

# 고호모시스테인혈증 임신 흰쥐에서 엽산보충이 혈장 호모시스테인, Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) 수준과 간의 SAM/SAH에 미치는 영향

홍경주\* · 현대선\*\* · 장남수\*§

이화여자대학교 생활환경대학 식품영양학과, \* 충북대학교 생활과학대학 식품영양학과\*\*

## Effects of Folic Acid Supplementation on Plasma Homocysteine and Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Levels and Liver SAM/SAH Ratio in Hyperhomocysteinaemia-induced Pregnant Rats

Hong, Kyoung Ju\* · Hyun, Taisun\*\* · Chang, Namsoo\*§

Department of Food and Nutritional of Sciences, Asia Food & Nutrition Research Institute,\*  
Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Department of Food and Nutrition,\*\* Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

### ABSTRACT

This study was performed to investigate effects of dietary folic acid supplementation on plasma homocysteine levels, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels and liver SAM/SAH ratio in hyperhomocysteinaemia-induced pregnant rats. Forty-two female Sprague-Dawley rats were divided three groups (C: control diet, HFD: 0.3% homocystine and 0 mg folic acid diet, HFS: 0.3 % homocystine and 8 mg/kg folic acid diet) according to homocystine and folic acid levels in the diet. They were fed experimental diets for 5 weeks prior to the mating and also during the entire period of pregnancy till gestational day 20. Dietary folic acid supplementation caused a significant decrease in plasma homocysteine levels which had been increased by a homocystine-diet, with a concomitant increase in plasma and liver folate levels. Liver TBARS levels in homocysteine-folic acid-deficient group (HFD) were higher than those in control group. Dietary folic acid supplementation increased hepatic SAM/SAH ratio in homocysteine-folic acid-supplementation group (HFS) when compared to the HFD ( $p < 0.05$ ). These data suggest that folate depletion and elevated plasma homocysteine may promote oxidative stress in rat livers and influence the remethylation cycle of the homocysteine metabolism detrimentally. In conclusion, dietary folic acid supplementation was found to be effective for lowering plasma homocysteine levels, relieving oxidative stress, and improving the methylation status in the body. (*Korean J Nutrition* 38(7): 495~502, 2005)

**KEY WORDS** : hyperhomocysteinemia, folate, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), SAM/SAH ratio.

### 서론

임신기에는 세포의 증식이 활발하게 일어나기 때문에 세포의 대사, 생존 및 성장을 위하여 영양소의 원활한 공급이 중요하다.<sup>1)</sup> 그 중 호모시스테인 대사에 관여하는 비타민 B군들의 요구량이 태아의 성장을 위해 증가되고, 특히

엽산은 nucleotide 합성과 세포분화에 필요한 단일탄소 전이반응의 조효소로 작용함으로써 임신 중에는 엽산의 요구량이 크게 증가하게 된다.

임신 중에 엽산의 결핍은 태아 사망의 위험률을 증가시키며 DNA 합성의 감소와 태아의 크기 및 무게도 감소시키는 것으로 보고된 바 있다.<sup>2)</sup> 또한 엽산결핍은 간이나 혈중 엽산 농도와 간의 S-adenosylmethionine (SAM) / S-adenosylhomocysteine (SAH) 비율을 감소시키는 것으로 보아 체내 methylation 상태에 영향을 줄 수 있을 것으로 시사된 바 있다.<sup>3,4)</sup>

임신기에 엽산 결핍은 혈장 호모시스테인 수준을 증가시

접수일 : 2005년 7월 12일

채택일 : 2005년 7월 29일

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : nschang@ewha.ac.kr

키는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 혈장 호모시스테인 농도가 상승되면 혈관의 내피세포 손상과 그로 인한 혈소판 축적 및 항응고 기능장애와 혈전 생성을 유도하게 되며 산화적 스트레스가 증가되어 활성산소의 과다 생성을 야기한다.<sup>5)</sup> 임신부의 고호모시스테인혈증은 자연유산<sup>6)</sup>이나 태반 박리<sup>7)</sup>와 조산 등의 임신 합병증을 유발시키고 태아성장지연 (IUGR, intrauterine growth retardation)<sup>8)</sup>과 저체중아 출산<sup>9)</sup> 등과 같이 바람직하지 못한 임신 결과에 영향을 미친다는 보고가 있다. 그러나 임신기간 엽산보충을 하면 출산아의 체중을 증가시키며<sup>10)</sup> 태아의 출생 길이, 태아생존율을 증가시킨다고 보고한 바 있다.<sup>11)</sup> Rolschau 등<sup>12)</sup>은 체내 엽산 상태와 출생체중간의 긍정적인 상관관계와 엽산 수준과 태반 무게와의 상관관계를 보고한 바 있다. 그러므로 엽산을 보충하면 임신 초기의 자연유산 위험을 감소시키고, 비타민 결핍 및 혈중 호모시스테인 상승으로 인한 바람직하지 못한 임신결과를 예방할 수 있을 것으로 보인다.

혈중 호모시스테인 수준의 증가나 엽산보충이 임신 결과에 미치는 영향을 관찰한 실험 연구는 많이 있지만, 임신 중에 고호모시스테인혈증이 혈장과 간의 산화적 스트레스 정도와 methylation 상태에 어떠한 영향을 미치는지, 또한 이에 대한 엽산 보충효과를 관찰한 연구는 없었다. 따라서 본 연구는 고호모시스테인 식이로 유발한 고호모시스테인혈증의 임신 흰쥐를 대상으로 엽산 보충이 혈장과 조직의 엽산 수준과 homocysteine 수준, 혈장 및 간의 과산화지질 수준인 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 수준 그리고 간조직의 SAM/SAH ratio에 미치는 영향을 알아보았다.

