J. Toxicol. Pub. Health
Vol. 23, No. 3, pp. 279-287 (2007)

Official Journal of
Korean Society of Toxicology
Available online at http://www.toxmut.or.kr

체내 철 수준이 뇌로의 구리 이동과 분포에 미치는 영향

최재혁 · 박정덕 · 최병선
중앙대학교 의과대학 예방의학교실

The Effect of Systemic Iron Level on the Transport and Distribution of Copper to the Brain

Jae-Hyuck Choi, Jung-Duck Park and Byung-Sun Choi
Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Received September 3, 2007; Accepted September 17, 2007

Copper (Cu) is an essential trace element indispensable for brain development and function; either excess or deficiency in Cu can cause brain malfunction. While it is known that Cu and Fe homeostasis are strictly regulated in the brain, the question as to how systemic Fe status may influence brain Cu distribution was poorly understood. This study was designed to test the hypothesis that dietary Fe condition affects Cu transport into the brain, leading to an altered brain distribution of Cu. Rats were divided into 3 groups; an Fe-deficient (Fe-D) group which received an Fe-D diet (3~5 mg Fe/kg), a control group that was fed with normal diet (35 mg Fe/kg), and an Fe-overload group whose diet contained an Fe-O diet (20 g carbonyl Fe/kg). Following a 4-week treatment, the concentration of Cu/Fe in serum, CSF (cerebrospinal fluid) and brain were determined by AAS, and the uptake rates of Cu into choroids plexus (CP), CSF, brain capillary and parenchyma were determined by an *in situ* brain perfusion, followed by capillary depletion. In Fe-D and Fe-O, serum Fe level decreased by 91% ($p < 0.01$) and increased by 131% ($p < 0.01$), respectively, in comparison to controls. Fe concentrations in all brain regions tested (frontal cortex, striatum, hippocampus, mid brain, and cerebellum) were lower than those of controls in Fe-D rats ($p < 0.05$), but not changed in Fe-O rats. In Fe-D animals, serum and CSF Cu were not affected, while brain Cu levels in all tested regions (frontal cortex, striatum, hippocampus, mid brain, and cerebellum) were significantly increased ($p < 0.05$). Likewise, the unidirectional transport rate constants (K_{in}) of Cu in CP, CSF, brain capillary and parenchyma were significantly increased ($p < 0.05$) in the Fe-D rats. In contrast, with Fe-O, serum, CSF and brain Cu concentrations were significantly decreased as compared to controls ($p < 0.05$). Cu transport was no significant change of Cu transport of serum in Fe-O rats. The mRNA levels of five Cu-related transporters were not affected by Fe status except DMT1 in the CP, which was increased in Fe-D and decreased in Fe-O. Our data suggest that Cu transport into brain and ensuing brain Cu levels are regulated by systemic Fe status. Fe deficiency appears to augment Cu transport by brain barriers, leading to an accumulation of Cu in brain parenchyma.

Key words: Copper, Iron, Transport, Distribution, Brain.

서 론

구리는 필수금속으로 체내의 생리적, 생화학적 기능에 있어 중요한 역할을 담당한다(Linder and Hazegh-Azam, 1996). 구리는 Cu/Zn superoxide dismutase, cytochrome-c oxidase, tryrosinase, lysyl oxidase, ceruloplasmin, hephaestin 등과 같은 구리함유 효소(cuproenzyme)의 보조인자(cofactor)로서 뿐 아니라, 혈관형성(angiogenesis), 신경 수초화 형성(myelination)과 endorphin 작용 등에도 중요한 역할을 한다. 하지만 체내의 유리 구리 이온은 쉽게 산소와 반응하여 산화스트레스를 일으키는 hydroxyl radical을 형성하기 때문에 체내에서 그 농도가 엄격하게

Correspondence to: Byung-Sun Choi, College of Medicine, Chung-Ang University, 221 Heuksuk-dong, Dongjak-ku, Seoul 156-756, Korea
E-mail: bschoi@cau.ac.kr

조절된다(Turnlund, 1998). 따라서 Wilson's disease와 Menkes' disease 등과 같은 구리 조절 기능의 선천성 이상은 성장 및 발달과정에 중대한 문제를 야기하며, 특히 신경계통의 손상을 유발한다(Danks, 2004).

또한 Alzheimer's disease, Parkinson's disease, spongiform encephalopathies와 familial amyotrophic lateral sclerosis 같은 신경변성질환들(neurondegenerative disorders)은 체내 구리 농도의 불균형과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Hartmann and Evenson, 1992; Deibel *et al.*, 1996; Waggoner *et al.*, 1999; Strausak *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2006). Alzheimer's disease 환자에서 구리 농도가 일반 인구집단에서 보다 높은 것으로 보고되었고(Basun *et al.*, 1991; Loeffler *et al.*, 1996; Squitti *et al.*, 2002; Squitti *et al.*, 2005), 실험동물을 통한 연구에서 Cu/Zn chelator를 투여하면 Alzheimer's disease의 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 amyloid β-peptide의 축적이 현저하게 감소한다고 보고하였다(Cherny *et al.*, 2001). Bellingham *et al.*(2004)은 최근 연구에서 구리를 고갈시키면 amyloid-beta precursor protein의 유전자 발현이 감소한다고 하였고, Sparks and Schreurs(2003)는 소량의 구리를 음용수를 통하여 실험동물에게 주었을 때 β-amyloid plaque이 증가하고 학습장애가 유발된다고 보고하여, Alzheimer's disease의 병인으로서도 체내 구리의 불균형이 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 따라서 뇌 내로의 구리 이동기전에 대한 연구는 Alzheimer's disease 및 그 밖의 신경변성질환들의 원인을 규명하는데 있어 필수적이라 생각된다.

한편 철 또한 필수 금속으로 헴 단백질의 일부분으로 산소를 운반하는데 있어 중추적 역할을 하며 이외에도 DNA 합성과 전자전달 및 에너지 대사에 관여하는 것으로 알려져 있다(Aisen, 1994; Lash and Saleem, 1995). 체내의 철 수준은 다른 금속이온의 흡수 및 분포에 영향을 미쳐, 동물실험이나 역학조사에서 철 결핍이 체내 구리의 농도를 높이고, 혈중 아연의 농도를 낮추는 것으로 보고하였다(Yokoi *et al.*, 1990; Ece *et al.*, 1997; Rodriguez-Matas *et al.*, 1998). 이는 체내 철 수준의 변화로 인하여 divalent metal transporter 1(DMT1), metal transporter protein 1(MTP1)와 같은 금속이동 단백질의 발현이 변화하여 나타나는 것으로 추정되나 아직 자세한 기전은 알려져 있지 않은 실정이다(Marzullo *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2005). 또한 Collins(2006)는 아연 결핍시킨 랫트에서의 십이지장(duodenum) 및 공장(jejunum)에서 아연의 이동에 관여하는 Menkes copper ATPase(ATP7A)의 mRNA가 과발현된다고 보고하였다.

