ^b
L	53.33 ± 9.75	25.52 ± 7.35 ^a	7.67 ± 2.16 ^a
M	47.52 ± 9.14	19.63 ± 8.76 ^{ab}	3.91 ± 1.66 ^b
H	42.71 ± 11.35	7.73 ± 1.91 ^b	2.61 ± 0.90 ^b

1) Mean ± Standard error (n = 8)

2) Not significant at α = 0.05 level by Duncan's multiple range test

3) Values with different alphabet within the column are significantly different at α = 0.05 level by Duncan's multiple range test

간이 16개월령 초기군과 유사하게 긴 것으로 나타났다. 그러므로 연령이 증가할수록, 식이 내 철분수준이 높을수록 전혈 응고시간이 단축되는 것으로 보인다.

혈장 내 thromboxane B₂ (TXB₂)의 함량은 혈소판 응집과 혈관 수축을 촉진하는 thromboxane A₂ (TXA₂) 지표로서 측정하였는데 철분 수준이 낮을수록 혈장 내 함량이 높았다. 한편, 혈장 내 6-keto-prostaglandin F_{1α}의 함량은 TXA₂와 정반대의 생리작용을 하는 prostacyclin (PGI₂)의 형성량을 대표하는 지표로 측정하였는데 그 결과, 철분 수준이 낮을수록 6-keto-prostaglandin F_{1α}의 함량은 높아서 저철분군의 경우 두 가지 eicosanoids 함량이 모두 높은 것으로 나타났다. Day 등³¹⁾은 만성적인 철분 공급은 thrombotic response를 현저히 증가시키고 systemic reactive oxygen species (ROS) 생성뿐 아니라 vascular ROS 생성을 증가시키며, endothelium-dependant vasorelaxation을 증가시킨다고 하였는데 혈소판 응집에는 철분의 영향이 나타나지 않았다고 하였다. 본 연구에서도 전혈 응고 시간과 혈관 이완인자인 6-keto-prostaglandin F_{1α}의 함량은 식이 철분수준이 높을수록 낮았으나 혈소판 응집과 관련된 혈중 TXB₂ 함량은 고철분군에서 오히려 낮아지는 것으로 나타났다. 따라서 식이 철분 수준이 높을수록 고철분군에서 전혈 응고 시간이 단축되었는데 이는 혈관 이완 인자인 6-keto-PGF_{1α}의 혈중 수준이 낮은 것과 관련된다고 생각된다. 그러나 식이 철분수준과 항혈전능의 관련성에 관한 보다 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

요약 및 결론

본 연구는 식이 철분 수준이 노령흰쥐의 지방대사, 항산화능 및 항혈전능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생후 16개월된 수컷 흰쥐를 사육환경에 적응시킨 후, 식이 철분 수준이 35 ppm인 중철분 식이를 10일간 공급하고 체중에 따라 4군으로 나누어 그 중 한 군을 희생하였고 나머지 3군은 식이 철분수준이 5, 35, 350 ppm가 되도록 식이를 공급하여 3개월간 사육하였다. 실험 기간동안 식이 섭취량과 체중 증가량을 측정하였고, 희생시 혈액 및 장기를 채취하여 지방대사를 살펴보기 위해 혈장, 간, 변의 총지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤과 혈장의 HDL-콜레스테롤의 양을 측정하였다. 저밀도 지단백질의 산화정도 (LDL oxidation)를 알아보기 위해서 low density lipoprotein과 very low density lipoprotein (LDL + VLDL) 분획 내 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 함량을 측정하였고, 항혈전능을 알아보기 위해서는 전혈 응고 시간, 혈장

내 thromboxane B₂ (TXB₂)와 6-keto-prostaglandin F_{1α} (6-keto-PGF_{1α})의 함량을 측정하였다.

생후 16개월에서 19개월의 3개월 동안 혈중 지질 수준이 높아졌고 LDL + VLDL 분획 내 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 함량이 증가하는 경향이 있었으며 전혈 응고 시간이 짧아지는 경향이 나타났다. 저 (5 ppm) 철분식은 중 (35 ppm) 철분식에 비하여 노령 흰쥐의 변으로의 콜레스테롤 배설을 증가시켰으며 혈중 HDL-콜레스테롤을 높여주었고 혈중 총지질, 중성지방, 총 콜레스테롤 농도를 감소시켰으며, 유의적이지는 않으나 혈중 LDL + VLDL 분획내 지질과산화물량을 감소시켰으며, 전혈응고시간을 늘리는 경향을 나타내었다. 따라서 저철분 식이의 공급은 노인에서 CVD risk를 감소시킬 것으로 사료된다. 한편, 고 (350 ppm) 철분 식이는 중철분 식이에 비하여 노령 흰쥐의 체중증가 억제, 부고환지방 조직의 감소 및 혈중 총지질, 중성지방, 총콜레스테롤 농도를 낮추는 경향을 나타내었다. 한편, 항산화능과 항혈전능 측면에서 고 철분식은 유의적이지는 않으나 혈중 LDL + VLDL 분획내의 지질과산화물량을 증가시켰고 이와 더불어 항혈전능을 감소시키는 경향을 보여서 CVD risk를 증가시킬 가능성을 보여주었다. 그러나 이러한 결과는 실험에 사용된 동물의 종 및 연령, 철분 공급 형태와 투여방식, 수준 및 기간 등의 차이를 고려하여 이해하여야 하겠다. 따라서 식이 철분 수준이 지질대사 및 항혈전능에 미치는 영향에 대하여서는 향후 보다 많은 intervention study가 요구된다 하겠다.