## 연구 방법

### 1. 실험동물의 사육 및 식이구성

본 실험에서는 생후 5주령 된 Sprague-Dawley종 암컷 쥐 42마리 (Initial body weight: 117.61 ± 1.7 g, (주) Orient)를 체중에 따라 난괴법에 의하여 대조군 (C), 호모시스테인 군 (HFD), 엽산 보충한 호모시스테인군 (HFS) 3군으로 나누었다. 실험동물들을 3일간 고품 배합사료 [(주) Orient]로 적응 시킨 후, 실험 식이를 공급하였다.

실험에서 사용된 식이의 조성은 Table 1과 같다. 식이는 American Institute of Nutrition (AIN)-93 Growth의 조성을 바탕으로 제조되었으며, 실험군은 호모시스테인을 3.0 g/kg diet로 첨가한 식이로 실험 식이의 엽산 함량을 0 mg, 8 mg/kg diet 두 가지 수준으로 제조하였다. 실험기간 동안 물과 식이는 자유로이 섭취하도록 하였다. 동물 사육실

Table 1. Composition of experimental diets<sup>1)</sup>

Ingredients (g/kg diet)	C	HFD	HFS
Cornstarch	466.79	463.79	463.79
Casein	140	140	140
Dextrinized cornstarch	155	155	155
Sucrose	100	100	100
Soybean oil	40	40	40
Fiber	50	50	50
Mineral Mix <sup>2)</sup>	35	35	35
L-cystine	1.8	1.8	1.8
Choline chloride	1.4	1.4	1.4
tert-Butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008
Vitamin mix without folic acid <sup>3)</sup>	10	10	10
Folic acid	0.008	0	0.008
Homocystine	0	3	3
Total	1,000	1,000	1,000

<sup>1)</sup>C: Control diet, HFD: 0.3% homocystine diet without folic acid, HFS: 0.3% homocystine diet with 0.008 g folic acid

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

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

의 온도는 23 ± 1°C, 습도는 50 ± 5%로 조정하였고, 명암 주기를 12시간으로 유지하였다. 매일 일정한 시각에 식이 섭취량을 측정하였으며 체중은 1주일에 한 번씩 일정한 시각에 측정하였다.

### 2. 교배 및 임신확인

실험 식이로 5주간 사육한 흰쥐를 대상으로 매일 오후 5시에 수컷 흰쥐와 교배시키고, 다음날 아침 9시에 sperm 조사를 통해 임신을 확인하였으며, 임신이 확인 된 후에도 동일한 실험식이로 출산 예정 하루 전까지 20일간 사육하였다.

### 3. 실험동물의 희생 및 혈액과 장기의 채취

실험동물을 희생하기 전 12시간을 절식시킨 후 에틸 에테르로 마취시켜 개복하고 heart puncture법으로 ethylene diamine tetra acetate (EDTA)가 처리된 10 ml 주사기를 사용하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 4°C, 3,000 × g에서 30분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 혈장은 -70°C에 냉동 보관하여 homocysteine, folate, vitamin B<sub>12</sub>, TBARS 분석에 이용하였다. 혈액 채취 후 실험동물을 즉시 해부하여 간을 적출하고, 즉시 -70°C에 냉동보관하여 folate, TBARS, SAM, SAH 분석에 이용하였다.

### 4. 생화학적 분석

#### 1) 혈장 호모시스테인 농도 분석

혈장 호모시스테인 농도는 Araki와 Sako<sup>13)</sup>의 방법을 기초로 하여 이를 변형시켜 HPLC (Waters 2690, U.S.A)

로 분석하였다. 혈장 100  $\mu$ l에 10%의 tri-n-butylphosphine 용액 10  $\mu$ l을 첨가한 후 잘 혼합하여 4°C에서 30분 동안 방치하였다. 냉각된 10% TCA 용액 100  $\mu$ l를 가한 후 잘 혼합하여 4°C, 3,000  $\times$  g에서 5분간 원심 분리하였다. 상층액 100  $\mu$ l를 취해 20  $\mu$ l의 1.55 M NaOH, 250  $\mu$ l의 4 mM EDTA를 함유하는 0.125 M borate buffer, pH 9.5, 100  $\mu$ l의 SBD-F 용액을 첨가한 후 60°C에서 1시간 동안 잘 혼합하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 용액을 냉각시켜 10 ml 주사기를 사용하여 0.45  $\mu$ m filter (HV type, Whatman, U.S.A)로 여과시켰다. 이 여과액을 vial에 넣어 auto-injection chamber로 20  $\mu$ l씩 column에 주입하여 분석하였다.

### 2) 혈장의 엽산, 비타민 B<sub>12</sub> 농도 분석

혈장 엽산 및 비타민 B<sub>12</sub> 수준은 <sup>125</sup>I-folic acid와 <sup>57</sup>Co-vitamin B<sub>12</sub> dualcount solid phase no boil (SPNB) radioimmunoassay kit (Diagnostic Products Co., Los Angeles, CA, U.S.A.)를 이용하여 분석하였다. 200  $\mu$ l의 혈장에 dithiothreitol과 tracer를 혼합한 working solution을 첨가한 후 NaOH/KCN을 넣고 반응을 중지시키고 binder를 넣고 원심 분리한 후 상층액을 버리고 dual  $\gamma$ -counter (Cobra II, auto-gamma, Perkin Elmer Inc., MA, USA)로 측정하였다.