구리의 체내 이동에 대한 연구는 꾸준히 계속되고 있으며, 최근 divalent metal transporter 1(DMT1), metal transporter protein 1(MTP1) 및 copper transporter 1 (Ctr1)과 같은 금속이동 단백질(metal transporter)이 발견되면서 세포내 구리 이동에 대한 연구가 더욱 활기를 띄고 있다. 최근 간세포나 소장 세포를 이용한 연구에서 세포 내로의 구리 유입(influx)에 있어 Ctr1과 DMT1이 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다(Tennant *et al.*, 2002; Tomas and Oates, 2003). 하지만 뇌 내로의 구리 이동 기전에 대한 연구는 매우 미흡하며, DMT1, MTP1이나 Ctr1 등의 금속이동 단백질 발현과 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier)이나 혈액-뇌척수액 장벽(blood-CSF barrier)에서 구리의 이동간의 관계는 아직 잘 알려져 있지 않다.

이에 본 연구에서는 체내 철 수준에 따른 혈청, 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF) 및 뇌 조직내의 구리 농도 변화를 관찰하였고, *in situ* brain perfusion technique을 이용하여 이들 실험동물에서 혈액-뇌 장벽 및 혈액-뇌척수액 장벽을 통한 뇌 내로의 구리이동을 직접 관찰하였다. 또한 real time reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 이용하여 철이나 구리이동에 관여하는 것으로 알려진 DMT1, MTP1, Ctr1, ATP7A 및 ATP7B와 같은 금속이동 단백질의 mRNA 발현 양상을 관찰함으로써 뇌에서의 구리 이동에 있어서 철이 미치는 영향을 밝히고, 구리이동 기전에 이들 금속이동 단백질의 역할을 규명하고자 하였다.

연구 방법

실험동물 및 처치. 본 연구에 사용된 실험동물은 3주령 된 Sprague-Dawley계 수컷 랫트로, 온도 23 ± 2°C, 습도 50 ± 5%, 채광 12시간인 사육장에서 사육하였다.

실험동물은 철 결핍 식이군(Fe-D), 대조군(control), 그리고 철 과잉 식이군(Fe-O)으로 나누었으며 각 군당 16마리씩 배당하였다. 실험동물의 식이는 American Institute of Nutrition(Bieri *et al.*, 1977)의 권장량을 근거로 하여 철 결핍 식이군은 3~5 mg Fe/kg, 대조군은 35 mg Fe/kg, 철 과잉 식이군은 20 g carbonyl Fe/kg이 되도록 조절한 사료를 Dyet사로부터 구입하여 4주간 공급하였다(Table 1). 이때 물은 증류수를 공급하여 음용수로 인한 철의 공급을 방지하였다. 실험기간 동안 주당 2회씩 체중을 측정하여 체중변화를 관찰하였다.

4주 후 각 군당 실험동물 7 마리씩은 케타민(ketamine hydrochloride)으로 마취하여 뇌척수액(Cerebrospinal fluid, CSF)와 혈액을 채취하였고, 맥락얼기(choroid plexus)와 뇌를 적출하였다. 우측 뇌는 다시 이마겉질(frontal cortex),

Table 1. The formulae of Fe-D (iron deficiency), control and Fe-O (iron overload) diet for rats

	Fe-D Diet (No. 115111)	Control Diet (No. 170481)	Fe-O Diet (No. 115122)
Casein	140.0	140.0	140.0
Corn Starch	465.7	465.7	465.7
Dextrose	155.0	155.0	155.0
Sucrose	100.0	100.0	80.0
Cellulose	50.0	50.0	50.0
Soybean Oil	40.0	40.0	40.0
Salt Mic, Fe Defic.	35.0	35.0	35.0
Fe	0.003~0.005	0.035	20 (Carbonyl Fe)
Cu (Cupuric carbonate)	10.5	10.5	10.5
Vitamin Mix, AIN-93M	10.0	10.0	10.0
L-Cystine	1.8	1.8	1.8
Choline Bitartrate	2.5	2.5	2.5

선조체(striatum), 해마(hippocampus), 중뇌(midbrain), 소뇌(cerebellum)으로 분리하여 구리와 철 농도를 측정하는데 사용하였고, 좌측부위는 모세혈관과 뇌 실질로 분리한 후 구리의 이동단백질의 발현의 변화를 살펴보기 위하여 real time RT-PCR를 하는데 사용하기 위하여 -80°C로 냉동 보관하였다.

4주 후 각 군당 실험동물 9 마리씩은 케타민으로 마취한 후 *in situ* brain perfusion을 시행하여 체내 철 수준에 따른 구리의 뇌로의 이동을 살펴보았다.

실험동물의 혈청 철 상태 평가. 혈청 철, unsaturated iron binding capacity(UIBC), 총 철결합능(total iron binding capacity; TIBC)와 트랜스페린 포화도(transferrin saturation)를 측정하여 철 결핍 및 과잉공급에 따른 체내 철 상태를 평가하였다. 혈청 내 총 철과 UIBC는 Pointe Scientific사의 Iron/TIBC Reagent Set를 이용하여 정량하였다. TIBC는 정량한 혈청 총 철과 UIBC를 합하여 계산하였고, transferrin saturation(%)은 혈청 총 철량을 TIBC로 나누어 백분율로 표시하였다.

구리와 아연 정량. 실험동물의 혈청, 뇌척수액 및 뇌 조직 부위별 구리와 철은 원자흡광분광광도계 (SpectrAA, Varian, Inc.)를 이용하여 flameless 방법으로 정량하였다. 모든 시료는 유해금속용 농질산을 첨가한 후 초단파회화기(MARS, CEM)을 이용하여 습식회화한 후 증류수로 희석하여 분석하였다.