Literature cited

- 1) Statistical Office. 2001 Yearbook of Death Cause Statistic, Korea, 2001
- 2) Kim SH, Kim HY. Aging. *Minumsa Pub Korea*, pp.13, 1995
- 3) Lauffer RB. Iron and human disease. CRD, Press. Boca Raton, 1992
- 4) Groff JL, Sareen S, Gropper. *Advanced Nutrition and Human Metabolism third edition, Wadsworth*, pp.140-114, 1999
- 5) Kirk EA, Heinecke JW, LeBoeuf RC, Iron overload diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice *J Clin Invest* 107: 1545-1553, 2001
- 6) Sareen S, Gropper, Sara Kerr, Jerrey M. Barksdale. Non-anemic iron deficiency, oral iron supplementation, and oxidative damage on college-aged females. *J Nutr Biochem* 14: 409-415, 2003
- 7) Jung YS, Sung CJ. Effect of dietary iron and selenium levels on lipid levels of rats fed cholesterol diet. *J Kor Nutr* 6 (2): 137-143, 1996
- 8) Lynch SR. Iron overload-prevalence and impact on heat. *Nutr Rev* 53: 255-260, 1995

- 9) Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppanen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 86: 803-811, 1992
- 10) Ramakishnan U, Kuklina E, Stein AD. Iron stores and cardiovascular disease risk factors in women of reproductive age in United States. *Am J Clin Nutr* 76: 1256-1260, 2002
- 11) Swain JH, Alekel DL, Dent SB, Peterson CT, Reddy MB. Iron indexes and total antioxidant status in response to soy protein intake in perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 76: 165-171, 2002
- 12) Kim UK, Lham HW, Park YS, Myoung SO, Lee KW. Nutrition across the life span. *Shinkwqng Pub* Seoul, pp.300-347, 2001
- 13) Reeves PG, Neilsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute Nutrition Ad Hoc Wrighting Committee on the reformulation of AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951, 1993
- 14) Frings CS, Dunm RT. A colorimetric method for determination of total serum lipid based on the sulfuric-phospho-vanillin reaction. *Am J Clin Nutr* 53: 89, 1970
- 15) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917, 1959
- 16) Sjoblom L, Eklund A. Determination of HDL₂ cholesterol by precipitation with dextran sulfate and magnesium chloride establishing optimal conditions for rat plasma. *Lipids* 24: 532-534, 1989
- 17) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randle RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- 18) Ferenoux JM, Noirot B, Prost ED, Modani S, Blond JP, Prost JL. Very high alpha-tocopherol diet diminishes oxidative stress and hypercoagulation in hypertensive rats but not in normotensive rat. *Med Sci Monit* 8 (10): BR 401-407, 2002
- 19) Yun EP, Kang OS, Lee MA. The antithrombotic effects of green tea, Catechin. *Fd Hyg Safety* 11 (2): 77-82, 1996
- 20) Michell D, Knutson PB, Walter B. Both iron deficiency and daily iron supplements increase lipid peroxidation in rat. *J Nutr* 130: 621-628, 2000
- 21) Um MY, Kim MK. Effect of grape intakes on lipid metabolism of rats during aging. *Kor J Nutr* 35 (7): 713-728, 2002
- 22) Masson R, Roome NO. Spontaneous iron overload in Sprague - Daweley rats. *Toxicol Patho* 125 (3): 308-316, 1997
- 23) Turbina-Riberio SML, Silva ME, Chianca DA, De Paula H Jr, Cardos LM, Colombari E, Pedosa ML. Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure. *J Nutr* 133: 15-20, 2003
- 24) Bureau I, Lewis CG, Fields M. Effect of Hepatic Iron on Hypercholesterolemia and Hypertriacylglycerolemia in Copper-Deficient Fructose-Fed Rats. *Nutr* 14 (4): 366-371, 1998
- 25) Tsuji Y, Ayaki H, Whitman SP, Morrow CS, Torti SV, Torti FM. Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin response to oxidative stress. *Molecular & cellular biology* 20 (16): 5818-5824, 2000
- 26) Bacon BR, Tavill AS, Brittenhan GM, Park CH, Recknagel RO. Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *J Clin Invest* 71: 429-439, 1993
- 27) Bonkowsky FL, Carpenter SJ, Healey JF. Iron and the liver subcellular distribution of iron and decreased microsomal cytochrome P490 in livers of iron-loaded rats. *Arch Pathol Lab Med* 103: 21-29, 1979
- 28) Brandsh C, Ringseis R, Eeder K. High dietary iron concentrations enhance the formation of cholesterol oxidation products in the liver of adult rats fed salmon oil with minimal effects on antioxidant status. *J Nutr* 132: 2263-2269, 2002
- 29) Njiveldt RJ, Nood E, Hoom DEC, Boelens PG, Norren K, Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74: 418-425, 2001
- 30) Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition on platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Res* 78 (2): 151-160, 1995
- 31) Day SM, Duquaine D, Lakshmi V, Menon RG, Khan BV, Rajagopalan S. Chronic iron administration increases vascular oxidative stress and accelerates arterial thrombosis. *Circulation* 170: 2601-2606, 2003