### 3) 간의 엽산 함량 분석

*Lactobacillus casei* (ATCC 7469)를 이용한 미생물법 (microbiological assay)에 의해 간의 엽산 함량을 분석하였다. 간 조직 0.5 g을 취하여 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 4.5)에 1%의 ascorbic acid를 첨가하여 10~20배 희석하고 homogenizer (Polytron<sup>®</sup>PT 3100, Kinematica AG, Swiss)로 균질화 시켰다. 10분간 100°C에서 끓인 후 5000  $\times$  g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 미리 준비한 rat serum conjugase<sup>14)</sup>와 potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 1%의 ascorbic acid를 첨가한 용액으로 4~5배 희석하고 37°C, 2시간 동안 항온 수조에서 incubate하였다. 준비된 시료는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.3) 100 ml에 ascorbic acid 0.1 g를 첨가하여 여과 멸균한 potassium phosphate-ascorbate buffer를 96-well microplate (Flat bottomed, Falcon, U.S.A)에 12-channel pipetter (Biohit Oyj, Finland)를 이용하여 주입하고 희석한 *L. casei*를 접종시켜 37°C incubator에서 18~20시간 동안 배양한 후 microplate reader (Emax, Molecular Devices)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였고, 자료 분석용 software (SOFTmax PRO)

를 이용하여 표준곡선을 그린 후 농도 계산을 하였다.

### 4) 혈장 및 간 조직의 Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 분석

혈장 TBARS 농도 분석은 Yagi 등<sup>15)</sup>의 방법을 기초로 분석하였다. 혈청 50  $\mu$ l에 1/12 N 황산 4 ml와 10% phosphotungstic acid 0.5 ml를 넣고 혼합하여 5분간 방치한 후 3,000  $\times$  g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 침전물에 1/12 N 황산 2 ml와 10% phosphotungstic acid 0.3 ml를 넣고 혼합하여 5분간 방치한 후 3,000  $\times$  g에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버렸다. 침전물에 증류수 2 ml와 thiobarbituric acid (TBA) reagent 1 ml를 첨가하여 철저히 혼합한 후 뚜껑을 단단히 막고 95°C water bath에서 1시간 incubation 시켰다. Butanol 3 ml를 첨가하여 3,000  $\times$  g에서 15분간 원심분리하여 10분간 방치하였다. 상층액을 luminescence spectrometer (Perkin-Elmer LS50, U.S.A)로 excitation wave length 515 nm, emission wave length 553 nm에서 비색 정량하였다.

간의 TBARS 농도 분석은 Ohkawa 등<sup>16)</sup>의 방법을 기초로 분석하였다. 일정량의 조직에 10배 용량의 1.15% potassium phosphate buffer를 넣고 Telfon-glass 균질화기를 이용하여 균질화 한 다음 3,000  $\times$  g, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 균질액으로 사용하였다. 상층액 0.2 ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2 ml, 20% sodium acetate (pH 3.5)로 녹인 0.8% TBA solution 3 ml와 증류수 1 ml를 섞고 95°C에서 1시간 가열한 후 식힌다. 5 ml의 n-butanol/pyridine (15 : 1, v/v)과 1 ml이 증류수를 가하여 혼합한 후 4,000 rpm에서 10분간의 원심 분리 후 10분간 방치하고 상층액을 취하여 luminescence spectrometer (Perkin-Elmer LS50, U.S.A)로 excitation wave length 515 nm, emission wave length 553 nm에서 비색 정량하였다.

### 5) 간 SAM, SAH 분석

간 조직의 S-adenosylmethionine (SAM), S-adenosylhomocysteine (SAH) 농도는 Wang<sup>17)</sup>의 방법을 기초하여 이를 변형시켜 HPLC-UV detection 방법을 이용하여 분석하였다. 일정 부위의 간 조직을 취하여 0.4 M HClO<sub>4</sub> 용액을 조직 부피의 4배 양을 넣고, Telfon-glass 균질화기를 이용하여 균질화 시킨 후, 4°C, 10,000  $\times$  g에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 취하여 0.2  $\mu$ m filter (PVDF, Whatman, U.S.A)로 여과시킨 후 automatic injector (Waters Co., U.S.A)로 25  $\mu$ l씩 column에 주입하여 분석하였다.

5. 통계분석

모든 실험분석 결과는 SPSS version 11.0 program을 이용하여 평균 ± 표준오차로 나타냈다. 동일한 사육기간 내에서 대조군과 실험군의 식이섭취량, 체중증가량, 혈장호모시스테인, 엽산 및 비타민 B<sub>12</sub> 농도를 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance)을 한 후 α = 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 군 평균치간의 유의성을 사후 검정하였다. 임신 전과 임신 후의 실험동물의 생화학적 지표를 비교하기 위하여 각 군간 Student's t-test를 하였다.

혈장 호모시스테인 농도와 엽산, 비타민 B<sub>12</sub> 수준, TBARS 및 간의 SAM, SAH 농도, SAM/SAH ratio와의 상관관계는 Pearson's correlation analysis를 이용하여 유의성을 검정하였다.

연구 결과

1. 실험동물의 체중 및 식이섭취량

실험동물의 평균 식이섭취량과 체중 증가량은 Table 2에 제시하였다. 동일한 사육기간 내에서 대조군과 호모시스

Table 2. Weight gain, daily food intake and food efficiency ratio (FER) in experimental rats<sup>1)</sup> prior to the mating for 5 weeks

Group <sup>2)</sup>	C	HFD	HFS
Weight gain (g/day)	3.61 ± 0.69	3.60 ± 0.51	3.56 ± 0.58
Food intake (g/day)	15.06 ± 2.04	14.34 ± 1.70	14.96 ± 2.13
FER	0.24 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.03

<sup>1)</sup>Values are means ± standard error (n = 14)  
<sup>2)</sup>C: Control diet, HFD: 0.3% homocystine diet without folic acid, HFS: 0.3% homocystine diet with 0.008 g folic acid

Table 3. Concentrations of plasma homocysteine, folate, vitamin B<sub>12</sub> and liver folate<sup>1)</sup>