In situ brain perfusion. *In situ* brain perfusion 방법은 Takasato *et al.*(1984)과 Smith(1996)의 방법을 다소 수정하여 사용하였다. 즉, 랫트를 케타민으로 마취하여 우측 온목 동맥(common carotid artery)을 노출시킨 후, 바깥목 동맥(external carotid artery), 날개입천장 동맥(pterygopalatine artery) 그리고 온목동맥 순으로 결찰한 후, 속목 동맥(internal carotid artery)에 폴리에틸렌 카테터(PE-10)을 삽입하여 모든 관류액이 속목 동맥을 통해 뇌내로 가도록 하였다. 관류액은 Ringer 용액(NaCl, 7.31 g/l; KCl, 0.356 g/l; $NaHCO_3$, 2.1 g/l; KH_2PO_4, 0.166 g/l; $MgSO_4 \cdot 3H_2O$, 0.213 g/l; glucose, 1.50 g/l; sodium pyruvate, 1 mmol/l; $CaCl_2$, 2.5 mmol/l; pH 7.4)에 5% CO_2와 95% O_2 가스를 지속적으로 통과시켜 산소를 포화시켜 사용하였다. 방사성 구리를 포함하지 않은 Ringer 용액의 관류속도는 연동펌프(peristaltic pump, Variable Flow, Mini Pump, VWR)를 이용하여 9.0 ml/min으로 맞추었다. 방사성 구리인 ^{64}Cu가 포함된 Ringer 용액은 실린지 펌프(syringe pump, Harvard Compact Infusion Pump, Model 975)를 이용하여 1.0 ml/min으로 맞추어 3-way valve를 이용하여 연결하여 최종 관류속도가 10 ml/min가 되도록 하였다.

30초, 60초, 120초간 관류시킨 후, 대수조(cisterna magna) 부위에서 뇌척수액을, 관류한 쪽의(ipsilateral) 가쪽 뇌실(lateral ventricle)에서 맥락얼기를 채취하였고, 관류한 쪽의 뇌는 모세혈관과 뇌 실질로 분리한 후 ^{64}Cu 방사능을 측정하는데 사용하였다.

뇌 모세혈관 분리. 뇌 모세혈관과 실질의 분리는 Deane *et al.*(2004)의 방법에 의하여 시행하였다. 즉, 뇌는 분리 즉시 무게를 측정하여 7 ml tissue grind pestle (Kontes, Vineland, NJ)에 넣은 뒤, 3배 부피의 찬 균질환 용액(homogenate buffer; HEPES, 10 g/l; NaCl, 141 g/l; KCl, 4 g/l; $MgSO_4$, 1 g/l; NaH_2PO_4, 1 g/l; $CaCl_2$, 2.5 g/l; glucose, 10 g/l; pH 7.4)을 넣어 7~8회 상하운동을 하여 균질화시킨다. 여기에 4배 부피의 30% Dextran 70 용액을 넣어 3회 상하 운동한 후 4°C에서 5,400×g의 속도로 15분간 원심분리하여 뇌 실질인 상층부와 모세혈관인 침전부를 분리하였다. 이렇게 분리한 뇌 모세혈관 분획은 광학현미경하에서 확인하였다.

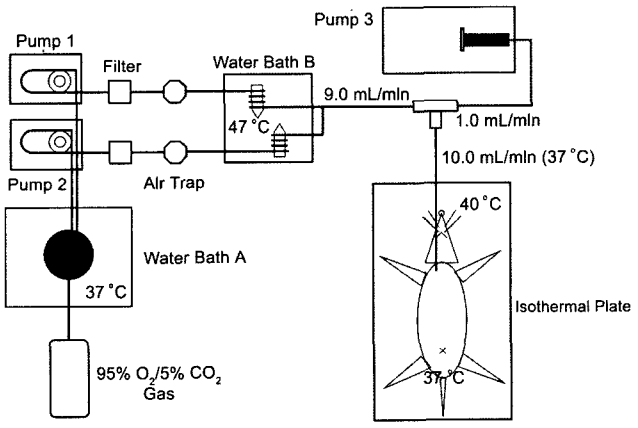

Fig. 1. Scheme of *in situ* brain perfusion technique.

방사능 측정. 뇌척수액 및 조직내 ^{64}Cu 방사능 측정은 베타 방사능 측정기(Packard Tri-Carb 2200A liquid scintillation counter)를 이용하여 측정하였다. 뇌조직은 무게를 측정한 뒤, 1 ml의 Solvable®(Packard BioScience B.V., Groningen) 용액을 넣어 55°C에서 2~3시간 정도 회화시켰다. 회화된 뇌 조직은 Hionic Fluor®(Packard BioScience B.V., Groningen) 10 ml를 첨가하여 방사능을 측정하였다.

계산. ^{64}Cu의 흡수는 volume of distribution(V_d)으로 표시하였다. V_d는 뇌척수액이나 조직에서의 방사능을 조직의 무게로 나눈 값(d.p.m./g)을 관류액의 방사능을 부피로 나눈 값(d.p.m./ml)으로 나누어 계산하였다. 일방향 흡수율 상수(unidirectional uptake rates constants), K_{in} (μl/s/g), 관류 시간에 따른 V_d값을 표시한 그림에서 직선 회귀선을 구하여 결정하였다($V_d = K_{in} T + V_i$).

금속 이동 단백질 발현 분석. 구리 이동단백질의 mRNA 수준을 정량화하기 위하여 Mx3000p(Stratagene, USA)을 이용하여 real time RT-PCR을 수행하였다. 먼저 TRIzol® Reagent(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)를 이용하여 acid guanidium-phenol-chloroform 방법으로 뇌 실질, 뇌 모세혈관 및 맥락얼기에서 총 RNA를 분리하였다. 이렇게 분리된 총 RNA로부터 GnenAmp® RNA PCR kit (ABI, USA)를 이용하여 cDNA를 생성하였다. DMT1, MTP1, Ctr1, ATP7A, ATP7B와 β-actin의 primer는 Primer Express 프로그램을 이용하여 설계하였다(Table 2). 각각의 PCR 반응은 5 μl의 cDNA, 12.5 μl의 2× Absolute QPCR SYBR Green® mix(ABgene, UK)와 primers를 200~400 nM이 되도록 혼합하여 특이적으로 증폭시켰다. 이때 각 시료의 발현 정도는 β-actin 발현 정도로 표준화하였다.

통계분석. 모든 자료는 SAS package(version 9.1)를 이용하여 분석하였다. 모든 자료에서 각 군간의 차이를 비교하기 위하여 일원 분산분석을 시행하였고, 유의한 차이를 보이는 경우에는 Duncan법에 의하여 반복비교(multiple comparison)를 하였다.