Group <sup>2)</sup>	C	HFD	HFS
Plasma homocysteine (μmol/L)			
Before pregnancy	8.76 ± 1.29 <sup>2b)</sup>	14.48 ± 1.74 <sup>2d)</sup> **	12.08 ± 1.34 <sup>2b)</sup> **
Gestational day 20	7.61 ± 0.49 <sup>1)</sup>	98.33 ± 6.49 <sup>c)</sup>	22.69 ± 3.29 <sup>b)</sup>
Plasma folate (nmol/L)			
Before pregnancy	24.65 ± 2.44 <sup>c)</sup> *	5.15 ± 0.29 <sup>2a)</sup> **	17.69 ± 1.24 <sup>b)</sup>
Gestational day 20	34.29 ± 2.31 <sup>c)</sup>	2.10 ± 0.41 <sup>1)</sup>	25.81 ± 3.43 <sup>b)</sup>
Plasma vitamin B <sub>12</sub> (pmol/L)			
Before pregnancy	2.33 ± 0.10 <sup>2b)</sup>	1.97 ± 0.28 <sup>2a)</sup> *	2.53 ± 0.09 <sup>b)</sup>
Gestational day 20	2.50 ± 0.22 <sup>1)</sup>	2.83 ± 0.09 <sup>2b)</sup>	3.23 ± 0.31 <sup>b)</sup>
Liver folate (nmol/g tissue)			
Before pregnancy	12.03 ± 0.87 <sup>b)</sup>	5.02 ± 0.50 <sup>2a)</sup> **	12.30 ± 0.52 <sup>b)</sup>
Gestational day 20	12.90 ± 0.72 <sup>c)</sup>	1.70 ± 0.21 <sup>1)</sup>	9.86 ± 0.44 <sup>b)</sup> *

<sup>1)</sup>Values are means ± standard error  
<sup>2)</sup>C: Control diet, HFD: 0.3% homocystine diet without folic acid, HFS: 0.3% homocystine diet with 0.008 g folic acid  
<sup>3)</sup>Values with different alphabet within the row are significantly different at α = 0.05 level by Duncan's multiple range test  
<sup>4)</sup>Significantly different between "Before pregnancy" and "gestational day 20" within the same column (\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.001)

틴 식이군 및 엽산 보충을 한 호모시스테인 식이의 일일 평균 식이 섭취량 및 실험기간 동안의 체중 증가량을 관찰한 결과 p < 0.05 수준에서 유의적인 차이가 없었다.

2. 혈장 호모시스테인 수준과 엽산 수준

실험동물의 혈장 호모시스테인 농도, 혈장 및 간의 비타민 B<sub>12</sub> 수준을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 임신여부에 따른 혈장 호모시스테인 수준에 나타난 변화를 보면 대조군의 경우에는 임신 전과 후 사이에 유의적 차이가 없었으나 엽산 결핍군 (HFD)의 경우 임신 전 보다 임신 후가 6.8배 높았으며, 엽산 보충군 (HFS)은 임신 전보다 임신 후가 1.9배 높아져서 임신 중의 혈장 호모시스테인의 상승폭을 1/3 가량 감소시켰다. 임신 전 엽산 영양상태에 따른 혈장 호모시스테인의 농도는 엽산결핍군이 대조군에 비해 1.7배로 유의적으로 높았으나 엽산 보충군의 호모시스테인 수준은 대조군과 유사하였다. 임신 후의 경우 엽산결핍군의 호모시스테인 수준이 대조군에 비해 12.9배 상승하여 임신이라는 특수한 생리적 스트레스가 엽산 결핍 상태를 악화시키는 것으로 나타났다. 엽산 보충군의 임신 후 호모시스테인 수준은 대조군 보다 4.3배로 높아서 엽산결핍과 호모시스테인 식이로 유도된 혈장 호모시스테인의 상승폭을 1/3 정도 감소시켰으나 임신 전의 경우와는 달리 임신 후에는 혈장 호모시스테인 수준을 대조군 수준으로까지 낮추지는 못했다.

임신 여부에 따른 혈장 엽산 수준은 임신 후가 임신 전에 비해 60%나 감소한 엽산결핍군 (HFD)에서만 다르게 나타났고 대조군이나 엽산보충군에서는 유의적 차이가 없었다. 한편 식이 엽산 함량에 따라 혈장 엽산 수준에 나타난 결과를 보면 임신 전의 경우 엽산결핍군이 대조군에 비해

79.1% 정도로 낮았고 엽산보충군은 대조군에 비해 28.2% 낮게 나타났다. 본 실험에서 사용한 식이 1 kg당 8 mg의 엽산 보충으로는 엽산결핍과 고호모시스테인혈증을 유도시킨 실험 동물의 혈장 엽산 수준을 대조군 수준으로까지는 회복시키지 못하는 것으로 나타났다. 임신 후에는 엽산결핍군의 혈장 엽산 수준이 대조군의 6.1% 밖에 되지 않을 정도로 매우 낮았는데, 엽산보충군은 대조군의 75.3%까지 달하는 것으로 나타났다.

간의 엽산 함량을 임신여부에 따라 비교한 결과를 보면 엽산결핍군의 경우 임신 전에 비해 임신 후에 66.1%로 유의적으로 낮아졌고 엽산보충군의 경우도 19.8%로 낮아져서 엽산보충이 임신 후 간의 엽산수준을 완전히 회복시키지는 못하지만 상당히 개선시키는 것을 볼 수 있었다. 식이 엽산 함량에 따라서 간 조직의 엽산 함량은 비교한 결과를 보면 임신 전의 경우 엽산결핍군이 대조군에 비해 58.4%가 유의적으로 낮았으나 엽산보충군과 대조군 사이에는 유의적 차이가 없는 것으로 보아 엽산 보충시 간의 엽산 수준이 완전히 회복되는 것으로 나타났다. 그러나 임신 후의 경우 엽산결핍군이 대조군에 비해 84.5%가 유의적으로 낮

았고 엽산보충군은 23.6% 유의적으로 낮아서 임신 후 엽산 보충이 간의 엽산수준을 완전히 회복시키지는 못했다.