연구 결과

체중 변화. 모든 군에서 실험동물의 체중은 관찰기간 동안 지속적으로 증가되었다(Fig. 2). 철 결핍 식이를 공급받은 군(Fe-D)에서는 10일 이후부터 대조군에 비해 체중

Table 2. Primers used for real-time RT-PCR analysis

mRNA	Sequence	Position
β-actin : GenBank accession number NM_031144		
Forward primer	5'-TCCTCCTGAGCGCAAGTACTC-3'	1074~1094
Reverse primer	5'-GCTCAGTAACAGTCCGCCTAG-3'	1206~1226
DMT1 : GenBank accession number NM_013173		
Forward primer	5'-CAGTGCTCTGTACGTAACCTGTAAGC-3'	4055~4080
Reverse primer	5'-CGCAGAAGAACGAGGACCAA-3'	4146~4165
Ctr1 : GenBank accession number NM_133600		
Forward primer	5'-CTAAACGCAGGCCGAGTTTC-3'	1275~1294
Reverse primer	5'-TTGGGATGGGCAGGTTCA-3'	1342~1359
MTP1 : GenBank accession number NM_AF394785		
Forward primer	5'-CCACCTGTGCCTCCCAGAT-3'	10815~1099
Reverse primer	5'-CCCATGCCAGCCAAAAATAC-3'	1155~1174
ATP7A : GenBank accession number NM_052803		
Forward primer	5'- CCCTCAACAGCGTCGTCACT-3'	4420~4439
Reverse primer	5'- GACTAGCAGCATCCCCAAAGG-3'	4511~4530
ATP7B : GenBank accession number NM_012511		
Forward primer	5'-GCCTACAAATCGCTGAGACAC-3'	2148~2168
Reverse primer	5'-CTCCGCCTTTTCAGCTATGG-3'	2248~2267

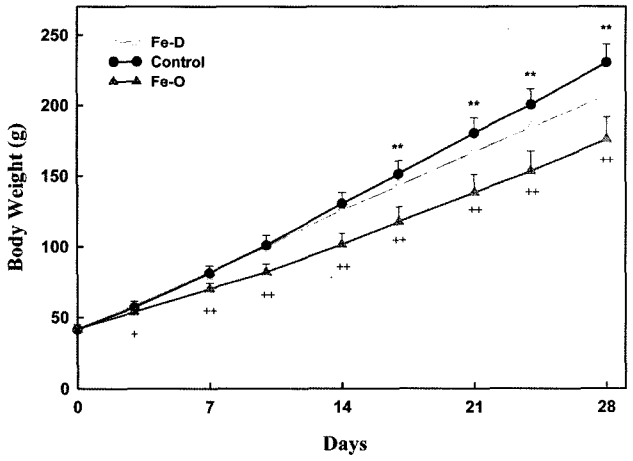

Fig. 2. The change of body weight gain in Fe-D, Control, and Fe-O diet fed rats. Data are represented as mean ± SE (n = 16).

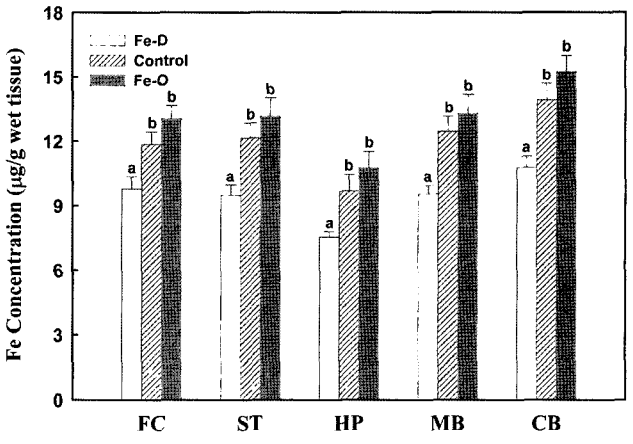

Fig. 4. Iron (Fe) concentrations of regional brain (FC: frontal cortex, ST: striatum, HP: hippocampus, MB: midbrain, CB: cerebellum) in Fe-D, Control and Fe-O rats. Data are represented as mean ± SE (n = 7) (P < 0.05).

증가가 다소 적은 것으로 나타났으며, 17일부터는 대조군에 비해 체중이 적었다($p < 0.01$). 철 과잉 식이를 공급받은 군(Fe-O)에서는 3일째부터 체중 증가가 적었으며, 체중도 3일째부터 대조군에 비해 적었고($p < 0.05$), 대조군과의 체중 격차는 시간경과에 따라 더 현저하였다.

혈청 철 수준. 철 결핍 식이를 4주간 공급받은 실험동물(Fe-D)의 혈청 총 철량은 14.8 μg/dl로 대조군의 163.3 μg/dl보다 91% 감소하였고($p < 0.01$), 총 철결합능은 801.7 μg/dl로 대조군의 585.8 μg/dl보다 37% 증가하여 ($p < 0.01$), 체내 철 결핍이 유도된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 트랜스페린 포화도는 Fe-D군에서 1.9%로 대조군의 27.7%보다 현저하게 낮았다($p < 0.01$). 철 과잉 식이를 공급받은 실험동물(Fe-O)에서는 혈청 총 철량이 377.0 μg/dl로 대조군보다 131% 증가하였고($p < 0.01$), 총 철결합능이 620.3 μg/dl로 대조군과 차이가 없었다. 트랜스페린 포화도는 Fe-O군에서 60.8%로 대조군보다 현저히 높았다($p < 0.01$).

뇌 조직내 철 농도. 뇌 조직내 철 농도는 철 결핍 식이군(Fe-D)의 경우, 5개 부위(frontal cortex, striatum, hippocampus, midbrain, cerebellum) 모두에서 대조군보다 낮았다($p < 0.05$). 하지만 철 과잉 식이를 공급받은 군(Fe-O)에서는 대조군과 차이가 나지 않았다(Fig. 4).

혈청, 뇌척수액 및 뇌 조직내 구리 농도. 혈청 구리농도는 철 결핍 식이군(Fe-D)에서 0.74 ± 0.09 μg/ml로 대조군의 0.81 ± 0.04 μg/ml과 차이가 없었으며(Fig. 5), 철

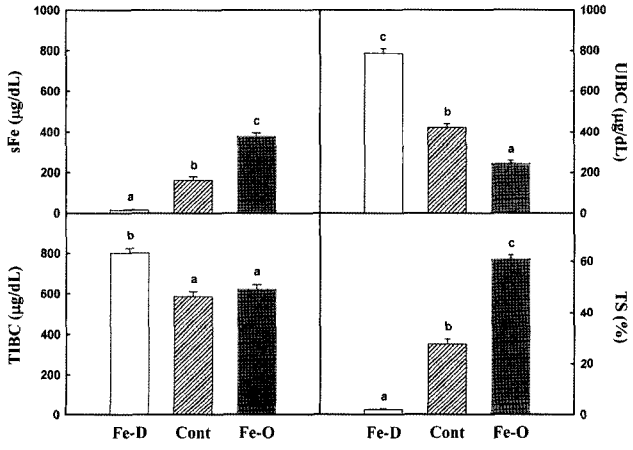

Fig. 3. Serum iron (Fe) status in Fe-D, Control and Fe-O rats. Data are represented as mean ± SE (n = 7) ($p < 0.05$).