혈장 vitamin B<sub>12</sub> 농도는 임신 전의 경우 호모시스틴과 엽산 섭취 유무와 관련 없이 유의적인 차이가 없었다. 임신 후의 경우 엽산보충군이 대조군보다 29.2% 높게 유의적인 차이를 보였다. 또한 혈장 vitamin B<sub>12</sub> 수준은 엽산결핍군에서 임신 전이 임신 후보다 유의적으로 낮았다.

**3. 혈장과 간의 과산화지질 수준**

임신 전 혈장 TBARS의 수준은 모든 실험식이군 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 임신 후에는 엽산보충군이 대조군과 엽산결핍군보다 유의적으로 낮았다. 엽산보충군에서는 임신 전보다 임신 후의 혈장 TBARS 수준이 유의적으로 낮았다 (Table 4).

동일한 실험식이내에서 간의 TBARS 수준은 임신 전보다 임신 후가 높은 경향이 있었으며 대조군에서만 유의적인 차이를 보였다. 실험 식이에 따른 간 조직의 TBARS 수준에 나타난 결과를 보면 임신 전의 경우 엽산결핍군이 대조군보다 1.9배 높았고 엽산보충군도 1.7배 높았다. 즉, 호모시스틴 식이로 증가된 간 조직의 TBARS 수준이 엽산 보충으로 감소되지 못한 것으로 나타났다. 임신 후 간 조직 TBARS 수준은 실험식에 따라 달라지지 않았다.

**4. 간의 SAM/SAH 비율**

간의 SAM/SAH 비율은 임신 전의 경우 엽산결핍군이 대조군보다 유의적으로 낮게 나타났고 엽산보충군의 경우 유의적인 차이가 없었다 (Table 5). 임신 후에도 엽산결핍군의 SAM/SAH 비율이 대조군에 비해 유의적으로 낮았으나 엽산보충군의 경우 대조군과 유의적인 차이가 없어서 엽산 보충이 간의 remethylation 수준에 영향을 미치는 것으로 추측된다. 또한 엽산결핍군의 경우 간의 SAM/SAH 비율이 임신 전보다 임신 후에 유의적으로 낮아지는 것으로 보아 임신 중 엽산 결핍이 체내 remethylation 상태를 악화시키는 것으로 사료된다.

**Table 4.** Plasma and liver TBARS levels in experimental rat fed diets<sup>1)</sup>

Group <sup>2)</sup>	C	HFD	HFS
Plasma TBARS (μmol/L)			
Before pregnancy	3.84 ± 0.17	3.87 ± 0.18	3.75 ± 0.13 <sup>3)*</sup>
Gestational day 20	3.49 ± 0.24 <sup>4a)</sup>	4.04 ± 0.47 <sup>b)</sup>	2.27 ± 0.24 <sup>a)</sup>
Liver TBARS (nmol/g tissue)			
Before pregnancy	11.52 ± 1.06 <sup>5a)</sup>	21.56 ± 1.45 <sup>b)</sup>	19.92 ± 1.59 <sup>b)</sup>
Gestational day 20	21.81 ± 3.94	35.56 ± 4.86	25.35 ± 9.88

<sup>1)</sup>Values are means ± standard error  
<sup>2)</sup>C: Control diet, HFD: 0.3% homocystine diet without folic acid, HFS: 0.3% homocystine diet with 0.008 g folic acid  
<sup>3)\*</sup>: Significantly different between "Before pregnancy" and "gestational day 20" within the same column, p < 0.05  
<sup>4)</sup>Values with different alphabet within the same row are significantly different at α = 0.05 level by Duncan's multiple range test

**Table 5.** Liver levels of SAM/SAH ratio in experimental rats<sup>1)</sup>

Group <sup>2)</sup>	C	HFD	HFS
SAM/SAH ratio			
Before pregnancy	1.67 ± 0.12 <sup>3b3)</sup>	1.03 ± 0.05 <sup>4a4)**</sup>	1.56 ± 0.14 <sup>b)</sup>
Gestational day 20	1.78 ± 0.25 <sup>b)</sup>	0.55 ± 0.08 <sup>a)</sup>	1.44 ± 0.26 <sup>b)</sup>

<sup>1)</sup>Values are means ± standard error  
<sup>2)</sup>C: Control diet, HFD: 0.3% homocystine diet without folic acid, HFS: 0.3% homocystine diet with 0.008 g folic acid  
<sup>3)</sup>Values with different alphabet within the same row are significantly different at α = 0.05 level by Duncan's multiple range test  
<sup>4)\*\*</sup>: Significantly different between "Before pregnancy", "gestational day 20" within the same column, p < 0.01

**Table 6.** Pearson's correlation coefficients between plasma homocysteine and other parameters in experimental rats

	Plasma homocysteine	
	Before pregnancy	Gestational day 20
Plasma folate	-0.725 <sup>1)**</sup>	-0.891 <sup>1)**</sup>
Plasma vitamin B <sub>12</sub>	-0.156	0.124
Plasma TBARS	0.136	0.275
Liver folate	-0.660 <sup>**</sup>	-0.927 <sup>**</sup>
Liver TBARS	0.462 <sup>*</sup>	0.340
Liver SAM/SAH ratio	-0.525 <sup>*</sup>	-0.726 <sup>**</sup>

<sup>1)</sup>Significantly correlated between plasma homocysteine levels and other parameters (\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.001)

### 5. 혈장 호모시스테인 수준과 비타민 B, 과산화지질, SAM/SAH 비율과의 상관관계

임신 전과 후 모두 혈장 호모시스테인 수준과 혈장 및 간 조직의 엽산 수준, 간의 SAM/SAH 비율 사이에는 유의적인 음의 상관관계가 있었다 (Table 6). 임신 전의 경우 혈장 호모시스테인 수준은 간의 TBARS 수준 사이에 유의적인 양의 상관관계가 있었으나 임신 후에는 장 호모시스테인 수준과 혈장 및 간의 TBARS 수준사이에는 양의 상관관계가 있었지만 유의적 차이는 없었다.