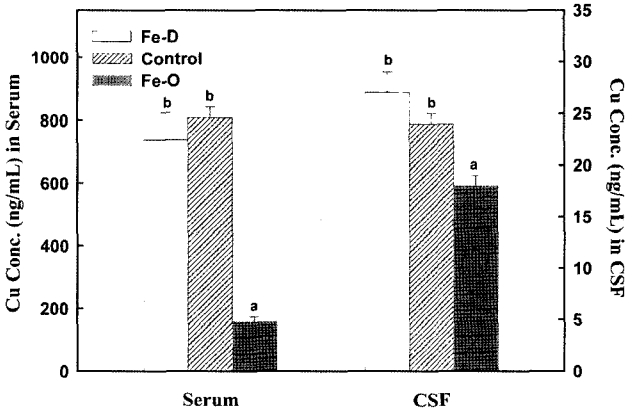

Fig. 5. Copper concentrations of serum and CSF in Fe-D, Control and Fe-O rats. Data are represented as mean ± SE (n = 7) (P < 0.05).

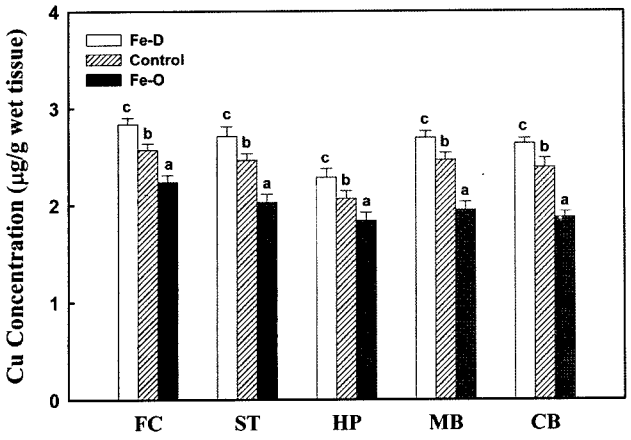

Fig. 6. Copper concentrations of regional brain (FC: frontal cortex, ST: striatum, HP: hippocampus, MB: midbrain, CB: cerebellum) in Fe-D, Control and Fe-O rats. Data are represented as mean ± SE (n = 7) (P < 0.05).

과잉 식이를 공급받은 군(Fe-O)에서는 0.16 ± 0.02 μg/ml로 대조군에 비하여 약 80% 감소하였다($p < 0.01$).

뇌척수액에서는 철 결핍 식이를 공급받은 군(Fe-D)에서 0.027 ± 0.002 μg/ml로 대조군의 0.024 ± 0.001 μg/ml과 차이가 없었으며, 철 과잉 식이군(Fe-O)에서는 0.018 ± 0.001 μg/ml로 대조군에 비하여 약 25% 감소하였다($p < 0.01$).

뇌 조직내 구리 농도는 철 결핍 식이군(Fe-D)의 경우, 5개 부위(frontal cortex, striatum, hippocampus, midbrain, cerebellum) 모두에서 대조군보다 높았고, 철 과잉 식이를 공급받은 군(Fe-O)에서는 대조군보다 낮게 나타났다(Fig. 6).

구리의 뇌 내로의 이동. *In situ* brain perfusion 방법으로 측정한 일방향 흡수율 상수(K_{in})은 맥락얼기(choroid plexus)에서 가장 높았고, 뇌 모세혈관, 뇌 실질 그리고 뇌척수액 순이었다(Fig. 7). 철 결핍 식이를 공급한 실험동물(Fe-D)은 맥락얼기, 뇌 모세혈관, 뇌실질 및 뇌척수액에서의 일방향 흡수율 상수(K_{in})이 각각 0.311, 0.061, 0.010, 0.0007 μl/s/g으로 대조군의 0.245, 0.023, 0.005, 0.0003 μl/s/g보다 높게 나타났다($p < 0.05$). 하지만 철 과잉 식이군(Fe-O)에서는 0.188, 0.025, 0.006, 0.0004 ml/s/g로 대조군과 차이가 없었다.

금속 이동 단백질의 mRNA 발현. 체내 철 수준에 따른 뇌내 금속 이동 단백질의 mRNA 발현 변화를 살펴본 결과는 Table 3과 같았다. DMT1의 경우 철 결핍 식이를 공급받은 실험동물(Fe-D)의 맥락얼기에서 대조군 보다 1.51배 높게 나타났고($p < 0.05$), 철 과잉 식이군(Fe-O)에서는 0.71배 낮게 나타났다($p < 0.05$). 하지만 다른 금속 이동 단백질에서는 철 수준에 따라 mRNA 발현의 변화는 볼 수 없었다.