## 고 찰

본 연구는 임신 중에 고호모시스테인혈증이 혈장과 간의 산화적 스트레스 정도와 methylation 상태에 미치는 영향과 이에 대한 엽산 보충 효과를 알아보기 위하여 고호모시스테인혈증이 유발된 흰쥐를 대상으로 임신 전과 임신 중 혈장 호모시스테인 수준, 혈장 및 간 조직의 엽산과 지질과 산화물인 TBARS 수준 그리고 간조직의 SAM/SAH 비율을 관찰하였다.

그 결과, 대조군의 경우 혈장 호모시스테인의 수준은 임신 전에 비해 임신 후에 감소하는 경향이 있었으나 엽산결핍군의 경우에는 호모시스테인 수준이 임신 후에 더욱 상승하는 것으로 나타났다. 임신 중에는 혈액희석 (hemodilution) 현상이 나타나고 태아의 메티오닌 요구량이 증가하며 알부민 농도가 감소하여 혈중 수용성 비타민 수준과 더불어 혈중 호모시스테인 수준이 감소하는 것이 일반적으로 일어나는 현상이다.<sup>18-20)</sup> 그러나 본 연구에서는 엽산결핍군의 경우 임신 후 혈장 호모시스테인 수준이 임신 전 수준보다 증가하였는데, 이러한 결과는 호모시스틴 투여와 엽산결핍으로 인하여 임신기간에도 혈액희석 현상을 능가할 정도로 체내 호모시스테인 생성이 증가한 것으로 사료된다. 본 연구에서 관찰된 혈장호모시스테인 수준의 상승 정도는 Smith 등<sup>21)</sup>과 Ebbesen 등<sup>22)</sup>이 수컷 설치류를 대상으로 호모시스틴식을 장기간 복용시킨 연구에서 나타난 결과와 비슷한 수준이었다.

본 연구에서 엽산 보충은 엽산결핍과 호모시스틴 식이로 유도된 혈장 호모시스테인의 상승폭을 1/3 수준으로 감소시켰다. 이렇게 엽산 보충시 호모시스테인이 저하된다는 결과는 Landgren 등<sup>23)</sup>이 가임기 여성에게 엽산을 보충하여 혈장 호모시스테인 농도가 저하했다는 보고와 Brouwer 등<sup>24)</sup>이 18~40세의 가임기 여성을 대상으로 하루 250 µg의 엽산을 보충시킨 결과 혈장 호모시스테인 수준이 낮아졌다는 보고, 그리고 M. Achon 등<sup>25)</sup>이 임신 기간 동안 흰

쥐에게 엽산을 보충할 경우 혈장 호모시스테인 수준이 감소한다는 보고와 일치하는 결과이다.

혈장과 간의 엽산 수준은 식이 엽산 수준이 충분한 경우 임신 여부에 따라 아무런 차이가 없었으나 엽산 결핍군의 경우에는 임신 전에 비해 임신 후에 조직과 혈장의 엽산 함량이 유의적으로 감소하였으며 이때 엽산을 보충하면 혈장 엽산 수준은 완전히 회복되나 간에서는 그렇지 못한 것으로 나타났다. 이와 같이 엽산을 보충하였을 때 혈장과 간의 엽산 수준의 회복 정도가 다른 것은 혈장과 조직의 엽산 이용 및 저장에 대한 기전이 다르기 때문으로 사료된다.

본 연구에서 식이 호모시스틴과 엽산 함량으로 인해 간과 혈장의 엽산 수준, 혈장 호모시스테인 수준에 야기된 변화는 간의 TBARS 수준과 SAM/SAH 비율에 나타난 변화와 유의적인 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 임신 전 혈장 TBARS의 수준은 모든 실험 식이군에서 유사하게 나타났다. 간에서는 엽산결핍군과 엽산보충군 모두 대조군보다 유의적으로 높아, 호모시스틴 식이가 간 조직의 TBARS 수준을 증가시킨 것으로 사료되었다. 혈장에서는 엽산 보충이 임신 후 TBARS 수준을 낮추었으나 간에서는 고호모시스테인혈증으로 인해 증가된 TBARS 수준을 감소시키지는 못했다.

임신은 산화적 스트레스를 증가시키는 것으로 잘 알려져 있다. Morris 등<sup>26)</sup>은 임신기간 동안 혈장 TBARS 수준이 임신 전 상태에 비해 상승한다고 보고한 바 있다. 이와 더불어 고호모시스테인혈증은 내피세포의 손상을 일으키며 그 기전으로 첫째, 혈장 호모시스테인 분자의 thiol 잔기가 free radical에 의해 자가산화되어 O<sub>2</sub><sup>-</sup>를 생성하고, nitric oxide와 쉽게 작용하여 지질 과산화물의 강력한 매체인 oxidant peroxynitrite를 만들며,<sup>27)</sup> 둘째, 호모시스테인이 항산화 효소인 glutathione peroxidase와 natural killer enhancing factor B의 발현을 감소시켜서 호모시스테인의 세포독성효과와 산화적 스트레스를 야기 할 수 있다는<sup>28)</sup> 것이 보고되었다. 또한 본 연구의 엽산 결핍군은 Huang 등<sup>29)</sup>이 4주간 엽산 함량을 달리하여 사육한 수컷 쥐의 TBARS 수준을 측정된 결과, 엽산 결핍과 호모시스테인 수준의 증가가 간의 산화적 스트레스를 촉진한다는 보고와도 일치하여, 결국 호모시스테인이 혈장 및 조직의 산화적 스트레스로 작용한다고 생각할 수 있다.

본 실험에서 간의 SAM/SAH 비율은 식이 엽산 수준과 체내 엽산 영양상태에 의해 영향을 받는 것으로 나타났다. 특히 엽산 결핍군의 경우 임신 전보다 임신 후에 SAM/SAH 비율이 유의적으로 낮아져서 임신 후의 엽산 결핍이 체내 remethylation 과정에 큰 지장을 줄 것으로 관찰되

었다. 호모시스테인은 엽산으로부터 메틸기를 받아 메티오닌으로 전환된 후 methionine adenosyltransferase에 의해 S-adenosylmethionine (SAM)으로 전환된다. SAM은 DNA, 단백질, 지질 등 생체 주요물질에게 methyl을 공여한 후 S-adenosylhomocysteine (SAH)으로 전환된다.<sup>30)</sup> 여러 동물에서 엽산, 메티오닌, 콜린, 비타민 B<sub>12</sub> 결핍 시 간의 SAM 수준이 감소하고 SAH의 수준이 증가되며 SAM/SAH ratio가 유의적으로 감소한다고 보고되어 왔다.<sup>31,32)</sup> 본 연구에서 엽산결핍군은 remethylation 대사 과정이 손상 받았지만 엽산보충군은 remethylation 과정의 손상이 회복되었다. 이러한 결과는 엽산 결핍이 혈장 호모시스테인 수준을 증가시키고 SAM/SAH ratio를 감소시킨다는 Sibani 등<sup>33)</sup>의 보고와도 일치하며, 고호모시스테인혈증이 유발되면 엽산이 부족하게 되어 호모시스테인 대사를 조절하는 SAM의 수준이 부족해지고 이것이 호모시스테인 수준을 상승시킨다는 Miller JW의 연구<sup>34)</sup>와, 1.5% 및 3.0%의 호모시스틴 식이로 유발한 고호모시스테인혈증 흰쥐에서 간의 SAM, SAH 수준 및 SAM/SAH ratio가 감소하였다고 보고한 Southern 등<sup>35)</sup>의 연구와 일치하였다. 그러므로 고호모시스테인혈증의 흰쥐에게 엽산을 공급하는 것은 호모시스테인 수준을 낮추고 remethylation 과정을 회복시킬 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 호모시스틴 투여와 엽산결핍식으로 유도된 고호모시스테인혈증은 체내 methylation 상태에 영향을 주고 산화적 스트레스를 유발시키는 것으로 사료되며 엽산보충은 혈중 호모시스테인 수준을 감소시키고 손상된 methylation의 기전을 어느 정도는 회복시키며 산화적 스트레스를 감소시켜 바람직하지 못한 임신결과를 예방하는데 기여할 것으로 사료된다.

## 요약 및 결론

본 연구에서는 임신 중에 고호모시스테인혈증이 혈장과 간의 산화적 스트레스 정도와 methylation 상태에 미치는 영향과 이에 대한 엽산 보충 효과를 혈장 호모시스테인 수준, 혈장 및 간 조직의 엽산과 지질과산화물인 TBARS 수준 그리고 간조직의 SAM/SAH 비율을 측정하여 알아보았다.

엽산결핍군의 경우에는 혈장 호모시스테인의 수준이 임신 전과 후에 모두 증가하였으며 엽산 함량도 모두 감소하였으나 엽산 보충군의 경우에는 혈중 호모시스테인 수준의 상승폭이 감소하였고 혈장과 간의 엽산함량도 대조군 수준으로 회복하였다. 간의 지질과산화물인 TBARS의 수준은 엽산결핍군의 경우에 임신 전의 경우 대조군보다 높았고 엽

산보충군도 대조군보다 유의적으로 높았으며 임신 후에는 실험 식이간에 유의적인 차이가 없었다. 또한 간의 TBARS 수준은 모든 실험식이군에서 임신 전 보다 임신 후가 높은 경향이 있었으며 대조군에서는 유의적인 차이를 보였다. 간의 SAM/SAH 비율은 엽산결핍군에서 임신 전과 후 모두 대조군보다 유의적으로 낮게 나타났으나 엽산보충군의 경우에는 임신 전이나 후 모두 대조군에 비해 유의적인 차이가 없었다. 혈장 호모시스테인 수준은 간의 엽산 수준을 감소시키는 강력한 인자로서 추정되고 고호모시스테인혈증은 remethylation에 영향을 주며 산화적 스트레스와 관련이 되었을 것이라고 사료된다.

고호모시스테인혈증 임신 쥐에서 엽산 보충은 혈장 호모시스테인 수준을 감소시켜 remethylation의 회복과 산화적 스트레스 감소에 긍정적인 영향을 주었다. 임신 중에 엽산 보충이 고호모시스테인혈증에 미치는 영향에 관한 체계적인 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## Literature cited