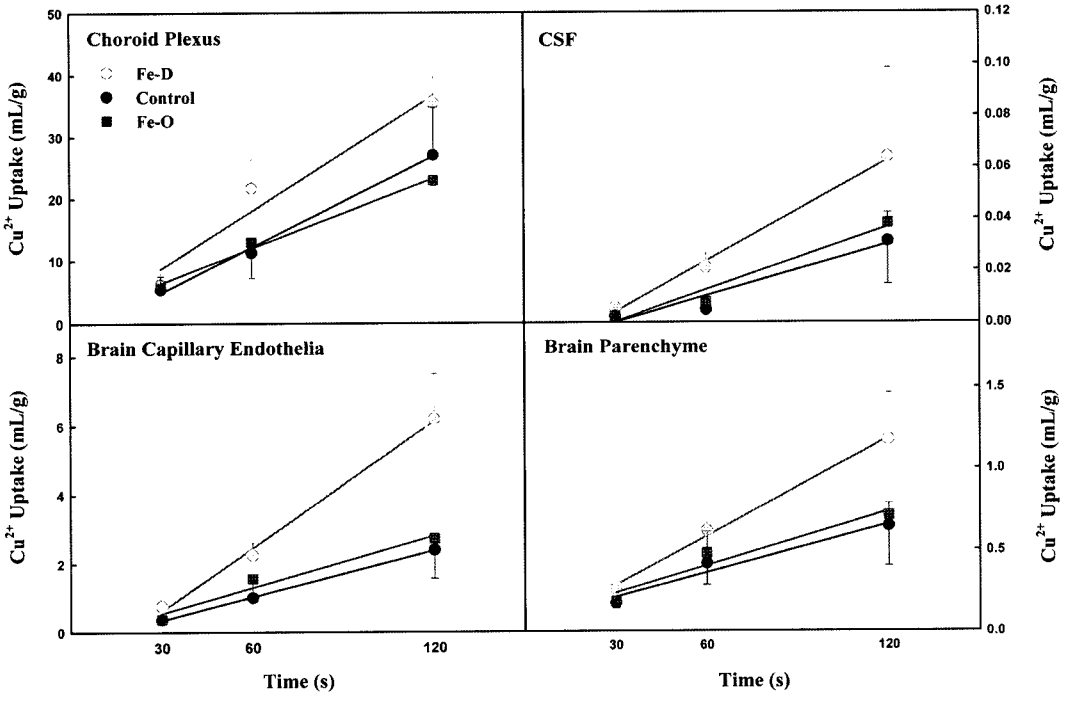

Fig. 7. Unidirectional uptake rate constants, K_{in} of free ^{64}Cu in the choroid plexus, brain capillaries, brain parenchyma and cerebrospinal fluid (CSF) ($P < 0.05$).

Table 3. Relative abundance of mRNAs encoding metal transporters in choroid plexus (CP), brain capillary endothelia (BCE), and brain parenchyma (BP)

		Fe-D	Control	Fe-O
DMT1	CP	1.51 ± 0.05*	1.00 ± 0.10	0.71 ± 0.06*
	BCE	0.96 ± 0.06	1.00 ± 0.06	0.93 ± 0.08
	BP	1.17 ± 0.14	1.00 ± 0.03	0.98 ± 0.10
MTP1	CP	0.89 ± 0.08	1.00 ± 0.24	0.85 ± 0.08
	BCE	0.52 ± 0.13	1.00 ± 0.31	1.26 ± 0.26
	BP	1.08 ± 0.22	1.00 ± 0.08	1.40 ± 0.27
Ctr1	CP	1.14 ± 0.12	1.00 ± 0.07	0.84 ± 0.06
	BCE	0.91 ± 0.04	1.00 ± 0.15	0.89 ± 0.32
	BP	1.03 ± 0.10	1.00 ± 0.05	1.08 ± 0.07
ATP7A	CP	0.99 ± 0.03	1.00 ± 0.03	0.95 ± 0.01
	BCE	0.89 ± 0.05	1.00 ± 0.11	0.94 ± 0.06
	BP	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.04	0.91 ± 0.11
ATP7B	CP	0.95 ± 0.04	1.00 ± 0.03	0.93 ± 0.01
	BCE	0.86 ± 0.08	1.00 ± 0.12	0.94 ± 0.05
	BP	1.08 ± 0.05	1.00 ± 0.05	0.92 ± 0.10

Each value represents the mean ± SE.
*Significantly different from the control, $P < 0.05$.

고 찰

체내 철 수준의 감소는 소장 상피세포에 위치한 DMT1, MTP1 등의 금속 이동 단백질 발현을 증가시켜 소화기계를 통해 구리이온의 흡수를 증가시키는 것으로 알려져 있다(Linder *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2005; Collins, 2006). 이번 연구에서 철 결핍 식이를 공급한 랫트에서는 17일째부터 체중증가가 감소하기 시작하였고, 4주 후에는 혈청내 총 철량이 대조군보다 91% 감소하고, 총 철결합능은 37% 증가하여, 트랜스페린 포화도가 93% 감소하는 등 철 결핍 소견을 보였다. 뇌조직내의 철 농도는 측정한 모든 부위에서 대조군보다 16~21% 정도 낮았다. 뇌에서 철 농도 감소 폭은 혈청에서의 감소 폭보다 매우 낮은 것을 볼 때, 뇌에서 철 농도를 유지하기 위해 혈액으로부터 뇌로의 철 흡수가 증가되는 것으로 여겨지며, 이는 Yokoi *et al.*(1990)과 Erikson *et al.*(1997)의 결과와 일치하였다.

철 결핍 식이를 공급한 집단에서 혈청과 뇌척수액의 구리농도는 대조군과 차이가 없었으나, 측정한 모든 뇌 조직에서의 구리농도는 철 결핍 식이를 공급한 집단에서 대조군보다 10~11% 높게 나타났다. Yokoi *et al.*(1991)은 철 결핍 식이를 공급하여 유발한 철 결핍 동물모형에서 혈청 구리 농도가 증가한다는 보고하였으나, Reeves *et al.*(2004)은 변화가 없다고 보고하였다. 역학조사에서도 Ece *et al.*(1997)과 Gurgoze *et al.*(2006)은 철 결핍성 빈혈에서 혈청 구리농도가 증가한다고 하였으나, Olivares *et al.*(2006)과 Van Nhien *et al.*(2006)은 변화가 없다고 하였다. 이러한 불일치는 체내 철의 결핍 정도, 철 결핍 기간 및 철 결핍 시작 연령에 따른 것으로 여겨진다.

In situ brain perfusion technique을 이용하여 구리 흡수율을 측정한 결과, 철 결핍 식이군에서 맥락얼기, 뇌척수액, 뇌 모세혈관, 뇌 실질의 K_{in}가 0.311, 0.0007, 0.061, 0.010 μl/s/g로 대조군보다 구리의 흡수가 증가하였다. 따라서 뇌 조직내에서의 구리농도 증가는 구리의 흡수율의 증가에 기인하는 것으로 생각된다. 이번 연구에서 맥락얼기에서의 구리 흡수율이 증가하였음에도 뇌척수액의 구리농도는 대조군과 차이가 나지 않았다. 일부 금속이온의 경우, 그 기전은 알려져 있지 않으나, 맥락얼기에 축적되어 주위 뇌실질이나 CSF의 농도보다 훨씬 높으며, 이는 이들 금속이온에 대한 뇌에서의 방어기전의 하나로 여겨지나(Zheng, 2001), 본 연구에서는 맥락얼기의 구리 농도를 직접 측정하지 못하였으므로, 추후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Collins *et al.*(2005, 2006)은 철 결핍을 유도한 랫트의 십이지장 및 공장에서 DMT1, Dcytb, transferrin receptor 1, heme oxygenase 1, metallothionein과 ATP7A 등의 mRNA 발현이 증가하며, 이들 금속 이동과 관련된 유전자의 발현 변화로 인해 철은 물론 구리 등 다른 금속이온에 이동이 영향을 미칠 것으로 추정하고 있다(Collins *et al.*, 2005; Collins, 2006). 하지만 이들 금속 이동 단백질은 장기마다 발현 양상이 다르며, 같은 뇌조직이라 하더라도 부위에 따라 발현 양상이 다른 것으로 알려져 있다(Erikson *et al.*, 2004). 이번 연구에서 금속 이동 단백질(DMT1, MTP1, Ctr1, ATP7A, ATP7B)의 mRNA 발현 양상을 금속이온의 뇌내 이동을 조절하는 혈액-뇌 장벽(뇌 모세혈관), 혈액-뇌척수액 장벽(맥락얼기)과 뇌 실질에서 관찰한 결과, 맥락얼기에서 DMT1의 발현이 증가하였다. 하지만 뇌 모세혈관이나 뇌 실질에서는 철 결핍이 mRNA 발현에 아무런 영향을 미치지 않았다.

철 과잉 식이를 공급한 랫트에서는 3일째부터 대조군에 비해 체중 증가가 둔화되기 시작하였다. 혈청 총 철량은 대조군보다 131% 증가하였고, 총 철결합능은 대조군과 차이가 없어 트랜스페린 포화도는 119% 증가하였다. 뇌조직내 철 농도는 대조군에 비하여 모든 부위에서 다소 증가하였으나 통계적으로 유의한 증가는 없었다. 혈청 내 철 농도는 대조군보다 131% 증가하였음에도, 뇌 조직내 철 농도는 변화가 없는 것을 볼 때 뇌로의 철 이동이 제한되어 철 농도를 엄격하게 유지하는 것을 알 수 있었다. 이는 Crowe and Morgan(1996b)이 방사성 동위원소를 이용한 철의 흡수 연구에서, 철 과잉 공급한 랫트의 철 흡수가 뇌에서는 감소하였다는 결과와 일치하였다.

철 과잉 섭취군(Fe-O)에서 혈청내 구리농도는 대조군보다 80% 가량 낮았으며, 뇌척수액 및 뇌 조직내 구리농도

는 대조군보다 11~25% 정도 낮게 나타났다. 이는 실험동물(Yu *et al.*, 1994; Crowe and Morgan, 1996a) 및 사람(Newhouse *et al.*, 1993)에서의 연구 결과와 유사하였으며, 이는 소장에서 철 흡수를 줄이기 위하여 DMT1이나 MTP1과 같은 금속 이동 단백질의 발현이 감소하기 때문인 것으로 추정된다(Martini *et al.*, 2002). 뇌 조직내의 구리 농도가 대조군보다 낮기는 하나, 혈청 구리농도에 비하면 그 감소 폭이 현저하게 작아서, 뇌 조직내 구리 농도 또한 엄격하게 조절되는 것으로 사려된다. *In situ* brain perfusion을 통한 구리의 이동에 대한 연구에서, 철 과잉 식이를 공급받은 군(Fe-O)에서의 구리 흡수율은 대조군과 차이가 없었다. 금속 이동 단백질(DMT1, MTP1, Ctr1, ATP7A, ATP7B)의 mRNA 발현은 맥락얼기에서 DMT1의 발현이 감소하였고, 뇌 모세혈관이나 뇌 실질에서는 변화가 없었다.

본 연구에서 맥락얼기에서의 구리 흡수율이 다른 부위보다 높고, 철 결핍시 증가폭이 큰 것과 맥락얼기의 DMT1 mRNA 발현이 철 결핍시에는 증가하고, 과잉시에는 감소하는 것을 볼 때, 맥락얼기가 철이나 구리의 뇌내 이동을 조절하는데 있어 중추적인 역할을 하는 것으로 생각되며, 그 기전은 DMT1과 연관이 있으리라 생각된다. 하지만 DMT1이 구리의 뇌내 이동에 직접적으로 작용하는지를 알기 위해서는 DMT1 knock-out이나 over-expression 모델을 이용한 연구가 필요하리라 생각된다. 다른 금속 이동 단백질의 발현은 차이가 없었는데, 이번 연구에서는 금속 이동 단백질의 발현 정도를 단백질 수준에서 검사하지 못하고 mRNA의 발현 정도를 측정하였으므로, post-transcription 단계에서 이들 이동 단백질 발현이 변화하는지를 확인할 수는 없었다. 또한 금속 이동 단백질의 발현 양상은 뇌의 부위에 따라 다를 수 있으므로, 추후 뇌 조직의 부위에 따른 이들 금속 이동 단백질의 발현 변화를 단백질과 mRNA 수준에서 측정하는 연구가 필요하리라 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

Aisen, P. (1994). The transferrin receptor and the release of iron from transferring. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **356**, 31-40.

Basun, H., Forssell, L.G., Wetterberg, L. and Winblad, B. (1991). Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal aging and Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.*, **3**, 231-258.

Bellingham, S.A., Lahiri, D.K., Maloney, B., La Fontaine, S., Multhaup, G. and Camakaris, J. (2004). Copper depletion down-regulates expression of the Alzheimer's disease amyloid-beta precursor protein gene. *J. Biol. Chem.*, **279**, 20378-20386.

Bieri, J.G., Stoewsand, G.S., Briggs, G.M., Phillips, R.W., Woodard, J.C. and Knapka, J.J. (1977). Report of the american institute of nurtition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, **107**, 1340-1348.

Cherny, R.A., Atwood, C.S., Xilinas, M.E., Gray, D.N., Jones, W.D., McLean, C.A., Barnham, K.J., Volitakis, I., Fraser, F.W., Kim, Y., Huang, X., Goldstein, L.E., Moir, R.D., Lim, J.T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R.E., Masters, C.L. and Bush, A.I. (2001). Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron*, **30**, 665-676.

Collins, J.F. (2006). Gene chip analyses reveal differential genetic responses to iron deficiency in rat duodenum and jejunum. *Biol. Res.*, **39**, 25-37.

Collins, J.F., Franck, C.A., Kowdley, K.V. and Ghishan, F.K. (2005). Identification of differentially expressed genes in response to dietary iron deprivation in rat duodenum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **288**, G964-G971.

Crowe, A. and Morgan, E.H. (1996a). Iron and copper interact during their uptake and deposition in the brain and other organs of developing rats exposed to dietary excess of the two metals. *J. Nutr.*, **126**, 183-194.

Crowe, A. and Morgan, E.H. (1996b). The effects of iron loading and iron deficiency on the tissue uptake of ^{64}Cu during development in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **1291**, 53-59.

Danks, D.M. (2004). Disorders of copper transport, in The metabolic and molecular basis of inherited disease (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.M. and Valle, D., Eds.). McGraw-Hill, New York, pp. 2211-2235.

Deane, R., Zheng, W. and Zlokovic, B.V. (2004). Brain capillary endothelium and choroid plexus epithelium regulate transport of transferrin-bound and free iron into the rat brain. *J. Neurochem.*, **88**, 813-820.