- 1) Brenner B, Blumenfeld Z. Thrombophilia and fetal loss. *Blood Rev* 11: 72-79, 1997
- 2) Thenen SW. Gestational and neonatal folate deficiency in rats. *Nutr Res* 11: 105-116, 1991
- 3) Achon M, Alonso-aperte E, Reyes L, Ubeda N, Varela-Moreiras G. High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. *Br J Nutr* 83: 177-183, 2000
- 4) Kim JM, Lee HY, Chang N. Effects of dietary folate supplementation on the homocystine diet-induced hyperhomocysteinemia and hepatic S-adenosylmethionine metabolism in rats. *J Kor Nutr* 36(8) : 811-818, 2003
- 5) Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res* 33: 181-194, 1996
- 6) Wouters MG, Boers GH, Bloom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, Steegers-Theunissen RP, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril* 60: 820-825, 1993
- 7) Goddijn-Wessel TA, Wouters MG, v.d. Molen EF, Spuijbroek MD, Steegers-Theunissen RP, Bloom HJ, Boers GH, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *Eur J Obstet Gynecol* 66: 23-29, 1996
- 8) Burke G, Robinson K, Refsum H, Stuart B, Drumm J, Graham I. Intrauterine growth retardation, perinatal death and maternal homocysteine levels. *N Engl J Med* 326: 69-70, 1992
- 9) Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, Monsen ALB, Ueland PM. Plasma total homocysteine, pregnancy complications and adverse pregnancy outcome: the Horland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 71: 962-968, 2000
- 10) Iyengar L, Rajalakshmi K. Effect of folic acid supplement on birth weight of infants. *Am J Obstet Gynecol* 122: 332, 1975

- 11) Trnblay GF, Matte JJ, Dufour JJ, Brisson GJ. Survival rate and development of fetuses during the first 30 days of gestation after folic acid addition to a swine diet. *J Anim Sci* 67: 724-732, 1989
- 12) Rolschau J, Kristoffersen K, Ulrich M, Grinsted P, Schaumburg E, Foged N. The influence of folic acid supplement on the outcome of pregnancies in the country of Funen in Denmark. Part I. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 87 (2): 105-110, 1999
- 13) Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromato* 422: 43-52, 1987
- 14) Tamura T. Determination of food folate. *J Nutr Biochem* 9: 285-293, 1998
- 15) Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. In: Armstrong D, Eed, Free Radicals in Diagnostic Medicine. New York: Plenum Press, pp.1-15, 1994
- 16) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95 (2): 351-358, 1979
- 17) Wang W, Kramer PM, Yang S, Pereira MA, Tao L. Reversed-phase high performance liquid chromatography procedure for the simultaneous determination of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine in mouse liver and the effect of methionine on their concentrations. *J Chromato B* 762: 59-65, 2001
- 18) Cikot RJ, Steegers-Theunissen RP, Thomas CM, de Boo TM, Merkus HM, Steegers EA. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. *Br J Nutr* 85: 19-58, 2001
- 19) Walker MC, Smith GN, Perkins SL, Keey EJ, Garner PR. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180: 660-664, 1999
- 20) Quinlivan EP, McPartlin J, Weir DG, Scott JM. Decreased serum homocysteine in pregnancy: possible role in methylation cycle regulation. *Pro Nutr Soc* pp.59-96, 2000
- 21) Smith TP, Cruz CP, Brown AT, Eidt JF, Moursi MM, Ask RL. Folate supplementation inhibits intimal hyperplasia induced by a high-homocysteine diet in a rat carotid endarterectomy model. *J Vasc Surg* 34: 474-481, 2001
- 22) Ebbesen LS, Christiansen K, Ingerslev J. Hyperhomocysteinemia due to folate deficiency is thrombogenic in rats. *J Nutr* 133: 2250-2255, 2003
- 23) Landgren F, Israelsson B, Lindgren A, Hultberg B, Andersson A, Brattstrom L. Plasma homocysteine in acute myocardial infarction: homocysteine-lowering effect of folic acid. *J Int Med* 237: 381-388, 1995
- 24) Brouwer IA, Dusseldrop M, Thomas CMG, Duran M, Hautvast JGAJ, Eskes TKAB, Steegers-Theunissen RPM. Low-dose folic acid supplementation decrease plasma homocysteine concentrations: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 69: 99-104, 1999
- 25) Achon M, Alonso-Aperte E. High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. *Br J Nutr* 83: 177-183 2000
- 26) Morris JM, Gopaul NK, Endresen MJ, Kinton EA, Dhir S, Anggard EE, et al. Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 105: 1195-1199, 1998
- 27) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 13: 341-390, 1993
- 28) Picciano MF. Is homocysteine a biomarker for identifying women at risk of complications and adverse pregnancy outcomes? *Am J Clin Nutr* 71: 857-858, 2000
- 29) Huang RF, Hsu YC, Lin HL, Yang FL. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J Nutr* 131 (1): 33-38, 2001
- 30) Fu W, Dudman NP, Perry MA, Young K, Wang XL. Interrelations between plasma homocysteine and intracellular S-adenosylhomocysteine. *Biochem Biophys Res Commun* 271 (1): 47-53, 2000
- 31) Kim YI, Pogribny IP, Basnakian AG, Miller JW, Selhub, James SJ, Masmon JB. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. *Am J Clin Nutr* 65 (1): 46-52, 1997
- 32) Henning SM, McKee RW, Swendseid ME. Hepatic content of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and glutathione in rats receiving treatments modulating methyl donor availability. *J Nutr* 119 (10): 1478-1482, 1989
- 33) Sibani S, Melnyk S, Pogribny IP, Wang W, Hio-tim F, Deng L, Trasler J, James S, Rozen R. Studies of methionine cycle intermediates (SAM, SAH), DNA methylation and the impact of folate deficiency on tumor numbers in Min mice. *Carcinogenesis* 23: 61-65, 2002
- 34) Miller JW, Nadeau MR, Smith J, Smith D, Selhub J. Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rat: disruption of S-adenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochem J* 289 (2): 415-419, 1994
- 35) Southerm F, Edit J, Drouilhet J, Mukunyadzi P, Williams DK, Cruz C, Wang YF, Poirier LA, Brown AT, Moursi MM. Increasing levels of dietary homocysteine with carotid endarterectomy produced proportionate increases in plasma homocysteine and intimal hyperplasia. *Atherosclerosis* 158 (1): 158-165, 2002