Deibel, M.A., Ehmann, W.D. and Markesbery, W.R. (1996). Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. *J. Neurol. Sci.*, **143**, 137-142.

Ece, A., Uyanik, B.S., Iscan, A., Ertan, P. and Yigitoglu, M.R. (1997). Increased serum copper and decreased serum zinc levels in children with iron deficiency anemia. *Biol. Trace Elem. Res.*, **59**, 31-9.

Erikson, K.M., Pinero, D.J., Connor, J.R. and Beard, J.L. (1997). Regional brain iron, ferritin and transferrin concentrations during iron deficiency and iron repletion in developing rats. *J. Nutr.*, **127**, 2030-2038.

Erikson, K.M., Syversen, T., Steinnes, E. and Aschner, M. (2004). Globus pallidus: a target brain region for divalent metal accumulation associated with dietary iron deficiency. *J. Nutr. Biochem.*, **15**, 335-341.

Gurgoze, M.K., Olcucu, A., Aygun, A.D., Taskin, E. and Kilic, M. (2006). Serum and hair levels of zinc, selenium, iron,

and copper in children with iron-deficiency anemia. *Biol. Trace Elem. Res.*, **111**, 23-29.

Hartmann, H.A. and Evenson, M.A. (1992). Deficiency of copper can cause neuronal degeneration. *Med. Hypotheses*, **38**, 75-85.

Lash, A. and Saleem, A. (1995). Iron metabolism and its regulation. *A Review. Ann. Clin. Lab. Sci.*, **25**, 20-30.

Linder, M.C. and Hazegh-Azam, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.*, **63**, 797S-811S.

Linder, M.C., Zerounian, N.R., Moriya, M. and Malpe, R. (2003). Iron and copper homeostasis and intestinal absorption using the Caco2 cell model. *Biometals*, **16**, 145-160.

Loeffler, D.A., LeWitt, P.A., Juneau, P.L., Sima, A.A., Nguyen, H.U., DeMaggio, A.J., Brickman, C.M., Brewer, G.J., Dick, R.D., Troyer, M.D. and Kanaley, L. (1996). Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders. *Brain Res.*, **738**, 265-274.

Martini, L.A., Tchack, L. and Wood, R.J. (2002). Iron treatment downregulates DMT1 and IREG1 mRNA expression in Caco-2 cells. *J. Nutr.*, **132**, 693-696.

Marzullo, L., Tosco, A., Capone, R., Andersen, H.S., Capasso, A. and Leone, A. (2004). Identification of dietary copper- and iron-regulated genes in rat intestine. *Gene*, **338**, 225-233.

Newhouse, I.J., Clement, D.B. and Lai, C. (1993). Effects of iron supplementation and discontinuation on serum copper, zinc, calcium, and magnesium levels in women. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **25**, 562-571.

Olivares, M., Araya, M., Pizarro, F. and Letelier, A. (2006). Erythrocyte Cu Zn superoxide dismutase activity is decreased in iron-deficiency anemia. *Biol. Trace Elem. Res.*, **112**, 213-220.

Reeves, P.G., Ralston, N.V., Idso, J.P. and Lukaski, H.C. (2004). Contrasting and cooperative effects of copper and iron deficiencies in male rats fed different concentrations of manganese and different sources of sulfur amino acids in an AIN-93G-based diet. *J. Nutr.*, **134**, 416-425.

Rodriguez-Matas, M.C., Lisbona, F., Gomez-Ayala, A.E., Lopez-Aliaga, I. and Campos, M.S. (1998). Influence of nutritional iron deficiency development on some aspects of iron, copper and zinc metabolism. *Lab. Anim.*, **32**, 298-306.

Rossi, L., Arciello, M., Capo, C. and Rotilio, G. (2006). Copper imbalance and oxidative stress in neurodegeneration. *Ital. J. Biochem.*, **55**, 212-221.

Smith, Q.R. (1996). Brain perfusion systems for studies of drug uptake and metabolism in the central nervous system. *Pharm. Biotechnol.*, **8**, 285-307.

Sparks, D.L. and Schreurs, B.G. (2003). Trace amounts of copper in water induce beta-amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11065-11069.

Squitti, R., Lupoi, D., Pasqualetti, P., Dal Forno, G., Vernieri, F., Chiovenda, P., Rossi, L., Cortesi, M., Cassetta, E. and Rossini, P.M. (2002). Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease. *Neurology*, **59**, 1153-1161.

Squitti, R., Pasqualetti, P., Dal Forno, G., Moffa, F., Cassetta, E., Lupoi, D., Vernieri, F., Rossi, L., Baldassini, M. and Rossini. P.M. (2005). Excess of serum copper not related to ceruloplasmin in Alzheimer disease. *Neurology*, **64**, 1040-1046.

Strausak, D., Mercer, J.F., Dieter, H.H., Stremmel, W. and Multhaup, G. (2001). Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res. Bull.*, **55**, 175-185.

Takasato, Y., Rapoport, S.I. and Smith, Q.R. (1984). An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am. J. Physiol.*, **247**, H484-H493.

Tennant, J., Stansfield, M., Yamaji, S., Srai, S.K. and Sharp, P. (2002). Effects of copper on the expression of metal transporters in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.*, **527**, 239-244.

Tomas, C. and Oates, P.S. (2003). Copper deficiency increases iron absorption in the rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **285**, G789-G795.

Turnlund, J.R. (1998). Human whole-body copper metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, **67**, 960S-964S.

Yu, S., West, C.E. and Beynen, A.C. (1994). Increasing intakes of iron reduce status, absorption and biliary excretion of copper in rats. *Br. J. Nutr.*, **71**, 887-895.

Yokoi, K., Kimura, M. and Itokawa, Y. (1990). Effect of dietary tin deficiency on growth and mineral status in rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, **24**, 223-231.

Yokoi, K., Kimura, M. and Itokawa, Y. (1991). Effect of dietary iron deficiency on mineral levels in tissues of rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, **29**, 257-265.

Van Nhien, N., Khan, N.C., Yabutani, T., Ninh, N.X., Kassu, A., Huong, B.T., Do, T.T., Motonaka, J. and Ota, F. (2006). Serum levels of trace elements and iron-deficiency anemia in adult Vietnamese. *Biol. Trace Elem. Res.*, **111**, 1-9.

Waggoner, D.J., Bartnikas, T.B. and Gitlin, J.D. (1999). The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol. Dis.*, **6**, 221-230.

Zheng, W. (2001). Toxicology of choroid plexus: Special reference to metal-induced neurotocities. *Microsc. Res. Tech.*, **52**, 89-103.